

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG I

Présentée à la
Faculté des Sciences de la Vie

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

DOMAINE : ASPECTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Odon THIEBEAULD

**Réinitiation de la traduction dépendante de TAV au cours de l'infection
des plantes par le virus de la mosaïque du chou-fleur :
caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle protéine cellulaire RISP**

Date de soutenance le 06 décembre 2007 devant la commission d'examen

Pr. Christophe ROBAGLIA
Pr. Eric WESTHOF
Dr. Stéphane BLANC
Dr. Franck MARTIN
Dr. Lyubov RYABOVA

Rapporteur externe
Rapporteur interne
Rapporteur externe
Examineur
Directrice de thèse

*Institut de Biologie Moléculaire des Plantes
UPR-CNRS 2357*

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le département « Virologie » à l'Institut de Biologie Moléculaire des plantes sous la direction du Docteur Lyubov Ryabova.

Aux professeurs Christophe Robaglia et Eric Westhof ainsi qu'aux docteurs Stéphane Blanc et Franck Martin.

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce mémoire, conscient du travail que cela représente.

Je tiens à remercier Mario Keller ainsi que Lyuba de m'avoir accepté au sein du laboratoire 426 et donné votre confiance pour ce premier pas dans la recherche.

A Lyuba,

Merci infiniment pour m'avoir initié au métier de chercheur, pour partager les moments de doute, de désespoir mais aussi de bonheurs (dur que ce métier là !). Ta confiance, ton enthousiasme et ton écoute de tout instant m'ont permis d'aller de l'avant. TIP, TAIIP ou RISIP... je suis perdu !

A Mario,

Guide gastronomique devant l'éternel, Héraut de l'Alsace, je te salue ! Mon cher Mario, un grand merci pour tes précieux conseils, ta vision optimiste de la vie mais surtout pour ta rigueur et ton soutien. Vive le « Beschcroft » !

A Angèle, à Gabrielle, à Grégory et à Misha,

Un grand merci pour tous les moments passés avec vous qui ont rendu ces années agréables. Beaucoup de personnes ont fait l'éloge des tartes d'Angèle, je ne la ferais donc pas... mais tout de même, qu'elles sont bonnes ! Merci Angèle pour ton aide, les discussions et ta disponibilité. Sacré Grégory, tes discussions politiques et tes compte rendus footballistiques nous manquent ! Merci beaucoup pour le grand coup de main apporté et ta bonne humeur de toujours. Merci « monsieur chocolat » pour les nombreuses discussions et ton aide précieuse.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de l'institut (en particulier, Philippe Hammann, Malek Alioua, les jardiniers ainsi que Marie-Jeanne Lejeune) qui font de l'IBM P un endroit extra pour travailler.

Enfin, comment ne pourrais-je remercier ma femme pour sa patience, son soutien et son aide de tous les jours mais qui s'est rendue compte que la biologie est une amante par trop exigeante ! Une pensée à notre fils Santiago qui m'a fait passer de courtes nuitées mais qui me le rend au centuple tous les jours !

« On ne découvre la vraie clarté qu'au bas de l'escalier, au souffle de la porte » (René Char)

Avant propos	1
Introduction	3
I.1 Mécanisme de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes	4
I.1.1 Vue générale de la traduction	4
I.1.1.1 Initiation de la traduction	4
I.1.1.2 Elongation de la traduction	5
I.1.1.3 Terminaison de la traduction	6
I.1.1.4 Recyclage des sous unités ribosomiques	7
I.1.1.5 Traduction des ARNm : formation de polysomes	8
I.1.2 Les ribosomes eucaryotiques	8
I.1.2.1 Les particules ribosomiques	9
a. Structure des ribosomes	9
b. Les sous unités ribosomiques	10
c. Contacts entre les sous unités ribosomiques	11
I.1.2.2 Biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes	12
a. Synthèse et maturation des ARNr	12
b. Maturation des particules	13
α. Clivage des précurseurs ribosomiques	13
β. Export des particules pré-60S dans le cytoplasme	14
γ. Assemblage des protéines ribosomiques	15
I.2.3 Fonction des facteurs d'initiation de la traduction (eIFs)	16
I.2.3.1 eIF1A/eIF1	16
I.2.3.2 eIF2/eIF2B	17
a. Fonction de eIF2/eIF2B dans l'initiation de la traduction	17
b. Régulation de la traduction par la phosphorylation de la sous unité α d'eIF2	18
I.2.3.3 eIF3	19
a. eIF3 empêche la formation du ribosome 80S	19
b. eIF3 stimule la formation du 43S	20
c. Le facteur eIF3 stimule la formation de 48S	21
I.2.3.4 eIF4F	22
a. eIF4A	22
b. eIF4E	23
c. eIF4G	24
I.2.3.5 eIF4B	24
I.2.3.6 eIF5	25
I.2.2.8 eIF5B	26
I.2.2.9 eIF6	27
I.2.2.10 PABP	28
I.2 Mécanismes de réinitiation de la traduction	30
I.2.1 Régulation de la traduction par un uORF	30

I.2.2 Facteurs influençant la réinitiation de la traduction après un sORF	31
I.2.3 Réinitiation de la traduction après un sORF	32
I.2.3.1 Régulation en trans par l'état phosphorylé d'eIF2 α	32
I.2.3.2 Régulation en cis par la séquence 5' UTR : le saut du ribosome.....	33
I.2.3.3 Régulation en cis par la séquence 3' UTR.....	34
I.2.4 Réinitiation de la traduction après un long ORF	35
I.2.4.1 Mécanisme de terminaison-reinitiation.....	35
a. Le virus respiratoire syncytial humain.....	35
b. Les calicivirus	36
I.2.4.2 Mécanisme de réinitiation de la traduction ou transactivation.....	37
I.2.5 Réinitiation de la traduction chez les plantes : exemple de stv1	37
I.3 Mécanismes d'expression des gènes de virus de plante	38
I.3.1 Stratégies alternatives de traduction chez les phytovirus	38
Article 1	39
I.3.2 Stratégies d'expression chez les pararétrovirus de plante (Caulimoviridae)	40
Résultats	43
II.1 Introduction : le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)	44
II.1.1 Organisation génomique du CaMV	44
II.1.2 Le cycle infectieux du CaMV	45
II.1.3 L'épissage de l'ARNm 35S	47
II.1.4 Le CaMV induit l'ARN silencing de certains transcrits hôtes	47
II.1.5 Les fonctions des différentes protéines du CaMV	48
II.1.5.1 P1 ou MP (Movement protein)	48
II.1.5.2 P2 ou ATF (aphid transmission factor)/ P3 ou VAP (Virion associated protein).....	49
II.1.5.3 P4 ou CP (capsid protein).....	50
II.1.5.4 P5 ou Pol (polymerase).....	51
II.1.5.5 P6 ou TAV (Transactivator/Viroplasmin).....	52
a. Principal composant des viroplasmes denses.....	52
b. Spécificité d'hôte et symptomatologie.....	53
c. La réplication virale	54
d. Navette nucléocytoplasmique.....	54
e. Facteur de transactivation traductionnelle.....	55
II.2 Partie I : RISP, nouveau partenaire cellulaire de TAV impliqué dans la réinitiation de la traduction	55
Article n°2	56
II.3 Partie II : La protéine cellulaire RISP est associée aux microtubules	57
II.3.1 Introduction	57
II.3.2 Résultats	60

II.3.2.1 La protéine RISP est essentielle pour le développement des feuilles apicales	60
<i>a. Obtention des plantes transgéniques</i>	60
<i>b. Phénotype des plantes exprimant l'amiRNA dirigée contre RISP</i>	61
II.3.2.2 Les microtubules, un nouveau partenaire de RISP	62
<i>a. La protéine RISP interagit directement avec la tubuline et les microtubules</i>	62
<i>b. La protéine RISP colocalise avec les microtubules in planta</i>	63
II.3.2.3 RISP, lien entre les microtubules et les ribosomes ?	64
<i>a. RISP médie l'interaction entre la sous unité 60S des ribosomes et les microtubules in vitro</i>	64
<i>b. La sous unité 60S colocalise avec les microtubules in planta</i>	65
II.3.3 Discussion	66
II.3.3.1 Phénotype des plantes d'Arabidopsis exprimant peu la protéine RISP.....	66
II.3.3.2 La protéine RISP est-elle une MAP ?.....	67
II.3.3.3 Rôle de la protéine RISP dans la localisation de la machinerie traductionnelle au niveau du cytosquelette.....	68
II.3.3.4 Rôle de la protéine RISP et des microtubules dans la traduction des transcrits du CaMV	70
Conclusions et perspectives	72
Matériel et méthodes	79
IV.1 Matériel	80
IV.1.1 Matériel végétal	80
IV.1.2 Souche virale	80
IV.1.3 Souches bactériennes	80
IV.1.3.1 Souches Escherichia coli.....	80
IV.1.3.2 Souche Agrobacterium tumefaciens	81
IV.1.4 Plasmides	81
IV.1.5 Milieux de culture	82
IV.2 Méthodes	83
IV.2.1 Techniques relatives aux plantes	83
IV.2.1.1 Transformation d'Arabidopsis par la méthode « dip floral »	83
IV.2.1.2 Croissance des plantes d'Arabidopsis.....	83
IV.2.2 Techniques relatives à la biologie cellulaire	84
IV.2.2.1 Immunomarquage des cellules de tabac BY-2	84
IV.2.2.2 Bombardement des cellules de tabac BY-2	84
<i>a. Recouvrement des billes d'or avec de l'ADN plasmidique</i>	84
<i>b. Préparation des cellules BY-2</i>	85
<i>c. Principe</i>	85
IV.2.2.3 Détection de la fluorescence.....	85
IV.2.2.4 Expression transitoire dans Nicotiana plumbaginifolia	86
<i>a. Préparation et transformation de protoplaste de Nicotiana plumbaginifolia</i>	86
<i>b. Dosage de CAT et mesure de l'activité GUS</i>	86

IV.2.3 Techniques relatives aux acides nucléiques	87
IV.2.3.1 Amplification par PCR (« Polymerase Chain Reaction »)	87
IV.2.3.2 Mutagenèse de délétion par PCR	88
IV.2.3.3 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	88
IV.2.3.4 Purification des fragments d'ADN issus de gel d'agarose	89
IV.2.3.5 Technique de clonage.....	89
a. Digestion par des enzymes de restriction.....	89
b. Déphosphorylation du plasmide	89
c. Ligation.....	89
d. Transformation et sélection	90
e. Criblage des colonies par PCR.....	90
IV.2.3.6 Génération et clonage de miRNA artificiel (amiRNA)	90
a. Dessin de l'amiRNA	90
b. Génération de l'amiRNA	91
c. Clonage de l'amiRNA et transformation des plantes	91
IV.2.4 Techniques relatives aux protéines	91
IV.2.4.1 Concentration des protéines.....	91
a. Précipitation des protéines	91
b. Cellules de concentration (« centrifugal filter devices », Amicon corporation)	92
IV.2.4.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	92
IV.2.4.3 Détection des protéines après fractionnement électrophorétique.....	93
a. Coloration des protéines	93
α. Bleu de Coomassie	93
β. Bleu colloïdal	93
b. Immunodétection de type « western blot »	93
α. Transfert des protéines sur une membrane	93
β. Fixation des anticorps.....	94
γ. Révélation de la fixation des anticorps	94
IV.2.4.4 Surexpression de protéines recombinantes dans E. coli	94
a. Expression chez E. coli.....	94
b. Purification de protéines	95
α. Purification en « batch »	95
β. Préparations de grandes quantités de protéines	96
IV.2.4.5 GST pull-down	96
IV.2.4.6 Production d'anticorps	97
IV.2.5 Techniques relatives aux ribosomes	97
IV.2.5.1 Purification des polysomes de navet	97
IV.2.5.2 Purification des ribosomes 80S	98
IV.2.5.3 Purification des sous-unités ribosomiques 60S et 40S.....	99
IV.2.5.4 Lavage des ribosomes et des sous-unités ribosomiques 60S et 40S	99
IV.2.5.5 Formation et analyse des complexes ribosomiques	100
a. A travers un gradient de saccharose	100
b. A travers un coussin de saccharose.....	100

<i>IV.2.6 Formation de complexes impliquant les microtubules</i>	<i>100</i>
<i>Bibliographie</i>	<i>102</i>
<i>Résumé pour l'école doctorale</i>	<i>121</i>

Avant-Propos

Avant-Propos

Chez les eucaryotes, les ARN messagers (ARNm) sont monocistroniques, coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. L'initiation de la traduction est coiffe-dépendante et nécessite la mise en place d'interactions complexes et dynamiques entre l'ARNm, la coiffe, les facteurs d'initiation de la traduction et les sous unités ribosomiques. La découverte d'ARNm possédant dans leur région 5' non traduite des petits ORFs indique que les ribosomes doivent dans ce cas procéder à des réinitiations de la traduction pour finalement exprimer la protéine d'intérêt. Cela est le cas des ARNm de proto-oncogènes ou de facteurs de transcription dont l'expression doit être finement régulée au niveau post-transcriptionnel car leur présence peut se révéler être toxique ou dommageable pour la cellule, voire pour l'organisme, si elles ne sont pas traduites au moment opportun. Cette stratégie de traduction d'ARNm polycistroniques diffère totalement de celle mise en œuvre pour les procaryotes où les transcrits sont traduits indépendamment grâce à l'attachement des ribosomes au niveau de la séquence Shine-Dalgarno précédant chaque cistron.

Les virus, et plus particulièrement les virus de plante, ont développé au cours de l'évolution plusieurs stratégies afin de pouvoir exprimer leurs protéines à partir d'ARNm polycistroniques : le « leaky scanning », le « readthrough », le « frameshift », le saut du ribosome et la synthèse d'ARN subgénomiques. Ces stratégies requièrent des éléments structuraux en *cis* et ne semblent pas modifier la machinerie traductionnelle de l'hôte.

Les *Caulimovirus*, dont le membre type est le virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV), ont développé la stratégie de la réinitiation de la traduction pour synthétiser l'ensemble des protéines virales à partir de leurs ARN polycistroniques. Cette stratégie extrêmement complexe et encore peu comprise consiste à exploiter la machinerie traductionnelle grâce à une protéine virale afin de repousser les limites traditionnelles de la traduction eucaryotique. Ce mécanisme semble également co-exister avec la stratégie de traduction canonique chez les eucaryotes et de ce fait, le CaMV constitue un formidable outil afin d'identifier les facteurs cellulaires requis pour la réinitiation de la traduction et d'élucider ce mécanisme.

La réinitiation de la traduction de l'ARN 35S du CaMV implique la protéine virale TAV. Afin de savoir comment TAV s'approprie la machinerie traductionnelle pour la rendre apte à

réinitier la traduction, une des approches est de connaître les protéines cellulaires interagissant avec TAV. Ainsi, la protéine TAV interagit avec la sous unité 60S grâce aux protéines L13, L18 et L24 et le facteur d'initiation de la traduction eIF3 en le stabilisant sur les ribosomes en cours d'élongation suggérant que ce facteur est essentiel pour la réinitiation. Cependant, le mécanisme moléculaire n'est pas encore complètement résolu. Le criblage d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana* chez la levure a permis d'isoler plusieurs protéines cellulaires dont la protéine désignée RISP. Cette protéine trouvée uniquement chez les végétaux n'a pas de fonction attribué à l'heure actuelle.

L'objectif de ma thèse a été de caractériser (i) le rôle de la protéine RISP dans la réinitiation de la traduction dépendante de TAV et (ii) d'identifier sa fonction cellulaire.

Pour mieux comprendre ces mécanismes de réinitiation de la traduction, un bref aperçu de la traduction des ARNm chez les eucaryotes sera présenté suivi de la description des principaux protagonistes de la réinitiation que sont les ribosomes et les facteurs d'initiation de la traduction. Les mécanismes de la traduction des ARN polycistroniques, en particulier chez les virus de plante, seront aussi abordés.

CHAPITRE I

Introduction Générale

La traduction est une étape clé dans l'expression des gènes : elle convertit l'information génétique portée par l'ARN messager en une chaîne continue d'acides aminés, formant un polypeptide ou une protéine, douée des propriétés structurale et/ou catalytique. Pour tous les organismes, les ribosomes constituent le cœur de la machinerie traductionnelle car, en plus de s'associer à l'ARNm, ils possèdent deux fonctions primordiales : ils acceptent les ARN de transfert (ARNt) qui déchiffrent le message et ils catalysent la formation des liaisons peptidiques, au fur et à mesure qu'ils se déplacent le long de l'ARNm. Ces deux fonctions ont lieu respectivement sur la petite et la grande sous unité qui représentent les deux particules ribonucléoprotéiques constituant les ribosomes. La fonction de mouvement, ou de translocation, requiert l'association des deux sous unités ribosomiques.

Cependant, les ribosomes ne peuvent initier la traduction sans la présence des nombreux facteurs cellulaires nécessaires, entre autres, pour associer les ribosomes à l'ARNm et pour sélectionner le codon initiateur. Contrairement aux procaryotes, où seuls 3 facteurs d'initiation sont requis, plus de 11 facteurs de traduction sont indispensables chez les eucaryotes suggérant une régulation de l'initiation plus complexe.

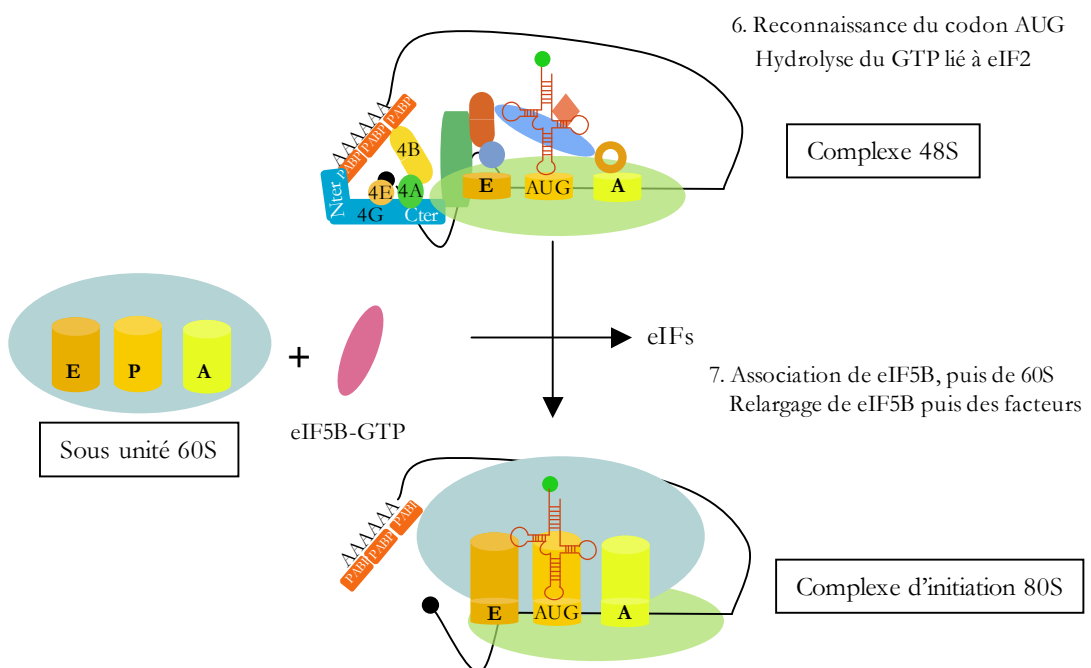
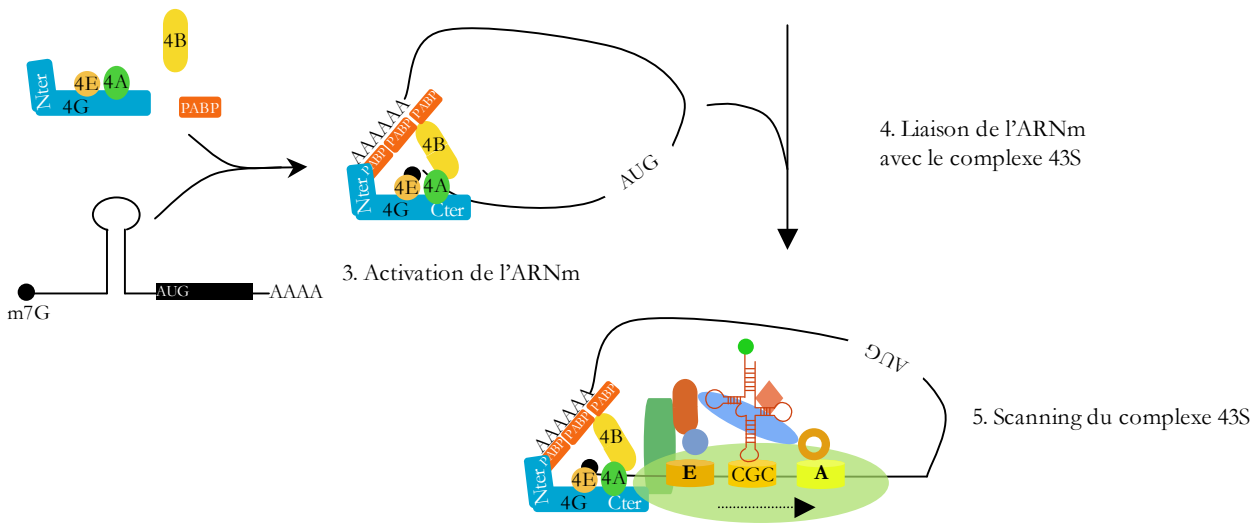
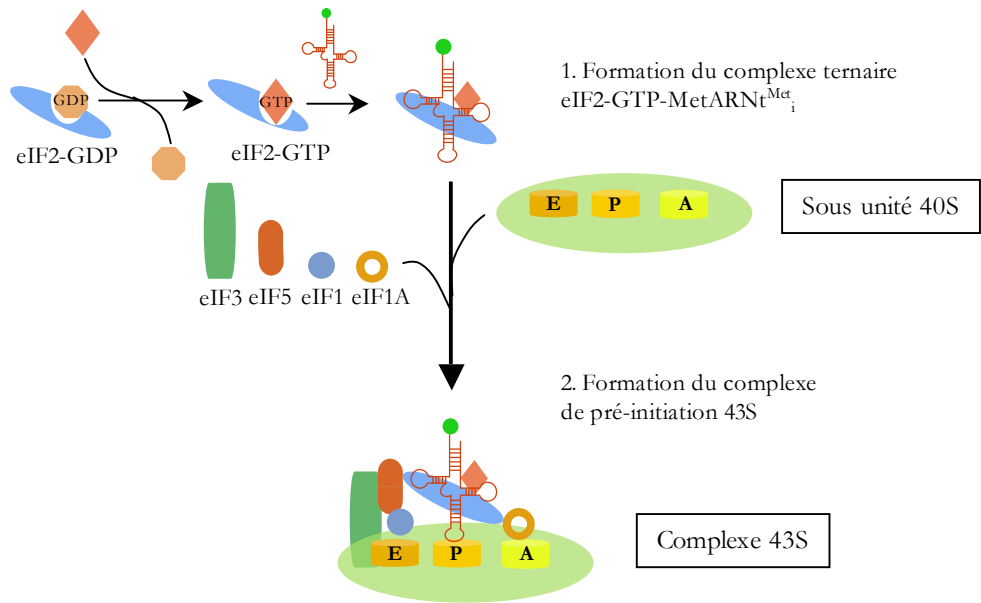
I.1 Mécanisme de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes

I.1.1 Vue générale de la traduction

I.1.1.1 Initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est l'étape permettant au ribosome d'être recruté sur l'ARNm et de reconnaître le codon initiateur AUG grâce à la présence de l'ARNt initiateur aminoacylé (MetARNt_i^{Met}). Chez les eucaryotes, elle peut être divisée en deux étapes : la formation du pré-complexe d'initiation 48S et l'association de ce dernier avec la sous unité 60S afin de former un ribosome compétent pour l'élongation de la traduction.

La première étape de l'initiation de la traduction débute par l'assemblage dans le cytosol du complexe ternaire eIF2-GTP-MetARNt_i^{Met} qui sera recruté par la sous unité ribosomique 40S (Figure 1). Cette liaison est favorisée par les facteurs eIFs 1, 1A, 3 et 5, formant ainsi le complexe de préinitiation 43S. Le complexe eIF4F, constitué de eIF4A, eIF4E et eIF4G,



s'associe à la coiffe en 5' de l'ARNm *via* le facteur eIF4E. Le facteur eIF4A, assisté par le facteur eIF4B, déroule les structures secondaires de la région 5' UTR de l'ARNm. La protéine de liaison de la queue polyA (PABP, PolyA binding protein) en 3' de l'ARNm interagit avec la protéine eIF4G présent sur la coiffe, permettant ainsi la circularisation de l'ARNm. Le facteur eIF4F, conjointement à eIF3 et à PABP, favorise l'association du complexe ribosomique 43S avec l'ARNm au niveau de la coiffe. Le complexe 43S commence alors à parcourir l'ARNm dans la direction 5' → 3' (scanning du ribosome) jusqu'à ce que l'anticodon de MetARNt^{Met}_i interagisse avec un codon initiateur AUG situé dans un contexte favorable (en général le premier codon AUG rencontré). Les facteurs eIF1 et eIF1A sont impliqués dans le balayage du ribosome alors que eIF1 et eIF5 interviennent dans la reconnaissance du codon initiateur AUG. Lors de l'association du codon AUG avec le MetARNt^{Met}_i, localisé dans le site P de la sous unité ribosomique 40S, eIF2 hydrolyse la GTP, stimulé par eIF5, produisant le complexe eIF2-GDP qui détachera l'ARNt^{Met}_i du site P. Le complexe eIF5B-GTP se lie à la sous unité 40S et favorise, grâce à l'hydrolyse de son GTP, l'association des sous unités 40S et 60S afin de former le ribosome 80S, puis eIF5B-GDP se dissocie des ribosomes ayant peu d'affinité pour eux. Il est admis que les facteurs eIFs 1, 1A, 3 et 5 se détachent eux aussi à ce moment, laissant ainsi un ribosome 80S prêt à entrer dans la phase d'élongation de la traduction. Le facteur eIF2-GDP est recyclé en eIF2-GTP par le facteur d'échange nucléotidique eIF2B afin de reformer un complexe ternaire qui pourra être utilisé par la sous unité 40S du ribosome pour un prochain cycle d'initiation de la traduction.

1.1.1.2 Elongation de la traduction

L'étape d'élongation est très conservée parmi les eucaryotes, les bactéries et les archéobactéries (Ramakrishnan, 2002), à l'inverse de celles impliquées dans l'initiation et la terminaison de la traduction.

Figure 1 : Modèle simplifié du mécanisme d'initiation de la traduction eucaryotique, dépendante de la coiffe.

eIF2-GTP-MetARNt^{Met}_i, eIFs 1, 1A, 3, 5 et la sous unité 40S forment le complexe 43S qui se lie à la coiffe en 5' de l'ARNm. Ce complexe balaye le messenger jusqu'au codon initiateur permettant au MetARNt^{Met}_i d'établir une interaction codon-anticodon formant ainsi le complexe 48S. eIF5 induit l'hydrolyse du GTP associé à eIF2 et eIF5B permet d'une part, la liaison de la sous unité 60S au 40S et d'autre part, la dissociation des autres facteurs, donnant ainsi naissance à un ribosome 80S prêt à procéder à l'élongation de la traduction.

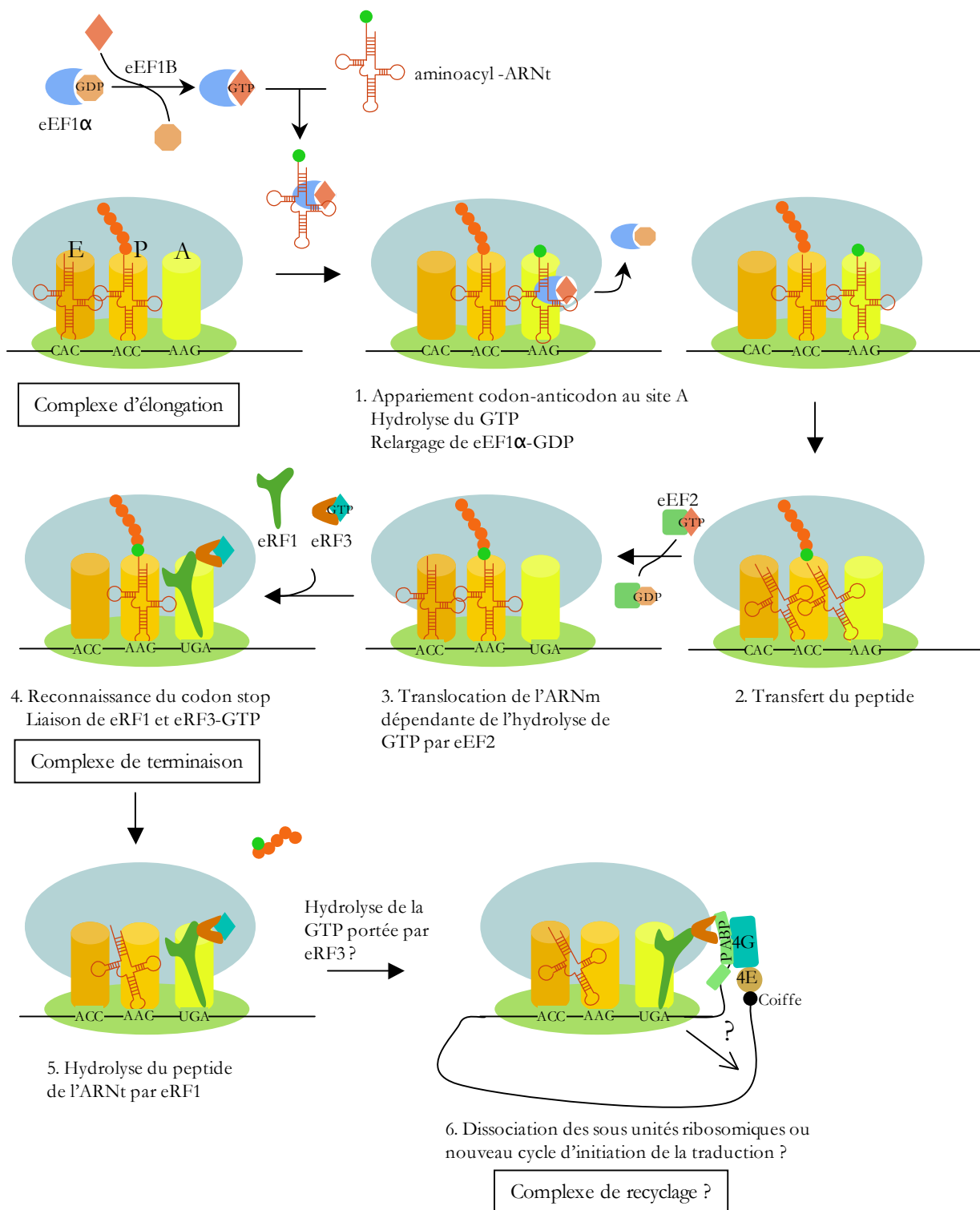


Figure 2 : Modèle des étapes d'élongation, de terminaison et du recyclage des ribosomes lors de la traduction eucaryotique.

Le cycle d'élongation consiste en trois étapes principales : la liaison de l'ARNt aminoacyl dépendant de l'appariement codon-anticodon (1), le transfert du peptide sur l' aminoacyl-ARNt (2) et la translocation de l'ARNm vers l'extrémité 5' (3). Ce cycle se répète jusqu'à la présence du codon stop (ici UGA) dans le site A induisant la terminaison de la traduction médiée par le complexe eRF1-eRF3-GTP (4) et libérant le polypeptide du ribosome (5). A cette étape, les sous unités ribosomiques se dissocient de l'ARNm ou pourraient être recyclées afin d'amorcer une nouvelle initiation de la traduction facilitée par la circularisation de l'ARNm et l'interaction entre eRF3 et eIF4G *via* PABP (6).

L'élongation de la chaîne peptidique débute lorsque l'ARNt aminoacyl est présent dans le site P de la sous unité 60S, à côté du site A vacant (Figure 2). Un ARNt aminoacylé, associé au facteur d'élongation eEF1 α et à une molécule de GTP, est apporté au site A du ribosome ; seule une interaction parfaite du codon et de l'anticodon active l'activité GTPase de eEF1 α (Pape *et al.*, 1998). Après le dépôt de l'ARNt aminoacyl dans le site A, l'activité peptidyl transférase du ribosome catalyse la formation d'un pont peptidique entre le nouvel acide aminé et l'ARNt peptidyl (Moore et Steitz, 2003). Un état intermédiaire s'ensuit où l'extrémité accepteur de l'ARNt déacylé se retrouve dans le site d'exit E alors que son extrémité anticodon est dans le site P. De même, l'extrémité accepteur du peptidyl ARNt est localisée dans le site P alors que son anticodon est situé dans le site A (Green et Noller, 1997). Le facteur d'élongation eEF2, en hydrolysant le GTP, facilite la translocation du ribosome en déplaçant l'ARNm de trois nucléotides ce qui permet au nouveau codon d'être placé dans le site A, au peptidyl ARNt dans le site P et à l'ARNt déacylé, dans le site E. Ce cycle est répété au moment où le codon stop de l'ARNm est présent dans le site A ce qui déclenche le processus de terminaison de la traduction. Après l'hydrolyse du GTP, le complexe eEF1 α -GDP est relargué puis recyclé en eEF1 α -GTP grâce au facteur eEF1B, composé d'eEF1B α et d'eEF1B β , afin de participer à d'autres cycles d'élongation peptidique.

1.1.1.3 Terminaison de la traduction

La présence d'un codon stop dans le site A induit l'hydrolyse de la liaison ester liant la chaîne polypeptidique à l'ARNt présent dans le site P, libérant ainsi le polypeptide du ribosome (Figure 2). Le centre de transfert du peptidyl du ribosome semble être requis pour catalyser la réaction d'hydrolyse, en réponse à l'activité des facteurs de relargage de classe 1 (RF1, release factor classe 1).

Contrairement aux procaryotes, un seul facteur de relargage de classe 1 est présent chez les eucaryotes (eRF1) et induit, conjointement avec le centre du transfert du peptide, l'hydrolyse du peptidyl ARNt quelle que soit la nature du codon stop UAA, UAG et UGA. La fonction de la classe 2 des facteurs de relargage (eRF3 chez les eucaryotes) n'est pas bien comprise ; cependant eRF3 interagit avec le GTP et possède une activité GTPase. Ce facteur forme un complexe avec eRF1 et le GTP, l'ensemble représentant le complexe fonctionnel requis pour la terminaison de la traduction.

1.1.1.4 Recyclage des sous unités ribosomiques

La dernière étape de la traduction est le recyclage des sous unités ribosomiques qui pourront être réutilisées pour un autre cycle d'initiation de la traduction. A l'inverse des eucaryotes, le mécanisme de recyclage a été relativement bien décrit chez les bactéries.

A la fin de la terminaison, le ribosome 50S est attaché à l'ARNm avec un ARNt déacylé positionné dans un état hybride P/E qui est reconnu, chez la bactérie, par le facteur de relargage des ribosomes (RRF, ribosome release factor). Ce dernier se lie au site A vacant et, assisté des facteurs d'initiation de la traduction IF3 et du facteur d'élongation (EF-G-GTP), dissocie le complexe de post-terminaison (Karimi *et al.*, 1999). Bien que le rôle exact de ces facteurs ne soit pas connu, RRF et EF-G doivent probablement altérer la structure du ribosome en déstabilisant les interactions engagées par l'ARNt et l'ARNm avec le ribosome ainsi que l'association entre les sous unités 30S et 50S. Par la suite, IF3 s'associe au ribosome et facilite la dissociation complète des sous unités et le relargage de l'ARNt et du messenger (Karimi *et al.*, 1999).

Un homologue du facteur RRF semble être absent chez les eucaryotes mais il s'avère que certains facteurs d'initiation, eIF3 associé à eIF1A et au complexe ternaire (Kolupaeva *et al.*, 2005) et, eIF6 (Ceci *et al.*, 2003), ont *in vitro*, des activités qui empêchent l'association des deux sous unités du ribosome. Ces facteurs pourraient être importants pour le recyclage des ribosomes ou pour prévenir une association prématurée de leurs sous unités. Selon le modèle de « boucle fermée » des ARNm eucaryotiques, une hypothèse suggère que la sous unité 40S n'est pas relarguée dans le cytoplasme mais qu'elle poursuit sa migration à travers la queue polyA vers l'extrémité 5' de l'ARNm, aidée en cela par les facteurs associés aux extrémités 5' et 3' du messenger (Uchida *et al.*, 2002) (Figure 2.6). Ainsi, la circularisation de l'ARNm favoriserait le recyclage de la sous unité 40S pour réinitier la traduction au niveau du même ARNm. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'eRF3 interagit avec la protéine PABP connectant ainsi l'appareil de terminaison à la queue polyA (Hoshino *et al.*, 1999). De plus, en absence de cette interaction, la traduction est inhibée alors que l'addition d'eRF3 dans un système de traduction *in vitro* stimule l'initiation de la traduction (Uchida *et al.*, 2002).

I.1.1.5 Traduction des ARNm : formation de polysomes

Au cours de la traduction, les ribosomes se déplacent de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' du messager permettant à d'autres ribosomes de s'associer à l'extrémité 5'. Plusieurs ribosomes peuvent donc traduire simultanément un ARNm et synthétiser la même chaîne polypeptidique bien qu'à un moment donné, ils soient chacun à une étape différente de la traduction. L'ARNm décoré de ribosomes en cours de traduction est appelé polysome. En effet, des observations en microscopie électronique ont montré que les ribosomes ne sont pas dispersés de manière uniforme dans la cellule, mais plutôt regroupés et connectés à un ARNm. Les polysomes provenant des eucaryotes ressemblent souvent à des structures ordonnées, telles que des « billes » attachées à un fil. Par exemple, les polysomes attachés au réticulum endoplasmique ont une forme circulaire (« O-like ») ou de spirale (« G-like ») alors que les polysomes libres peuvent être visualisés sous forme linéaire ou de zig-zag. La signification biologique de ces différents arrangements n'est pas comprise à part pour celle de la forme circulaire qui peut être reliée au mécanisme de recyclage des ribosomes réinitiant la traduction à l'extrémité 5' (voir paragraphe I.1.1.4).

I.1.2 Les ribosomes eucaryotiques

Les ribosomes sont constitués de deux sous unités qui sont composées d'un ou de plusieurs ARN ribosomiques (ARNr) et de diverses protéines, dont certaines sont assemblées sur les ARNr, chacune reconnaissant un site de liaison spécifique. Les principales fonctions du ribosome, à savoir la liaison des ARNt et à l'ARNm et le transfert du peptide, prennent place dans la cavité formée par l'association des deux sous unités (revue, Spirin, 2002).

La quantité des ribosomes dans la cellule varie considérablement selon l'activité traductionnelle de la cellule. La plupart des ribosomes sont retrouvés dans le cytoplasme, soit attachés à la membrane du réticulum endoplasmique afin de permettre la traduction des ARNm codant pour des protéines sécrétées, soit libres dans le cytoplasme afin de synthétiser les protéines de « ménage ». Des ribosomes sont également trouvés dans le nucléole, leur lieu de biosynthèse, mais ils ne seraient pas actifs du point de vue traductionnel.

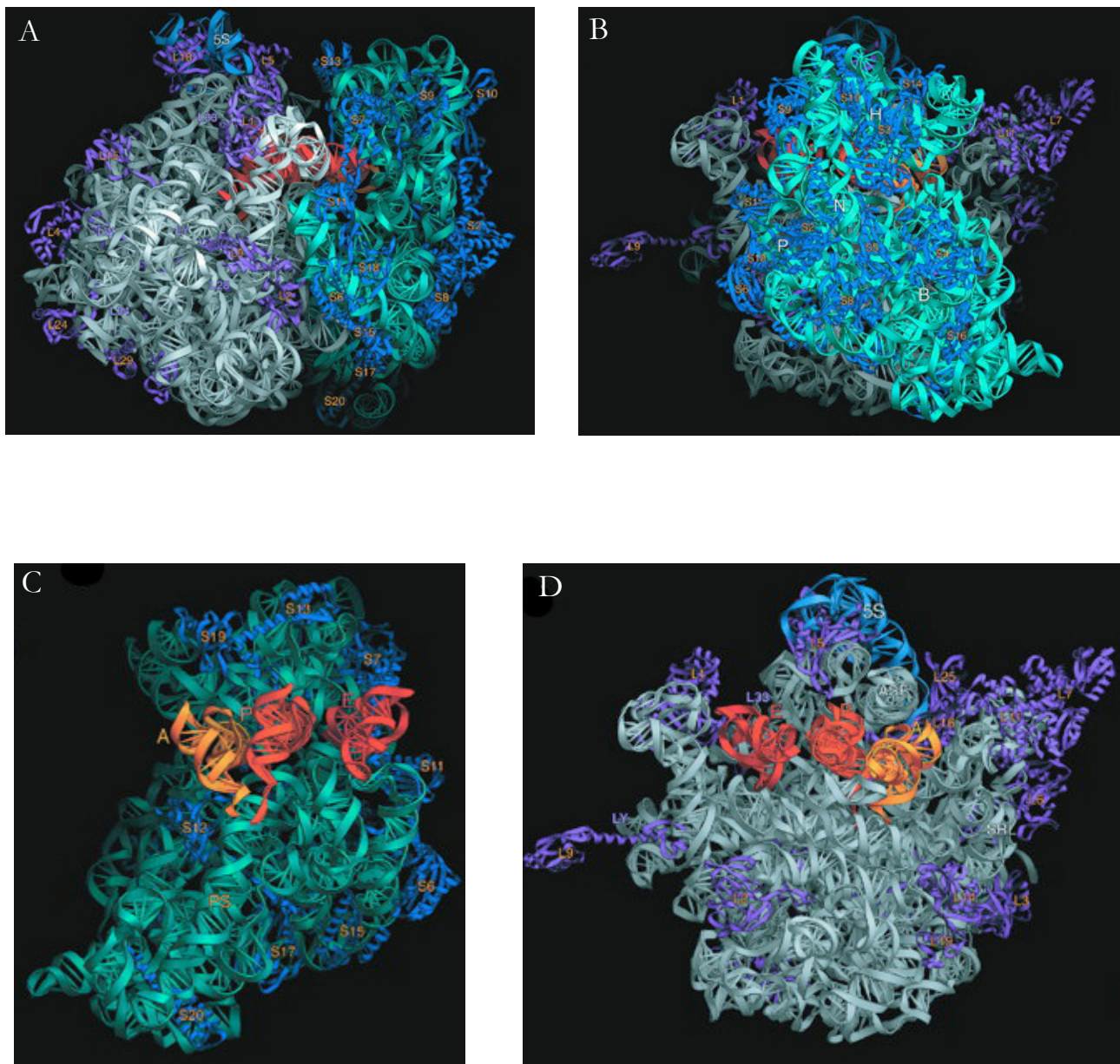


Figure 3 : Représentation de la structure cristallographique (résolution 5,5 Å) du ribosome procaryotique 70S de *Thermus thermophilus* et de la petite (30S) et grande sous unité (50S).

(A) et (B) sont des vues successives du ribosome 70S suivant une rotation de 90° autour de l'axe vertical. La sous unité 30S est vue de dos (B) ; la localisation de la tête H, du corps B, du cou N et de la plateforme P est indiquée.

Vues de l'interface de la sous unités 30S (C), rotation de 180° par rapport à l'image présentée en (B) et du ribosome 70S (D), rotation de 90° par rapport à l'image (A).

Les différents composants sont colorés: ARNr 16S : turquoise ; ARNr 23S : gris ; ARNr 5S : bleu clair (5S) ; protéines de la sous unité 30S : bleu foncé ; protéines de la sous unité 50S : violet.

Les ARNr associés aux sites A, P, et E sont indiqués respectivement en jaune, orange et rouge et sont présents dans la cavité formée par l'interface des deux sous unités (A) et (B).

I.1.2.1 Les particules ribosomiques

L'analyse comparative des ARNr et des protéines ribosomiques laisse penser que les ribosomes de différents règnes ont évolué à partir d'une même particule ribonucléoprotéique ancestrale (Wool *et al.*, 1995). Bien que les ribosomes eucaryotiques 80S soient plus grands et complexes que leurs homologues procaryotiques 70S, ils présentent plusieurs similitudes au niveau de la cavité résultant de l'association des deux sous unités, ce qui suggère que le mécanisme de la traduction ait été conservé au cours de l'évolution (Wilson et Noller, 1998).

a. Structure des ribosomes

La morphologie des ribosomes 70S procaryotiques est quasi-universelle (seuls les ribosomes des archéobactéries présentent certaines différences), alors que les ribosomes 80S des eucaryotes supérieurs (animaux et plantes) et inférieurs (levures) possèdent des caractéristiques morphologiques identiques. Les ribosomes 80S sont des molécules ribonucléoprotéiques d'une masse moléculaire d'environ 4 000 kDa dont le ratio en poids ARN/protéine est de 1/1. Leur dimension linéaire est de 250 à 300 Å.

De nombreuses informations concernant la structure des ribosomes ont été obtenues chez les procaryotes. Les structures, à une résolution atomique, de la grande sous unité 50S de l'archéobactérie *Haloarcula marismortui* (Ban *et al.*, 2000) et du ribosome 70S de *Thermus thermophilus* portant l'ARNt (Yusupov *et al.*, 2001) ont pu être résolues par cristallographie aux rayons X (Figure 3). Récemment la structure atomique du ribosome 70S d'*Escherichia coli* (Schuwirth *et al.*, 2005) a permis de mettre en évidence les différentes conformations adoptées par le ribosome au cours de la synthèse protéique.

A ce jour, la structure atomique des ribosomes d'eucaryotes n'a pas encore pu être résolue. En revanche, la structure du ribosome 80S en cours de traduction chez *Saccharomyces cerevisiae* a pu être établie grâce à la microscopie électronique par cryo-fracture (cryo-EM ; cryo electron microscopy) (Figure 4) (Spahn *et al.*, 2001). La cryo-EM, associée aux données des structures atomiques des ribosomes statiques ou de ses ligands, est devenu un outil très puissant afin de déterminer la structure quasi-atomique des ribosomes (environ 15 Å) dans différents états transitionnels (association, dissociation avec différents ligands), mettant ainsi en évidence la dynamique des ribosomes.

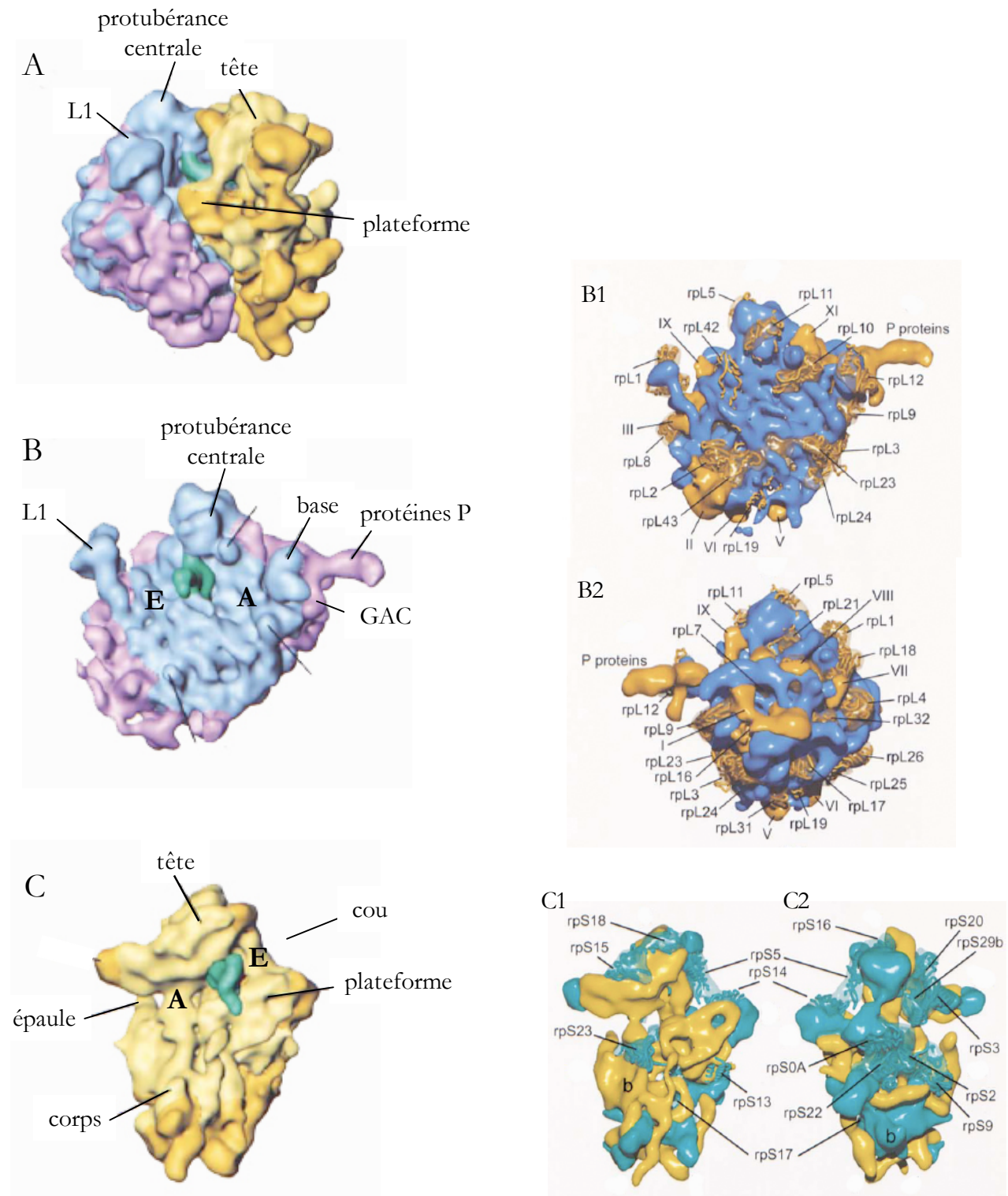


Figure 4 : Représentation de la structure du ribosome eucaryotique 80S de *Saccharomyces cerevisiae* et de la petite (40S) et grande sous unité (60S) obtenue par microscopie électronique à cryofracture (résolution 15 Å).

Le ribosome 80S (A) est montré selon le côté L1 alors que les sous unités 60S (B) et 40S (C) sont présentées selon leur interface. Les parties additionnelles des ARNr et des protéines ribosomiques trouvées chez les ribosomes eucaryotiques sont représentées en or pour la sous unité 40S (A et C) et en violet, pour la sous unité 60S (A et B). Les sites A et E sont indiqués ; l'ARNt situé sur le site P est en vert. GAC : centre d'activation de la GTPase.

La partition en ARNr et en protéines ribosomiques est représentée pour la sous unité 60S (B1 et B2) et la sous unité 40S (C1 et C2) selon la vue de l'interface (B1 et C1) et du dos (B2 et C2). Les ARNr sont en bleu et les protéines en jaune.

Cette étude a révélé d'importants degrés de conservation entre les ribosomes procaryotiques et eucaryotiques. Toutefois, il existe des différences significatives du fait de l'insertion de séquences dans les molécules d'ARNr des eucaryotes et de la présence de 20 à 30 protéines supplémentaires (Planta et Mager, 1998).

b. Les sous unités ribosomiques

La configuration générale de chaque sous unité est déterminée par la structure tridimensionnelle des ARNr. Les protéines ribosomiques sont regroupées sur les faces exposées et à la périphérie de l'interface des sous unités. Le rôle des protéines serait, entre autres, de stabiliser la structure des ARNr. Beaucoup de protéines ribosomiques ont des longues extensions basiques qui serpentent à travers les ARNr pour atteindre le cœur de la sous unité. Les protéines ribosomiques eucaryotiques sont relativement petites, leur masse moléculaire varie de 7 à 41 kDa et elles sont toutes très basiques (pHi situé entre 10 et 12), à l'exception des protéines P0, P1 et P2 qui sont de nature acide.

La sous unité 40S contient l'ARNr 18S ainsi que 32 protéines chez *A. thaliana* (Barakat *et al.*, 2001) ; elle a une masse moléculaire d'environ 1 400 kDa. La morphologie de la particule est asymétrique et présente la division classique en corps, tête et plateforme (Figure 4C) (Verschoor *et al.*, 1998 ; Dube *et al.*, 1998) de la sous unité procaryotique 30S. Cependant, la superposition des sous unités 40S et 30S est difficile à cause de la présence de régions supplémentaires chez la sous unité 40S des ribosomes eucaryotiques (Spahn *et al.*, 2001).

La sous unité 60S est constituée des ARNr 25S, 5,8S et 5S et de 48 protéines chez *A. thaliana* (Barakat *et al.*, 2001), l'ensemble ayant une masse moléculaire d'environ 2 800 kDa. La grande sous unité des eucaryotes (60S) et des procaryotes (50S) est assez similaire avec notamment l'existence de trois protubérances (Figure 4B). La protubérance L7/L12 de la sous unité 50S, constituée des protéines L7 et L12 et qui peut être assimilée à celle formée par les protéines acides P0/P1/P2 de la sous unité 60S. Une autre protubérance latérale, symétrique à celle formée par P0, P1 et P2, résulte de la liaison de la protéine L1 à l'ARNr 25S. La troisième protubérance est dite centrale car elle est située entre les deux autres. Lors de l'association des deux sous unités pour constituer le ribosome 80S, la « tête » de la particule 40S s'associe avec la protubérance centrale de la sous unité 60S formant ainsi une cavité de taille suffisante pour le passage d'un ARNt (Figure 4A).

Le ribosome possède deux sites distincts et adjacents liant les ARNt, les sites A et P, et un site de relargage des ARNt, le site E, qui sont occupés au cours des différentes étapes de l'élongation de la traduction (paragraphe I.1.1.2). Les sites de liaison des ARNt occupent une place importante sur les deux sous unités ribosomiques. La boucle anticodon de l'ARNt s'apparie avec le codon de l'ARNm au niveau du site P de la sous unité 40S ; ce dernier est situé entre la tête, la plateforme et le corps de la particule 40S (Figures 4B et 4C) impliquant des interactions avec l'ARN 18S et certaines protéines ribosomiques (Spahn *et al.*, 2001). Le bras accepteur de l'acide aminé de l'ARNt est localisé sur la grande sous unité au niveau de la protubérance centrale. Le site A est situé à gauche de la base de la protubérance P qui, par sa flexibilité, adapte sa conformation aux facteurs qui sont liés à sa base et lors de l'entrée des ARNt (revue, Gonzalo et Reboud, 2003). Le site E, situé à droite de la base de la protubérance L1 montre aussi une grande flexibilité lors de l'élongation (Figure 4B) (Nikulin *et al.*, 2003).

L'interaction entre le ribosome et l'ARNm a été très bien étudiée chez les procaryotes (Yusupov *et al.*, 2001 ; Yusupova *et al.*, 2006) alors qu'il existe moins de données concernant celle qui a lieu chez les eucaryotes. La structure récente obtenue en microscopie électronique des ribosomes associés à l'IRES (internal ribosome entry site) de l'ARN du virus de la paralysie du criquet (Schüler *et al.*, 2006) apporte des données concernant l'association d'une molécule d'ARN avec le ribosome. L'IRES est présent dans la cavité formée par les deux sous unités ribosomiques. L'ARN se lie à la partie inférieure de la tête (le cou) de la sous unité 40S au niveau des sites E, P et A établissant ainsi des contacts avec l'ARNr 18S et la protéine S5. Trois contacts s'établissent entre l'ARN et la sous unité 60S, au niveau de la protubérance L1, la protubérance centrale *via* entre autres la protéine L11, et l'hélice 69 de l'ARNr 25S.

c. Contacts entre les sous unités ribosomiques

La synthèse protéique implique une communication entre la petite et la grande sous unité du ribosome par le biais de divers contacts spécifiques.

Les travaux de Spahn *et al.* (2001) ont mis en évidence six contacts qui sont conservés chez les procaryotes et les eucaryotes démontrant ainsi leur importance ; quatre autres sites d'interaction ont été identifiés chez *S. cerevisiae*. Les contacts entre les deux sous unités ribosomiques reposent principalement sur des interactions ARN-ARN mais des interactions protéine-ARN et protéine-protéine ont été également mises en évidence. La plupart de ces

interactions relie la partie centrale de la particule 60S et les parties plateforme/corps de la particule 40S. Deux contacts connectent la tête de la particule 40S et la protubérance centrale de 60S avec notamment deux interactions entre les protéines L23 et L24 et respectivement, les hélices 14 et 44 de l'ARN 18S à l'extérieur de l'interface des deux sous unités du ribosome. En absence de L24, les sous unités 60S se lient inefficacement aux complexes de pré-initiation 48S conduisant ainsi à leur accumulation (Baronas-Lowell et Warner, 1990).

1.1.2.2 Biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes

La biosynthèse des ribosomes constitue l'activité métabolique consommant le plus d'énergie dans la cellule. L'assemblage des ribosomes eucaryotiques est un processus complexe impliquant 4 molécules d'ARN (25S, 18S, 5,8S et 5S), plus de 75 protéines ribosomiques et l'assistance de nombreux facteurs.

La biogenèse des ribosomes eucaryotiques prend place dans le nucléole par la transcription des ADNr pour donner naissance à des pré-ARNr qui seront modifiés et associés aux protéines ribosomiques et non ribosomiques formant ainsi de larges complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Ces derniers sont rapidement convertis en précurseurs des sous unités ribosomiques 40S et 60S. En parallèle, des digestions endo- et exonucléotidiques permettent de maturer les pré-ARNr en ARNr constituant les sous unités 60S (5,8S, 25S et 5S) et 40S (18S). Les pré-40S et pré-60S seront par la suite exportés séparément vers le cytoplasme où s'achevera leur formation (revue, Venema et Tollervey, 1999). Cependant, dans la plupart des organismes eucaryotiques, à l'exception notable de *S. cerevisiae*, les gènes codant l'ARN 5S sont localisés en dehors du nucléole (Warner, 1989) et transcrits par l'ARN polymérase III. Les molécules d'ARN 5S sont stockés dans le cytoplasme pour finalement être associées aux précurseurs de 60S après leur importation dans le noyau. En résumé, la biogenèse des ribosomes eucaryotiques requiert la coordination de différentes étapes de maturation et d'assemblage ainsi qu'un contrôle spatio-temporel de ces étapes (Revue Fromont-Racine *et al.*, 2003).

a. Synthèse et maturation des ARNr

Les ARN ribosomiques sont codés par 100 à 200 copies d'unités d'ADNr dont la longueur varie de 9,1 kb chez *S. cerevisiae* à 43 kb chez l'homme (Figure 5A). La synthèse du

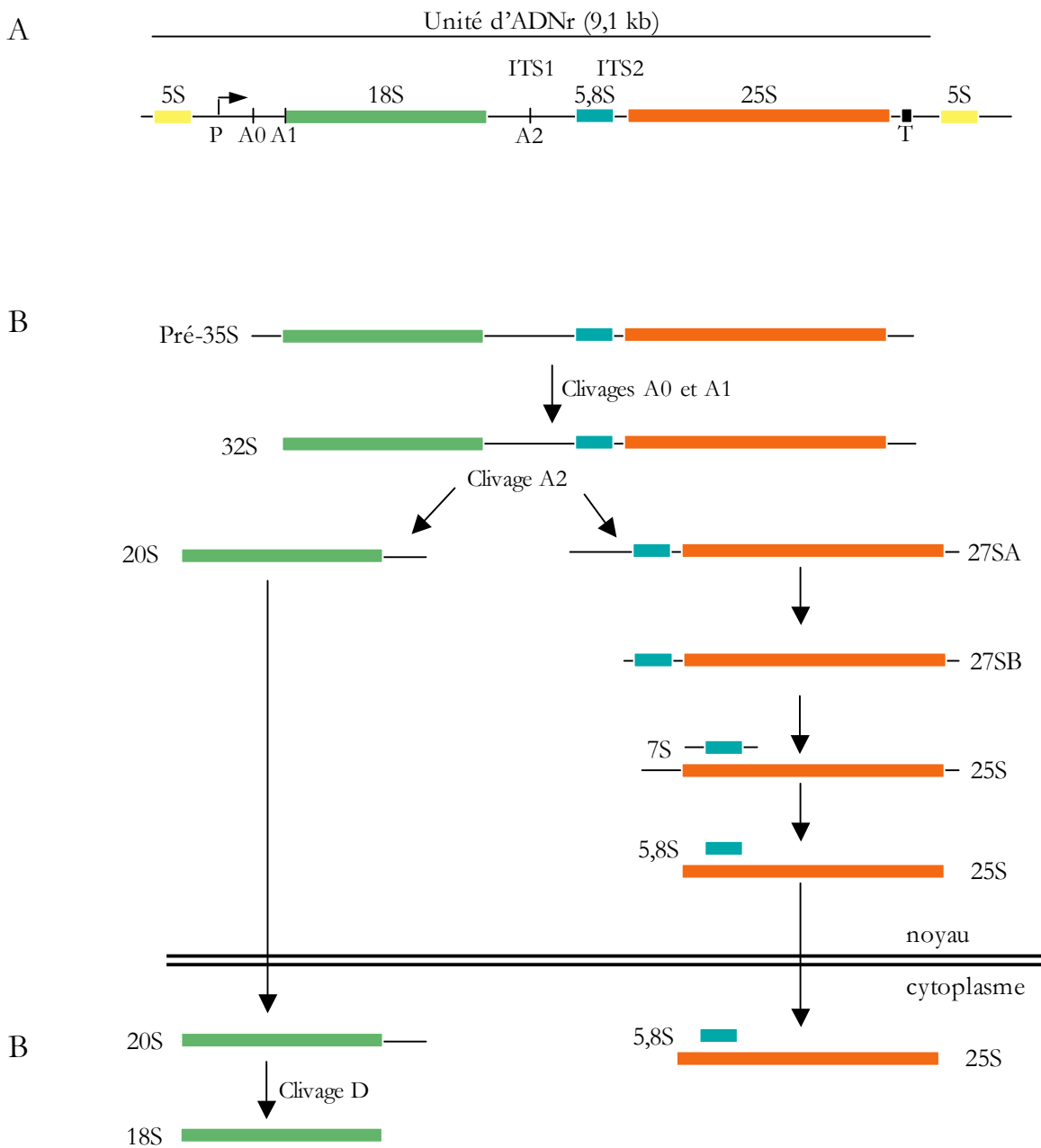


Figure 5 : Structure et maturation du pré-ARNr chez *Saccharomyces cerevisiae*.

A. L'unité d'ADNr de 9,1 kb comprend l'opéron du pré-ARNr 35S et de deux séquences non transcrites (ITS1 et 2) interrompues par le gène de l'ARNr 5,8S. La localisation du promoteur (P) et du terminateur (T) de l'opéron et les sites de clivages A0, A1 et A2 sont indiqués.

B. Plusieurs clivages successifs du pré-ARNr 35S réalisés dans le noyau génèrent les ARNr matures 5,8S et 25S qui sont par la suite, transportés dans le cytoplasme, alors que l'ARNr 20S est exporté puis mûré dans le cytoplasme pour donner naissance à l'ARNr 18S.

pré-ARNr 35S par l'ARN polymérase I est suivie par les clivages A0, A1 et A2 qui engendrent les pré-ARNr 20S et 27SA. L'ARN 20S est exporté dans le cytoplasme où il sera clivé en ARNr mature 18S (clivage D) alors que la maturation du 27SA se poursuit dans le noyau afin de générer les ARNr matures 5,8S et le 25S (Figure 5B) suivant deux voies alternatives. Certains nucléotides subissent des modifications post-transcriptionnelles, comme l'isomérisation d'uridine en pseudo-uridine ou la méthylation des 2'-hydroxyl des riboses (Maden, 1990). Globalement, ces modifications semblent être importantes pour la conformation et la stabilisation des ARNr (Ofengand, 2002). Elles sont concentrées dans les régions fonctionnelles des ARNr (Decatur et Fournier, 2002) et régulent l'activité des ribosomes lors de la traduction (Kowalak *et al.*, 1995 ; Nissen *et al.*, 2000).

Chez les eucaryotes, les modifications post-transcriptionnelles sont dues à l'activité des snoRNAs (small nucleolar RNA) qui sont associés à différentes protéines afin de former des petites RNP (Kiss, 2001). Les sites à modifier sont sélectionnés grâce à la complémentarité avec les petites régions conservées entre les snoRNAs et les ARNr (Balakin *et al.*, 1996 ; Kiss-László *et al.*, 1996).

b. Maturation des particules

L'assemblage des ribosomes eucaryotiques le mieux compris est celui qui s'opère chez la levure ; plus de 170 facteurs pré-ribosomiques agissant à différentes étapes de la maturation des ribosomes ont été identifiés chez cet organisme. Trois intermédiaires majeurs ont été mis en évidence au cours de la biogenèse : le précurseur 90S et les particules pré-40S et pré-60S qui résultent de la maturation du premier.

α. Clivage des précurseurs ribosomiques

Chez la levure, l'ARN intermédiaire 35S est détecté dans des particules pré-ribosomiques ayant un coefficient de sédimentation de 90S (Udem et Warner, 1972) et dont la composition est distincte de celle des particules pré-40S et pré-60S. Les particules 90S sont des RNP constitués de plus de 40 protéines (Grandi *et al.*, 2002) et du snoRNA U3. Le snoRNA U3 a été purifié comme faisant parti d'un large complexe (> 2MDa) contenant, entre autres, plusieurs protéines. Ce complexe, nommé « processome » (Figure 6), se lie à l'ARN 35S dans le nucléole et joue un rôle important dans la maturation des particules 90S, en permettant le clivage du pré-ARN 35S (Sharma et Tollervey, 1999) pour donner naissance aux pré-40S et pré-60S. Le

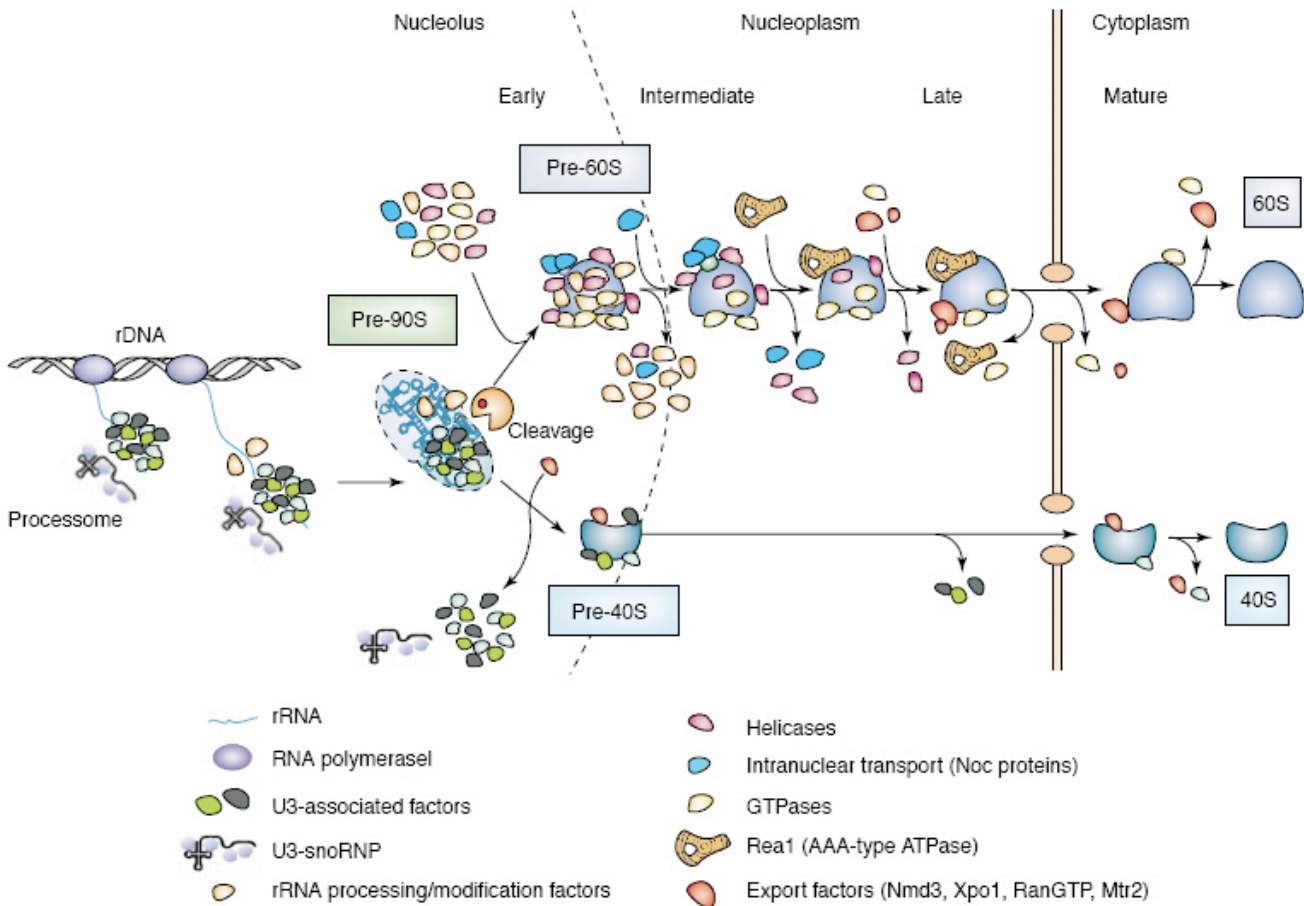


Figure 6 : Modèle de la maturation et du transport des particules ribosomiques dans le noyau et le cytoplasme. La particule ribosomique précurseur 90S, composée du pré-ARN 35S, du processome contenant le snoRNA U3 et des facteurs de maturation de la particule pré-40S, est clivée dans le nucléole au site A2 afin de donner naissance aux sous unités pré-40S et pré-60S. Alors que le processome se dissocie de la particule pré-40S, certains facteurs interagissent avec le pré-40S avant que celui-ci ne migre vers le cytoplasme selon un mécanisme encore inconnu. La maturation du pré-60S se fait principalement dans le nucléoplasme et requiert la présence de facteurs qui s'associent après et au cours du clivage A2. Les facteurs requis pour l'export du pré-60S vers le cytoplasme se lient tardivement au pré-60S dans le nucléoplasme. La maturation finale du pré-40S et du pré-60S a lieu dans le cytoplasme afin de donner naissance aux sous unités ribosomiques 40S et 60S.

snoRNA U3 intervient également dans l'assemblage des particules 40S. Il est important de noter que la particule 90S contient les facteurs impliqués dans la maturation du pré-40S, mais pas ceux nécessaires à celle du pré-60S. Ces facteurs se lient aux particules pré-60S plus tardivement, probablement après le clivage du site A2 (Grandi *et al.*, 2002).

Les particules pré-40S, contenant l'ARNr précurseur 20S, sont exportées du noyau vers le cytoplasme selon un mécanisme encore inconnue, où elles subiront les ultimes étapes de maturation afin de donner naissance à l'ARNr 18S. Les protéines impliquées dans cette étape s'associent avec les particules pré-40S dans le noyau ou dans le cytoplasme (Valasek *et al.*, 2001). La plupart des 32 protéines ribosomiques de la sous unité 40S jouent un rôle dans la biogénèse des ribosomes ; certaines sont requises lors des stades précoces et tardives de la maturation du pré-ARN 20S en pré-ARN 18S, alors que d'autres sont impliquées dans le transport intracellulaire de la particule pré-40S (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005).

La maturation des pré-60S est plus complexe que celle des pré-40S dans la mesure où les clivages de l'ARNr 27S, précurseur des ARN 25S et 5,8S, s'effectuent dans différents compartiments cellulaires (Trapman *et al.*, 1975). Il est admis que la maturation des pré-60S a lieu principalement dans le nucléole avec une étape courte et transitoire dans le nucléoplasme avant leur exportation dans le cytoplasme. Plus de 70 protéines non ribosomiques, dont plusieurs s'associent aux pré-60S dans le nucléole, sont nécessaires à la maturation des pré-60S. Après la maturation des ARNr, les particules pré-60S passent du nucléole vers le nucléoplasme. Cette migration s'accompagne d'importants changements dans la composition protéique des particules ; seuls 5 facteurs sont encore présents dans les pré-60S matures. L'ARNr 5S, après avoir été exporté dans le cytoplasme, retourne dans le noyau pour s'intégrer dans la particule pré-60S, cette association étant essentielle pour la maturation des pré-ARNs 27S en ARNr 25S et 5,8S. Les trois ARNr constituant les sous unités 60S sont produits en quantité stoechiométrique (Dechampesme *et al.*, 1999).

β. Export des particules pré-60S dans le cytoplasme

Les pré-60S sont exportées dans le cytoplasme associées, entre autres, à la protéine Nmd3 grâce à l'exportine CRM-1 (Ho *et al.*, 2000 ; Gadal *et al.*, 2001). Différents facteurs cytoplasmiques, telles que les GTPases, permettent le relargage des protéines nucléolaires associées aux 60S. Ces activités GTPasiques contrôlent le passage des sous unités 60S de la

maturation tardive à l'initiation de la traduction (Nissan *et al.*, 2002 ; Saveanu *et al.*, 2001). Un des exemples les mieux connus est celui de la protéine Tif6 (orthologue de eIF6 chez les mammifères) qui s'associe aux particules pré-60S dans le nucléole. Une des fonctions de Tif6 est d'empêcher l'association de la sous unité 40S avec la sous unité 60S pour former le ribosome 80S. Seule la GTPase cytoplasmique Eif1 permet de détacher Tif6 de la sous unité 60S et sert donc de contrôle afin de vérifier que la sous unité 60S est correctement formée avant de s'engager dans la traduction (Senger *et al.*, 2001).

γ. Assemblage des protéines ribosomiques

La synthèse des protéines ribosomiques est fortement liée à la maturation des ARNr (Venema et Tollervey, 1999). En effet, les protéines ribosomiques jouent un rôle central en stabilisant la structure des ARNr et en orchestrant les changements conformationnels des ARNr au cours de l'assemblage (Stern *et al.*, 1989). Elles sont de plus impliquées dans le transport des précurseurs ribosomiques (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005).

Les protéines ribosomiques sont synthétisées dans le cytoplasme mais la plupart d'entre elles s'associent avec les ARNr dans le noyau. L'étude de la cinétique d'assemblage des protéines ribosomiques au niveau des particules ribosomiques de levure montre qu'un certain nombre de protéines sont intégrées aux particules dans le noyau lors d'un stade tardif de la maturation alors que d'autres, comme les protéines L7, L9, L24 et L30, le sont bien plus tardivement dans le cytoplasme (Kruiswijk *et al.*, 1978). Un traitement des particules ribosomiques par un gradient de sel monovalent permet de dissocier les protéines ribosomiques par étape jusqu'à l'obtention d'un cœur qui est constitué, pour la sous unité 60S de levure, des ARNr 25S/5,8S et de 6 protéines (L4, L8, L10, L12, L16 et L25). Celles-ci sont les premières à s'associer avec les ARNr au cours de l'assemblage (El-Baradi *et al.*, 1984). Une approche identique a été suivie pour l'étude de la particule 40S humaine et a permis de montrer que les protéines S7, S10, S16 et S19 interagissent fortement avec l'ARNr 18S (Malygin *et al.*, 2000).

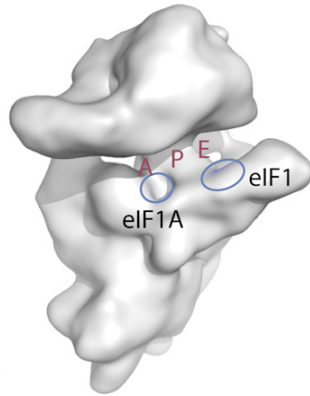


Figure 7 : Représentation de la structure de la sous unité 40S associée aux facteurs d'initiation eIF1 et eIF1A obtenue par microscopie électronique à cryofracture (résolution 25 Å).

Les sites approximatifs de liaison des facteurs d'initiation eIF1 et eIF1A à la surface de la sous unité 40S sont indiqués par un cercle bleu et les sites A, P et E sont indiqués en rouge.

Passmore et al. (2007) - Mol. Cell 26(1) : 41-50

I.2.3 Fonction des facteurs d'initiation de la traduction (eIFs)

La fonction et la structure de la plupart des facteurs d'initiation de la traduction ont été élucidées (revue, Hershey et Merrick, 2000). Cependant, les interactions protéine-protéine et protéine-ARN qui s'établissent entre les facteurs d'initiation de la traduction, l'ARNm et les ribosomes durant les différentes étapes de l'initiation de la traduction ne sont pas encore bien comprises.

I.2.3.1 eIF1A/eIF1

Les facteurs eIF1A (17-22 kDa) et eIF1 (12 kDa) sont essentiels pour l'initiation de la traduction ; ils sont très conservés chez les eucaryotes (Hershey et Merrick, 2000). Ils se lient à la sous unité 40S du ribosome avec une forte affinité et de manière coopérative (Maag et Lorsch, 2003) : eIF1A stimule l'association d'eIF1 avec la sous unité 40S (Majumdar *et al.*, 2003). Les régions C-terminales de ces deux facteurs associés au complexe ribosomique 43S sont très proches (Maag *et al.*, 2005) ; eIF1A occupe probablement le site A alors qu'eIF1 est localisé près du site P (Figure 7) (Lomakin *et al.*, 2003). Le facteur eIF1A agit en synergie avec eIF3 afin de favoriser la liaison du complexe ternaire eIF2-GTP-MetARNt^{Met}_i à la sous unité 40S (Olsen *et al.*, 2003 ; Singh *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été montré que eIF1 et eIF1A sont impliqués dans la formation du complexe 43S et dans le balayage de l'ARNm par ce complexe jusqu'au codon AUG (Pestova *et al.*, 1998). Le facteur eIF1 est essentiel pour le choix du codon d'initiation AUG car, en son absence, le complexe 48S sélectionne les codons non-AUG pour initier la traduction (Pestova et Kolupaeva, 2002). En effet, chez la levure, des mutations dans la facteur *Sui1*, qui est homologue à eIF1, provoquent une initiation de la traduction aberrante au niveau de codons autres que AUG suite à des mésappariements entre le codon et le MetARNt^{Met}_i (Yoon et Donahue, 1992). Ces mutations sont toutes situées dans le domaine très conservé d'eIF1 qui est probablement impliqué dans la sélection du codon initiateur.

Maag *et al.* (2005) ont récemment mis en évidence par spectroscopie à fluorescence, deux états conformationnels du complexe 43S, un état « fermé » qui est incompetent pour scanner l'ARNm et un état « ouvert » qui en est capable (Pestova et Kolupaeva, 2002). L'état fermé est caractérisé par une structure appelée « loquet » qui résulte de l'interaction entre les hélices 18 et 34 de l'ARN ribosomique 18S (Passmore *et al.*, 2007). Afin de comprendre

comment les facteurs eIF1 et eIF1A s'associent avec la sous unité 40S et régulent les états conformationnels de 43S, Passmore *et al.* (2007) ont déterminé la structure par microscopie électronique de la sous unité 40S complexée avec eIF1, eIF1A ou avec les deux facteurs. Seule la liaison des deux facteurs provoque un changement conformationnel de la sous unité 40S en permettant l'ouverture du loquet décrit précédemment et par conséquent la liaison de l'ARNm avec la sous unité 40S. En présence de eEF1, le facteur eIF1A augmente la processivité du complexe 43S en stabilisant l'état « ouvert » et en déstabilisant l'état « fermé » (Algire et Lorsch, 2006) afin de faciliter l'acquisition du complexe ternaire par le 40S et son scanning jusqu'au codon d'intitiation AUG. Le complexe 43S subit un changement conformationnel lors de l'identification du codon initiateur AUG. Ainsi, l'interaction de eIF1A avec eIF5 au niveau du complexe 48S (Maag *et al.*, 2005) fait augmenter la distance entre les extrémités C-terminales de eIF1 et eIF1A (Algire *et al.*, 2002 ; Maag *et al.*, 2005) entraînant la dissociation d'eIF1 du 48S (Unbehaun *et al.*, 2004). Cette dissociation est essentielle car ce facteur agit comme un inhibiteur de l'hydrolyse de la GTP (Valasek *et al.*, 2004) du complexe ternaire eIF2-GTP-MetARNt^{Met}_i. En absence de eIF1, l'eIF1A favoriserait la fermeture du loquet sur l'ARNm afin de le bloquer jusqu'à l'association de la sous unité 60S (Schluzenzen *et al.*, 2000).

1.2.3.2 eIF2/eIF2B

a. Fonction de eIF2/eIF2B dans l'initiation de la traduction

Le facteur eIF2 est constitué de trois sous unités, α , β et γ , qui sont toutes essentielles. eIF2 fixe une molécule de GTP et se lie à l'ARNt initiateur aminocylé afin de former un complexe ternaire actif eIF2-GTP-MetARNt^{Met}_i qui sera chargé sur la sous unité 40S. Le complexe ternaire joue un rôle crucial dans la sélection du codon initiateur AUG. Une interaction correcte entre le MetARNt^{Met}_i et le codon AUG déclenche l'hydrolyse du GTP sous le contrôle d'eIF5 qui active l'activité GTPase d'eIF2 (Huang *et al.*, 1997).

Afin de reformer un complexe ternaire actif, eIF2-GDP est recyclé en eIF2-GTP par le facteur d'initiation eIF2B qui possède une activité GEF (GTP Exchanging Factor). Le complexe eIF2-GTP pourra par la suite se lier à un nouveau MetARNt^{Met}_i et participer à une nouvelle initiation de la traduction. L'affinité du facteur eIF2 pour le GDP est environ 100 fois plus

forte que celle pour le GTP mais en présence du facteur eIF2B, cette affinité est identique et par conséquent il y aura échange entre les deux nucléotides en faveur du GTP car la concentration intracellulaire de ce nucléotide est plus élevée que celle de GDP. Cependant, chez les plantes, l'affinité du facteur eIF2 pour le GDP est seulement 10 fois plus forte que celle pour le GTP, suggérant que le facteur eIF2B n'est pas requis pour l'échange entre les deux nucléotides si le ratio GTP/GDP est suffisamment élevé (Shaihbin *et al.*, 1991). Toutefois, un homologue du facteur eIF2B a été isolé chez les plantes (Kim *et al.*, 2001) mais aucune activité catalytique n'a encore été détectée.

eIF2B est un complexe composé de 5 sous unités désignées α , β , γ , δ et ϵ . Les sous unités eIF2B ϵ et eIF2B γ sont responsables de l'activité catalytique alors que les 3 autres ont une fonction régulatrice. Les complexes catalytiques et régulateurs peuvent lier eIF2 indépendamment ; le premier se lie à eIF2 β (Gomez *et al.*, 2002) alors que le second fixe eIF2 α et stimule le relargage du GDP associé à eIF2 γ (Krishnamoorthy *et al.*, 2001).

b. Régulation de la traduction par la phosphorylation de la sous unité α d'eIF2

Les cellules eucaryotiques répondent à des conditions de stress, notamment à l'infection virale, en diminuant le taux de traduction. Ce contrôle traductionnel est principalement médié par la phosphorylation de la sous unité α d'eIF2 par différentes protéines kinases. En réponse à des signaux spécifiques, ces kinases phosphorylent la sérine en position 51 d'eIF2 α inhibant ainsi la réaction d'échange GDP-GTP. Le complexe eIF2 α P-GDP a une affinité de liaison plus élevée avec eIF2B qu'eIF2 α -GTP, et par conséquent, séquestre eIF2B sous forme de complexe inactif eIF2B-eIF2 α P-GDP. La quantité cellulaire d'eIF2B étant de 10 à 20 fois plus faible que celle d'eIF2, une légère augmentation du taux de phosphorylation d'eIF2 est suffisante pour séquestrer l'ensemble des molécules eIF2B ce qui empêche la formation du complexe ternaire et bloque ainsi l'initiation de la traduction.

Cinq différentes protéines kinases au minimum jouent un rôle dans le contrôle de la traduction modulant l'état phosphorylé d'eIF2 α . La protéine kinase HRI (heme-regulated inhibitor kinase) est exprimée dans les réticulocytes de mammifères et phosphoryle eIF2 en réponse à un déficit en hème (Chen et London, 1995). Les protéines kinases PERK (dsRNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase) et PEK (PERK/pancreatic eIF2 α kinase) résident dans le réticulum endoplasmique afin de moduler la traduction en réponse

au stress relatif aux protéines mal repliées dans le réticulum (Harding *et al.*, 1999 ; revue, Kaufman, 2004). Le facteur de transcription GCN2 (general control of nitrogen metabolism kinase 2) de la levure est activé lors d'un épuisement du milieu en acides aminés (Hinnebusch, 1997) et enfin la PKR (dsRNA activated protein kinase) est un composant de la réponse antivirale induit par les interférons IFN de type I (Clemens et Elia, 1997).

Chez la plante, la régulation de la synthèse protéique via la phosphorylation de eIF2 n'est pas bien comprise. Bien que la protéine PKR n'ait pas été identifiée, une activité similaire à celle de la PKR phosphorylant la protéine eIF2 α a pu être détectée (Langland *et al.*, 1996). Toutefois, l'orthologue de l'inhibiteur de la PKR (P58^{IPK}) a été isolé et semble jouer un rôle dans la pathogénèse virale (Bilgin *et al.*, 2003). L'homologue de GCN2 a été également mis à jour chez *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2003), mais la cible (GCN4) du contrôle traductionnel médié par GCN2 est absent.

1.2.3.3 eIF3

eIF3 est le facteur d'initiation le plus complexe ; il est impliqué dans le recrutement du complexe ternaire et de l'ARNm par la sous unité 40S et dans le scanning du complexe 43S favorisant ainsi la reconnaissance du codon initiateur AUG. Le facteur eIF3 interagit avec de nombreux autres facteurs d'initiation et semble les organiser à la surface de la sous unité 40S. Chez les mammifères, ce facteur d'une masse moléculaire d'environ 750 kDa est constitué de 13 différentes sous unités, eIF3a à eIF3m, alors que 12 sous unités ont pu être identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, l'orthologue de la sous unité eIF3j des mammifères étant absente des plantes. La levure *Saccharomyces cerevisiae* contient des orthologues de seulement 6 sous unités d'eIF3 de mammifères dont 5 sont essentielles pour la traduction *in vivo*, eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g et eIF3i. La sous unité eIF3j n'est pas essentielle bien qu'elle favorise l'interaction d'eIF3 avec d'autres eIFs et avec la sous unité 40S (Fraser *et al.*, 2004). Les 5 sous unités de la levure constituent donc le « cœur » catalytique exécutant les fonctions les plus cruciales d'eIF3 (revue, Hinnebusch, 2006).

a. eIF3 empêche la formation du ribosome 80S

Une des premières fonctions attribuée à eIF3 était d'empêcher la formation du ribosome 80S en interagissant directement avec la sous unité 40S et permettre ainsi, la constitution du

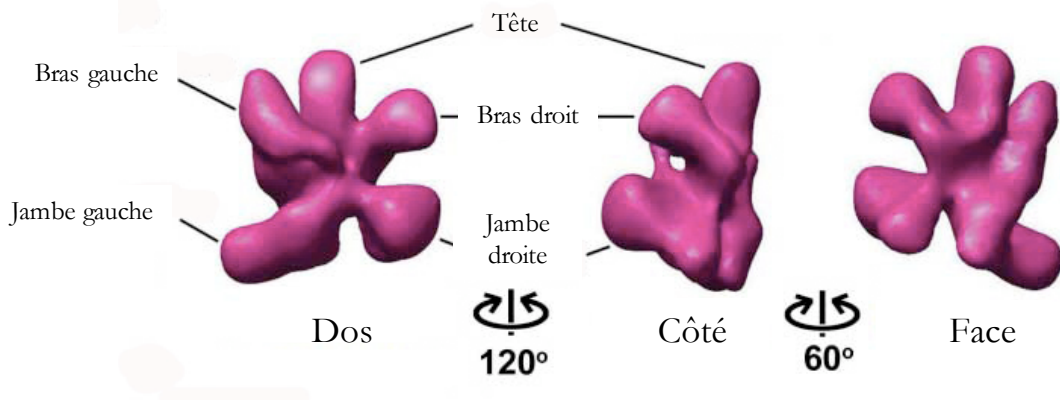


Figure 8 : Reconstruction en microscopie électronique du facteur eIF3 à une résolution de 30 Å.

Le facteur d'initiation eIF3 purifié à partir de cellules humaines HeLa est représenté selon différentes faces. Les cinq domaines : jambes, bras et tête de eIF3 sont indiqués.

Siridechadilok et al. (2005) - Science (310): 1513-1515

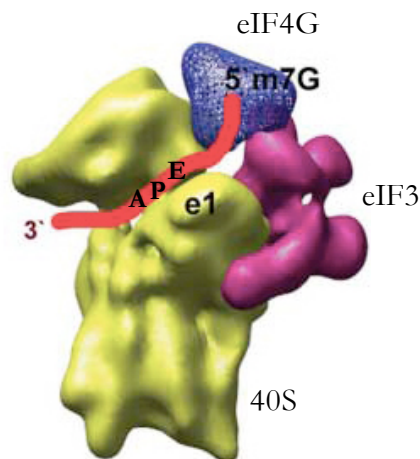


Figure 9 : Modèle montrant l'association des facteur d'initiation eIF3 et eIF4G à la sous unité 40S.

Le facteur d'initiation eIF1 (e1), l'ARNm (rouge), la coiffe 5'm7G et les sites A, P et E sont indiquées.

Siridechadilok et al. (2005) - Science (310): 1513-1515

complexe de préinitiation 43S (Thompson *et al.*, 1977). Cependant, Kolupaeva *et al.* (2005) ont démontré récemment qu'eIF3 seul, ou en association avec les facteurs eIF1 et eIF1A, ne possède pas d'activité de dissociation ou d'anti-association. Ces activités requièrent la présence du complexe ternaire ou d'un oligonucléotide. Le complexe ternaire et les facteurs eIF1 et eIF1A se lient à l'interface de 40S et entrent en compétition avec les domaines de la sous unité 60S nécessaires à la stabilisation du ribosome 80S (Spahn *et al.*, 2001), alors que eIF3 semble s'associer à la face « solvant » de la 40S (Srivastava *et al.*, 1992 ; Valasek *et al.*, 2003). La modélisation du facteur eIF3 (Figure 8) et de son interaction avec la sous unité 40S à partir des données obtenues en microscopie électronique (Figure 9) (Siridechadilok *et al.*, 2005) font suggérer à Hinnebusch (2006) qu'une protubérance d'eIF3 se situe à l'interface du ribosome et qu'elle empêche ainsi la liaison entre les deux sous unités ribosomiques. De leur côté, Kolupaeva *et al.* (2005) proposent que l'association d'eIF3 avec la sous unité 40S, en présence d'un ARN cofacteur (oligonucléotide) et en absence d'autres facteurs d'initiation, influe sur le mécanisme de relargage des facteurs d'initiation avant la formation du ribosome. Il a aussi été proposé que eIF3 est impliqué dans la dissociation du ribosome 80S au codon stop, jouant ainsi un rôle dans le recyclage des sous unités ribosomiques.

b. eIF3 stimule la formation du 43S

Chez les mammifères, eIF3 stimule *in vitro* l'association du complexe ternaire à la sous unité 40S, notamment s'il est associé à eIF1 et eIF1A (Majumdar *et al.*, 2003). En revanche, chez la levure, la présence de eIF3 et de eIF5 favorise l'association du complexe ternaire au 43S (Maag *et al.*, 2005). Ainsi, les facteurs eIF3, eIF1, eIF5 et le complexe ternaire peuvent être isolés sous la forme d'un complexe (MFC : multifactor complexe) sans pour autant être associé au 40S. Ce résultat suggère que ces facteurs sont pré-assemblés afin de favoriser leur liaison à la sous unité 40S pour engendrer le complexe 43S, bien qu'alternativement, chaque facteur puisse se lier indépendamment à la sous unité 40S. Le facteur eIF3 peut se lier directement à l'ARNm car plusieurs de ses sous unités possèdent une activité de liaison aux ARNs (Asano *et al.*, 1997 ; Block *et al.*, 1998 ; Unbehaun *et al.*, 2004). Par ailleurs, eIF3 interagit directement avec le facteur eIF4G fixé sur la coiffe de l'ARNm (figure n°9) (Korneeva *et al.*, 2000) lui permettant d'établir une liaison entre la sous unité 40S et le complexe eIF4F-ARNm. Récemment, il a été montré qu'eIF3 se lie aussi au complexe eIF4E-coiffe

indépendamment de la présence d'eIF4G (Holz *et al.*, 2005). En résumé, eIF3 semble être un adaptateur entre le complexe eIF4F, associé à l'ARNm, et la sous unité 40S.

c. Le facteur eIF3 stimule la formation de 48S

Après l'association du complexe 43S avec l'ARNm, eIF3 reste attaché à la sous unité 40S pendant le scanning du complexe le long de l'ARNm. Il est relargué seulement au moment de la formation du ribosome 80S sur l'ARNm (Kapp et Lorsch, 2004) ce qui suggère qu'il a une fonction lors du scanning et de la reconnaissance du codon AUG. Des expériences réalisées avec le facteur eIF3 provenant des levures bourgeonnantes semblent aller dans ce sens (Valasek *et al.*, 2004 ; Nielsen *et al.*, 2004). Ainsi, une mutation ponctuelle de la sous unité b d'eIF3 (*prt1-1*) conduit à un phénotype dit GCN⁻ pour l'ARNm de la protéine GCN4 se caractérisant par un défaut d'expression de GCN4. Nielsen *et al.* (2004) suggèrent que ce phénotype résulte d'un ralentissement important des ribosomes sur le messenger. De plus, *prt1-1* facilite le rejet de tout codon initiateur autre que AUG.

De récentes études faites chez *A. thaliana* ont suggéré que la sous unité h d'eIF3 a un rôle sélectif dans l'initiation de la traduction des ARNm possédant des ORFs dans la région leader, appelés uORFs (upstream ORF) (Kim *et al.*, 2004). En effet, des délétions de la partie C-terminale d'eIF3h compromet la traduction de ce type d'ARN, alors que les ARNm contenant un seul uORF ou qui en sont dépourvus, sont exprimés correctement (Kim *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter, d'une part que les uORFs sont particulièrement présents dans la région leader des gènes codant des proto-oncogènes, et d'autre part, qu'eIF3h est surexprimé dans les cellules cancéreuses (Nupponen *et al.*, 1999). Ces observations suggèrent que ce facteur est impliqué dans la régulation de la traduction de ces ARNm particuliers. Selon Kim *et al.* (2007), eIF3h contribuerait à augmenter le nombre de ribosomes s'associant aux ARNm qui possèdent plusieurs uORFs dans la région leader. Le mécanisme exact de l'activité d'eIF3h reste à définir, mais il a été suggéré qu'eIF3h favorise la réinitiation de la traduction après un uORF.

En conclusion, de par sa fonction d'intermédiaire entre différents facteurs d'initiation, l'ARNm et la sous unité 40S, eIF3 est un facteur indispensable pour le contrôle et l'efficacité de l'initiation de la traduction.

1.2.3.4 eIF4F

eIF4F est un complexe comprenant trois facteurs d'initiation : (i) eIF4A qui possède une activité ATPase ARN-dépendante ainsi qu'une activité hélicase ; (ii) eIF4E, une protéine se liant à la coiffe et (iii) eIF4G, une protéine ayant des sites de liaison avec les facteurs d'initiation eIF4E, eIF4A, eIF3 et la protéine PABP (Poly A binding protein) qui s'associe à la queue polyA, faisant du facteur eIF4G une protéine d'échafaudage permettant de maintenir le complexe ribosomique 43S au niveau de la coiffe.

Les plantes possèdent une seconde forme de eIF4F (eIF(iso)4F) similaire à eIF4F et composée de deux sous unités : eIF(iso)4E et eIF(iso)4G. Elle a *in vitro* une activité similaire à celle de eIF4F (Browning, 1996). eIF4E et eIF(iso)4E possèdent environ 50% de similarité et ont le même poids moléculaire. Les isoformes, eIF4G et eIF(iso)4G, diffèrent en poids moléculaire, respectivement 165 kDa et 86 kDa, et présentent seulement 30% d'homologie ce qui suggérerait une régulation ou un rôle différent de ces complexes. Effectivement, il s'est avéré que eIF4F permet une traduction plus efficace des ARN contenant une région leader structurée qu'eIF(iso)4F (Gallie et Browning, 2001) alors que ce dernier se lie plus facilement aux ARN peu structurés (Carberry et Goss, 1991). De plus, eIF4F stimule la traduction des ARNm non coiffés ou bien des ARNm possédant des petits ORFs suggérant une spécialisation fonctionnelle de eIF4F et de eIF(iso)4F leur permettant de discriminer entre les ARNm (revue, Gallie, 2002).

a. eIF4A

eIF4A est une hélicase qui utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour désapparier les structures secondaire et tertiaire de la région 5'UTR de l'ARNm, ce qui facilite l'attachement des complexes ribosomiques et leur scanning jusqu'au codon initiateur (Rogers *et al.*, 1999). Elle appartient à la famille des ARN hélicases contenant plusieurs motifs conservés permettant la liaison de l'ATP et de l'ARN et le motif « DEAD » qui est impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP. Des mutations dans ces domaines génèrent des inhibiteurs transdominants de la traduction qui inactivent le facteur eIF4F (Pause *et al.*, 1994). Le complexe eIF4A a une activité hélicase peu efficace et elle est faiblement processive, se dissociant de l'ARN plus vite qu'elle n'hydrolyse l'ATP (Rogers *et al.*, 1999). En revanche, eIF4F, en combinaison avec eIF4B, possède une activité ARN hélicase qui est environ 20 fois plus

importante que le facteur eIF4A associé à eIF4B (Rozen *et al.*, 1990), ce qui suggère que cette activité est principalement assurée par le complexe eIF4F (Revue Pestova et Hellen, 2000).

b. eIF4E

Les ARNm cytoplasmiques eucaryotiques sont pourvus à l'extrémité 5' terminale d'une coiffe 7-méthyl G(5')ppp(5')N (N= A, U, G ou C) qui est spécifiquement reconnue par eIF4E (Sonenberg *et al.*, 1978). De multiples isoformes extrêmement conservés d'eIF4E sont codés chez les eucaryotes.

eIF4E interagit avec la protéine PABP *via* eIF4G conduisant ainsi à la circularisation de l'ARNm et au rapprochement des extrémités 5' UTR et 3' UTR de l'ARNm, de sorte que les facteurs associés à la région 3' UTR peuvent réguler l'initiation de la traduction (Gallie, 1991 ; Tarun et Sachs, 1995). L'interaction entre eIF4E et eIF4G est contrôlée par un régulateur négatif 4E-BP (eIF4E-binding protein) qui interagit avec eIF4E grâce à un domaine similaire à celui présent dans eIF4G (Lin *et al.*, 1994). La protéine 4E-BP entre en compétition avec eIF4G pour la liaison à eIF4E et cette interaction est régulée par la phosphorylation de 4E-BP. En effet, cette modification post-traductionnelle provoque la dissociation du complexe 4E-BP-eIF4E, libérant ainsi eIF4E qui, à son tour, sera phosphorylé augmentant son affinité pour la coiffe (Minich *et al.*, 1994). Ce mécanisme permet de contrôler le taux de synthèse des protéines car il régule aussi la capacité d'eIF4E à se lier à eIF4G (Gingras *et al.*, 1999). La phosphorylation de 4E-BP change en réponse à différents stimuli tels que le stress oxydatif, le choc thermique, la variation dans la disponibilité des acides aminés et l'infection virale, entraînant une baisse consécutive de la traduction. Aucun homologue de la protéine 4E-BP n'a été isolé chez les plantes suggérant que la plante doit réguler la synthèse protéique par des mécanismes différents.

Il est intéressant de noter que le facteur eIF4E est un déterminant de la résistance des plantes à l'infection par les potyvirus. Ces virus codent une protéine virale VPg qui est liée de manière covalente à l'extrémité 5' des ARNm viraux et qui s'associe au facteur eIF4E (Schaad *et al.*, 2000) ou à l'isoforme eIF(iso)4E (Wittmann *et al.*, 1997). L'interaction VPg-eIF(iso)4E semble être essentielle pour l'infection des plantes hôtes par les potyvirus (Leonard *et al.*, 2000) mais le rôle exact de cette interaction dans le cycle viral n'est pas encore bien compris. Elle pourrait jouer un rôle dans la réplication du génome des potyvirus. En effet, la protéine

VPg uridylée (VPgpUpU) des poliovirus sert d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire et requiert probablement la présence de eIF4E, associé à PABP *via* le facteur eIF4G, lui permettant d'être positionnée à proximité de la queue polyA afin de faciliter l'initiation de la réplication (Herold et Andino, 2001 ; revue, Robaglia et Caranta, 2006).

c. eIF4G

Lors des premières étapes de l'initiation de la traduction, eIF4G joue un rôle central en coordonnant et en amplifiant l'activité de liaison de eIF4E à la coiffe, de PABP à la queue polyA et d'eIF3 à la sous unité 40S (Hentze, 1997, revue, Morley *et al.*, 1997) et, l'activité ARN hélicase de eIF4A (Revue Pestova et Hellen, 2000 et les réf citées). eIF4G agit en se liant physiquement et spécifiquement à chacun de ces facteurs ; il joue donc un rôle important de pont moléculaire dans l'assemblage du complexe eIF4F sur la coiffe et dans l'interaction entre eIF4F et le complexe 43S.

Certains virus des animaux, comme les picornavirus et quelques rétrovirus (HIV, Human immunodeficiency virus) possèdent une protéase qui clive spécifiquement eIF4G afin d'inhiber la traduction coiffe-dépendante des ARNm de la cellule hôte et privilégient ainsi, l'expression coiffe-indépendante de ses propres messagers. En effet, ce clivage empêche la liaison de eIF4G au facteur eIF4E et/ou à la protéine PABP. Le facteur eIF4G est également hydrolysé de manière séquence spécifique par certaines caspases cellulaires au cours de l'apoptose ce qui suggère que les virus ont tout simplement détourné des mécanismes développés par la cellule hôte afin de réguler la synthèse protéique (revues, : Schneider et Mohr, 2003 ; Clemens, 2005).

1.2.3.5 eIF4B

eIF4B est l'un des facteurs les moins conservés chez les eucaryotes et ne semble pas jouer un rôle essentiel dans la traduction, ce qui est conforté par le fait que des levures dépourvues du gène eIF4B sont parfaitement viables (Altmann *et al.*, 1993). Ce facteur favoriserait la fixation de l'ARNm au complexe 43S bien que sa présence ne soit pas absolument requise (Pestova *et al.*, 1996).

Contrairement aux mammifères, le facteur eIF4B de plante stimule très peu l'activité hélicase d'eIF4A et n'est pas requis pour l'hydrolyse de l'ATP par eIF4A (Browning *et al.*,

1989). Une étude récente (Cheng et Gallie, 2006) du facteur eIF4B de blé montre qu'il interagit avec eIF(iso)4G et eIF4A par le biais de domaines conservés. Deux domaines de eIF4B sont impliqués dans la liaison avec la protéine PABP et trois, avec l'ARN. Un domaine d'interaction avec la sous unité g d'eIF3 a été mis en évidence par Park *et al.* (2004). Cheng et Gallie (2006) suggèrent que la fonction d'eIF4B serait similaire à celle d'eIF4G, c'est-à-dire de promouvoir l'assemblage des protéine partenaires sur l'ARNm afin de stimuler leurs fonctions. Chez les plantes, eIF4B associé à PABP (Le *et al.*, 1997) favorise le recrutement d'eIF4F au niveau de l'ARNm en accélérant sa liaison avec la coiffe (Khan et Goss, 2005) et en stabilisant la protéine PABP sur la queue polyA (Bi et Goss, 2000).

Le facteur eIF4B des animaux et des plantes est une phosphoprotéine dont l'état de phosphorylation est régulé par des signaux externes ou développementaux (Le *et al.*, 1998). Cet état détermine la spécificité d'interaction avec d'autres facteurs comme PABP ou eIF4G (Gallie, 2002) et a, par conséquent, une influence sur l'activité traductionnelle. La traduction est active lorsque le facteur eIF4B est fortement phosphorylé, alors qu'elle est faible, par exemple, lors de choc thermique ou à un stade tardif de développement de la graine (Le *et al.*, 1998). Chez les animaux, durant l'apoptose, ou lors de certaines infections virales, l'inhibition de la synthèse protéique est également régulée par le clivage de eIF4B car ce dernier ne peut plus interagir avec PABP (Bushell *et al.*, 2000 ; 2001).

1.2.3.6 eIF5

eIF5 est un élément constitutif du complexe multi-facteur isolé chez la levure. Il joue un rôle essentiel dans la formation de ce complexe grâce au domaine HEAT localisé en C-terminal qui lui permet d'interagir avec eIF1 et les parties N-terminales d'eIF2 β et d'eIF3c (Asano *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2005). L'association entre eIF5 et eIF3 est fortement stimulée si eIF5 s'est préalablement complexé avec eIF2 (Singh *et al.*, 2004). Le domaine C-terminal d'eIF5 peut aussi lier simultanément eIF4G et l'extrémité N-terminale d'eIF3c, facilitant ainsi la liaison entre l'ARNm et le complexe 43S (Singh *et al.*, 2005). La région C-terminale d'eIF5 intervient également au cours du scanning du complexe 43S et de la reconnaissance du codon initiateur.

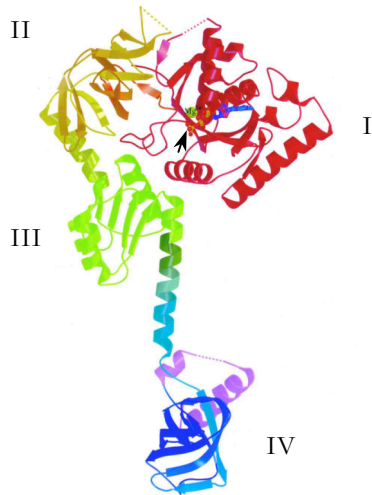


Figure 10 : Structure du facteur d'initiation eIF5B associé à une molécule de GTP.

Diagramme de Ribbons montrant le site de liaison de la GTP (flèche) au niveau du domaine I. Les domaines I, II, III et IV sont représentés par les couleurs suivantes : rouge, jaune, vert et bleu.

Roll-Mecak et al. (2000) - Cell (103):783-792

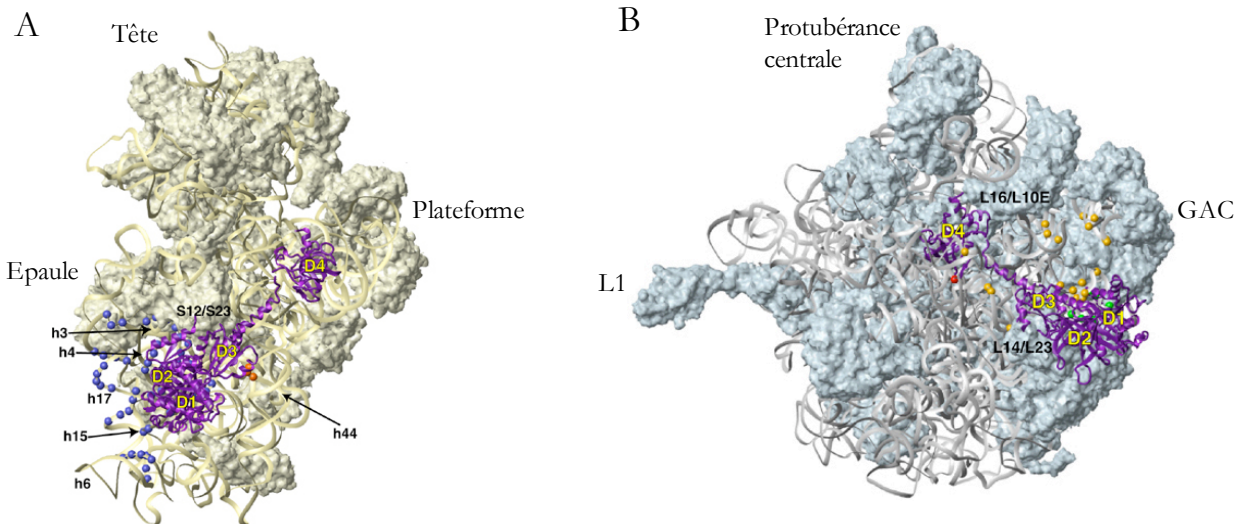


Figure 11 : Modèle montrant le positionnement du facteur d'initiation eIF5B sur les sous unités ribosomiques.

La structure cristallographique des sous unités 30S (A) et 50S (B) de *E. coli* (Schuwirth *et al*, 2005) a été utilisée comme modèle pour positionner le facteur eIF5B selon les interactions mises en évidence entre eIF5B et le ribosome 80S. Les hélices de l'ARN 18S de la sous unité 40S sont indiquées ainsi que les protéines des sous unités 40S et 60S impliquées dans l'interaction avec eIF5B.

GAC : centre activant la GTPase ; L1 : protubérance L1 ; D1, D2, D3 et D4 : domaines I, II, III et IV du facteur eIF5B.

Unbehaun et al. (2007) - EMBO J (26): 3109-3123

Yamamoto *et al.* (2005) pensent que la présence d'eIF5 est nécessaire pour maintenir eIF3 et eIF1 dans une conformation propice au niveau de la sous unité 40S (état ouvert du 43S) pour le scanning du 40S jusqu'au codon initiateur. De plus, les travaux de Maag *et al.* (2005) ont établi que le domaine C-terminal d'eIF5 interagit avec celui de eIF1A lors de la reconnaissance du codon AUG favorisant le passage de l'état ouvert du 43S à un état fermé et arrêtant ainsi le scanning du complexe 43S.

Enfin, eIF5 s'associe au même domaine de liaison de eIF2 que la sous unité ϵ du facteur eIF2B et ce, que eIF2 soit lié au GDP ou au GTP (Algire *et al.*, 2005). Le facteur eIF2B entre donc en compétition avec eIF5 pour sa liaison à eIF2, d'autant plus que, suite à l'hydrolyse du GTP après la reconnaissance du codon initiateur, eIF2 et eIF5 sont relargués du 48S sous la forme d'un complexe eIF5-eIF2-GDP. De ce fait, Singh *et al.* (2006) proposent que le complexe eIF5-eIF2-GDP régulerait la quantité de eIF2-GTP et donc, l'initiation de la traduction, en empêchant le recyclage eIF2-GDP en eIF2-GTP par eIF2B.

1.2.2.8 eIF5B

eIF5B est avec eIF1A un des deux facteurs eucaryotiques qui sont communs aux eubactéries et aux archéobactéries (Lee *et al.*, 1999). Le facteur eIF5B est une GTPase dont sa structure cristallographique, associé ou non au GDP ou au GTP, a pu être déterminée à une résolution d'environ 2 Å (Roll-Mecak *et al.*, 2000). Il possède quatre domaines formant un calice ; les domaines I à III forment la coupe et le domaine IV, constitué d'une longue hélice α , la base (Figure 10). Le domaine I lie la molécule de GTP ; l'hydrolyse de ce nucléotide induit des changements conformationnels d'eIF5B.

L'emplacement d'eIF5B sur le ribosome 80S (Unbehaun *et al.*, 2007) est similaire à celui de son homologue procaryotique (IF2) au niveau du ribosome 70S (Figure 11) (Allen *et al.*, 2005). Le facteur eIF5B est localisé entre les deux sous unités ribosomiques : (i) le domaine I d'eIF5B est situé près du centre activant la GTPase du ribosome, (ii) le domaine II interagit avec la sous unité 40S, (iii) le domaine III interagit avec l'ARNr 28S de la sous unité 60S et 18S de la sous unité 40S et est placé entre les protéines rpS23 et rpL23 et (iv) le domaine IV est localisé près du site P établissant une connection avec la protéine rpL10.

La présence d'eIF5B permet l'association de la sous unité 60S avec le complexe 48S au niveau du codon initiateur de l'ARNm afin de former le ribosome 80S, compétent pour la traduction (Pestova *et al.*, 2000). Ce facteur induit aussi une dissociation partielle de eIF2-GDP avant la jonction des sous unités ribosomiques 40S et 60S ; cependant la dissociation complète de eIF2-GDP et des facteurs eIF1, 1A, 3 n'a lieu que lors de la formation du ribosome 80S (Pisareva *et al.*, 2006) ou au cours de l'élongation (Park *et al.*, 2001 ; Pöyry *et al.*, 2004). Le ribosome formé, la molécule de GTP est hydrolysée par l'activité GTPasique de eIF5B, diminuant ainsi son affinité pour le ribosome ce qui provoque son détachement (Pestova *et al.*, 2000). Shin et al (2002) ont proposé que la fonction d'eIF5B serait de contrôler la formation du ribosome 80S et que seule une conformation correcte du ribosome, probablement lorsque les parties C-terminales d'eIF5B et eIF1A interagissent l'une avec l'autre (Marintchev *et al.*, 2003), permettrait l'hydrolyse de la GTP (Acker *et al.*, 2006).

I.2.2.9 eIF6

eIF6 maintient *in vitro* les sous unités 40S et 60S à l'état dissocié (Valenzuela *et al.*, 1982), mais son rôle dans l'initiation de la traduction n'a pas été élucidé (Si et Maitra, 1999). Ce facteur est impliqué dans la biogénèse des ribosomes (Sanvito *et al.*, 1999) si on se réfère au fait que son homologue de levure, Tif6, est localisé dans le nucléole où il est associé aux particules pré-60S et semble intervenir dans sa maturation (Basu *et al.*, 2001).

Des études réalisées dans des cellules animales (Ceci *et al.*, 2003) montrent que le facteur eIF6 s'associe directement avec la sous unité 60S et avec la sous unité 40S *via* la protéine RACK1, un récepteur de la protéine kinase C, PKC (Mochly-Rosen *et al.*, 1995). L'association de eIF6 avec la sous unité 60S bloque la traduction en empêchant la formation du ribosome. Cependant, cette inhibition peut être levée par l'expression de RACK1 et la stimulation de PKC. RACK1 et PKC auraient pour fonction de phosphoryler eIF6 qui serait ensuite relargué de la sous unité 60S, limitant ainsi son activité inhibitrice de la traduction.

Il est intéressant de noter qu'eIF6 s'associe aussi avec le complexe RISC (Chendrimada *et al.*, 2007) impliqué dans l'ARN silencing médié par les miRNAs (Jackson et Standart, 2007). Chendrimada *et al.* (2007) suggèrent que l'activité inhibitrice d'eIF6 est régulée par le

complexe RISC pour des transcrits spécifiquement ciblés par les miRNAs, probablement en bloquant l'initiation ou le recyclage des ribosomes.

1.2.2.10 PABP

La queue polyA en 3' des ARNm agit en synergie avec la coiffe afin de stimuler la traduction des ARNm (Gallie, 1991 ; Tarun *et al.*, 1995) grâce à la protéine PABP (revue, Jacobson et Peltz, 1996). Cette dernière a une structure très conservée ; elle possède 4 motifs RRM (RNA recognition motif) dont les deux premiers sont indispensables pour sa liaison à la queue polyA (Burd *et al.*, 1991). Le domaine C-terminal de PABP est responsable de son homodimérisation permettant à plusieurs molécules de PABP, environ 6 chez les mammifères, de se lier à la queue polyadénylée.

L'interaction PABP-eIF4G permet de rapprocher la coiffe de la queue polyA et de circulariser l'ARNm (Tarun et Sachs, 1996 ; Le *et al.*, 1997) et induit des changements conformationnels au niveau d'eIF4F favorisant ainsi la traduction des ARNm polyadénylés et coiffés. En effet, ces changements augmentent non seulement l'affinité de liaison d'eIF4E à la coiffe (Luo et Goss, 2001), mais stimulent également les activités ATPase et hélicase d'eIF4A (Bi et Goss, 2000) et la liaison de PABP aux ARNs (Le *et al.*, 1997).

Chez les mammifères, la stimulation de la traduction par l'intermédiaire de PABP peut être contrôlée par deux partenaires d'interaction, Paip1 et 2 (PABP interacting protein), qui active et inhibe respectivement la traduction (Craig *et al.*, 1998). Paip 1 interagit également avec eIF4A ; un complexe tripartite PABP-Paip1-eIF4A a pu être purifié ce qui suggère que Paip1 joue un rôle analogue à celui d'eIF4G, à savoir, de favoriser la circularisation de l'ARNm. En revanche, la protéine Paip2 inhibe la traduction en (i) entrant en compétition avec Paip1 pour la liaison à PABP (Karim *et al.*, 2006) et (ii) en dissociant la protéine PABP de la queue polyA (Khaleghpour *et al.*, 2001), ce qui déstabilise la configuration fermée de l'ARNm.

L'activité de la PABP est modulée par certains virus afin de favoriser la synthèse des protéines virales au détriment de celles de la cellule hôte. Ainsi, les rotavirus synthétisent une protéine, NSP3, qui interagit avec une séquence consensus en 3' des ARNm viraux (ces ARN ne sont pas polyadénylés) et avec eIF4G (Groft et Burley, 2002). L'interaction NSP3-eIF4G pourrait inhiber la traduction des ARNm cellulaires en empêchant la liaison entre PABP et

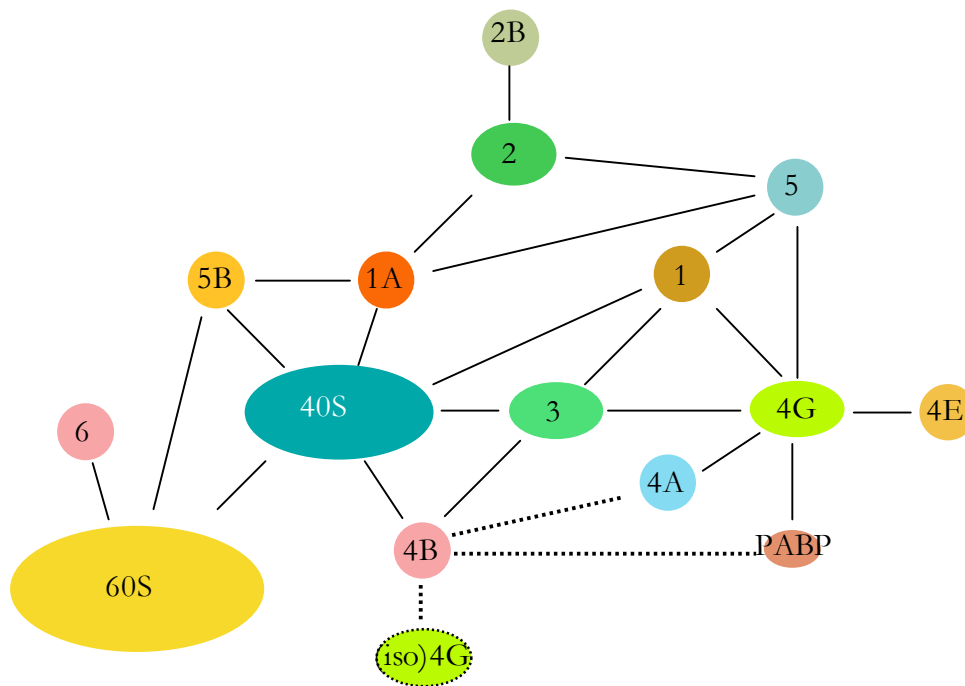


Figure 12 : Réseau des interactions entre les facteurs d'initiation de la traduction et les sous unités ribosomiques chez les eucaryotes.

Les lignes pleines représentent les interactions entre les facteurs d'initiation de la traduction et les sous unités ribosomiques 40S et 60S mises en évidence chez les animaux et les levures, et les lignes en pointillé, celles mises à jour seulement chez les plantes.

eIF4G. Les enterovirus réduisent l'activité traductionnelle cellulaire (Kerekatte *et al.*, 1999) en clivant la PABP grâce à leurs protéases 2A et 3C (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2002).

La protéine PABP interagit aussi avec la GTPase eRF3 (eukaryotic release factor 3) qui active le facteur eRF1 impliqué dans l'hydrolyse du polypeptide en voie de synthèse, lors de la reconnaissance d'un codon d'arrêt de la traduction (Figure 2). Cette observation indique qu'il y aurait un lien entre l'initiation et la terminaison de la traduction.

Comme nous venons de le voir, la multiplicité des interactions que les facteurs d'initiation établissent entre eux et/ou avec les sous unités ribosomiques rendent difficile l'assignation d'une fonction particulière pour chaque facteur. La Figure 12 et le tableau 1 résument les diverses interactions entre les facteurs d'initiation ainsi que leurs fonctions au cours de l'initiation de la traduction dont celle considérée comme étant la principale. La compréhension du rôle joué par chaque facteur lors de l'initiation de la traduction est essentielle pour déterminer l'importance et la fonction potentielle de chacun de ces facteurs pour la réinitiation de la traduction (tableau 1).

Facteurs	Sous unité	Poids moléculaire (kDa)	Fonction(s)	Fonction possible
eIF1		12, 6	Initiation de la traduction	Réinitiation de la traduction
			<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à 40S, près du site P • Stimule le scanning des ribosomes • Stimule l'assemblage du 43S • Stimule la reconnaissance du codon AUG 	<ul style="list-style-type: none"> • Rôle potentiel : facilite le scanning des sous unités 40S et stimule la reconnaissance du codon AUG
		16,6	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à 40S, près du site A • Stimule l'association de eIF1 et de eIF2-GTP-MetARN_{t^{Met}} au 40S 	
			<ul style="list-style-type: none"> • Stimule le scanning des ribosomes • Stimule la reconnaissance du codon AUG 	
eIF2			<ul style="list-style-type: none"> • Forme le complexe ternaire en s'associant avec le MetARN_{t^{Met}} et au GTP • Reconnaissance du codon AUG • S'associe au 40S 	<ul style="list-style-type: none"> • Levure : Facteur limitant essentiel apportant le MetARN_{t^{Met}}. Doit être réacquis <i>de novo</i>. Exemple de GCN4
	α	41,6	• Régulation par phosphorylation chez les mammifères et les levures	
	β	26,6	• S'associe avec le MetARN _{t^{Met}}	
	γ	50,9	• S'associe avec le MetARN _{t^{Met}} et au GTP	
eIF2B			• Permet l'échange GDP-GTP au niveau de eIF2	
	α	39,8	• Pas essentiel	
	β	43,6	• Fixation de GTP	
	γ		<ul style="list-style-type: none"> • Facteur d'échange GTPase • Fixation d'ATP 	
	δ	29,4	• Fixation d'ATP	
ϵ	81,9	<ul style="list-style-type: none"> • Facteur d'échange GTPase • Régulée par phosphorylation 		

eIF3	750	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison au 40S • Recrutement du complexe ternaire • Protéine échafaudage • Association avec l'ARNm • Favorise le scanning • Reconnaissance du codon AUG <ul style="list-style-type: none"> • Plantes : la protéine virale TAV stabilise eIF3 sur les ribosomes en cours d'élongation. Facteur indispensable pour la transactivation du CaMV. • Mammifère : Association d'eIF3 avec la partie 3' de l'ORF 1 du FCV. Facteur indispensable ? <p>→ eIF3 favoriserait un recrutement rapide du complexe ternaire.</p>
eIF3 possède 12 sous unité chez les plantes. Seules celles ayant une fonction particulière dans la réinitiation de la traduction sont présentées ici		
	g	<ul style="list-style-type: none"> • Association avec eIF4B chez les plantes et la levure
	h	<ul style="list-style-type: none"> • Sélectionne les ARNm possédant des uORFs
eIF4A	46,7	<ul style="list-style-type: none"> • Composant du complexe eIF4F • Activité ARN hélicase • Activité ATPase • Liaison à l'ARNm • Favorise l'association du 43S à l'ARNm <ul style="list-style-type: none"> • Plantes : Augmenterait le nombre de polysomes sur les ARNm possédant des uORF • Mammifères : eIF4A, eIF4G et probablement eIF4B, restent associés au 40S (via eIF3 ?), lors de la traduction du sORF. Doivent favoriser la réacquisition du complexe ternaire.
eIF4B	57,6	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule l'activité ARN hélicase d'eIF4A • Favorise le recrutement de la coiffe par eIF4F • Liaison à l'ARNm • Favorise l'association du 43S à l'ARNm • Rôle probable de protéine d'échafaudage
eIF4E	26,5	<ul style="list-style-type: none"> • Composant du complexe eIF4F • Liaison à la coiffe • Régulation activé par la liaison à 4E-BP

eIF(iso)4E	22,5	<ul style="list-style-type: none"> • Composant du complexe eIF(iso)4F
eIF4G	188	<ul style="list-style-type: none"> • Composant du complexe eIF4F • Protéine d'échafaudage • Stimule l'activité ARN hélicase d'eIF4A, la liaison PABP à la queue polyA, l'activité de liaison d'eIF4E à la coiffe • Favorise l'interaction de 43S à l'ARNm • Traduction des ARNm structurés
eIF(iso)4G	83	<ul style="list-style-type: none"> • Composant du complexe eIF(iso)4F • Traduction des ARNm peu structurés
eIF5	48,6	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à 40S • Active l'activité GTPase de eIF2 • Favorise l'interaction de 43S à l'ARNm • Stimule le scanning des ribosomes • Stimule la reconnaissance du codon AUG
eIF5B	85	<ul style="list-style-type: none"> • Favorise l'association du 60S avec le 40S sur l'ARNm pour former le ribosome 80S • Activité GTPase
eIF6	25	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à 60S empêchant la formation du ribosome 80S • Association avec le complexe RISC de la machinerie de l'ARN silencing. Implication dans l'inhibition de la traduction ?

Tableau 1 : Fonction des facteurs d'initiation de la traduction chez les eucaryotes.

Le poids moléculaire protéique et les fonctions dans l'initiation de la traduction sont indiqués pour chaque facteur d'initiation de la traduction et leurs sous unités éventuelles. La fonction principale de chaque facteur est indiquée en gras. La fonction avérée ou probable pour la réinitiation de la traduction après un sORF (vert) ou un ORF long (rouge) est précisée pour certains facteurs.

I.2 Mécanismes de réinitiation de la traduction

Pour la plupart des ARNm eucaryotiques, la sous unité ribosomique 40S commence à balayer l'ARN à partir de la coiffe en direction de l'extrémité 3' afin d'initier la traduction au codon AUG le plus proche de la coiffe si celui-ci est dans un contexte nucléotidique favorable (A/GNNATGG). Après la terminaison de la traduction, les deux sous unités ribosomiques se détachent de l'ARNm et recommencent un cycle de traduction. Dans certains cas, la sous unité 40S reste fixée sur l'ARNm après la traduction de l'ORF et poursuit sa migration et initie la traduction à un deuxième codon initiateur situé en aval du premier. Toutefois, les mécanismes permettant la réinitiation de la traduction semblent différents selon la longueur du premier ORF traduit, inférieur ou supérieur à 30 codons. Dans aucun des cas, on ne connaît les facteurs d'initiation de la traduction qui s'associent à la sous unité 40S afin de la rendre apte à initier la traduction au second ORF.

I.2.1 Régulation de la traduction par un uORF

Les ORFs, en général de petite taille, présents dans la région 5' non traduite (UTR) de l'ARNm, encore appelée région leader, sont désignés uORFs (upstream ORF). Selon une analyse des séquences 5' UTR de gènes de mammifères (Suzuki *et al.*, 2000), des uORFs sont présents dans environ 20-50% des ARNm ; ils sont particulièrement fréquents dans les transcrits codant pour les oncoprotéines, les facteurs de croissance et les récepteurs cellulaires. De même, environ 30% des ARNm d'*A. thaliana* possèdent des uORFs dans leur séquence leader, notamment ceux codant pour des régulateurs de la transcription (Kawagushi *et al.*, 2005). Ces uORFs permettent de moduler la stabilité des ARNm ou l'efficacité de la traduction du ou des ORFs localisés en aval par la réinitiation de la traduction ou en bloquant les ribosomes sur l'ARNm par le peptide naissant (revue, Morris et Geballe, 2000) ; seul le mécanisme de la réinitiation sera développé ici.

La présence d'un uORF constitue une barrière pour les ribosomes en cours de scanning et réduit le pourcentage de ribosomes pouvant réinitier la traduction en aval. Le potentiel inhibiteur d'un uORF faiblit lorsque son codon initiateur est situé dans un contexte qui n'est

pas optimal (Kozak, 1984 ; 1986) ou s'il est trop proche de la coiffe (moins de 10 nucléotides) (Sedman *et al.*, 1990). Par ailleurs, les effets d'un uORF sur la traduction du messenger peuvent être régulés par des conditions spécifiques qui limiteraient la disponibilité du facteur d'initiation de la traduction eIF2. Ainsi, la réduction de la quantité de complexe ternaire (eIF2-GTP-MetARNt^{Met}) stimule sélectivement la traduction d'un ensemble d'ARNm codant pour des produits impliqués dans la réponse de la cellule au stress. De récentes études ont aussi démontré l'importance des séquences 3' UTR qui, dans des cellules cancéreuses, s'associent avec des facteurs protéiques afin de déréguler l'action inhibitrice des uORF et donc, par ce biais permettent la traduction de l'oncogène (Mehta *et al.*, 2006).

Les stratégies de réinitiation de la traduction sont différentes suivant la taille des uORFs. La majorité des cas de réinitiation implique des uORFs de petite taille (inférieure à 30 codons) que l'on qualifiera de sORF (short ORF). Des stratégies alternatives ont été développées, entre autres par les virus, afin de réinitier la traduction après un long uORF.

1.2.2 Facteurs influençant la réinitiation de la traduction après un sORF

L'étape limitante de la réinitiation de la traduction est la réacquisition *de novo* de facteurs nécessaires à l'initiation de la traduction tel que le complexe ternaire (eIF2-GTP-MetARNt^{Met}) au cours du scanning entre l'uORF et l'ORF principal. La distance entre ces deux ORFs est essentielle, car plus elle est importante, plus la probabilité de réacquisition du complexe ternaire par les ribosomes est grande (Kozak, 1987 ; Fütterer et Hohn, 1991). Chez la levure, le temps nécessaire est inversement proportionnel à sa concentration (Dever *et al.*, 1995 ; Hinnebusch, 1997).

Chez les mammifères, un paramètre important pour que le ribosome puisse réinitier la traduction est le temps mis par celui-ci pour traduire l'uORF (Kozak, 2001). La présence d'un long uORF (supérieur à 30 codons), ou d'une structure pseudonoeud, provoque une pause de l'élongation et prévient ainsi la réinitiation de la traduction (Rajkowitsch *et al.*, 2004). Si la traduction de l'uORF est suffisamment rapide, certains facteurs d'initiation demeurent sur le ribosome et favorisent le scanning et l'acquisition du complexe ternaire afin de permettre la réinitiation au prochain codon initiateur (Pöyry *et al.*, 2004). Se fondant sur des études

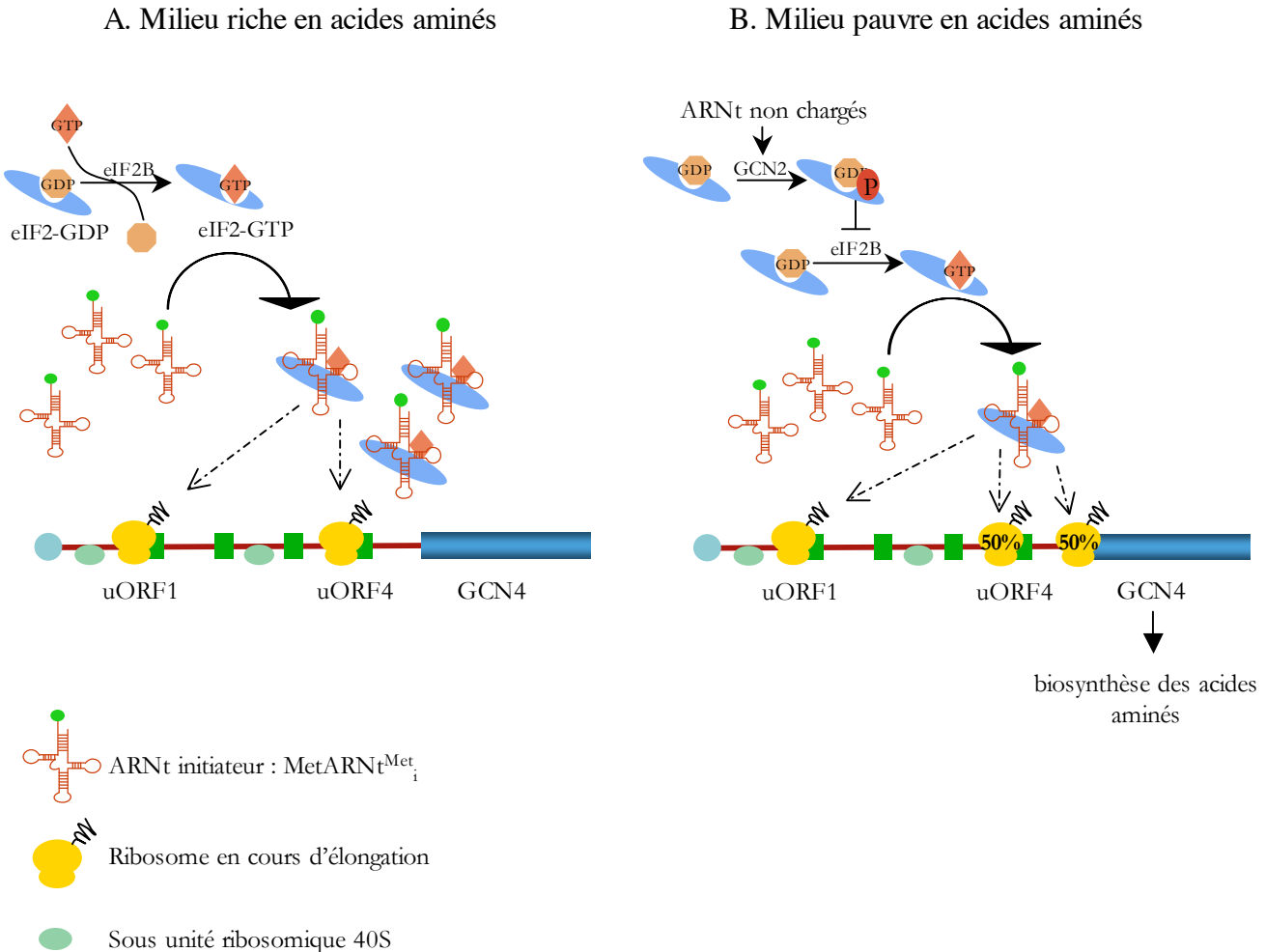


Figure 13 : Modèle du contrôle traductionnel de l'ARNm du facteur de transcription GCN4 de la levure par la phosphorylation de eIF2 α .

L'ARNm de GCN4 contient 4 uORFs (rectangles verts), dont deux (uORFs 1 et 4) jouent un rôle essentiel pour le contrôle traductionnel de GCN4 (rectangle bleu). Après la traduction de l'uORF1, environ 50% des sous unités 40S scannent l'ARNm et, selon la concentration en acides aminés du milieu de culture, réinitie la traduction à l'uORF4 (A) ou à l'ORF GCN4 (B).

A. En présence d'une concentration importante en acides aminés, l'acquisition du complexe ternaire par la sous unité 40S se fait rapidement et la majorité des ribosomes réinitie la traduction à l'uORF4.

B. Un milieu pauvre en acides aminés induit la phosphorylation de eIF2 α provoquant une diminution de la concentration en complexe ternaire. Afin d'acquies ce dernier, les ribosomes nécessitent un temps plus important ; de ce fait, environ 50% des ribosomes initie la traduction à l'uORF4 et les 50% restants, à l'ORF codant pour GCN4.

D'après Hinnebusch (1997) - J biol chem (35): 21661-21664

réalisées *in vitro* dans un système animal, ces auteurs ont montré que le facteur eIF4F, ou eIF4G associé à eIF4A, persiste quelques temps sur la sous unité 40S, probablement par l'intermédiaire de eIF3, après avoir participé à l'initiation de la traduction de l'uORF. En effet, les interactions entre la sous unité 40S, eIF3 et eIF4G doivent être modifiées après la jonction de la sous unité 60S et donc être plus labiles. Si ces interactions sont perdues avant la fin de la traduction de l'uORF, la sous unité 40S n'étant plus stabilisée par les facteurs d'initiation, se dissocie de l'ARNm.

I.2.3 Réinitiation de la traduction après un sORF

1.2.3.1 Régulation en trans par l'état phosphorylé d'eIF2 α

Le contrôle de l'expression du gène *GCN4* de levure est l'exemple le mieux compris quant à la régulation de la traduction par la présence de sORF. La protéine GCN4 est un facteur transcriptionnel qui active l'expression d'une cinquantaine de protéines impliquées dans la biosynthèse des acides aminés. Lors d'un appauvrissement du milieu en acides aminés, la synthèse des protéines est inhibée et la traduction de l'ARNm de GCN4 est augmentée (Figure 13) (revue, Hinnebusch, 1997).

La régulation de la synthèse de GCN4 est due à la présence de 4 sORF, constitués de deux ou trois codons chacun, situés en amont de l'ORF GCN4. Trois paramètres entrent en compte pour la traduction du messenger de GCN4 : la disponibilité du complexe ternaire actif, la présence de l'uORF4 inhibiteur et la distance entre l'uORF1 et l'uORF4.

Si le milieu est riche en acides aminés, la sous unité 40S pourra acquérir rapidement le complexe eIF2-GTP-MetARNt^{Met}_i et la réinitiation de la traduction se fera majoritairement au niveau de l'uORF4. Cet uORF inhibe la traduction de l'ORF principal car il possède une séquence riche en GC encadrant le codon de terminaison qui interagit avec la machinerie traductionnelle. En revanche, si le milieu est pauvre en acides aminés, la concentration élevée d'ARNt non chargés active la protéine kinase codée par *GCN2*. Cette dernière phosphoryle la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 empêchant ainsi la réactivation de ce facteur et par conséquent, la formation de complexes ternaires fonctionnels. Du fait d'une faible concentration en complexes ternaires, la sous unité 40S nécessite un temps plus important pour son acquisition, ce qui permet à la moitié des sous unités ribosomiques

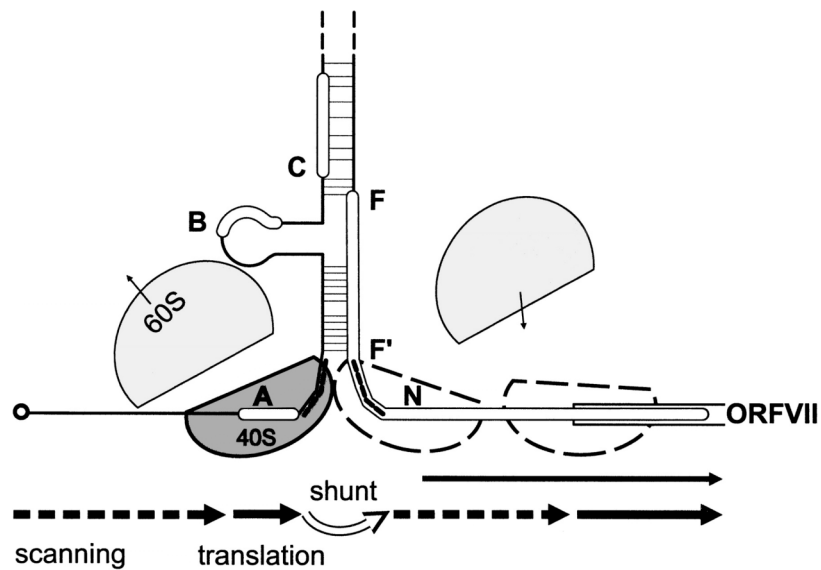


Figure 14 : Modèle du saut du ribosome de l'ARN 35S du CaMV.

Seule la base de la structure secondaire de la séquence « leader » de l'ARN 35S est présentée. Les sites donneur et accepteur du saut sont indiqués par des traits gras à la base de la tige-boucle. La progression du ribosome sur l'ARN 35S est schématisée par des flèches en pointillées pour le « scanning », pleines pour la traduction et blanche, pour le saut. La sous-unité 40S se fixe à l'extrémité coiffée de l'ARN 35S et migre jusqu'au codon d'initiation de l'ORF A. La traduction de ce dernier produit une sous-unité 40S compétente pour le saut. Une fois, sur le site accepteur du saut, la sous-unité 40S va scanner le messager jusqu'à ce qu'elle atteigne l'AUG initiateur de l'ORF VII. Certains ribosomes peuvent initier la traduction au niveau de codons non-AUG situés en amont de cet ORF (site noté N), mais ces événements de traduction sont plus rares.

engagées dans la traduction de l'ARNm *GCN4* de passer à travers l'uORF4 et d'être chargée par le complexe eIF2-GTP-MetARNT_i^{Met} afin de réinitier la traduction au niveau de l'ORF *GCN4*.

Le contrôle de la réinitiation de la traduction par phosphorylation d'eIF2 α existe également chez les mammifères (Lu *et al.*, 2004 ; Vattem et Wek, 2004). Ainsi, l'expression d'ATF4 est régulée par la présence de 2 uORFs en 5' UTR du messenger. ATF4 est un facteur d'expression qui active des gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, le transport et des réactions d'oxydo-réduction (Harding *et al.*, 2003). L'uORF 1 5' proximal facilite le scanning des ribosomes et la réinitiation alors que l'uORF 2 est un élément inhibiteur qui, lorsqu'il est traduit, empêche la traduction de l'ORF *ATF4*. L'expression d'ATF4 est aussi régulée par la disponibilité en complexe eIF2-GTP-MetARNT_i^{Met} comme décrit précédemment. Dans ce cas, eIF2 est phosphorylé par la protéine kinase PERK au cours d'un stress dû à la présence de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique.

1.2.3.2 Régulation en cis par la séquence 5' UTR : le saut du ribosome

Certains transcrits possèdent une région leader contenant des éléments qui interfèrent avec le scanning linéaire des ribosomes et qui inhibent donc la traduction des séquences situées en aval. Ces éléments peuvent être des sORFs, comme nous l'avons vu précédemment, mais aussi des structures secondaires importantes comme des tiges-boucles. Dans ce dernier cas, les particules ribosomiques 40S débutent leur scanning à partir de la coiffe puis contournent ces structures secondaires grâce à un saut afin d'initier la traduction de l'ORF situé en aval ; pour cette raison, ce mécanisme est appelé « saut du ribosome », ou en anglais « ribosomal shunt » (revue, Ryabova *et al.*, 2006 et réf citées). Dans de nombreux cas, le saut du ribosome est dépendant de la traduction d'un sORF présent en amont de la tige-boucle et par conséquent, le ribosome effectue une réinitiation lorsqu'il traduit l'ORF situé en aval (Figure 14) (Ryabova et Hohn, 2000).

Des régions 5' UTR de structure extrêmement complexe sont trouvées chez les ARN viraux, et plus particulièrement chez les (para)rétrovirus où l'ARN sert à la fois de transcrite et d'intermédiaire de réplication. Ces virus utilisent souvent la stratégie du « saut du ribosome » pour exprimer leurs gènes, les exemples les mieux décrits étant ceux du virus de

la mosaïque du chou fleur (CaMV) et du virus bacilliforme du tungro du riz (RTBV) des pararétrovirus de plantes. Ils font l'objet d'une description détaillée dans l'article 1 présenté dans ce chapitre.

1.2.3.3 Régulation en cis par la séquence 3' UTR

Mehta *et al.* (2006) ont mis en évidence le premier mécanisme de régulation de la traduction par la séquence 3' UTR des ARNm pourvus de sORF en 5' UTR.

Dans des cellules de différents tumeurs malignes, dont 20-30% des cas de cancer du sein, la protéine Her-2 est surexprimée contribuant ainsi à la formation des tumeurs (revue, Rabindran, 2005). Chez les mammifères, la séquence 5' UTR de l'ARNm Her-2 contient un uORF de 6 codons qui est traduit et inhibe efficacement l'expression de Her-2 (Child *et al.*, 1999). Mehta *et al.* (2006) ont établi que la présence de la séquence 3' UTR de Her-2, en particulier de l'élément TDE (translational derepression element), était requise pour lever l'inhibition de la traduction médiée par la présence de l'uORF, en d'autres termes, pour permettre la réinitiation de la traduction de Her-2. Plusieurs protéines, comme HuR et HnRNPC1, s'associent dans les cellules cancéreuses avec l'élément TDE et sont impliquées dans la traduction et la stabilité de l'ARNm. Ce complexe protéique interagit avec la protéine PABP suggérant un rôle de PABP dans la régulation de la synthèse de Her-2. Il doit moduler, en association avec PABP et le facteur de relargage eRF3, l'activité des facteurs de relargage au niveau du codon stop de l'uORF afin de rapidement dissocier les ribosomes 80S permettant aux sous unités 40S de rester accrocher à l'ARNm. L'uORF étant de petite taille, certains facteurs d'initiation de la traduction sont encore présents sur la petite sous unité du ribosome qui pourra alors réacquérir rapidement le complexe ternaire et réinitier la traduction. Sachs et Geballe (2006) suggèrent que les protéines se fixant sur la séquence 3' UTR apportent d'autres facteurs aux ribosomes qui traduisent l'uORF, afin de favoriser la réinitiation de la traduction.

I.2.4 Réinitiation de la traduction après un long ORF

Après la terminaison de la traduction d'un long ORF, le devenir du ribosome est multiple. Il peut répéter le cycle de la traduction sur un ARNm différent ou sur le même ARNm (i) au même ORF (recyclage), (ii) à un deuxième ORF situé en aval dans la même phase de lecture (réinitiation de la traduction après un long ORF) ou (iii) situé dans une phase de lecture différente (frameshift). Seul l'avant dernier cas sera discuté dans ce chapitre.

Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe pas d'exemples décrivant la réinitiation de la traduction après un long ORF dans les cellules animales, végétales ou de levures. Seuls certains virus infectant les cellules animales tels que les calicivirus et les pneumovirus (Meyers, 2003, 2007 ; Ahmadian *et al.*, 2000) ou les cellules de plante, comme les *Caulimovirus* (de Tapia *et al.*, 1993), et des transposons (Alisch *et al.*, 2006) ont développé des stratégies alternatives permettant à la sous unité 40S de réinitier la traduction sur le même ARNm après un long ORF.

I.2.4.1 Mécanisme de terminaison-réinitiation

a. Le virus respiratoire syncytial humain

L'ARNm M2 de tous les pneumovirus contient 2 ORFs qui se chevauchent. Ainsi, pour le virus respiratoire syncytial humain (RSV, respiratory syncytial virus), la traduction de l'ORF 1 se termine au codon stop situé au nucléotide 592 alors que la traduction de l'ORF 2 commence au niveau d'un des trois codons AUG situés en amont de ce codon stop, respectivement aux nucléotides 563, 569 et 581. La traduction de l'ORF 2 est couplée à la terminaison de la traduction de l'ORF 1 (Ahmadian *et al.*, 2000). Le produit de l'ORF 2 n'étant pas très abondant, la réinitiation doit être un événement relativement rare. L'allongement de la distance entre le codon stop de l'ORF 1 et un des codon initiateur de l'ORF 2 diminue la probabilité qu'un ribosome puisse réinitier la traduction à l'ORF 2. Néanmoins, la distance de 29 nucléotides entre ces deux codons (positions 563-592) est suffisamment petite pour que le ribosome puisse réinitier avant qu'il ne se détache de l'ARNm. Le mécanisme moléculaire permettant la réinitiation de la traduction n'est pas connu ; Ahmadian *et al.* (2000) suggèrent qu'une partie des ribosomes est capable de scanner l'ARNm dans les deux directions 5'→3' et

3'→5', ou bien qu'une structure secondaire de l'ARN M2 permette la translocation des ribosomes dans la direction 3'→5' pour le repositionner au niveau du codon AUG de l'ORF 2. Cependant, la séquence nucléotidique de l'ORF M2 n'est pas essentielle pour la réinitiation de la traduction (Ahmadian *et al.*, 2000), à l'inverse d'une région fortement structurée, d'environ 150 nucléotides, qui est située à en aval du codon initiateur de M2 (Gould et Easton, 2005). Des mutations déstabilisant cette structure secondaire réduisent significativement la réinitiation de la traduction.

b. Les calicivirus

Des mécanismes semblables de termination-reinitiation où les codons stop et initiateurs se chevauchent ont été décrits chez le virus de l'influenza B (Horvath *et al.*, 1990) et chez les calicivirus (Meyer, 2003 ; Jackson, 2005 ; Lutterman et Meyers, 2007).

Chez les calicivirus, l'ARN génomique contient deux ORFs codant pour les protéines de la capsidie majeur et mineur. Le codon d'initiation AUG du deuxième ORF chevauche l'ORF 1 de 8 nucléotides pour le rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) et de 4 nucléotides pour le feline calicivirus (FCV) (AUGA). La réinitiation de la traduction au niveau de l'ORF 2 n'est pas dépendante d'un contexte nucléotidique fort du codon d'initiation AUG. L'expression du deuxième ORF dépend de la terminaison de la traduction de l'ORF précédent ainsi que d'une séquence de 84 nucléotides en 3' du premier ORF pour le RHDV (Meyers, 2003) et pour le FCV de deux séquences séparées de 36 nucléotides (Lutterman et Meyers, 2007). Ces régions sont nommées TURBS (termination codon upstream ribosome-binding site) et sont complémentaires à l'ARNr 18S de la sous unité 40S chez le FCV (Lutterman et Meyers, 2007). Ceci suggère que les motifs TURBS permettent l'association du 40S sur l'ARN viral en absence de facteurs d'initiation de la traduction, de manière similaire à la séquence Shine-Dalgarno chez les procaryotes, et ainsi favoriser l'association des facteurs d'initiation sur la sous unité 40S immobilisée par ces motifs (Lutterman et Meyers, 2007).

L'équipe de Jackson (2005) a montré que les facteurs eIF4G/eIF4A ne jouaient pas de rôle dans ce processus de réinitiation comme cela a été démontré dans le cas de la réintiation après un sORF, suggérant que la réinitiation traductionnelle après un sORF ou un long ORF ne requiert pas les mêmes facteurs. Néanmoins, eIF3 s'associerait avec le motif TURBS et

contribuerait à la rétention de la sous unité 40S au niveau de ce motif afin de favoriser l'acquisition du complexe ternaire par la sous unité ribosomique.

1.2.4.2 Mécanisme de réinitiation de la traduction ou transactivation

Une autre stratégie de réinitiation de la traduction a été très bien documentée chez les *Caulimovirus* de plantes, en particulier dans le cas du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). Elle se singularise par le fait qu'elle est indépendante de la présence de facteurs en cis et qu'elle requiert l'assistance en *trans* d'une protéine virale. Cette dernière permet la réinitiation de la traduction à chaque ORF de l'ARN 35S du CaMV en s'associant avec la machinerie traductionnelle. Ce mécanisme sera détaillé dans l'article 1 présenté dans ce chapitre.

1.2.5 Réinitiation de la traduction chez les plantes : exemple de *stu1*

Peu d'exemples de réinitiation de la traduction ont été décrits chez les plantes. Un ou plusieurs uORFs, constitués d'au moins 2 codons, ont été trouvés dans la région 5' leader de plusieurs ARNm de plantes. Ainsi, l'ARNm *R-Lc* codant pour un activateur transcriptionnel est peu traduit à cause de la présence d'une tige boucle en 5' UTR qui inhibe la première initiation de la traduction, d'un uORF et d'une séquence intercistronique riche en AU (Wang et Wessler, 1998 ; 2001). De même, la répression de la traduction de l'ARNm *MYB7* du riz dépend de l'uORF et de la région intercistronique (Locatelli *et al.*, 2002). Enfin, la présence de 4 uORFs est nécessaire pour la répression, induite par le saccharose, de l'ARNm *ATB2* qui code une protéine bZIP chez *Arabidopsis* (Rook *et al.*, 1998 ; Wiese *et al.*, 2004).

Tous ces exemples relatent de la réinitiation de la traduction après un sORF. Cependant, des études prometteuses d'un mutant d'*Arabidopsis* semblent indiquer qu'une régulation de la traduction après un long ORF existerait également chez les plantes. Les gènes *ETT* (ETTIN) et *MP* (MONOPTEROS) codent des facteurs qui régulent l'expression des gènes en réponse à l'auxine (ARF, auxin response factor) (Ulmasov *et al.*, 1997 ; Sessions *et al.*, 1997 ; Hardtke et Berleth, 1998). Des mutations introduites dans ces gènes conduisent à un développement anormal du gynécium. Les ARNm de *ETT* et *MP* possèdent dans la séquence 5' UTR,

respectivement 2 et 6 uORFs dont le codon AUG initiateur est en contexte favorable pour l'initiation de la traduction. Seul le produit du premier uORF de ETT est détectable après traduction *in vitro* du fait de sa relative grande taille (environ 10 kDa), ceux des autres uORFs étant trop petits. Des expériences *in vivo* ont démontré que la présence de ces uORF inhibait la traduction des gènes rapporteurs situés en aval (Nishimura *et al.*, 2005) ce qui suggère que la traduction des uORFs contrôlerait l'expression des gènes *ETT* et *MP*, probablement par le mécanisme de réinitiation de la traduction.

Nishimura *et al.* (2005) ont isolé chez *Arabidopsis*, un mutant knock-out de la protéine ribosomique L24, *stv1* (short valve1), présentant des symptômes similaires à ceux de *ETT* et de *MP*. Plusieurs données suggèrent que L24 affecterait la traduction des gènes *ETT* et *MP*. Ainsi, le phénotype du gynécium chez *stv1* est partiellement complété par la transformation de ce mutant par un gène d'*ETT* dépourvu d'uORFs. Par ailleurs, la mutation *stv1* accentue le développement anormal du gynécium dû à un allèle faible *ett*.

Il est intéressant de noter que la longueur du premier uORF d'*ETT* est de 93 codons et que celle-ci est proche de celle de l'ORF VII du virus de la mosaïque du chou fleur (97 codons). La réinitiation de la traduction après l'ORF VII est dépendante de la présence de la protéine virale TAV. Si la réinitiation de la traduction après le premier uORF d'*ETT* est bien effective, alors ce sera le premier cas connu de réinitiation de la traduction après un long ORF d'un transcrite cellulaire. L24 est aussi impliquée dans la réinitiation de la traduction après un long ORF dépendante de TAV ; sa surexpression dans les protoplastes de *N. plumbaginifolia* accroît la transactivation traductionnelle médiée par TAV (Park *et al.*, 2001). Ces différents résultats suggèrent donc que L24 joue un rôle important dans la réinitiation de la traduction après un long ORF.

I.3 Mécanismes d'expression des gènes de virus de plante

I.3.1 Stratégies alternatives de traduction chez les phytovirus

ARTICLE 1

Alternative translation strategies in plant viruses

Odon Thiébeauld, Mikhail Pooggin and Lyubov Ryabova

Publié en juin 2007 dans Plant Viruses (1) : 1-20

Alternative translation strategies in Plant viruses

Odon THIÉBEAULD, Mikhail M. POOGGIN, Lyubov A. RYABOVA

Plant viruses, 2007, Volume 1, Pages 1-20

Copyright ©2005-2007 Global Science Books Ltd., UK

Pages 40-59 : Article 1

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

[http://gsbjournalssup.client.jp/images/SF/PV_1\(1\)1-20.pdf](http://gsbjournalssup.client.jp/images/SF/PV_1(1)1-20.pdf)

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

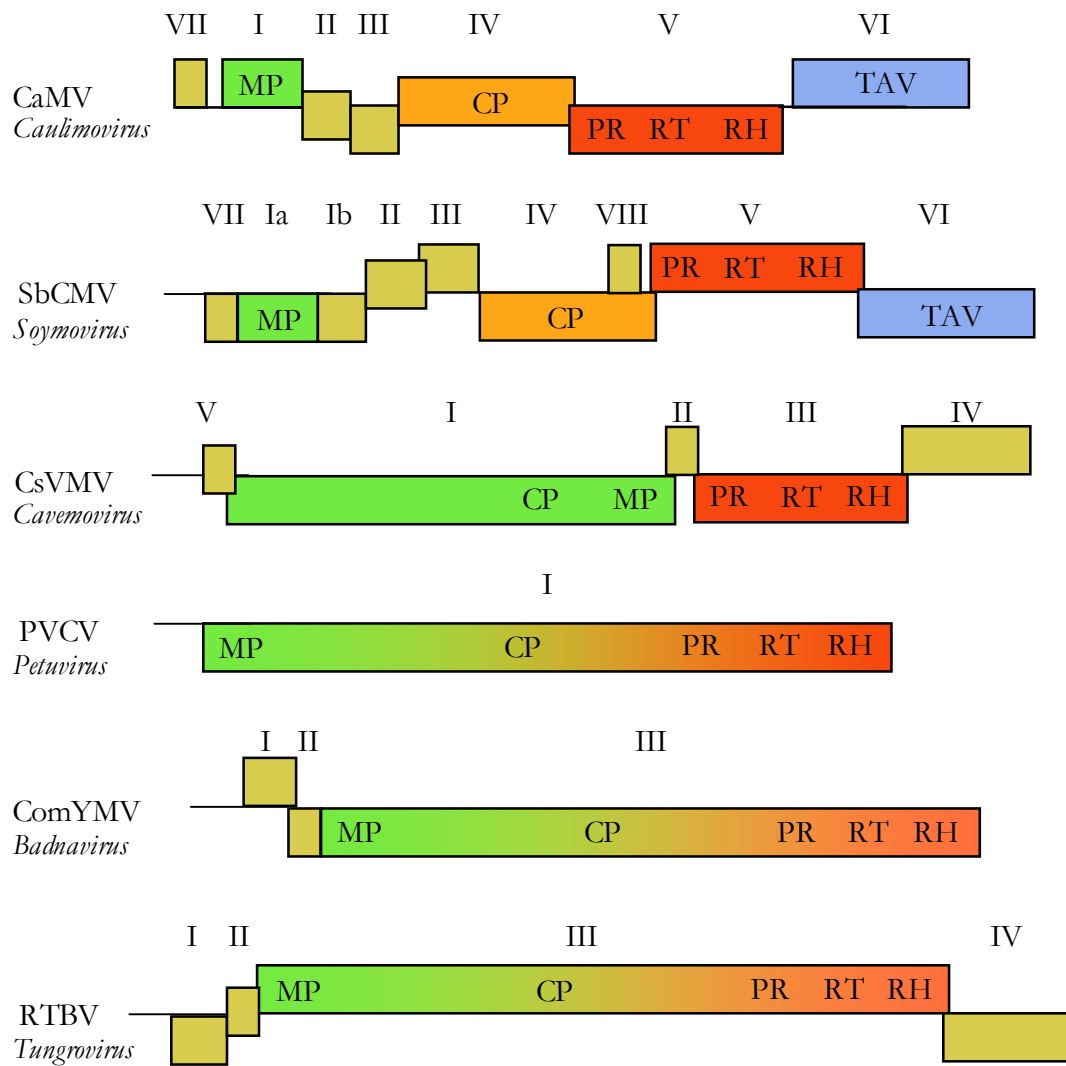


Figure 15 : Organisation génomique des membres types des 6 genres représentant la famille des *Caulimoviridae*.

Les ORF des génomes linéarisés sont représentés par des rectangles.

MP : protéine de mouvement ; CP : protéine de la capside ; PR : protéinase ; RT : transcriptase inverse ; RH : ribonucléase H ; TAV : protéine transactivateur/viroplasmine.

I.3.2 Stratégies d'expression chez les pararétrovirus de plante (*Caulimoviridae*)

Les virus de la famille des *Caulimoviridae* possèdent une molécule circulaire d'ADN double brin relâchée qui est répliquée par transcription inverse à partir d'un ARN pré-génomique. Contrairement aux rétrovirus, le cycle de réplication des *Caulimoviridae* est épisomal et n'implique pas de phase d'intégration du génome viral dans celui de la plante hôte ; pour cette raison, les *Caulimoviridae* sont appelés pararétrovirus afin de les distinguer des rétrovirus. Les *Caulimoviridae* regroupent 6 genres : les *Caulimovirus* (membre type CaMV : Cauliflower mosaic virus), les *Soymovirus* (membre type SbCMV : Soybean chlorotic mottle virus), les *Cavemovirus* (membre type, CsVMV : Cassava vein mosaic virus) et les *Petuvirus* (membre type, PVCV : Petunia vein clearing virus) dont la capsid est isométrique et les *Badnavirus* (membre type, ComYMV : Commelina yellow mottle virus) et les *Tungrovirus* (membre type RTBV : Rice tungro bacilliform virus) dont les particules virales sont bacilliformes. Les virions sont présents dans le cytoplasme des cellules infectées, majoritairement associés aux viroplasmes, corps d'inclusion protéique d'origine viral, sauf pour les genres *Badnavirus* et *Tungrovirus* qui sont exclusivement présents dans le système vasculaire ; les derniers ne produisent pas de viroplasma.

L'ARN pré-génomique des genres de la famille des *Caulimoviridae* est polycistronique, sauf celui des *Petuvirus* qui est monocistronique. Les six genres diffèrent par la complexité de leur organisation génomique (Figure 15) ; le nombre des ORF porté par l'ARN génomique est de trois pour les *Badnavirus*, de quatre pour les *Tungrovirus*, de cinq pour les *Cavemovirus*, de sept pour les *Caulimovirus* et de huit pour les *Soymovirus*.

Cette diversité se reflète également par des mécanismes de traduction mis en œuvre par les genres pour exprimer l'ensemble de leurs protéines. Ainsi, les *Caulimovirus* et les *Soymovirus* codent une protéine ayant une activité transactivatrice (la protéine P6) qui permet une réinitiation de la traduction à chacun des ORF. Seul le mécanisme impliquant la protéine P6 des *Caulimovirus* a été décrit (voir l'article 1) mais il semble être similaire chez les *Soymovirus*. La protéine P6 est exprimée par un ARNm monocistronique transcrit à partir d'un promoteur interne spécifique.

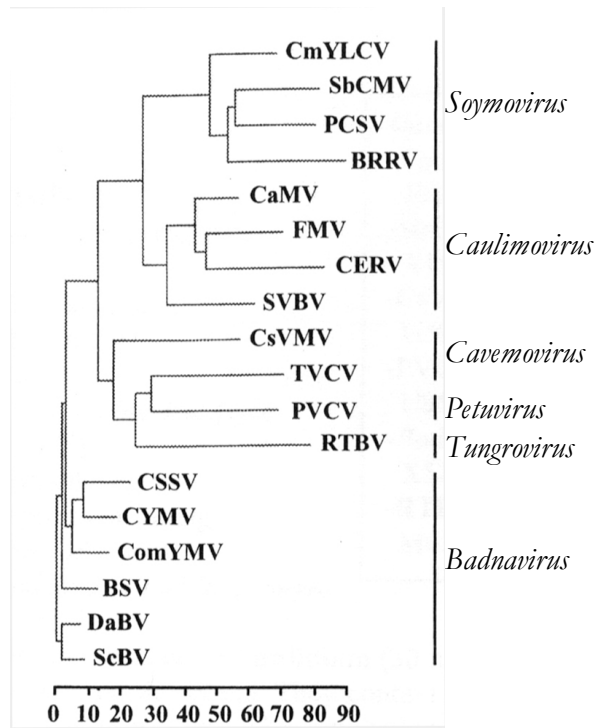


Figure 16 : Arbre phylogénétique des différents genres de la familles des *Caulimoviridae*.

L'arbre phylogénétique a été établi selon la variabilité d'une région conservée de la transcriptase inverse des six genres constituant la famille des *Caulimoviridae*. Les distances horizontales dépendent de la variabilité des séquences alors que les distances verticales sont arbitraires.

CmYLCV : Citrus yellow mosaic virus ; SbCMV : Soybean chlorotic mottle virus ; PCSV : Peanut chlorotic streak virus ; BRRV : Blueberry red ringspot virus ; CaMV : Cauliflower mosaic virus ; FMV : Figwort mosaic virus ; CERV : Carnation etched ring virus ; SVBV : Strawberry vein banding virus ; CsVMV : Cassava vein mosaic virus ; TVCV : Tobacco vein clearing virus ; PVCV : Petunia vein clearing virus ; RTBV : Rice tungro bacilliform virus ; CSSV : Cacao swollen shoot virus ; CYMV : Citrus yellow mosaic virus ; ComYMV : Commelina yellow mosaic virus ; BSV : Banana streak virus ; DaBV : Dioscorea bacilliform virus ; ScBV : Sugarcane bacilliform virus

D'après P. Yot (2003) Caulimoviridae

Le mécanisme de traduction des *Cavemovirus* n'est pas connu. Cependant, il est intéressant de noter que l'ORF IV de ces virus possède une similarité faible mais significative avec l'ORF VI codant pour la protéine P6 des *Caulimovirus* et qu'il est situé en dernière position sur le génome viral suggérant que son produit est doué d'une fonction transactivatrice.

Les autres genres ne codent pas de protéine ayant une activité transactivatrice de la traduction, ce qui explique pourquoi d'autres stratégies traductionnelles sont mises en œuvre pour la synthèse des protéines virales. Ainsi, le RTBV traduit les ORFs I à III par « leaky scanning », favorisé par un contexte défavorable des codons initiateurs des ORFs I et II, et par épissage alternative produisant un ARNm monocistronique portant l'ORF IV. Il est vraisemblable que les *Badnavirus* utilisent aussi le « leaky scanning » pour traduire l'ARN polycistronique (Fütterer *et al.*, 1997) car ce genre est proche de celui des *Tungrovirus* et les ORFs I et II sont dépourvus de codon AUG.

Le nombre réduit d'ORF au niveau de l'ARN génomique se traduit par la synthèse de polyprotéines dont les différentes fonctions sont libérées par des clivages protéolytiques. Les *Petuvirus* constituent l'exemple le plus flagrant vu qu'ils possèdent un unique ORF codant pour une seule polyprotéine contenant toutes les fonctions des *Caulimovirus* à part celle de transactivateur de la traduction (Figure 15). L'augmentation du nombre d'ORF semble être donc associée à la production d'une protéine possédant une fonction de transactivateur de la traduction et qui est exprimée à partir d'un transcrit monocistronique. Il s'avère, selon l'arbre phylogénétique des différents genres de la famille des *Caulimoviridae* (Figure 16), que ceux qui ont le plus évolué sont les *Caulimovirus* et les *Soymovirus* et que l'organisation génomique des *Cavemovirus* est la plus proche de celle de ces derniers. Il semblerait donc que la fonction de transactivation soit une acquisition récente et que les *Cavemovirus* seraient en train de l'acquérir. Sachant que cette fonction se manifestent par des interactions complexes s'établissant entre la protéine transactivatrice et les partenaires de la cellule hôte, nous pouvons nous interroger sur les avantages que procurent aux virus la nature polycistronique des ARN dans un système eucaryotique et l'activité de transactivation sous-jacente.

Les *Caulimovirus* ont développé deux stratégies différentes de réinitiation de la traduction afin d'exprimer ses protéines virales. La stratégie du saut du ribosome est

vraisemblablement utilisée afin de préserver la structure secondaire de la région leader qui peut servir soit de signaux d'encapsidation de l'ARN prégénomique soit de matrice générant des siRNA afin de déréguler l'expression de certains transcrits de la plante hôte facilitant l'infection du virus (paragraphe II.1.4).

Dans la majorité des exemples connues à ce jour, la réinitiation de la traduction est un mécanisme permettant l'induction de l'expression d'une protéine à un instant donné ou bien de diminuer l'expression d'une protéine dont l'accumulation peut se révéler être toxique. Concernant les *Caulimovirus*, nous pouvons supposer que l'expression trop précoce de la polyprotéine P5 pourrait être dommageable pour le cycle virale. En effet, l'ARN prégénomique 35S est utilisé comme matrice à la fois pour la synthèse de l'ADN viral et pour la traduction des protéines virales. La protéine P5 code pour la transcriptase inverse qui, si elle est traduite trop tôt au cours du cycle viral, pourrait interférer avec la traduction de l'ARN 35S. De plus, comme la protéine P5 possède une activité enzymatique, seul un faible niveau de son expression est nécessaire. L'ORF codant la protéine P5 est situé en 3' de l'ARN 35S et son expression doit être moindre lors des premiers moment de l'infection virale du fait d'une baisse de l'efficacité de la traduction après plusieurs cycles de réinitiation. Cela a été confirmé par les travaux de Fütterer *et al.* (1990) mettant en évidence une baisse importante de l'activité de transactivation pour l'ORF V qui est environ 10 fois moindre en comparaison à celle de l'ORF IV. Nous pouvons considéré la réinitiation de la traduction comme étant un mécanisme régulant finement l'expression de certaines protéines virales dans le temps.

CHAPITRE II

Résultats et discussion

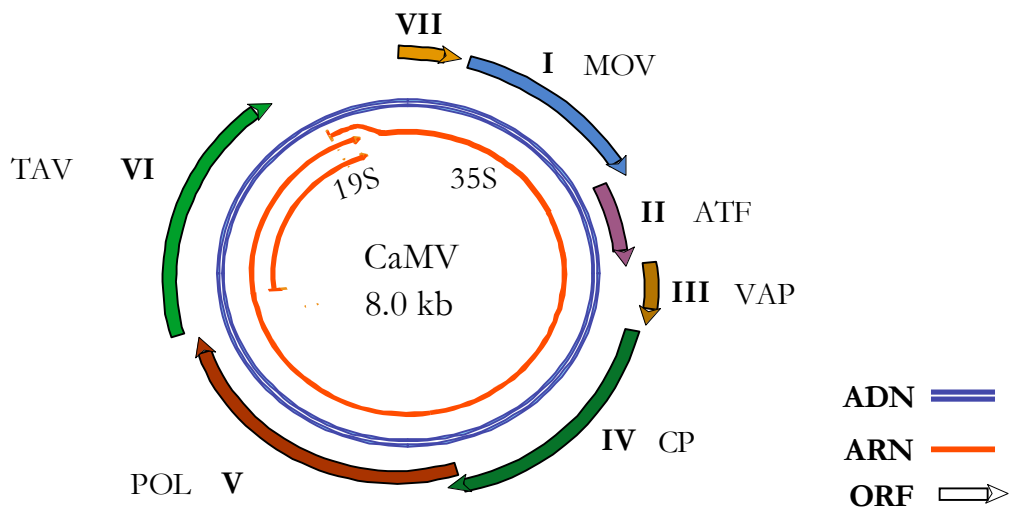


Figure 17 : Organisation du génome du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV).

L'ADN double brin de 8 kpb est représenté par la double ligne bleue. Les ARN 19S et 35S sont illustrés par les lignes rouges ; les versions épissées de l'ARN 35S ne sont pas montrées ici. Les ORFs notés de I à VII sont indiqués par des flèches pleines.

VII, fonction inconnue ; I, MOV : protéine de mouvement cellule à cellule ; II, ATF : facteur de transmission par les aphides ; III, VAP : protéine associée aux virions et fonction de transmission ; IV, CP : protéine de la capsid ; V, POL : protéase, transcriptase inverse, RNase H ; VI, TAV : transactivateur/viroplasmine

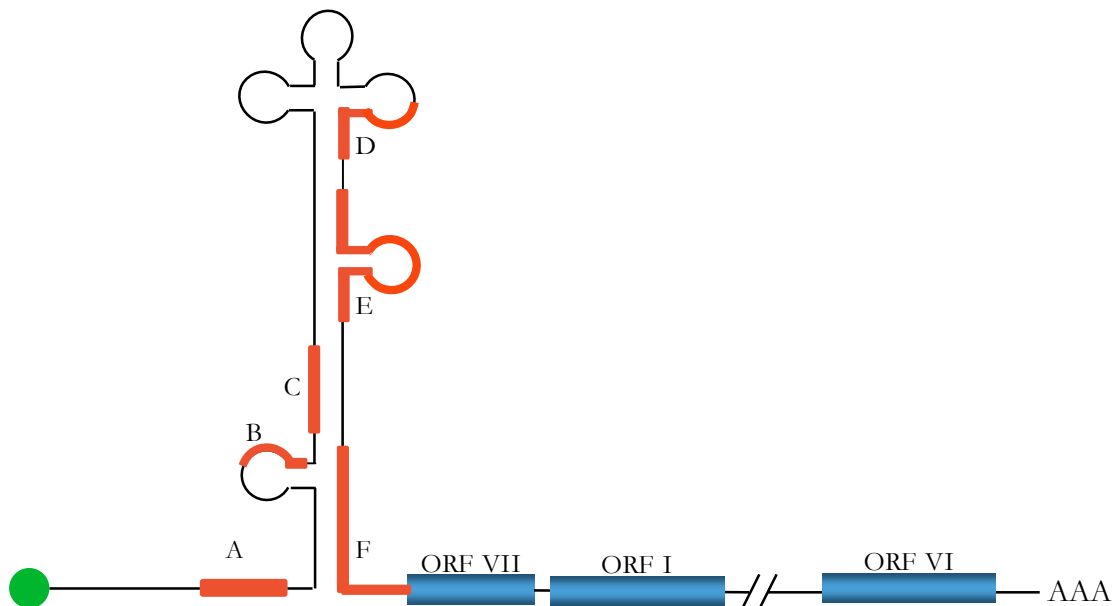


Figure 18 : Représentation schématique de l'ARN pré-génomique du virus de la mosaïque du chou fleur.

L'ARN pré-génomique possède une région leader constituée d'une tige boucle et de 6 petits ORF (traits épais oranges) notés de A à F, dont 5 sont situés dans la tige-boucle. L'ARN contient une coiffe (cercle vert) située à l'extrémité 5' et une queue polyadénylée en 3'. La région codante de l'ARN est constituée de 7 ORF (rectangles bleus), ORF I à VII ; seuls les ORF VII, I et VI sont représentés.

II.1 Introduction : le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)

Le virus de la mosaïque du chou fleur est le membre type du genre des *Caulimovirus*, de la famille des *Caulimoviridae* qui constitue la seule famille de phytovirus à ADN double brin. Le CaMV infecte les crucifères et un petit nombre d'espèces de solanacées (Daubert *et al.*, 1984 ; Schoelz et Shephered, 1988) comme tous les *Caulimoviridae*. Le CaMV a été classé comme étant un pararétrovirus car il partage certaines caractéristiques des rétrovirus : il réplique son ADN génomique par rétrotranscription (Hull et Covey, 1983 ; Guilley *et al.*, 1983 ; Pfeiffer et Hohn, 1983) et les gènes codant pour la protéine de la capsid (Gag), la protéase à acide aspartique (Pro) et la transcriptase inverse (Pol) sont arrangés selon le tryptique Gag-Pro-Pol trouvé chez tous les rétrovirus (revue, Rothnie *et al.*, 1994).

II.1.1 Organisation génomique du CaMV

Le génome du CaMV est une molécule d'ADN double brin circulaire de 8 Kpb de longueur qui est présente dans la particule virale à l'état relâché car elle possède des interruptions de séquence (nommées Δ) sur les brins (+) et (-) dont le nombre et la localisation varient selon les souches virales. Ces interruptions sont réparées par les enzymes hôtes dans le noyau de la cellule hôte afin de former une molécule d'ADN super enroulée qui, associée à des histones, donnera lieu à un minichromosome. Le génome du CaMV contient 7 ORFs majeurs localisés sur le brin d'ADN (-) et deux régions intercistroniques d'environ 700 pb et 150 pb contenant les promoteurs qui contrôlent respectivement la synthèse des ARN 35S et 19S par l'ARN polymérase II (Figure 17).

L'ARN 35S pré-génomique est polycistronique, il est le messenger des 6 protéines virales (P1 à P6) trouvées dans la cellule infectée. La région leader de l'ARN 35S en 5' UTR est étonnamment longue (environ 700 nt) et structurée en une tige boucle ; elle renferme 6 sORFs ayant une taille variant de 2 à 34 codons. Cinq de ces sORF sont constitutifs de la tige-boucle

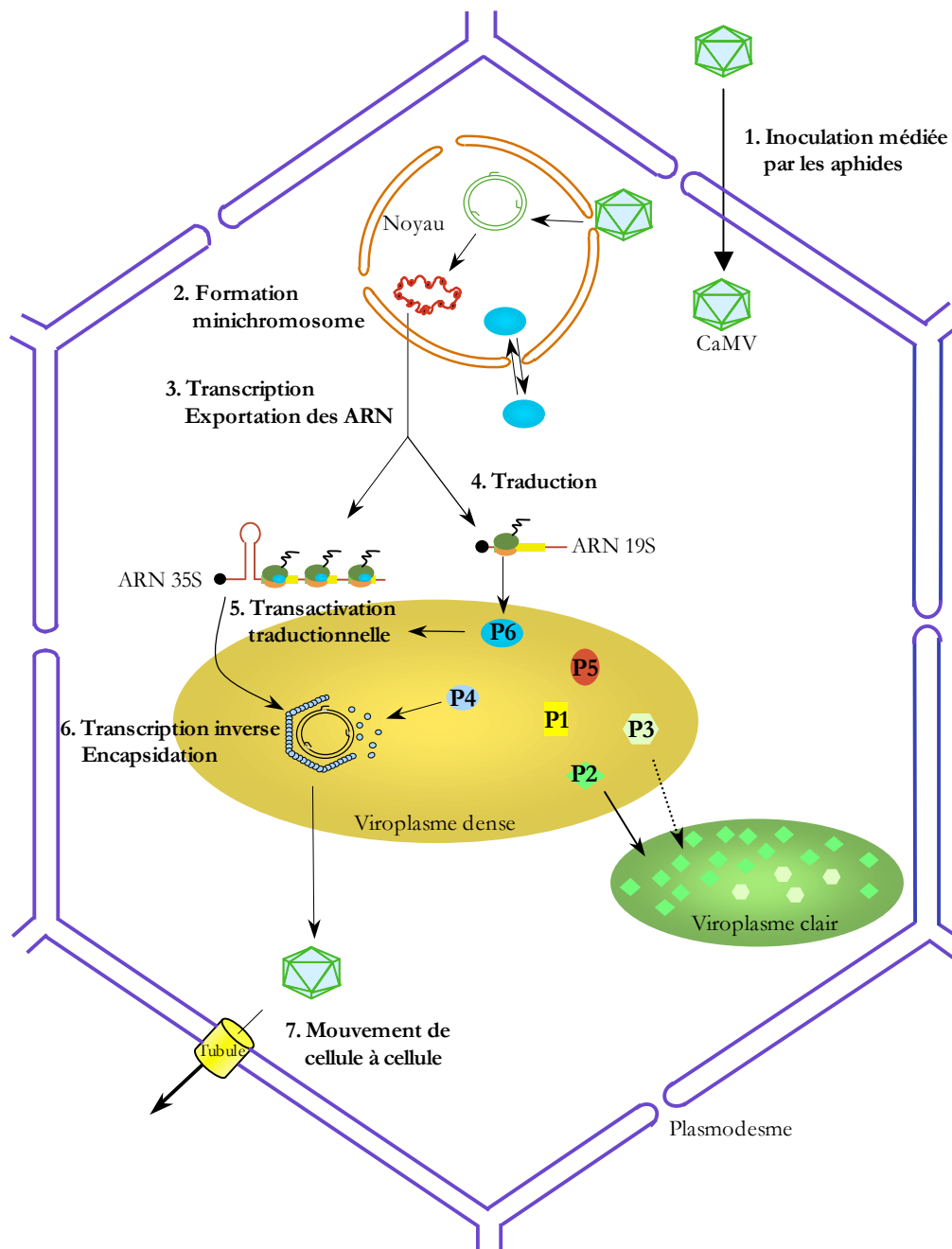


Figure 19 : Représentation schématique de la multiplication du virus de la mosaïque du chou fleur dans la cellule hôte.

Les particules virales du CaMV entrent dans la cellule hôte par l'intermédiaire des aphides (1), puis migrent vers le noyau grâce à la séquence NLS située sur la protéine de capsid. La capsid se désintègre pour laisser place à l'ADN viral qui, une fois réparé, forme un minichromosome dans le noyau (2). La transcription de l'ADN viral a lieu dans le noyau pour donner naissance aux transcrits 19S et 35S qui sont exportés dans le cytoplasme (3). La protéine virale P6 est traduite à partir de l'ARN 19S (4) et est essentielle pour médier la transactivation traductionnelle de l'ARN 35S donnant naissance aux protéines virales P1 à P5 (5). La protéine P6 forme des viroplasmes denses, lieu de stockage des protéines virales et des particules virales. Ces dernières sont constituées de l'ADN viral qui est synthétisé par transcription inverse de l'ARN pré-génomique puis encapsidé par la protéine de capsid P4 (6). La protéine P2 forme des viroplasmes clairs qui sont essentiels pour la transmission du CaMV par les aphides. Le mouvement cellule à cellule des particules virales se fait au moyen de tubules formés par la protéine P1 au niveau des plasmodesmes (7). La protéine P6 fait la navette nucléocytoplasmique pour exercer dans le noyau sa fonction de suppresseur de RNA silencing ; il n'est cependant pas exclu que P6 soit dotée d'autres fonctions nucléaires.

alors que le premier, sORFA, est situé en amont (Figure 18). Les ORFs I, II, III, IV, V et VI codent respectivement pour un facteur de mouvement cellule à cellule (MP, movement protein), un facteur de transmission aux aphides (ATF, aphid transmission factor), une protéine associée aux virions (VAP, virion-associated protein), un précurseur de la protéine de la capsid (CP, capsid protein), une polyprotéine contenant plusieurs domaines : protéase, transcription inverse et RNase H, et une protéine multifonctionnelle, (TAV, transactivator/viroplasmin) (Rothnie *et al.*, 1994). L'ARNm 19S est monocistronique et code pour la protéine TAV.

II.1.2 Le cycle infectieux du CaMV

Le CaMV se propage de plante en plante par l'intermédiaire de son vecteur naturel, le puceron (*Myzus persicae*) qui introduit le virus dans la cellule végétale au cours de son alimentation. Le CaMV peut également pénétrer dans la cellule suite à une blessure provoquée de manière mécanique. La pénétration est suivie d'une étape de dissociation de la particule virale dont le processus et la localisation ne sont pas encore bien définis (Figure 19). La décapsidation pourrait avoir lieu dans le cytoplasme ou au niveau de l'enveloppe nucléaire, le transport de l'ADN viral vers l'intérieur du noyau étant assuré par la protéine de la capsid (Leclerc *et al.*, 1999). Les interruptions de séquence de l'ADN sont réparées dans le noyau grâce à des enzymes cellulaires, puis l'ADN est associé aux histones cellulaires afin de former un minichromosome comportant 42 ± 1 nucléosomes (Olszewski *et al.*, 1983 ; Menissier *et al.*, 1983). L'ADN viral est ensuite transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire pour générer les ARN messagers 19S et 35S qui sont coiffés et polyadénylés. Différentes versions épissées sont produites à partir de l'ARN 35S. L'ARN 35S est légèrement plus long que le génome car il possède une séquence redondante (R) aux deux extrémités. Cet ARN sert à la fois de messenger et de matrice pour la rétrotranscription.

La protéine TAV est synthétisée à partir de l'ARN 19S à un taux élevé ; elle forme des viroplasmes denses aux électrons dans le cytoplasme. TAV est indispensable pour activer en *trans* la synthèse des autres protéines virales à partir de l'ARN 35S, et probablement de ses versions épissées. L'observation en microscopie électronique de ribosomes décorant les viroplasmes (Shepherd *et al.*, 1979) suggère que la traduction s'effectue au niveau de ces

corps d'inclusion. Ces derniers permettent de concentrer les protéines virales et d'augmenter l'efficacité de réplication du virus. En effet, diverses études ont montré que les viroplasmes sont le lieu de la rétrotranscription, de la morphogénèse des particules virales et de leur accumulation. Toutes les protéines virales s'accumulent dans les viroplasmes denses à l'exception de la protéine P2 qui est rapidement exportée vers les viroplasmes clairs dont elle est le constituant majeur. Ces derniers refferment aussi la protéine P3 en faible quantité et quelques virions et sont impliqués dans la transmission aux pucerons (Khelifa *et al.*, 2007).

La réplication du génome viral s'effectue par transcription inverse de l'ARN 35S pré-génomique. Ce processus requiert l'appariement de la séquence 3' de l'ARN_t^{Met} au niveau du site PBS (« primer binding site ») qui est localisé à environ 600 nucléotides de l'extrémité 5' de l'ARN 35S (Turner et Covey, 1984). Cet ARNt sert d'amorce à la transcriptase inverse pour la synthèse du brin (-) de l'ADN. La transcription se poursuit jusqu'à l'extrémité 5', générant un ADN simple brin long de 600 nucléotides appelé ADN « strong stop » qui porte en 3' une copie complémentaire de la séquence redondante R. Cet ADN, libéré de son appariement avec l'ARN grâce à l'activité de la RNase H associée à la transcriptase inverse, s'hybride à la séquence redondante R localisée à l'extrémité 3' de l'ARN 35S. Après ce saut réplcatif, l'ADN « strong stop » sert d'amorce pour la synthèse complète du brin (-) de l'ADN. Au cours de cette élongation, l'ARN matriciel est dégradé par la RNase H, à l'exception de deux régions riches en purines qui, à leur tour, servent d'amorces pour la synthèse de l'ADN de polarité positive (Pfeiffer et Hohn, 1983). L'élongation de l'un des brins (+) est bloquée à l'extrémité 5' et ne peut se poursuivre que lorsqu'il s'associe à l'extrémité 3' complémentaire du brin (-). Cet appariement est à l'origine de la circularisation du génome et de l'interruption de séquence $\Delta 1$ observée au niveau du brin (-) de l'ADN. La synthèse des deux brins (+) ne s'arrête qu'après le déplacement par la transcriptase inverse des amorces situées en amont, sur une distance de quelques nucléotides. Ce déplacement de brins génère les interruptions de séquence $\Delta 2$ et $\Delta 3$. La molécule d'ADN génomique néosynthétisée est encapsidée pour former la particule virale ou éventuellement redirigée vers le noyau pour servir de matrice pour la synthèse de nouveaux transcrits après sa conversion en minichromosome.

Les virions néosynthétisés s'accumulent dans les viroplasmes ou sont transportés de cellule à cellule au travers des tubules constitués par la protéine P1 au niveau des plasmodemes. Par ces mouvements de cellule à cellule, les particules virales atteignent le

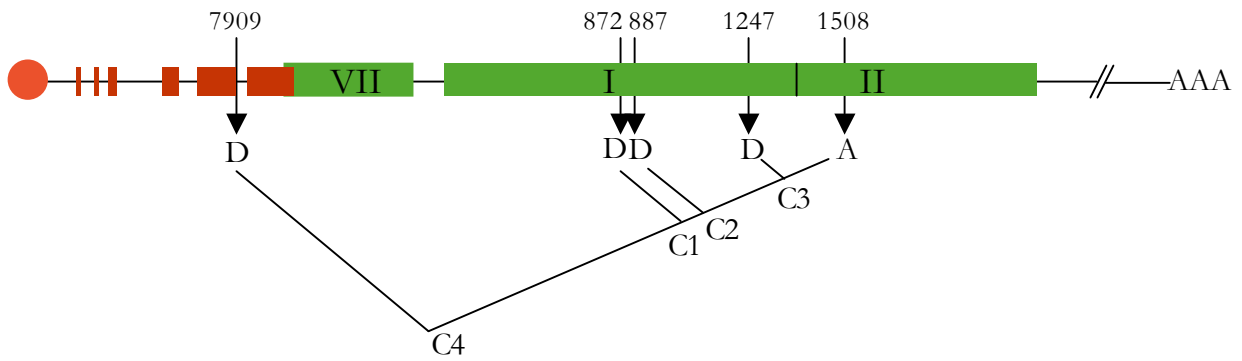


Figure 20 : Localisation des sites accepteur et donneurs pour l'épissage de l'ARN 35S.

Représentation schématique des 4 sites donneurs (D) situés au niveau du leader (7909) et de l'ORF I (872, 887 et 1247) et du site accepteur (A) dans l'ORF II (1508). Les 4 versions épissées sont nommées C1 à C4. Les 6 petits ORF de la région leader sont représentés en rouge et les ORF VII, I et II sont en vert.

D'après Kiss-Laszló et al. (1995) - EMBO J (14) 3552-3562

système vasculaire d'où elles infectent les différents tissus de la plante hôte, conduisant ainsi à l'infection systémique.

II.1.3 L'épissage de l'ARNm 35S

Kiss-László *et al.* (1995) ont montré que l'ARN 35S fait l'objet d'un épissage différentiel donnant naissance à 4 nouvelles espèces d'ARNm (C1 à C4) (Figure 20). Cet épissage utilise 4 sites donneurs et un site accepteur unique. Un des sites donneurs est localisé dans la région 5' UTR de l'ARN 35S alors que les trois autres sont à l'intérieur de l'ORF I. Le site accepteur est, quant à lui, situé dans la première moitié de l'ORF II, au nucléotide +1508. Des mutations dans la séquence consensus du site accepteur abolit totalement l'épissage et sont létales pour le CaMV. Les formes épissées de l'ARN 35S représentent environ 70% de la quantité totale d'ARN 35S. Kiss-László *et al.* (1995) ont suggéré que l'épissage permettait de réguler l'expression des ORFs I et II, qui ne seront traduits qu'à partir des 30% d'ARN 35S complet, ou celle de l'ORF III qui ne sera plus dépendante de l'activité transactivatrice de TAV, l'ORF III étant en position proximal des ARN. Toutefois, Froissart *et al.* (2004) ont montré d'une manière convaincante que l'épissage de l'ARN 35S empêche l'accumulation précoce de P2 dans la cellule qui se révèle être toxique. Selon ces auteurs, l'épissage aurait pour objectif de réguler l'expression de P2 au cours du cycle viral. En effet, l'épissage de l'ARN 35S n'est pas requis pour la viabilité de différents mutants du CaMV dès lors que ceux-ci n'accumulent plus la protéine P2. De plus, en absence de P2, les mutants du CaMV présentant un défaut d'épissage peuvent se répliquer et induire l'apparition de symptômes laissant suggérer que l'épissage en soi n'est pas essentiel pour les fonctions biologiques du CaMV (Froissart *et al.*, 2004).

II.1.4 Le CaMV induit l'ARN silencing de certains transcrits hôtes

Lors de l'infection virale par le CaMV, des petits ARNs (siRNAs, silencing RNA), principalement dérivés de la région leader de l'ARN 35S, s'accumulent chez le navet et *Arabidopsis* (Moissiard et Voinnet, 2006 ; Blevins *et al.*, 2006). La biogénèse de ces siRNAs requiert l'action coordonnée et hiérarchique des 4 protéines dicers (DCL, dicer-like)

d'*Arabidopsis* qui font partie de la machinerie de silencing de la plante. Ainsi, la région leader de l'ARN 35S est efficacement clivée en siRNAs de 21 et de 24 nt respectivement par DCL4 et DCL3, alors que l'action de DCL2, générant des siRNAs de 22 nt, n'est évidente que si DCL4 est génétiquement inactivée. DCL1 ne semble pas être impliquée dans la biogénèse des siRNAs mais plutôt dans le clivage du leader du 35S afin de donner naissance à une structure similaire au pré-miRNA qui faciliterait le clivage par les trois autres DCL (Moissiard et Voinnet, 2006). Des siRNAs provenant de la région leader possèdent une complémentarité quasi-parfaite avec plusieurs transcrits d'*Arabidopsis* et ainsi vraisemblablement doivent inhiber la traduction de ces transcrits, ce qui pourrait faciliter l'infection virale (Moissiard *et al.* 2006).

II.1.5 Les fonctions des différentes protéines du CaMV

II.15.1 P1 ou MP (Movement protein)

L'infection virale systémique des plantes implique des interactions complexes entre le virus et la plante hôte permettant la réplication du génome viral, le mouvement du virus ou de son génome de cellule à cellule ainsi que le mouvement longue distance à travers l'appareil vasculaire (Carrington *et al.*, 1996 ; Lazarowitz et Beachy, 1999). Ce mouvement viral est facilité par la ou les protéine(s) de mouvement (MP, movement protein) codée(s) par le virus. Afin de permettre le passage des particules virales à travers les plasmodesmes, la MP modifie, en absence d'autres protéines virales, la structure des plasmodesmes en y formant des tubules (Linstead *et al.*, 1988 ; Kasteel *et al.*, 1996). D'autres virus transportent uniquement le génome à travers les plasmodesme sous la forme de complexes ribonucléoprotéiques constitués du génome viral et de la protéine de mouvement.

L'ORF I du CaMV code pour la MP (40 kDa) requis pour le mouvement cellule à cellule (Thomas *et al.*, 1993 ; Thomas et Maule, 1995) et pour le mouvement longue distance (Thomas et Maule, 1999). L'observation en microscopie électronique de plantes infectées contenant des particules de CaMV dans les plasmodesmes suggère que les virions se déplacent de cellule à cellule en empruntant les tubules formés par la protéine P1 au niveau des plasmodesmes (Linstead *et al.*, 1988). La protéine P1 du CaMV est aussi capable de former des tubules lorsqu'elle est exprimée dans des protoplastes et dans des cellules

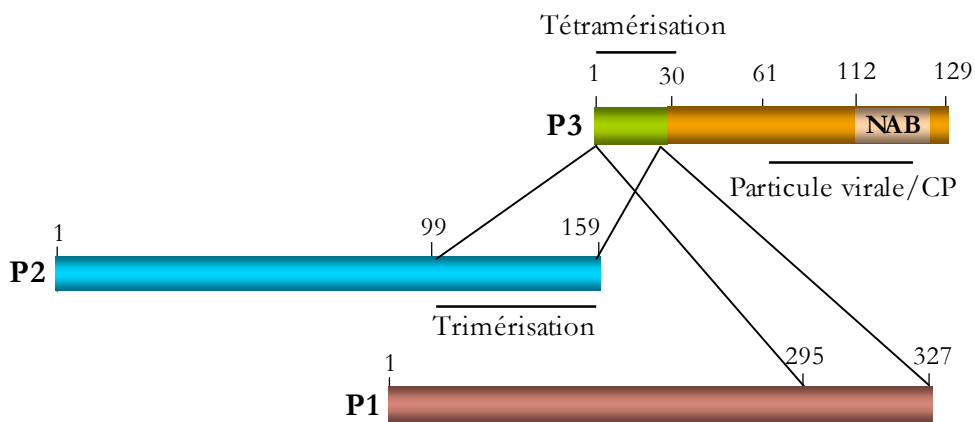


Figure 21 : Représentation schématique des interactions entre les protéines P1, P2 et P3 du CaMV.

L'extrémité C-terminale de la protéine P3 interagit avec la particule virale alors que l'extrémité N-terminale se lie à l'extrémité C-terminale des protéines P1 ou P2. La protéine P3 possède aussi un domaine arborant une activité de liaison aux acides nucléiques (NAB, nucleic acid binding).

d'insecte, suggérant que les autres protéines virales ne sont pas requises. Un domaine central de P1 est nécessaire pour cibler la protéine à la périphérie de la cellule (Huang *et al.*, 2001) alors que la majeure partie de la protéine (1 à 282 aa) l'est pour élaborer des tubules au niveau de la membrane cytoplasmique (Thomas et Maule, 1999). Les extrémités N- et C-terminales correspondent aux régions les plus variables des différentes P1 des *Caulimovirus* et sont respectivement exposées à la face extérieure et intérieure (lumen) des tubules (Thomas et Maule, 1995 ; 1999).

La protéine P1 possède aussi un domaine d'interaction aux ARN (aa 120 à +197) (Thomas et Maule, 1995) qui est très conservé parmi les caulimovirus. Il n'est donc pas exclu que P1 médie le transport des ARN 35S et 19S à travers les plasmodesmes sous forme de complexes ribonucléoprotéiques et par conséquent, que le CaMV utilise deux modes différents de mouvement de cellule à cellule (Citovsky et Zambryski, 1991 ; Thomas *et al.*, 1995 ; revue, Carrington *et al.*, 1996).

II.1.5.2 P2 ou ATF (aphid transmission factor)/ P3 ou VAP (Virion associated protein)

La propagation du CaMV d'une plante à l'autre se fait par les pucerons encore appelés aphides. Le mode de transmission du CaMV est non circulant, les particules virales acquises par l'aphide à partir de la plante infectée étant retenues dans le stylet ou au niveau de l'œsophage antérieur. Les particules virales sont relarguées lorsque l'aphide s'alimente sur plante. La transmission du CaMV s'effectue selon la stratégie « helper », une protéine virale servant de pont réversible entre les particules virales et l'insecte.

P2 et P3 sont des petites protéines (respectivement 18 et 15 kDa) qui sont requises pour former le complexe viral transmissible. Leh *et al.* (1999) ont démontré que la région N-terminale (1-30 aa) de P3 interagit spécifiquement avec la région C-terminale de la protéine P2 du CaMV alors que le domaine C-terminal de P3 est impliqué dans l'interaction directe avec les particules virales, et plus précisément avec la protéine de la capsid, grâce au domaine comprenant les résidus 61-122 (Figure 21) (Leh *et al.*, 2001). Cela a été confirmé par microscopie électronique ; l'extrémité N-terminale de P3 est exposée à la surface du virion alors que la partie C-terminale est ancrée dans le virion (Plisson *et al.*, 2005). La liaison directe de P3 avec les particules virales et la protéine P2 est indispensable pour la

transmission du CaMV par les pucerons. La protéine P3 doit être préalablement associée aux virions pour attacher P2 afin de permettre la transmission.

En prenant en compte la localisation compartimentée des viroplasmés clairs (P2, P3) et des viroplasmés denses (P3-virions) dans la plante infectée, Drucker *et al.* (2002) ont proposé un modèle d'acquisition séquentielle des particules virales. Après ingestion par l'aphide de corps d'inclusion clairs, ceux-ci se désintègrent permettant aux P2 libres de se lier sur un récepteur présent sur la cuticule du stylet du vecteur. Une seconde phase d'acquisition par l'aphide permettra l'accrochage des virions associés à P3 présents principalement dans les viroplasmés denses. Les auteurs n'écartent pas la possibilité de la présence de quelques particules virales associées à P3 dans les viroplasmés clairs permettant une acquisition des particules virales en une seule étape. D'autres études montrent que les particules de CaMV sont principalement acquises dans le phloème. Or, la protéine P2 n'étant pas détectée dans ce tissu vasculaire, contrairement aux complexes P3-virions, cela suggère que la première acquisition se fait dans les cellules du mésophylle et les autres, dans le phloème (Palacios *et al.*, 2002).

In vitro, la protéine P2 interagit directement avec les microtubules. Cependant, dans les cellules de plantes infectées, P2 est principalement présente dans les viroplasmés clairs et n'a jamais été vue associée aux microtubules.

L'inoculation mécanique d'une souche virale n'exprimant pas P3 ne permet pas l'infection virale (Kobayashi *et al.*, 2002). Cependant, la réplication du CaMV peut avoir lieu en absence de P3 (Jacquot *et al.*, 1998), ce qui suggère un rôle de P3 dans le mouvement du virus. Il a été montré que la région N-terminale interagit avec le domaine C-terminal de la protéine de mouvement P1 (Figure 21) et que P3 et P1 sont localisées au niveau des plasmodesmes (Stavolone *et al.*, 2005).

II.1.5.3 P4 ou CP (capsid protein)

La capside des virions est formée de 3 protéines structurales, p44, p39 et p37 provenant de clivages spécifiques aux deux extrémités du précurseur de la protéine de la capside (pré-CP, 57 kDa). Ce précurseur est très instable, dû à la présence de certaines séquences au niveau des extrémités N- et C-terminales (Karsies *et al.*, 2001). Des formes plus stables de la

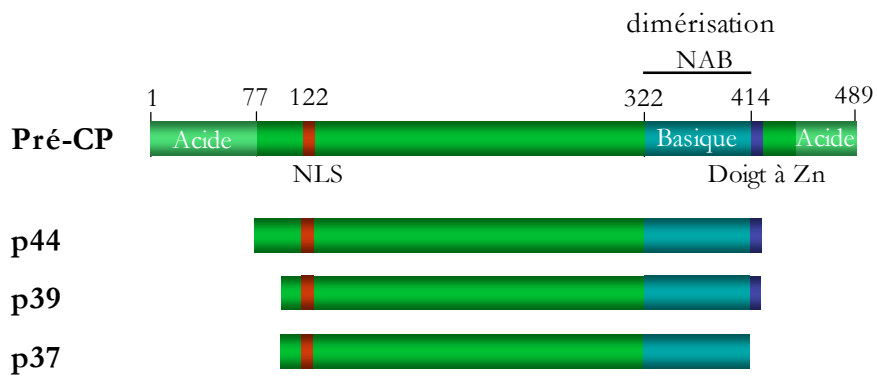


Figure 22 : Représentation schématique du précurseur de la protéine de capsid du CaMV et de ses versions clivées.

Le précurseur de la protéine de la capsid étant instable, le clivage de ses extrémités N- et C-terminales donne naissance à des formes plus stables (p44, p39 et p37).

Les domaines acide et basique ainsi que la séquences de localisation nucléaire (NLS, nuclear localization sequence) sont figurés. Les protéines de capsid possèdent une activité de liaison aux acides nucléiques (NAB, nucleic acid binding).

CP sont obtenues suite aux clivages spécifiques par la protéinase virale, des 76 aa en N-terminal et de 40 aa en C-terminal. Ces deux coupures engendrent la protéine p44 qui est ensuite clivée en p39 et p37 selon un processus de clivage encore inconnu (Figure 22) (Martinez-Izquierdo et Hohn, 1987 ; Torruella *et al.*, 1989).

Guerra-Peraza *et al.* (2000) ont mis en évidence *in vivo* une interaction entre la protéine de la capsid, p44, du CaMV et le domaine central de la région leader de l'ARN 35S contenant la séquence riche en purine. Le CaMV possède une séquence conservée riche en purine présente sur la tige boucle de la région leader. Ceci suggère que cette tige-boucle pourrait agir comme un signal d'encapsidation de l'ARN viral (Fütterer *et al.*, 1988), bien qu'aucune expérience probante n'ait étayé pour l'instant cette hypothèse. La seule indication à ce jour est que la délétion de cette séquence provoque un retard important dans l'apparition des symptômes des plantes infectées bien qu'elle n'ait pas d'influence sur l'expression des gènes situés en aval.

La pré-CP a une localisation strictement cytoplasmique et s'accumule à des sites spécifiques, probablement au niveau de la membrane plasmique, où commence le site d'assemblage des virions. Les virions immatures forment des petits agrégats dans lesquels s'initie leur maturation. Par la suite, les virions matures fusionnent avec les corps d'inclusion formées par la protéine P6, probablement par des interactions P4-P6 (Champagne *et al.*, 2004). Après la formation des virions, la protéase virale clive la partie N-terminale de CP afin d'exposer les NLS à la surface des virions (Leclerc *et al.*, 1999 ; Champagne *et al.*, 2004). Seuls les virions matures seront transportés, *via* l'importine α , vers les pores nucléaires où l'ADN viral sera relargué du virion (Karsies *et al.*, 2002).

II.1.5.4 P5 ou Pol (polymerase)

La protéine P5 est essentielle pour la réplication du génome viral, il s'agit d'une polyprotéine (78 kDa) homologue au produit du gène pol des rétrovirus. Elle possède un domaine protéinase aspartique dans la région N-terminale et un domaine de transcriptase inverse/RNase H en C-terminal. La protéine P5 subit un auto-clivage par la protéinase à acide aspartique, ce qui libère cette enzyme de la transcriptase inverse associée à la RNase H (Torruella *et al.*, 1989). Il n'a pas été établi si ces deux activités enzymatiques sont séparées

par un clivage supplémentaire. Les pararétrovirus, à la différence des rétrovirus, ne codent pas pour une intégrase ; toutefois, un motif intégrase a été mis en évidence dans la séquence de la polyprotéine codée par le génome de l'éclaircissement des veines du pétunia (PVCV) (Richert-Poggeler, 1997).

II.1.5.5 P6 ou TAV (Transactivator/Viroplasmin)

a. Principal composant des viroplasmes denses

Des viroplasmes denses peuvent être observés dans le cytoplasme des cellules infectées par le CaMV. Les viroplasmes denses sont des corps d'inclusions denses aux électrons en microscopie électronique contenant de nombreuses particules ainsi que toutes les protéines virales exceptée la protéine P2 (Drucker *et al.*, 2002). Les fonctions associées à ces structures sont la réplication par transcription inverse (Mazzolini *et al.*, 1989) ainsi que l'assemblage des particules virales. Divers données suggèrent que les viroplasmes denses sont aussi le siège de la traduction des ARNm viraux (Rothnie *et al.*, 1994).

TAV été identifiée comme étant le composant majeur des viroplasmes (Covey et Hull, 1981). TAV peut interagir avec elle même afin de former des homodimères (Li et Leisner, 2002 ; Haas *et al.*, 2005). Des expériences de far-western ont établi que le domaine N-terminal (1-83 aa) est nécessaire et suffisant pour l'homodimérisation de TAV (Haas *et al.*, 2005) (Figure 23A). Par ailleurs, les travaux de Li et Leisner (2002), obtenus chez la levure selon la technique du double hybride, indiquent que trois autres domaines de TAV sont également capables d'interagir avec la protéine TAV complète : les domaines dits miniTAV et MBD et une région C-terminale (414 à 520 aa). Le domaine N-terminal contient une hélice α (région 4 à 31) pouvant former une structure coiled-coil *via* un motif leucine zipper. Des mutations ponctuelles ont établi que ce motif était indispensable pour l'interaction TAV-TAV (Haas *et al.*, 2005).

L'expression transitoire de mutants de TAV dans des cellules de tabac BY-2 en culture démontre clairement que le domaine N-terminal de TAV est nécessaire quoique pas suffisant pour la formation des viroplasmes denses (Haas *et al.*, 2005). Par conséquent, d'autres domaines de TAV doivent être impliqués tels que par exemple, ceux prédits par Li et Leisner (2002) ce qui n'exclut pas l'implication de certaines protéines ou des structures de la cellule

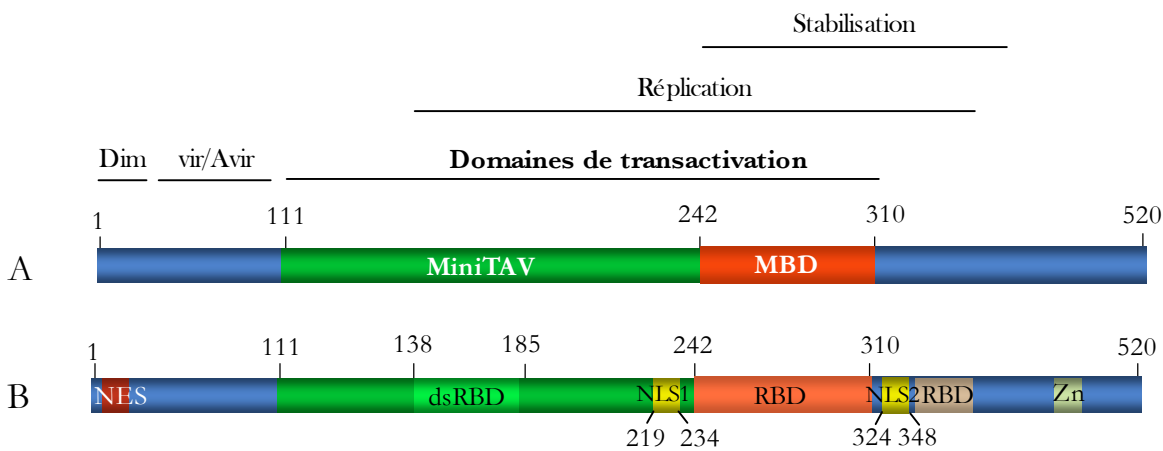


Figure 23 : Représentation schématique des domaines et des motifs de la protéine TAV du CaMV.

A. La protéine TAV possède plusieurs domaines dont celui impliqué dans sa dimérisation (Dim), dans la virulence et l'avirulence (vir/Avir), dans la stabilisation de la protéine et la réplication du génome viral. Deux domaines sont importants pour l'activité de transactivation traductionnelle, le miniTAV (domaine minimal requis pour la transactivation) et le MBD, (Multiple Binding Domain).

B. Plusieurs motifs caractérisent la protéine TAV. Un motif d'export nucléaire (NES, Nuclear Export Signal) et deux motifs de localisation nucléaire (NLS 1 et 2, Nuclear Localization Signal) qui régulent le transport nucléocytoplasmique de TAV. TAV possède une activité de liaison aux ARN double brin (dsRBD, double-stranded RNA Binding Domain) et deux motifs de liaison aux ARN simple brin (RBD, RNA Binding Domain). TAV contient aussi un motif en doigt de zinc (Zn).

hôte dans la formation des viroplasmés. Cependant, les plantes transgéniques surexprimant TAV présentent aussi des viroplasmés denses aux électrons, similaires à ceux trouvés dans les cellules de plantes infectées par le CaMV, indiquant que les autres protéines virales ne sont pas requises pour l'assemblage de TAV.

b. Spécificité d'hôte et symptomatologie

La protéine TAV est le déterminant majeur de la spécificité d'hôte. La principale différence entre les souches de CaMV repose essentiellement sur leur capacité ou non à infecter certaines Solanacées (Qiu et Schoelz, 1992). Plusieurs études ont établi que TAV est à la fois un facteur de virulence et d'avirulence dont le domaine a été localisé à l'extrémité N-terminal (Figure 23A) (Daubert *et al.*, 1984 ; Palanichelvam *et al.*, 2000). TAV contient des déterminants pathogéniques régulant la spécificité d'hôte (Wintermantel *et al.*, 1993) et le type de symptôme et leur sévérité (Daubert et Routh, 1990 ; Anderson *et al.*, 1991). Ainsi, il a été montré que des *A. thaliana* transformés par la protéine TAV provenant de différentes souches de CaMV exhibaient des symptômes dont la sévérité dépendait de la séquence en acides aminés de TAV ou de son niveau d'expression (Cecchini *et al.*, 1997).

Le rôle de TAV dans la symptomatologie a été confirmé par le fait que différentes espèces de plantes hôtes et non hôtes transformées par le gène VI présentaient toutes des symptômes similaires à ceux apparus au cours d'une infection virale (Bálazs, 1990 ; Zijlstra *et al.*, 1996). Il s'avère que la surexpression de TAV chez *A. thaliana*, soit dans les plantes transgéniques soit au cours de l'infection virale, dérégule de manière similaire l'expression d'un certain nombre de gènes hôtes (Geri *et al.*, 1999).

Différentes études ont montré que la protéine TAV provenant de certaines souches du CaMV élicitait une réponse hypersensible (HR) chez les espèces de *Datura* et de *Nicotiana* (Schoelz *et al.*, 1986 ; Cole *et al.*, 2001) et donc, que l'ORF VI pouvait être considéré comme étant un gène d'avirulence (Avr) (Palanichelvam *et al.*, 2000). Il semblerait que la fonction d'avirulence corresponde au tiers N-terminal de TAV et selon les études de Palanichelvam et Schoelz (2002), l'activité de transactivation de TAV semble être nécessaire, quoique pas suffisante, pour éliciter la réponse HR. Kobayashi et Hohn (2004) ont identifié le domaine 40-110 aa comme étant responsable de la virulence du CaMV chez les crucifères et les solanacées. Certaines solanacées reconnaissent ce domaine comme étant l'éliciteur de la

réponse hypersensible de la plante hôte. Cependant, le domaine vir/Avr de TAV n'est pas indispensable pour la réplication du CaMV, l'activité de transactivation de TAV et pour le mouvement cellule à cellule du virus ; il doit donc jouer un rôle lors de l'infection systémique du virus.

c. La réplication virale

Kobayashi *et al.* (1998) ont établi que la protéine TAV était aussi requise pour la réplication virale dans des protoplastes transfectés.

Deux régions de TAV sont indispensables pour la réplication virale (Figure 24A) (Kobayashi et Hohn, 2003). Afin de découpler l'activité de transactivation et l'activité potentielle de TAV sur la réplication virale, les protéines CP et Pol ont été exprimées de manière indépendante en absence ou en présence d'un mutant de TAV délété du miniTAV. Seule la présence du mutant de TAV permet d'atteindre un niveau important de la réplication virale (Kobayashi *et al.*, 2003) suggérant que TAV a une fonction post-traductionnelle requise pour une réplication efficace en stabilisant, par exemple, les protéines CP et Pol (Kobayashi *et al.*, 1998).

Il est intéressant de noter que les deux domaines conservés de TAV correspondent aux domaines impliqués dans la réplication virale alors que les deux domaines hypervariables (Sanger *et al.*, 1991) sont localisés dans les régions N- et C-terminales qui sont responsables de la sélection de l'hôte et de la pathogénécité (Daubert *et al.*, 1984 ; Schoelz et Shepherd, 1988).

d. Navette nucléocytoplasmique

Des études d'expression transitoire de TAV fusionnée à EGFP ont montré en microscopie confocale la présence de TAV dans le noyau (Haas *et al.*, 2005) alors qu'elle était considérée comme étant une protéine strictement cytoplasmique. L'export nucléaire de TAV est associé à la présence d'un NES (nuclear export sequence), riche en leucines, situé en N terminal de la protéine (résidus 11 à 20) (Figure 23B) (Haas *et al.*, 2005). Le NES étant constitutif du domaine responsable de la dimérisation de TAV, Haas *et al.* (2005) suggèrent qu'une population de TAV échappe à l'aggrégation en étant prise en charge par les importines afin d'entrer dans le noyau. Récemment, Haas *et al.* (communication personnelle) ont montré que l'importation

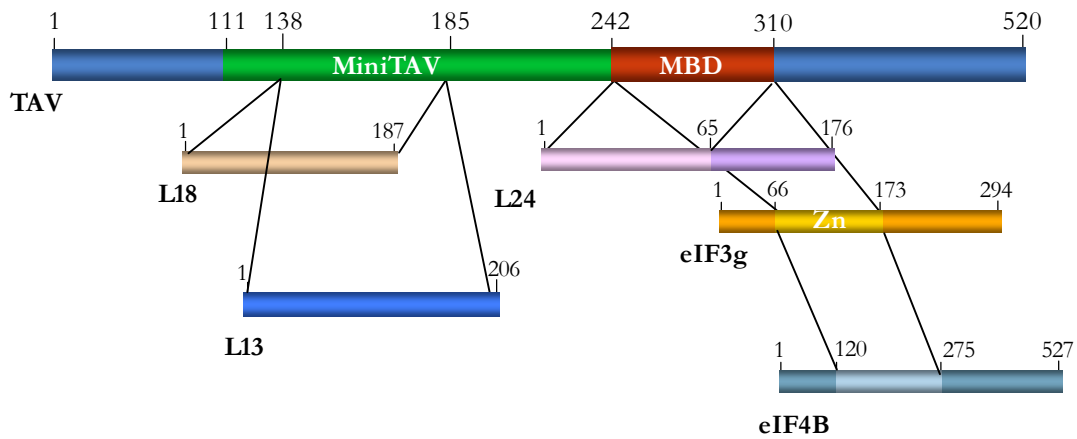


Figure 24 : Représentation des interactions établies par la protéine TAV avec la machinerie traductionnelle.

Les deux domaines de transactivation de la protéine TAV établissent plusieurs interactions avec la machinerie traductionnelle. L'extrémité N-terminale du domaine miniTAV interagit avec les protéines ribosomiques L13 et L18 de la sous unité 60S. La protéine L24 de la sous unité 60S et la sous unité g du facteur d'initiation de la traduction eIF3 (eIF3g) entrent en compétition pour s'associer au domaine MBD. Le domaine MBD de TAV et le facteur d'initiation de la traduction eIF4B entrent en compétition pour se lier à la sous unité eIF3g.

nucléaire de TAV est sous le contrôle de deux NLS (Nuclear localisation signal), l'un classique de nature basique, et l'autre non conventionnel, ressemblant à l'un des trois NLS de la protéine NP du virus influenza de type A (Figure 23B).

Plusieurs hypothèses concernant le rôle de TAV dans le noyau ont été émises (Haas *et al.*, 2005). TAV, ayant la capacité de se lier aux ARN simple et double brins (De Tapia *et al.*, 1993 ; Cerritelli *et al.*, 1998), pourrait contrôler l'export des ARNm viraux et de ses versions épissées ou bien prévenir leur dégradation. Récemment Haas *et al.* (données non publiées) ont montré que TAV exerce la fonction de suppresseur de silencing dans le noyau.

e. Facteur de transactivation traductionnelle

La fonction la plus remarquable de la protéine TAV est celle permettant la réinitiation de la traduction à chaque ORF de l'ARN 35S. La protéine TAV interagit avec plusieurs partenaires de la machinerie traductionnelle dont la sous unité 60S et le facteur eIF3 (Figure 24), afin de la rendre apte à réinitier la traduction. La stabilisation par TAV de eIF3 sur les ribosomes en cours d'élongation a fait l'objet d'une description dans l'article 1. L'importance de l'interaction entre TAV et la sous unité 60S pour la réinitiation de la traduction est discutée dans l'article 2.

II.2 Partie I : RISP, nouveau partenaire cellulaire de TAV impliqué dans la réinitiation de la traduction

ARTICLE 2

Viral reinitiation factor and its new co-factor, a novel 60S subunit-binding protein, promote 60S recruitment for polycistronic RNA translation

Odon Thiébeauld, Hyun-Sook Park, Mikhail Shchepetilnikov, Angèle Geldreich, Mario Keller, Thomas Hohn et Lyubov Ryabova

Soumis en octobre 2007 dans Molecular Cell

Viral reinitiation factor and its new co-factor, a novel 60S subunit-binding protein, promote 60S recruitment for polycistronic RNA translation

Odon THIÉBEAULD, Hyun-Sook PARK, Mikhail SHCHEPETILNIKOV, Angèle GELDREICH, Mario KELLER, Thomas HOHN et Lyubov

Molecular cell

Copyright © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved. ScienceDirect® is a registered trademark of Elsevier B.V.

Pages 56- : Article 2

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/10972765>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

II.3 Partie II : La protéine cellulaire RISP est associée aux microtubules

II.3.1 Introduction

Les précurseurs des ARNm subissent dans le noyau des modifications post-transcriptionnelles avant d'être exportés dans le cytoplasme à travers les pores nucléaires pour y être traduits. Le réticulum endoplasmique rugueux constitue le site majeur de synthèse pour les protéines destinées aux lysosomes et à la sécrétion ainsi que les protéines intégrales des membranes plasmiques. Les ARNm des protéines solubles ne sont pas pour autant localisés de manière aléatoire dans le cytoplasme. En effet, certaines classes d'ARNm sont adressées vers des régions spécifiques de la cellule et ne sont traduites qu'après avoir atteint leur destination finale (St Johnston, 1995 ; Hesketh, 1996). L'adressage de ces transcrits est donc un mécanisme permettant de réguler spatialement et temporellement la production de certaines protéines (revue, Jansen, 1999). Ce type de régulation a lieu dans différents organismes (levure, drosophile, mammifères et plantes) et dans différents types cellulaires (oocyte, embryon et cellules somatiques).

Dans les embryons, la localisation des ARNm est nécessaire à la formation d'un gradient de morphogène ou à la distribution asymétrique des déterminants cellulaires alors qu'elle contribue dans les cellules somatiques, à l'assemblage local de complexes protéiques, à la croissance cellulaire polarisée ou au ciblage des protéines vers les organelles (revue, Du *et al.*, 2007). Par exemple, la localisation des transcrits à des sites privilégiés est un phénomène courant chez la drosophile, notamment dans l'oocyte où près de 10% des transcrits ont une destination bien spécifiée (Dubowy et Macdonald, 1998) ; ces derniers sont impliqués dans la détermination de l'axe antéro-postérieur de la drosophile. En revanche, il existe peu de données concernant la localisation intracellulaire des ARNm chez les plantes. Toutefois, les informations disponibles indiquent que l'adressage des ARNm est en relation directe avec le développement des plantes, notamment avec la croissance polarisée des feuilles (Im *et al.*, 2000).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la localisation des ARNm : (i) transport le long des microtubules ou des microfilaments ; (ii) transport actif directionnel, du noyau vers le

cytoplasme, (iii) diffusion à travers le cytoplasme puis séquestration au niveau du site de localisation ou (iv) diffusion puis dégradation dans le cytoplasme sauf à leur site de localisation où ils sont protégés (revue, Lipshitz et Smibert, 2000). Parmi ces mécanismes, le cytosquelette joue sans conteste un rôle essentiel dans le transport actif de la majorité des transcrits jusqu'à leur destination finale (revues, Lopez de Heredia et Jansen, 2004 ; St Johnston, 2005). Rappelons que le cytosquelette est non seulement impliqué dans la détermination de la forme des cellules, la ségrégation des chromosomes lors de la mitose ou de la méiose et le trafic des organelles mais qu'il constitue également un site pour la synthèse des protéines (Chuong *et al.*, 2004 ; revue, Wasteney, 2004). En effet, de nombreuses observations réalisées en microscopie électronique ont montré que des polysomes sont associés avec le cytosquelette, en particulier avec le réseau microtubulaire (Suprenant *et al.*, 1989 ; Taneja *et al.*, 1992 ; Han *et al.*, 2006).

Les microfilaments d'actine et de microtubules constituant le cytosquelette sont tous deux impliqués dans le transport des ARNm. De manière générale, les premiers assurent le transport à courte distance et les seconds, celui à longue distance. Cependant, il semblerait que le transport des transcrits se fasse chez la plante par les microfilaments d'actine alors que les microtubules servent plutôt de site d'ancrage de certains messagers et par conséquent sont le siège de la traduction de ces ARN (Muench et Park, 2006).

La localisation intracellulaire des ARNm est déterminée par des signaux dits zipcodes qui sont situés généralement dans leur région 3' UTR. Toutefois, dans certains cas, ces signaux peuvent aussi être présents dans la région 5' UTR voire même dans la séquence codante (revues, Jansen, 2001 ; Chabanon *et al.*, 2004). Ils sont extrêmement variables du point de vue longueur, structure et complexité, rendant ainsi difficile l'établissement d'une séquence ou d'une structure consensus. Ces signaux de localisation sont fréquemment constitués de courtes séquences répétées et/ou de structures secondaires voire tertiaires (tige-boucles) qui sont spécifiquement reconnus par des facteurs protéiques cytoplasmiques agissant en *trans* (« trans-acting factor »). Plusieurs zipcodes peuvent être présents sur un même transcrit et être responsables d'une localisation cellulaire séquentielle ou être impliqués dans des fonctions séparées, l'un dans l'adressage et l'autre dans l'ancrage des transcrits sur le cytosquelette.

L'interaction des protéines avec les signaux *cis* détermine la localisation cytoplasmique d'un transcrit. Ces facteurs diffèrent par leur composition, leur localisation cellulaire et les caractéristiques structurales leur permettant de reconnaître les ARN cibles. Ils contiennent en général, un ou plusieurs domaines de reconnaissance des ARNs, RRM (RNA recognition motif) ou des ARN double brin, dsRBD (double stranded RNA-binding domaine) ainsi que des signaux de localisation nucléaire (NLS) leur permettant de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau. Il devient de plus en plus évident que le processus de localisation des ARNm commence déjà dans le noyau où certains facteurs *trans* interagissent avec la séquence zipcode afin de les marquer et/ou de les escorter le long du cytosquelette jusqu'à leur destination finale dans le cytoplasme (revue, Farina et Singer, 2002). Après leur reconnaissance par les facteurs *trans* spécifiques, les transcrits sont acheminés vers leurs sites, sous forme de granules dont la taille peut atteindre 0,7 μm dans les cellules d'oligodendrocyte (Barbarese *et al.*, 1995). Ces granules sont des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) qui doivent probablement contenir l'ensemble des composants nécessaires pour le transport, la localisation, l'accrochage et la traduction des ARNm. Ainsi, dans les oligodendrocytes et dans les neurones (Bassell *et al.*, 1998), une fraction importante de la machinerie traductionnelle (ribosomes et le facteur d'élongation eEF2) accompagnent les transcrits jusqu'à leur lieu final en formant des granules (revue, Anderson et Kedersha, 2006). Dans les cellules de drosophile ou de levure, ces complexes se déplacent de manière directionnelle, du fait de l'association avec le cytosquelette (revue, Lopez de Heredia et Jansen, 2004). La traduction des ARNm s'effectue sur le cytosquelette par la machinerie traductionnelle emportée dans ces complexes. En effet, il a été démontré que plusieurs facteurs de traduction s'associent aux microtubules tels que des facteurs d'initiation (eIF3g, eIF4B, eIF4A, eIF(iso)4G), le facteur d'élongation EF-1 α , des protéines ribosomiques (L7, L10, S2, S3...) et des aminoacyl ARNt synthétases (Bokros *et al.*, 1995 ; Chuong *et al.*, 2004).

L'association de la machinerie traductionnelle avec le cytosquelette augmente certainement l'efficacité de la traduction par un phénomène de concentration locale des facteurs impliqués dans la synthèse protéique. Ainsi, les transcrits qui sont activement traduits, sont souvent isolés à partir des polysomes associés au cytosquelette (Davies *et al.*, 1998).

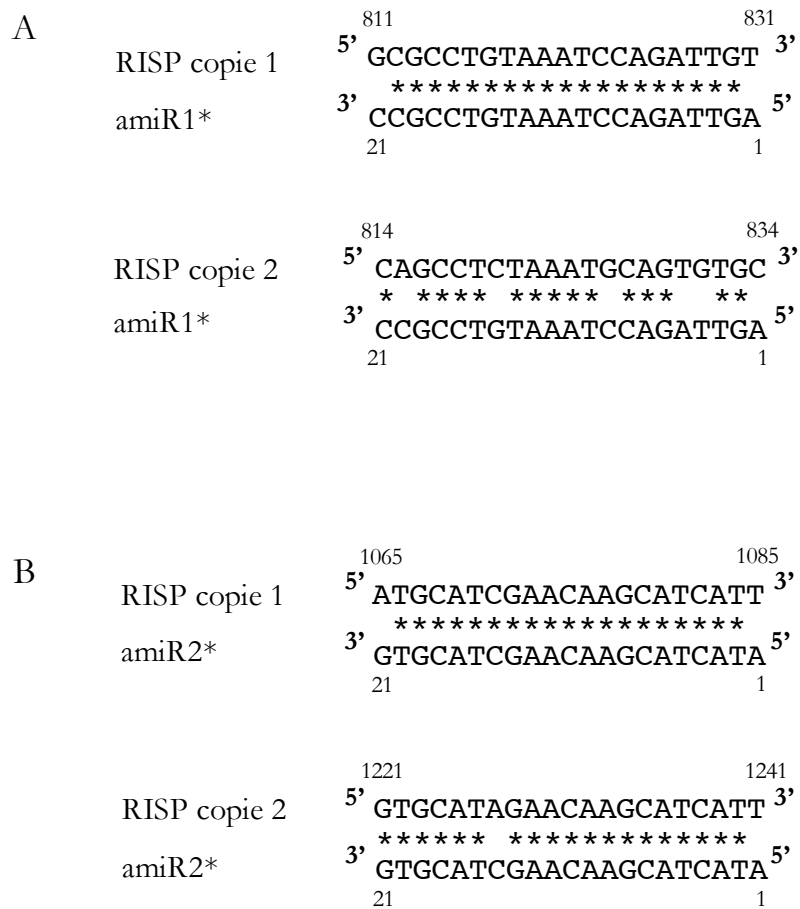


Figure 25 : Alignement des séquences nucléotidiques de l'amiR1 et de l'amiR2 avec les deux copies codant pour RISP.

Les miRNA artificiels (amiR) ont été dessinés pour empêcher spécifiquement l'expression des transcrits codant pour RISP. La copie complémentaire de l'amiR (amiR*) est également représentée.

A. amiR1 s'apparie spécifiquement au transcrit de la première copie de RISP (At5G61200) mais pas avec celui de la seconde copie (At5G0789).

B. amiR2 s'apparie avec les transcrits issus des deux copies de RISP.

II.3.2 Résultats

II.3.2.1 La protéine RISP est essentielle pour le développement des feuilles apicales

a. Obtention des plantes transgéniques

Deux allèles codant pour la protéine RISP sont présents chez *A. thaliana* ; les protéines correspondantes ont une homologie de séquence de 62%. Afin de diminuer spécifiquement le niveau d'expression de RISP, nous avons choisi l'approche du RNA silencing en utilisant un microRNA artificiel (amiRNA) qui cible spécifiquement le(s) transcrit(s) ce qui amènera la machinerie de l'ARN silencing à les cliver ou à inhiber leur traduction.

L'algorithme développé par Schwab *et al.* (2006) a été utilisé afin d'identifier l'amiRNA ayant la plus grande spécificité vis-à-vis de l'ARNm de RISP. Pour cela, plusieurs caractéristiques des miRNAs de plantes ont été prises en compte (Schwab *et al.*, 2005). L'appariement de la partie 5' du miRNA (positions 2 à 12) avec sa cible est le paramètre le plus important ; la région 5' du miRNA doit s'hybrider parfaitement avec l'ARN cible. Des mésappariements ne sont pas tolérés au niveau du site de clivage (positions 10 et 11) alors qu'ils le sont dans la région 3'. La présence d'une uridine en position +1 et d'une adénine en position +10 étant très fréquente dans les miRNAs de plante, la sélection de l'amiRNA se fera préférentiellement selon ces critères.

Deux amiRNAs ont pu être identifiés respectant l'ensemble des critères. L'un (amiR1) cible spécifiquement le transcrit correspondant à la copie désignée At5G61200 et l'autre (amiR2), les transcrits provenant des deux copies codant pour RISP, At5G61200 et At5G07890 (Figure 25). Afin de s'assurer que les amiRNAs ne reconnaissent pas d'autres ARN (off-target), la séquence des amiRNAs sélectionnés a été comparée à la base de données de TAIR (<http://wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl?page=2>). L'analyse montre qu'aucun autre transcrit n'est reconnu par les deux amiRNAs ce qui suggère que seuls les transcrits d'intérêt seront ciblés par les amiRNAs.

L'expression des amiRNAs est sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV, ce qui permet de produire de grandes quantités d'ARN quel que soit le tissu de la plante. La quantité d'amiRNA synthétisé devrait théoriquement suffire à fortement diminuer l'expression de RISP. Les organes floraux de la plante *A. thaliana*, écotype WS, ont été

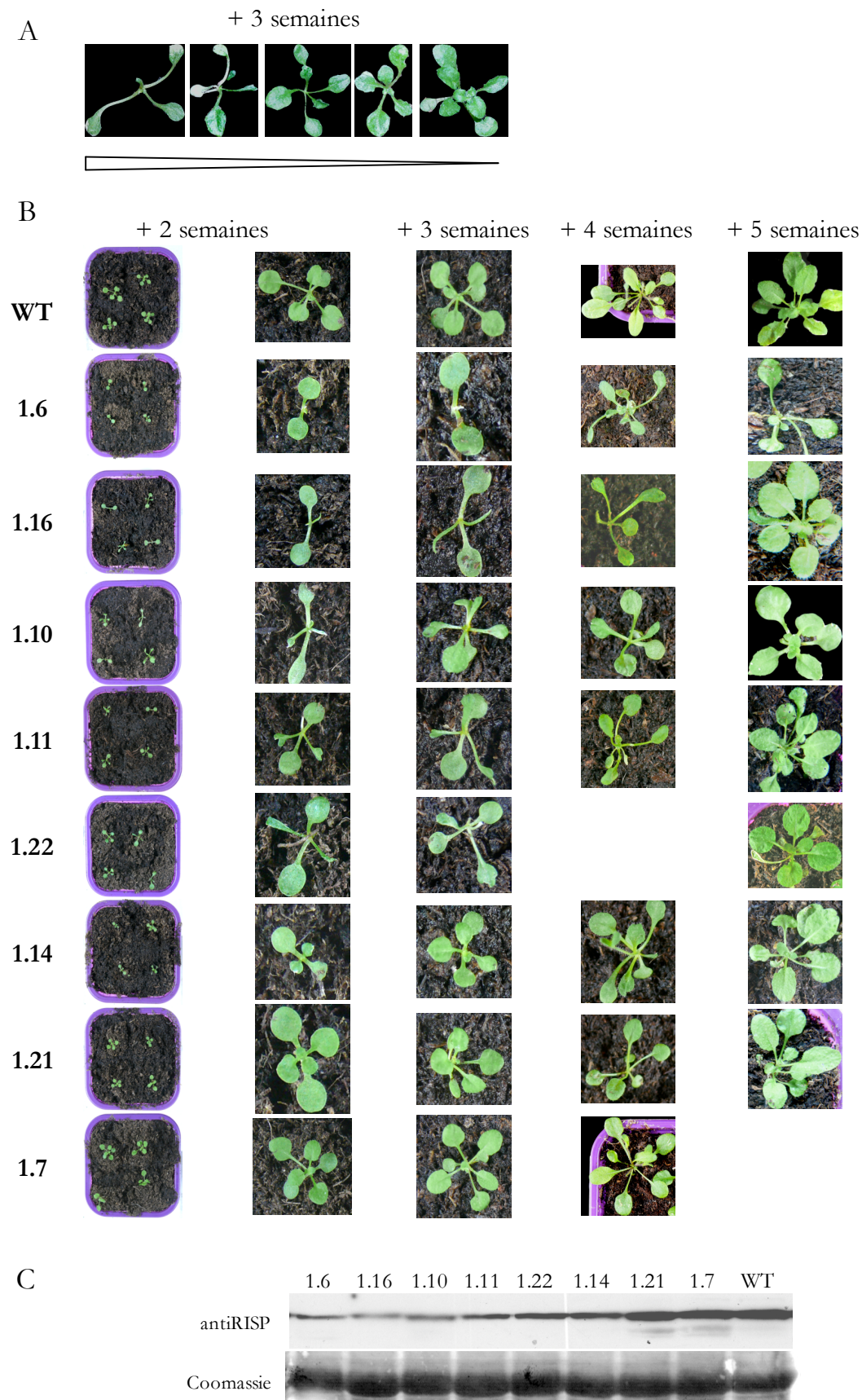


Figure 26 : Plantules d'*A. thaliana* exprimant l'*amiR1*.

A. Photographies des *A. thaliana* (écotype WS) de génération F1 de différentes lignées exprimant l'*amiR1*.

B. Photographies d'*A. thaliana* sauvage (WT) et des différentes lignées de génération F2 exprimant l'*amiR1* (1.X) (prises à deux, trois et à 4 semaines après germination).

Les mutants sont ordonnés selon l'importance du phénotype par ordre décroissant.

C. Le niveau d'expression de la protéine RISP pour l'*A. thaliana* sauvage et les différentes lignées des plantules *amiR1* a été évalué en révélant RISP par western blot à partir d'un extrait de protéines totales. La présence de la grande sous unité de la protéine RubisCO est révélée par coloration au bleu de Coomassie.

transformés par *A. tumefaciens*, contenant la construction amiR1 ou amiR2, selon la méthode dite de « dip floral » (voir IV.2.1.1). Les graines obtenues sont mises sur un milieu contenant de la kanamycine afin de ne sélectionner que celles qui possèdent la construction d'intérêt.

b. Phénotype des plantes exprimant l'amiRNA dirigée contre RISP

Des plantules d'*A. thaliana* de génération F1 exprimant l'amiRNA 1 (amiR1) ont été obtenues mais aucune exprimant l'amiRNA 2 (amiR2) qui cible les deux transcrits de RISP n'ont pu l'être, ce qui suggère que l'extinction de l'expression des deux gènes est létale pour la plante. Les plantules F1 amiR1 sont caractérisées par un gradient phénotypique assez prononcé qui est sans doute associé au niveau d'expression d'amiR1. Nous devons donc réalisé un northern afin de vérifier cette hypothèse. Les plantules dont le phénotype est le plus fort n'ont pas survécu ; elles ont péri une à deux semaines après apparition des premières feuilles. Les feuilles apicales des autres plantules sont abortives ou présentent des anomalies sévères tel qu'un phénotype filliforme et un hypocotyle allongé. Par ailleurs, les feuilles se développent symétriquement en forme d'hélice avec une rotation vers la gauche (« left-handed twisting ») (Figure 26A).

Les graines issues de l'autofécondation des plantes F1 ont été mises à germer sur un milieu sélectif afin d'obtenir des plantes F2. Ces dernières présentent un gradient phénotypique similaire à celui des plantes F1 ; celui-ci est en corrélation avec le niveau d'expression de la protéine RISP (Figures 26B et 26C). En effet, lorsque nous analysons à l'aide d'anticorps polyclonaux, le taux de protéine RISP présent dans les différentes plantules transformées, nous constatons que celles ayant un phénotype prononcé renferment moins de protéine RISP que les plantules peu affectées par l'expression de l'amiR1. Ces dernières possèdent une quantité de protéine RISP équivalente à celle trouvée dans les plantules sauvages (Figure 26C). A deux semaines, les lignées présentant les phénotypes les plus sévères sont caractérisées par un retard important de l'apparition des deux premières feuilles apicales (lignées 1.6 et 1.16) (Figure 26B) ou par une malformation foliaire sévère (lignées 1.10, 1.11 et 1.22). En effet, ces feuilles montrent un défaut de développement avec un hypocotyle très allongé et aminci (lignée 1.16), ou ont un limbe en forme de cœur (lignée 1.11). La morphologie des feuilles apicales de certaines lignées est similaire à celle des plantes sauvages mais les plantes présentent un retard de croissance plus ou moins important. Ainsi, la lignée 1.14 possède deux feuilles apicales à peine formées alors que la

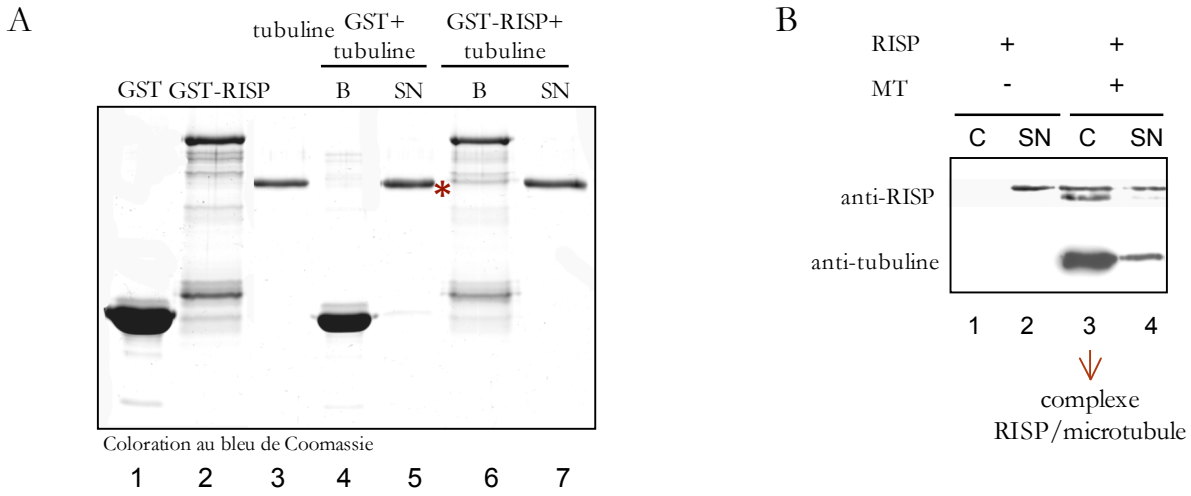


Figure 27 : La protéine RISP s'associe avec la tubuline et les microtubules *in vitro*.

A. 10 μg de tubuline sont incubés en présence de GST (4, 5) ou de 5 μg de GST-RISP (6, 7) associées aux billes de sépharose. Les protéines correspondant aux billes (B) ou au surnageant (SN) sont révélées après SDS-PAGE au bleu de Coomassie.

B. 5 μg protéine RISP sont incubés en présence (3, 4) ou non (1, 2) de 5 μg de microtubules (MT) stabilisés par le taxol puis l'ensemble est déposé sur un coussin de saccharose 30%. Après sédimentation, les protéines présentes dans le culot (C) et le surnageant (SN) sont analysées par SDS-PAGE. La présence de la protéine RISP et des microtubules est révélée par western blot en utilisant les anticorps dirigés contre RISP (anti-RISP) et la tubuline α (anti-tubuline).

lignée sauvage en possède 4 à 6 au même stade de croissance. A trois semaines, la différence de phénotypes entre la lignée sauvage et les lignées transgéniques est plus prononcée. Les feuilles apicales des lignées 1.6, 1.10, 1.11, 1.16 et 1.22 ne se sont pas ou très peu développées, et ce toujours en forme de filament. Les plantes de la lignée 1.14 ne comprennent que quatre feuilles relativement bien formées alors que les plantes sauvages portent au même stade déjà 6 à 8 feuilles. Après quatre à cinq semaines de culture, la majorité des plantes de la lignée 1.6 ont dépéri. En ce qui concerne les plantes des lignées 1.10, 1.11, 1.14, 1.16 et 1.22, elles présentent une distorsion en forme d'hélice de certaines feuilles apicales. Cependant, vers cinq à six semaines, ces feuilles retrouvent un phénotype sauvage.

L'expansion isotropique des cellules végétales requiert un réseau organisé de microtubules corticaux. Chez *A. thaliana*, les mutations de la tubuline α ou β , ou de certaines protéines associées aux microtubules, affectent leur stabilité et provoquent une croissance en hélice des feuilles, un phénotype qui est similaire à celui des plantes amiR1, suggérant que la protéine RISP pourrait s'associer avec les microtubules.

II.3.2.2 Les microtubules, un nouveau partenaire de RISP

a. La protéine RISP interagit directement avec la tubuline et les microtubules

Afin d'établir si la protéine RISP interagit directement avec la tubuline α et β , la protéine GST et la protéine de fusion GST-RISP ont été produites chez *E. coli* puis associées à des billes de sépharose 4B (article 2). Pour cette expérience, nous avons utilisé des microtubules constitués exclusivement de tubulines α et γ et purifiés à partir de cerveau de porc (don de A.-C. Schmit). La tubuline a été incubée la nuit sous agitation à 4°C avec les protéines GST ou GST-RISP. Après une brève centrifugation, le surnageant comprenant les protéines n'ayant pas d'affinité pour les protéines GST ou GST-RISP (fraction SN) a été écarté alors que les protéines associées aux billes ont été lavées avec du tampon d'association puis éluées (fraction B). Les protéines des deux fractions, de même que la tubuline, ont été déposées sur un gel SD-PAGE puis après électrophorèse révélées par coloration au bleu de Coomassie. Comme le montre la Figure 27A, la tubuline est présente dans le surnageant après avoir été incubée avec la GST (col 5) indiquant qu'elle n'interagit pas de manière aspécifique avec la

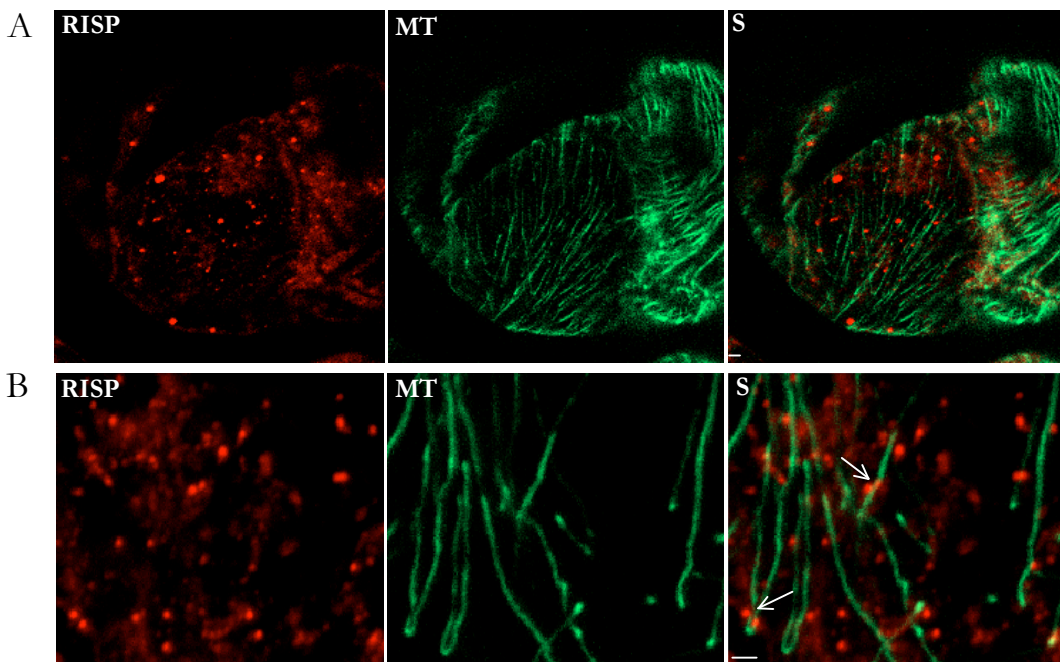


Figure 28 : La protéine RISP colocalise avec les microtubules dans les cellules BY-2 de tabac.

Immunomarquage de la protéine RISP endogène dans une cellule entière (A) ou dans une portion de cellule (B) de tabac BY2 exprimant la protéine de fusion GFP-MAP 65.5.

Seul un plan focal est montré ici. La protéine RISP est révélée par l'anticorps dirigé contre RISP reconnu par l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 568 (rouge). Les microtubules sont visualisés par émission dans le vert. Les doublets de RISP qui colocalisent avec les microtubules sont signalés par des flèches blanches.

MT : microtubule ; S : superposition. La barre correspond à une longueur d'un μM .

protéine GST. En revanche, après incubation avec la protéine GST-RISP, la tubuline est certes présente majoritairement dans le surnageant (col 7) mais des quantités relativement faibles sont également détectées dans la fraction liée (col 6) démontrant que la protéine RISP interagit directement avec la tubuline. Cependant, l'interaction de RISP avec la tubuline ne signifie pas pour autant qu'elle se lie aux microtubules. En effet, il a été montré que des protéines sont capables d'interagir avec la tubuline mais pas avec les microtubules et qu'elles empêchent en fait la polymérisation de la tubuline (Uckun *et al.*, 2000). Afin de déterminer qu'elle interagit aussi avec les microtubules, la protéine RISP a été purifiée comme décrit précédemment, éluée des billes par clivage enzymatique de l'étiquette GST grâce à la protéase PreScission et incubée en présence ou non de microtubules stabilisés à 37°C en présence de taxol et de GTP. Le milieu d'incubation a été déposé sur un coussin de saccharose 30% puis centrifugé à 100 000 g pendant 20 min à 25°C. Le coussin contenant les protéines libres a été écarté et le culot contenant les microtubules a été délicatement lavé à l'aide du tampon d'incubation. Les protéines du surnageant (SN) et du culot (C) ont été déposées sur un gel SDS-PAGE puis, après électrophorèse, la présence de RISP et de la tubuline a été révélée grâce à des anticorps dirigés respectivement contre RISP et la tubuline α (Figure 27B). En absence de microtubules, la protéine RISP est présente seulement dans le surnageant, son coefficient de sédimentation étant trop faible pour qu'elle puisse sédimenter à travers le coussin de saccharose ; les conditions de centrifugation utilisées pour cette expérience sont suffisamment stringentes pour ne sédimenter que les microtubules. En revanche, après incubation avec les microtubules, la protéine RISP est présente dans le culot (col 3) et dans le surnageant (col 4), indiquant qu'elle interagit avec les microtubules. La protéine de masse moléculaire légèrement inférieure à celle de RISP correspond sans doute à un produit de dégradation de RISP car elle est révélée par les anticorps anti-RISP.

b. La protéine RISP colocalise avec les microtubules *in planta*

L'interaction observée *in vitro* entre la protéine RISP et les microtubules nous a conduit à voir si cette protéine colocalise avec les microtubules *in vivo*. Pour cela, nous avons procédé à l'immunodétection de la protéine RISP endogène dans des cellules de tabac BY-2 qui expriment constitutivement la protéine de fusion GFP-MAP 65.5. La protéine MAP 65.5 est une protéine associée aux microtubules qui permet de visualiser le réseau de microtubules corticaux au microscope à fluorescence. La protéine RISP est détectée par l'utilisation d'un

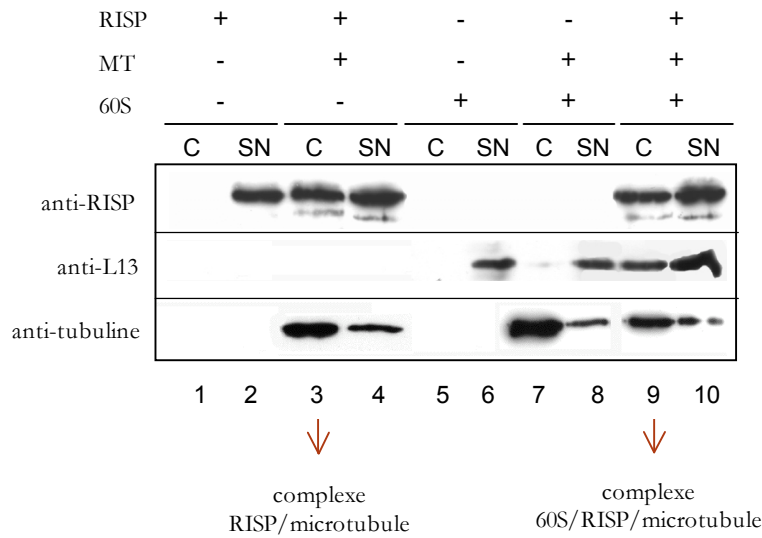


Figure 29 : La sous unité 60S s'associe avec les microtubules seulement en présence de la protéine RISP.

25 pmol de la sous unité 60S sont incubés en présence de microtubules (MT) stabilisés par le taxol en absence (7, 8) ou en présence de 10 μ g RISP (9, 10) puis le mélange est centrifugé sur un coussin de saccharose 30%. Les protéines du culot (C) et du surnageant (SN) sont analysées par SDS-PAGE. La protéine RISP, la sous unité 60S et les microtubules sont détectés par western blot en utilisant les anticorps dirigés respectivement contre RISP (anti-RISP), la protéine L13 (anti-L13) et la tubuline α (anti-tubuline).

anticorps spécifique et un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 568 (émission dans le rouge) alors que le réseau microtubulaire est révélé par fluorescence de la GFP par le canal vert (Figure 29 A et B).

La protéine RISP est présente dans le cytoplasme, formant des granules de tailles variant généralement de 0,3 à 0,5 μm mais certains peuvent atteindre 1 μm comme cela a été décrit dans l'article 2. Une proportion significative des granules colocalise parfaitement le long des microtubules comme le montre la surperposition des images des cellules obtenues respectivement dans le rouge et dans le vert (Figure 28A) ce qui suggère que les granules de RISP sont associées aux microtubules. Dans certains cas, deux granules sont trouvés de part et d'autre d'un microtubule formant ainsi des doublets (Figure 28B, flèches blanches). Les mêmes observations ont été faites dans les cellules épidermiques de *N. benthamiana* exprimant constitutivement la protéine GFP-tubuline (données non montrées).

Ces résultats indiquent donc qu'une population des granules, formée de la protéine RISP, colocalise avec les microtubules de la cellule végétale.

II.3.2.3 RISP, lien entre les microtubules et les ribosomes ?

a. RISP médie l'interaction entre la sous unité 60S des ribosomes et les microtubules *in vitro*

Les résultats présentés dans l'article 2 montrent que la protéine RISP interagit directement avec la sous unité ribosomique 60S. Sachant que RISP se lie aussi aux microtubules, nous avons donc voulu déterminer si elle sert de lien moléculaire pour l'association de la sous unité 60S avec les microtubules *in vitro*.

Afin de tester cette hypothèse, les sous unités 60S de germes de blé ont été purifiées sur un gradient de saccharose et incubées avec des microtubules en présence ou non de la protéine RISP. Après incubation, le complexe est centrifugé à travers un coussin de saccharose de 30%. Les protéines contenues dans le surnageant et le culot sont séparées sur SDS-PAGE, puis la protéine RISP et la tubuline ont été détectées par western blot comme décrit précédemment, alors que la présence de la sous unité 60S a été révélée par immunodétection de la protéine ribosomique L13 (Figure 29).

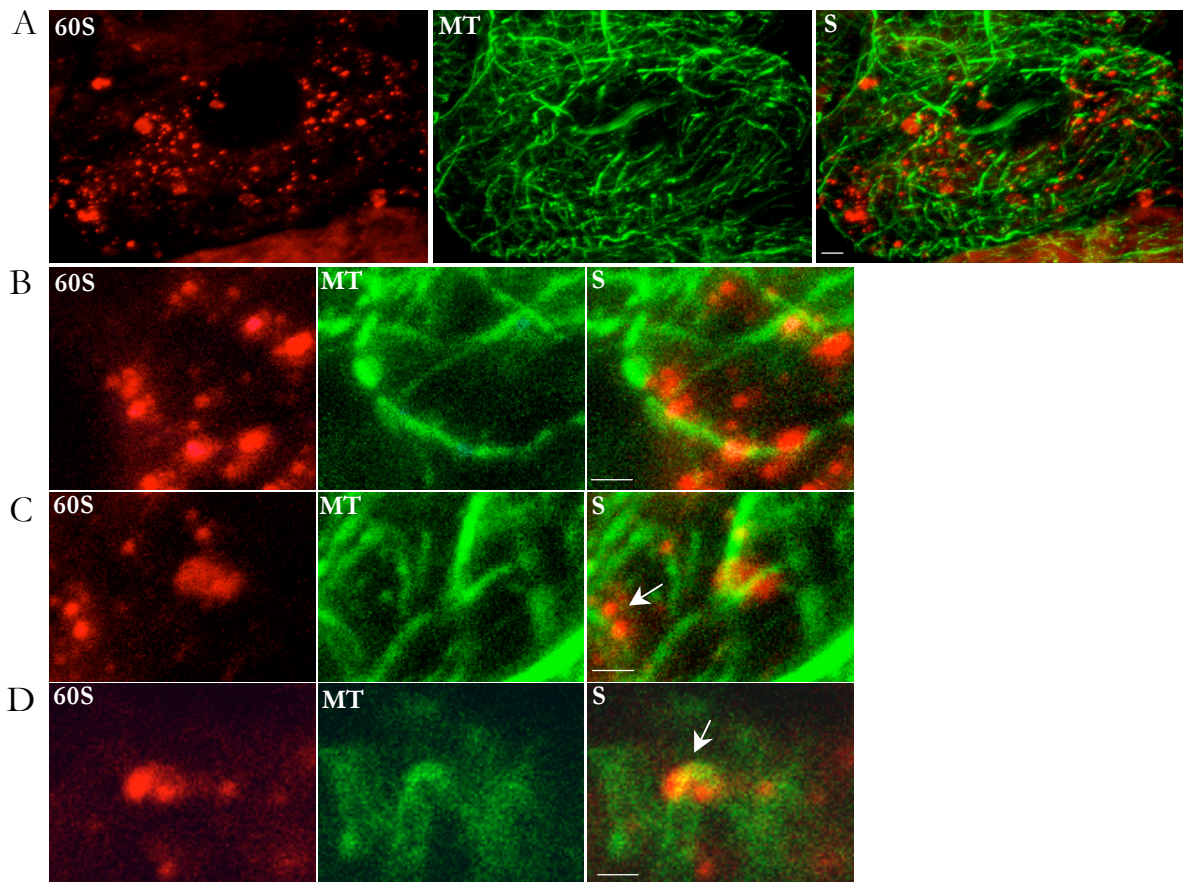


Figure 30 : La sous unité 60S colocalise avec les microtubules dans les cellules BY-2 de tabac.

Immunomarquage de la sous unité 60S dans une cellule de tabac BY2 exprimant la protéine de fusion GFP-MAP 65.5. Seul un plan focal est montré ici. La sous unité 60S est révélée par l'anticorps @60S reconnu par l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa (rouge). Les microtubules sont visualisées par émission dans le vert.

Les images B, C et D sont des images agrandies de la cellule A. Les doublets de la sous unité 60S qui colocalisent avec les microtubules sont signalés par des flèches blanches.

60S : sous unité 60S ; MT : microtubules ; S : superposition. La barre correspond à 1 μm .

La protéine RISP (col 2) et la sous unité 60S libre (col 6) ne traversent pas le coussin de saccharose. En revanche, après incubation avec les microtubules, de même qu'un très faible pourcentage de la sous unité 60S (col 7). La sous unité 60S reste presque exclusivement dans le surnageant (col 8). Nous pouvons remarquer que le surnageant renferme également de la tubuline démontrant que tous les microtubules n'ont pas été sédimentés à moins qu'il s'agisse de la tubuline libre dans le milieu d'incubation. La sous unité 60S est retrouvée dans le culot après avoir été incubée en présence de la protéine RISP et des microtubules (col 9). L'interaction *in vitro* de la sous unité 60S avec les microtubules est donc dépendante de la présence de la protéine RISP. La faible association de la sous unité 60S avec les microtubules (col 7) doit résulter de la présence de la protéine RISP endogène qui a été co-purifiée avec les ribosomes de germes de blé (Figure 3A de l'article 2). En résumé, ces résultats montrent donc que la sous unité 60S est incapable d'interagir directement avec les microtubules, à l'inverse de la protéine RISP, et qu'elle le fait que par l'intermédiaire de RISP.

b. La sous unité 60S colocalise avec les microtubules *in planta*

Une part importante de la population des granules constitués par la protéine RISP colocalise avec la sous unité 60S dans la cellule végétale (Figure 1F de l'article 2). Pour déterminer si les sous unités 60S colocalisent avec les microtubules au même titre que la protéine RISP, nous avons révélé leur présence par immunodétection dans des cellules de tabac BY-2 transgéniques exprimant la protéine GFP-MAP65.5 ainsi que des cellules épidermiques de *N. benthamiana* GFP-tubuline. La sous unité 60S a été révélée par un anticorps dirigé contre les protéines ribosomiques P0, P1 et P2 de cellules humaines (figure supplémentaire 2 de l'article 2) et par un anticorps secondaire couplé à l'alexa 568 (émission dans le rouge).

Nous avons montré que les sous unités 60S sont présentes dans le cytoplasme et autour du noyau sous forme de granules de tailles variables, vraisemblablement à cause de leur composition en polysomes. Comme le montre la surperposition des images montrant les granules (rouge) et le réseau de microtubule (vert), la majorité des granules sont libres dans le cytoplasme mais certains sont visibles le long des microtubules (Figure 30). Nous pouvons également mettre en évidence, comme observé avec la protéine RISP, des « doublets » de granules de 60S de part et d'autre des microtubules (Figure 30.D, flèche blanche). Ces résultats suggèrent que les granules sont constituées, entre autres, de la sous unité 60S et de

la protéine RISP et que cet ensemble colocalise avec les microtubules *in planta*. Evidemment, il convient de réaliser un triple marquage (RISP, sous unité 60S et microtubules) pour prouver de manière définitive l'association de ces trois constituants cellulaires.

II.3.3 Discussion

La protéine RISP est une protéine cellulaire de fonction inconnue présente uniquement chez les plantes et qui interagit spécifiquement avec la sous unité ribosomique 60S. Elle est recrutée par la protéine virale TAV du virus de la mosaïque du chou fleur afin de promouvoir la réinitiation de la traduction d'ARNm polycistronique. Plusieurs approches ont été utilisées afin de déterminer la fonction de RISP dans la cellule. La première consista à caractériser ses partenaires cellulaires éventuels en criblant une banque d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* chez la levure selon la technique du double hybride. La toxicité de RISP ou de ses domaines N- et C-terminaux dans la levure n'ont pas permis de caractériser des partenaires. La deuxième approche que nous avons mise en œuvre a consisté à diminuer *in planta* l'expression de la protéine RISP en induisant le silencing de l'une ou des deux copies du gène correspondant à l'aide de miRNA artificiels. Le phénotype exprimé par ces plantes a abouti à la démonstration que la protéine RISP interagit avec les microtubules. De plus, la protéine RISP semble médier l'interaction de la sous unité 60S avec les microtubules.

II.3.3.1 Phénotype des plantes d'*Arabidopsis* exprimant peu la protéine RISP

L'extinction des deux copies codant pour la protéine RISP par un miRNA artificiel est létale pour la plante. Seul le « silencing » de l'une des deux copies permet d'obtenir des plantes viables exhibant un phénotype plus ou moins marqué. Cependant, celles qui ont un phénotype très prononcé ne survivent pas plus de quelques jours, ce qui suggère que la protéine RISP joue un rôle essentiel dans le développement de la plante. Le phénotype des plantes de génération F2 est similaire à celui des plantes dont le méristème apical foliaire (SAM, « shoot apical meristem ») est manquant ou non fonctionnel. Il se caractérise par un retard dans l'apparition des feuilles apicales, par un défaut de leur développement et par un hypocotyle long et filiforme. Ce méristème, situé entre les deux cotylédons, permet la

formation d'organes apicaux sur les côtés latéraux tout en maintenant des cellules totipotentes en son centre. Plusieurs mutants, tels que *PINHEAD/ZWILLE* (*PNH*) et *ARGONAUTE 1* (*AGO1*), caractérisé par un méristème apical non fonctionnel, montrent un phénotype similaire (Lynn *et al.*, 1999). *PNH* et *AGO1* codent deux protéines de la famille des Argonautes qui possèdent une homologie très importante avec le facteur d'initiation de la traduction eIF2C ; ce dernier stabilise l'interaction entre le complexe ternaire et la sous unité 40S, lors de l'initiation de la traduction (Roy *et al.*, 1988). La protéine AGO1 d'*A. thaliana* est aussi un élément central du PTGS (post-transcriptional gene silencing) en induisant, entre autres, le clivage des ARNm ciblés par des miRNA. Ces protéines sont donc fortement impliquées dans la régulation de l'expression des gènes au niveau traductionnel. Il est cependant intéressant de noter que les feuilles apicales de tous les mutants amiR1, lesquels sont âgées de 4 à 5 semaines, recouvrent totalement le phénotype sauvage. De ce fait, la protéine RISP n'est peut être nécessaire que lors du développement des premières feuilles apicales. Alternativement, comme elle appartient à une famille multigénique, l'augmentation de l'expression de la seconde copie de RISP pourrait compenser la perte d'expression de la première. Nous devons donc déterminer, par des expériences de northern et/ou de PCR semi-quantitative, le taux de transcrits issus des deux copies du gène RISP, au niveau des feuilles apicales des mutants amiR1, avant et après le recouvrement du phénotype avant de conclure quant à l'importance de la protéine RISP dans le développement des organes foliaires de la plante.

II.3.3.2 La protéine RISP est-elle une MAP ?

Trois semaines après germination, les feuilles des mutants d'*Arabidopsis* amiR1 exhibent une torsion en hélice vers la gauche. Plusieurs mutants d'*A. thaliana* de phénotype similaire ont déjà été isolés ; ils se caractérisent tous par des mutations dans les protéines associées aux microtubules ou dans les tubulines α et β , affectant la stabilité des microtubules (Thitamadee *et al.*, 2002 ; Ishida *et al.*, 2007). La torsion des organes est le résultat d'un défaut d'expansion cellulaire isotropique probablement due à une mauvaise réorganisation des polysaccharides constituant la paroi cellulaire. Or, la déposition orientée des microfibrilles de cellulose sur la paroi cellulaire est contrôlée par les microtubules corticaux (Baskin, 2001 ; Baskin *et al.*, 2004), ce qui suggère que le phénotype observé résulte

d'un défaut dans la stabilité des microtubules corticaux. Cependant, contrairement à ces mutants d'*A. thaliana*, les organes racinaires et floraux du mutant amiR1 ne semblent pas montrer de torsion (données non présentées) ce qui pourrait signifier que la protéine RISP n'est bien exprimée que dans les feuilles. Nous avons montré *in vitro* et *in vivo* que la protéine RISP est associée aux microtubules confirmant l'association de RISP avec les microtubules. Néanmoins, la faible association de GST-RISP avec la tubuline est relativement suprenant. La présence de l'étiquette GST en N-terminale de RISP doit modifier l'accessibilité de cette extrémité qui pourrait être requis pour la liaison avec la tubuline. Des expériences de sédimentation avec différents mutants de délétion de RISP permettraient de déterminer le domaine d'interaction de RISP avec les microtubules. La désorganisation du méristème apical foliaire pourrait être due à la déstabilisation des microtubules suite à l'expression réduite de la protéine RISP. En effet, un des rôles des microtubules est de permettre la ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire.

Cependant, faut-il en conclure que la protéine RISP est une MAP (microtubule associated proteine) impliquée dans la stabilisation des microtubules ? Pour cela, il serait intéressant d'éteindre l'expression de la protéine RISP en agroinfiltrant des feuilles de *N. benthamiana* GFP-tubuline par la construction amiR1 ou amiR2 puis de visualiser l'intégrité du réseau microtubulaire.

II.3.3.3 Rôle de la protéine RISP dans la localisation de la machinerie traductionnelle au niveau du cytosquelette

La protéine RISP médie *In vitro* l'interaction entre les sous unités 60S et les microtubules ce qui suggère que la protéine RISP permettrait la concentration des ribosomes à certains points du réseau microtubulaire favorisant localement la traduction de certains ARNm sur les microtubules. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la protéine RISP est majoritairement associée *in vivo* avec les sous unité 60S et que ces dernières sont détectables au niveau des microtubules. A ce jour, aucune étude n'a démontré l'implication d'une protéine végétale dans l'interaction des ribosomes avec les microtubules. En revanche, nous connaissons l'exemple d'une protéine, nommée EMAP (echinoderm MAP), qui a été purifiée à partir d'un complexe polysome/microtubules provenant d'oeufs d'oursin et qui semble jouer ce rôle (Suprenant *et al.*, 1993). Des observations en microscopie électronique révèle la

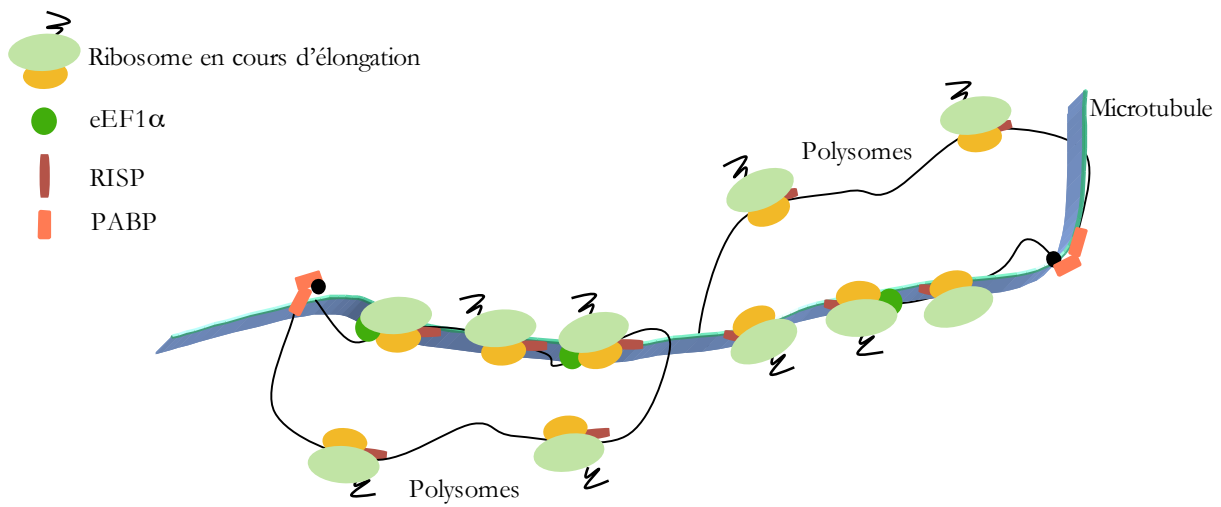


Figure 31 : Modèle de l'association de la protéine RISP avec la sous unité 60S sur les microtubules.

Certains ARNm sont traduits sur les microtubules et requiers l'association de la machinerie traductionnelle avec les microtubules tels que les polysomes, la protéine PABP et le facteur d'élongation eEF1 α . La protéine RISP est localisée sur la sous unité 60S et pourrait médier l'association de la sous unité 60S, ou des polysomes, avec les microtubules.

présence d'une « tige » qui pourrait être la protéine EMAP (Hamill *et al.*, 1994), établissant la connection entre les microtubules et les ribosomes.

D'après les observations en microscopie confocale, les granules marquées par les anticorps dirigés contre la sous unité 60S ou la protéine RISP, sont de taille relativement importante, entre 0,5 et 1 μm , et nettement supérieure à celle des ribosomes (30 nm). Il est donc vraisemblable que d'autres facteurs composent ces agrégats. Il serait intéressant de déterminer si des facteurs de la machinerie traductionnelle tel que la sous unité 40S ou les facteurs d'initiation de la traduction colocalisent avec les granules de RISP comme cela est le cas des particules ribonucléoprotéiques visualisées dans les cellules d'oligodendrocytes (0,6-0,8 μm) (Barbarese *et al.*, 1995), dans les neurones (0,7 μm) (Bassell *et al.*, 1998) et dans les cellules endospermiqes du riz (0,5-0,1 μm) (Hamada *et al.*, 2003). En effet, ces particules résultent de l'association de plusieurs éléments de la machinerie traductionnelle, notamment des ribosomes et des ARNm (Barbarese *et al.*, 1995), permettant le transport *via* le cytosquelette puis l'ancrage d'ARNm (Wilhelm et Vale, 1993). Cependant, nous n'avons pas pu déterminer *in vivo* si les granules formés par RISP se déplaçaient dans le cytoplasme car la protéine de fusion RFP-RISP utilisée à cet effet ne forme pas d'agrégat mais au contraire diffuse dans le cytoplasme.

Au vu de ces résultats, nous proposons un modèle dans lequel la protéine RISP, associée aux ribosomes via la sous unité 60S médie l'ancrage des ribosomes sur les microtubules afin de former des « points chauds » de la traduction et permettre la traduction de certains transcrits localisés sur les microtubules (Figure 31).

La localisation intracellulaire des ARNm dans la plante semble être un processus essentiel gouvernant la croissance cellulaire polarisée et le développement de la plante (Okita et Choi, 2002). L'absence de RISP pourrait conduire à une baisse de la traduction de es ARN au niveau des microtubules, ce qui expliquerait le retard de croissance et les défauts développementaux exhibés par les plantes amiR.

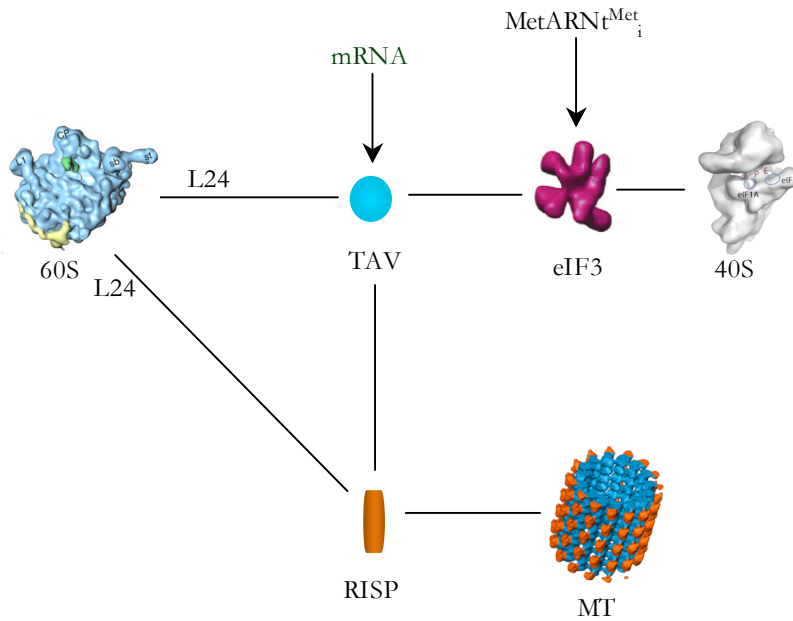


Figure 32 : Représentation schématique des interactions entre les protéines TAV, RISP et la machinerie traductionnelle.

Les protéines TAV et RISP s'associent avec la sous unité 60S par le biais des différentes protéines ribosomiques. La protéine TAV s'associe avec la sous unité 40S *via* le facteur d'initiation eIF3, la protéine RISP avec les microtubules (MT). Le facteur eIF3 est requis pour l'acquisition du complexe ternaire (eIF2-GTP-MetARnt^{Met}) par la sous unité 40S et TAV, vraisemblablement pour recruter l'ARN 35S et ses versions épissées.

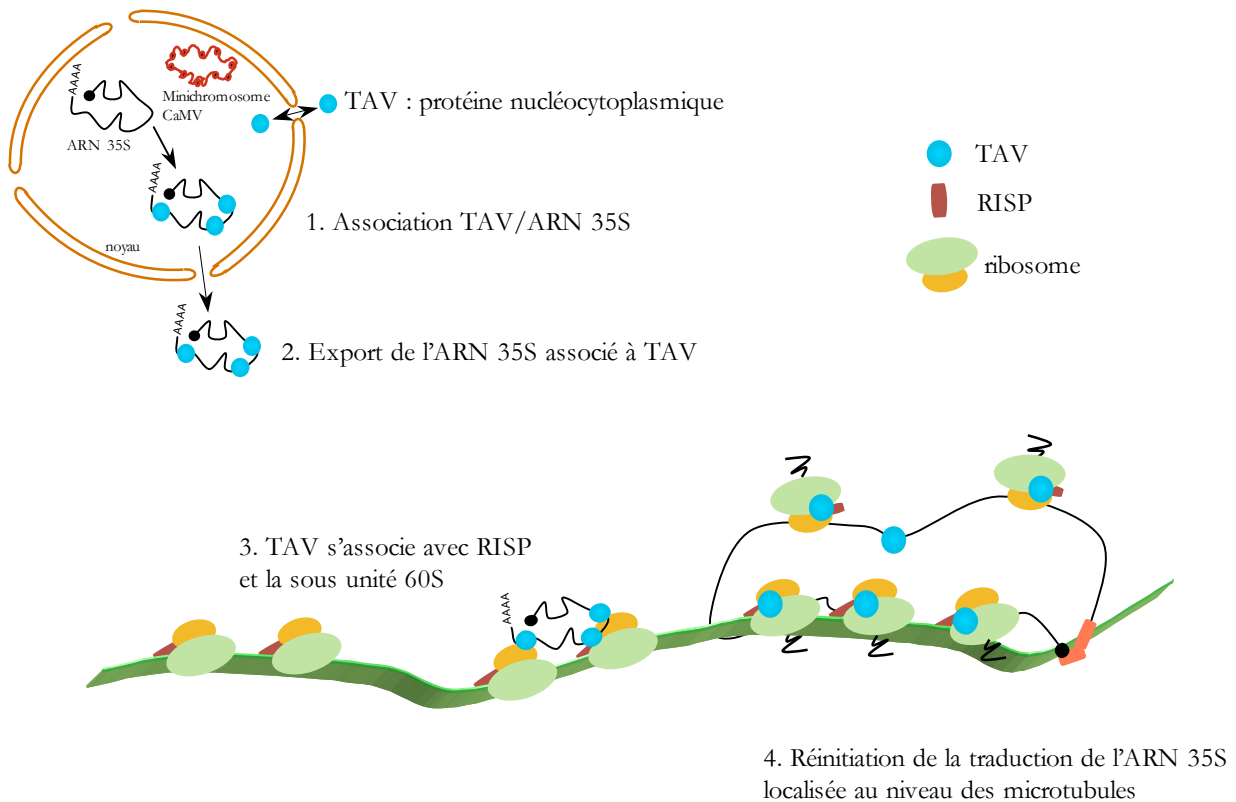


Figure 33 : Modèle de la localisation et de la traduction de l'ARN35S du CaMV au niveau des microtubules.

La protéine virale TAV fait la navette nucléocytoplasmique ; elle pourrait s'associer avec l'ARN 35S dans le noyau (1) et médier son export dans le cytoplasme vers les microtubules (2) puis interagir avec les microtubules via la sous unité 60S et/ou la protéine RISP (3) où aura lieu la traduction (4). Alternativement, l'association de TAV, de l'ARN 35S et des ribosomes contenant RISP peut se faire avant leur fixation sur les microtubules.

II.3.3.4 Rôle de la protéine RISP et des microtubules dans la traduction des transcrits du CaMV

La protéine TAV du CaMV recrute la protéine RISP afin de promouvoir la réinitiation de la traduction de l'ARN polycistronique 35S et ses versions épissées comme le montre les tests de transactivation réalisés dans des protoplastes. La sous unité ribosomique 60S devant être un facteur limitant pour la réinitiation de la traduction, le recrutement de RISP, associée à ces sous unités, par la protéine TAV permettrait de concentrer ces sous unités au niveau des microtubules et favoriser ainsi la traduction des ARN polycistroniques viraux. En effet, comme les complexes 60S/RISP semblent s'associer avec les microtubules, nous pensons que la traduction de ces ARN a lieu préférentiellement sur le cytosquelette (Figure 32). Les microtubules constitueraient ainsi une structure permettant d'arrimer la machinerie traductionnelle et créer ainsi un environnement propice à la réinitiation de la traduction.

Nous avons découvert au laboratoire que la protéine TAV est une navette nucléocytoplasmique. Il n'est donc pas exclu que la protéine TAV s'associe aux transcrits viraux dans le noyau grâce à ses domaines de liaison aux ARN (Ceritelli, 1998) puis les exporte vers le cytoplasme au niveau des microtubules où ils seront pris en charge par les ribosomes contenant RISP afin d'amorcer la traduction (Figure 33). Il est intéressant de noter que lors du criblage d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana* chez la levure effectué par Lyubov Ryabova, un partenaire de la protéine TAV a été isolé comme appartenant à la famille des kinésines, cette protéine est nommée GRIMP (Geminivirus Rep Interacting Motor Protein). Les kinésines sont des protéines motrices s'associant avec les microtubules pour transporter de manière antérograde des protéines vers l'extrémité + des microtubules. La protéine GRIMP a été découverte comme interagissant avec la protéine AL1 des geminivirus (Kong et Hanley-Bowdoin, 2002) qui est essentielle pour la réplication virale (Elmer *et al.*, 1988). La protéine TAV colocalise avec les microtubules dans les feuilles de navet infectées par le CaMV (Mikhail Shchepetilnikov, communication personnelle) alors qu'elle est incapable d'interagir directement avec les microtubules *in vitro* (donnée non présentée), suggérant la présence d'un intermédiaire qui pourrait être la protéine GRIMP.

Malheureusement, à ce jour aucune donnée concrète n'a permis de démontrer que le cytosquelette est employé par les virus de plantes pour traduire localement les transcrits viraux. En revanche, un modèle a été proposé par Mallardo *et al.* (2001) pour expliquer

comment le virus de la vaccine exploite le réseau microtubulaire afin de concentrer ses transcrits précoces qui sont traduits par la suite. Selon ces auteurs, ces ARN sont organisés en granules cytoplasmiques pouvant atteindre la taille de 1 μm et sont alignées sur les microtubules entourées de molécules appartenant à la machinerie traductionnelle. De plus, la synthèse des protéines du virus de la vaccine est dépendante de l'intégrité des microtubules comme la protéine virale p25 s'associe aux microtubules (Ploubidou *et al.*, 2000) et aux ARN (Bayliss et Smith, 1997) avant que ceux-ci ne soient organisés en granules. Mallardo *et al.* (2001) suggèrent qu'elle est impliquée dans l'adressage des ARNm précoces vers les microtubules et dans leur ancrage avant leur traduction.

CHAPITRE III

Conclusion et perspectives

Chez les eucaryotes, les ARN messagers sont majoritairement monocistroniques. Environ 30% des messagers cellulaires chez les mammifères et les plantes (Iacono *et al.*, 2005 ; Kawagushi *et al.*, 2005) mais seulement 1% chez la levure (Zhang et Dietrich, 2005) sont pourvus de petits ORFs dans leur région 5' non traduite. Cependant, la présence de ces petits ORFs inhibe en générale de manière significative l'expression de l'ORF majeur. L'expression de ces ARNm est vraisemblablement régulée par le mécanisme de réinitiation de la traduction. Ce n'est sans doute pas un hasard si cette organisation structurale particulière est trouvée chez des ARNm cellulaires codant pour des proto-oncogènes ou des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire, dont l'expression doit être finement régulée au cours du cycle cellulaire ou de la différenciation des organes. Le mécanisme de réinitiation est relativement bien compris chez les levures et les mammifères ; il est régulé négativement par la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 par différentes protéines kinases en réponse à divers stress.

La réinitiation de la traduction s'effectue sans doute selon un mécanisme différent de celui des transcrits contenant des petits uORFs lorsque les uORFs de la région leader ont une taille relativement longue. Il s'agit d'un événement peu commun chez les eucaryotes. Seuls quelques cas ont été décrits dont le mieux documenté est celui du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV). Ce virus usurpe la machinerie traductionnelle de l'hôte, grâce à une protéine virale TAV qui la contraint à réinitier la traduction. Existe-t-il chez la plante, ou de manière plus générale chez les eucaryotes, une protéine ayant une fonction similaire pour la traduction des messagers cellulaires polycistroniques ? Cette question n'a pas encore été résolue.

Le CaMV est apparu comme étant un bon outil biologique pour caractériser les facteurs requis pour la réinitiation de la traduction chez les eucaryotes car plusieurs cycles consécutifs de réinitiation de la traduction sont nécessaires pour exprimer les protéines virales à partir des transcrits viraux polycistroniques. Les modèles décrivant les mécanismes de réinitiation après un sORF chez les levures et les mammifères, insistent sur l'importance du recrutement du complexe ternaire (eIF2-GTP-MetARNT₁^{Met}) par la sous unité 40S lors de son balayage sur l'ARNm. Ce recrutement peut être facilité par des facteurs d'initiation de la traduction dont eIF3. Différentes études effectuées tout d'abord chez les plantes (Park *et al.*, 2001), puis chez les mammifères (Jackson *et al.*, 2005) et les levures (Hinnenush *et al.*, 2007),

montrent l'importance du facteur eIF3 pour la réinitiation traductionnelle. D'autres facteurs d'initiation peuvent s'avérer indispensables dans la réinitiation, comme le facteur eIF5B qui interagit avec les sous unités ribosomiques et facilite la formation du ribosome 80S. Son site d'interaction au niveau de la sous unité 60S est proche de celui de TAV ce qui suggère que cette protéine virale puisse interférer avec l'interaction entre eIF5B et la sous unité 60S. A l'inverse, le facteur eIF6 qui se lie aussi à la sous unité 60S, inhibe la formation du ribosome de sorte que la protéine TAV pourrait entrer en compétition avec ce facteur afin de garder la sous unité 60S compétente pour la formation du ribosome.

Au cours de ma thèse, j'ai montré qu'un autre acteur est critique pour la transactivation traductionnelle, la sous unité ribosomique 60S ; en effet, une trop faible concentration de cette sous unité aux alentours de l'ARNm pourrait diminuer l'efficacité de la réinitiation de la traduction. Nous avons ainsi mis à jour un nouveau cofacteur de TAV pour la réinitiation de la traduction, une protéine cellulaire de fonction inconnue que nous avons appelée RISP (Reinitiation Supporting Protein). Nous avons démontré que cette protéine interagit fortement avec la sous unité 60S, *via* la protéine ribosomique L24 et avec la partie C-terminale du domaine minimal de TAV, requis pour la transactivation. Le complexe entre TAV et RISP peut donc se former et se stabiliser sur la sous unité 60S par le biais de la protéine ribosomique L24 qui est un partenaire d'interaction commun aux deux protéines. L'association de la protéine RISP avec la sous unité 60S facilitera le recrutement des complexes 60S-RISP ou 60S-RISP-TAV par le complexe 48S contenant la protéine TAV à la fin de son balayage sur l'ARNm, probablement au niveau du codon initiateur, et ce *via* des interactions RISP-TAV. La sous unité 60S ne sera ainsi plus limitante pour la réinitiation de la traduction. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la protéine RISP s'accumule au niveau des polysomes en présence de TAV suggérant que TAV stabilise RISP sur les ribosomes.

La réinitiation de la traduction des ARNm polycistroniques du CaMV est donc principalement gouvernée par un jeu d'interactions entre les protéines RISP, TAV, le facteur eIF3 et les sous unités ribosomiques. L'échafaudage moléculaire des complexes ribosomiques et la dynamique des interactions sont encore inconnus à ce jour. Il n'est pas exclu que d'autres protéines contribuent à la complexité moléculaire déjà entrevue, pour la réinitiation de la traduction. En effet, le criblage d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana* a permis d'identifier

un autre partenaire de TAV, la protéine cellulaire TOR (target of rapamycin) qui est impliquée dans la régulation de la traduction. Cette protéine active des facteurs d'initiation et d'élongation en réponse à divers signaux (Harris et Lawrence, 2005). La protéine TAV en interférant avec la voie régulée par TOR pourrait favoriser la réinitiation de la traduction.

Dans le modèle de réinitiation proposé par Park *et al.* (2001), la protéine TAV peut stabiliser le facteur eIF3 sur la sous unité 60S au cours de l'élongation de la traduction et est associée à la sous unité 40S *via* eIF3 lors de l'initiation permettant au facteur eIF3 d'effectuer la navette entre les sous unités ribosomiques. Cependant, ce modèle repose uniquement sur la formation *in vitro* des complexes TAV-eIF3-40S et eIF3g-TAV-60S, alors que le complexe eIF3-TAV-60S, contenant le facteur eIF3 complet, n'a pas été obtenu. Un autre scénario pourrait être proposé dans lequel le facteur eIF3 reste toujours associé à la sous unité 40S au cours de la traduction et qu'elle y soit maintenue par TAV lors de l'étape d'élongation de la traduction. Cette hypothèse est renforcée par des résultats préliminaires démontrant l'interaction de TAV avec la sous unité 40S dépourvue de eIF3. Il est donc important de confirmer l'existence de ces complexes, notamment eIF3-TAV-60S et TAV-eIF3-40S, et leur stabilité en les centrifugeant sur un gradient de saccharose puis d'analyser le complexe TAV-eIF3-80S en microscopie électronique par cryo-fracture. La formation de ces complexes *in vivo* et, plus particulièrement, en contexte viral devra être démontrée notamment par des expériences d'immunoprécipitation et de gel filtration.

Concernant la grande sous unité ribosomique comprenant TAV, elle est également en cours d'analyse par microscopie électronique à cryofracture en collaboration avec le Dr C.M. Spahn (Berlin, Allemagne). La résolution obtenue, de 10 à 15Å, sera suffisante pour distinguer les différentes protéines ribosomiques et les protéines TAV et/ou RISP ainsi que les hélices des ARNr. Cette analyse conduira, non seulement, à une meilleure compréhension des interactions entre la sous unité 60S et TAV en absence ou en présence de RISP, mais permettra également de voir si ces deux protéines sont engagées dans de multiples interactions avec la 60S. En effet, TAV est théoriquement capable de s'associer à la fois à l'interface de cette sous unité ribosomique grâce à L24 et probablement RISP et, sur son dos par le biais d'interactions avec les protéines L13 et/ou L18. Enfin, la comparaison de la structure tridimensionnelle des complexes 60S-TAV et 60S-RISP apportera indirectement des

informations sur la dynamique des interactions engagées par ces trois partenaires au cours de la traduction.

L'association de RISP avec la sous unité 60S suggère qu'elle est impliquée dans la traduction, son rôle étant de concentrer cette sous unité ribosomique au niveau des microtubules. Effectivement, des expériences effectuées *in vitro* indiquent que la protéine RISP interagit physiquement avec les microtubules et que la sous unité 60S s'associe à ce réseau en présence de RISP. Par ailleurs, le phénotype de distorsion foliaire présenté par des plantes d'*A. thaliana* où l'expression de RISP a été réduite par « gene silencing » d'une des deux copies de son gène semble indiquer que RISP s'associe effectivement avec les microtubules et, que son expression au niveau du méristème apical foliaire est cruciale pour le développement de la plante. Nous pensons que RISP a pour fonction d'associer les sous unités 60S aux microtubules et qu'elle favorise ainsi la traduction locale de certains ARN messagers cellulaires. Cette fonction est vraisemblablement exploitée lors de l'infection par le CaMV par la protéine TAV pour traduire l'ARN 35S et ses versions épissées. Cette nouvelle vision de la compartimentation du cycle infectieux du CaMV s'avère d'autant plus pertinente que nous avons démontré récemment au laboratoire, que les viroplasmes denses formés lors de l'infection virale ne sont pas nécessaires pour l'expression des protéines virales. Le CaMV utiliserait donc les microtubules comme support pour synthétiser ses protéines virales. L'accumulation de ces protéines, en particulier de TAV, ainsi que des ARN viraux puis des particules virales, pourra à terme être responsable de la formation des viroplasmes denses dans le cytoplasme où se poursuivra la traduction et ce, toujours grâce à l'action de la protéine RISP. En effet, des expériences de colocalisation dans des cellules de navet infectées par le CaMV indiquent que la protéine RISP et les ribosomes s'accumulent au niveau des viroplasmes denses.

Afin de privilégier l'expression de leurs protéines, de nombreux virus des animaux ont mis en place des stratégies qui diminuent drastiquement l'expression des protéines hôtes en inhibant et/ou clivant certains facteurs de traduction. Le CaMV ne semble pas mettre en œuvre une telle stratégie vu que les protéines cellulaires d'une fraction polysomale extraites de plantes saines ou infectées par le CaMV présentent le même profil électrophorétique. Ce virus semble utiliser une stratégie différente qui consiste à favoriser la traduction de ses ARN

en les localisant au niveau de structures cellulaires où la machinerie traductionnelle est présente en quantité importante.

L'implication des microtubules dans la traduction des transcrits du CaMV semble d'autant plus plausible que nous avons également mis en évidence l'interaction entre la kinésine GRIMP et la protéine TAV, ce qui suggère que cette dernière pourrait acheminer les transcrits le long des microtubules. Cette hypothèse sera vérifiée par des expériences de localisation des transcrits viraux dans des cellules de feuilles épidermiques de *N. benthamiana* GFP-tubuline infectée par le CaMV grâce à la méthode « FISH » (Fluorescent In Situ Hybridization). L'interaction entre TAV et les microtubules, par l'intermédiaire de la protéine GRIMP, sera également investiguée *in vitro* et *in vivo*. Enfin, le mouvement intracellulaire de TAV sera suivi par vidéomicroscopie dans des cellules de *N. Benthamiana* GFP-tubuline en exprimant la protéine de fusion mRFP-TAV. L'interaction TAV-GRIMP n'est apparemment pas impliquée dans le transport des petits agrégats de TAV qui semblent être à l'origine des viroplasmes denses car l'utilisation de drogues déstabilisant le réseau de microtubules n'a aucune conséquence sur la formation de ces corps d'inclusion.

Les *Caulimovirus* ont développé des mécanismes de réinitiation de la traduction défiant les règles canoniques de l'initiation de la traduction. Des mécanismes similaires doivent aussi exister chez les eucaryotes afin de favoriser la réinitiation de la traduction de certains ARNm cellulaires polycistroniques et/ou possédant des uORFs. Cependant, à l'heure actuelle, peu de données sont encore disponibles à ce sujet et aucun homologue de la protéine TAV du CaMV, ou d'autres *Caulimoviridae* pratiquant la transactivation traductionnelle comme les *Soymovirus*, n'a pu être caractérisé chez les plantes ou les animaux. Néanmoins, certains facteurs, dont le rôle a pu être mis en évidence lors de la transactivation chez le CaMV, peuvent se révéler être essentiels pour la réinitiation : c'est le cas du facteur eIF3 et des protéines L24 et RISP. Il existe à l'heure actuelle un exemple unique chez les plantes de messenger possédant un long uORF (le messenger *ETT*). Les études sur ce messenger suggèrent que la réinitiation ait lieu (Nishimura *et al.*, 2005) et que la protéine L24 joue un rôle dans ce mécanisme. Il n'est donc pas exclu que cette protéine soit impliquée de manière plus générale dans la réinitiation de la traduction des ARN messagers cellulaires renfermant des uORFs. Il serait intéressant de déterminer si les facteurs promouvant la transactivation chez le CaMV

sont aussi requis pour la réinitiation de la traduction d'ARNm cellulaires possédant un ou plusieurs uORF et/ou si ces messagers se servent d'éléments en *cis* pour faciliter ce processus, comme le font les calicivirus. En effet, pour réaliser le processus de terminaison-réinitiation, ces virus des animaux utilisent au niveau de leur ARNm une séquence permettant l'interaction avec l'ARN 18S de la petite sous unité du ribosome, rappelant la séquence Shine-Dalgarno des messagers procaryotiques. Cette interaction stabilise la sous unité 40S avec l'ARNm (Lutterman et Meyer, 2007) pendant un moment suffisamment long pour acquérir certains facteurs, dont eIF3, (Jackson, 2005) afin que le ribosome puisse réinitier la traduction. Il ne serait pas étonnant que certains ARN messagers cellulaires possèdent ce type de séquence afin de faciliter la réinitiation après la traduction d'un uORF.

L'élucidation des mécanismes moléculaires de la réinitiation de la traduction développés par certains virus s'avère donc indispensable pour comprendre comment sont exprimés les ARN cellulaires polycistroniques, d'autant plus que les protéines codées par ces messagers sont impliquées dans les processus fondamentaux et plus particulièrement dans la différenciation cellulaire.

CHAPITRE IV

Matériel et méthodes

IV.1 Matériel

IV.1.1 Matériel végétal

Deux plantes hôtes du CaMV sont utilisées, le navet (*Brassica rapa*, cultivar Just Right Hybride F1) et l'*Arabidopsis thaliana* (écotype ws). Leur infection par le CaMV s'effectue par inoculation mécanique en frottant les feuilles préalablement saupoudrées d'un abrasif (Célite) avec un broyat de feuilles virosées.

IV.1.2 Souche virale

L'isolat de CaMV utilisé pour l'infection des plantes est Cabb-JI (John Innes Institute, Norwich). Il donne lieu à des symptômes sévères lorsqu'il infecte *A. thaliana* et le navet.

IV.1.3 Souches bactériennes

IV.1.3.1 Souches *Escherichia coli*

XL-1 Blue

La souche d'*Escherichia coli* XL-1 blue est utilisée pour le clonage et l'amplification de plasmides recombinants car elle est incapable d'effectuer des événements de recombinaison entre des molécules d'ADN.

BL21 (DE3) RIL

Cette souche (Stratagene), lysogène pour le phage λ DE3, est utilisée pour l'expression des protéines hétérologues car elle est déficiente en protéases Lon et OmpT, ce qui limite la dégradation des protéines qui y sont exprimées. Elle renferme dans son chromosome le gène lacI et le gène de l'ARN polymérase du phage T7, ce dernier étant placé sous le contrôle du promoteur lacUV5 inductible par l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside).

La production efficace de protéine recombinante chez *E. coli* est souvent limitée par la rareté de certains ARNt. La souche BL21 RIL porte un plasmide qui contient des copies des

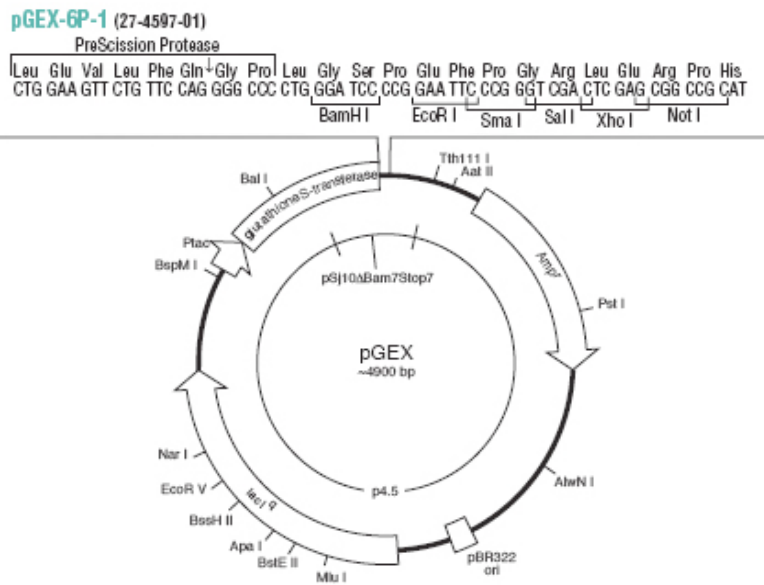


Figure 35 : Carte du plasmide pGEX-6P1.

Le plasmide pGEX-6P1(GE Healthcare) permet le clonage d'une séquence d'ADN en aval de la séquence codante pour la protéine Glutathion S-transferase (GST) afin d'obtenir une protéine de fusion contenant la GST en N-terminal.

Le plasmide contient une cassette de clonage permettant de cloner une séquence dans le même cadre de lecture que celle de la GST. Un site de coupe, spécifiquement reconnu par la PreScission Protease, est situé entre la séquence de la GST et la cassette de clonage afin de cliver la GST avec la protéine recombinante. L'expression de la GST est sous le contrôle d'un promoteur (Ptac) inductible par l'IPTG qui se lie au repressur lacI^q.

gènes codant les ARNt spécifiques des codons arginine (AGA et AGG), isoleucine (AUA) et leucine (CUA), ce qui permet d'adapter la population d'ARNt au contenu en codons des ARNm des protéines hétérologues. Ce plasmide confère une résistance au chloramphenicol.

IV.1.3.2 Souche *Agrobacterium tumefaciens*

GV3101

La souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* contient sur son chromosome le gène de résistance à la rifampicine. Cette souche possède un plasmide Ti dépourvu des gènes oncogéniques (*ONC*) et des séquences de bordure de l'ADN-T. Cependant, le plasmide apporte les gènes de virulence (*VIR*) qui permettent le transfert en *trans* d'une séquence d'ADN introduit entre les bordures artificielles d'un second vecteur, tel que pBIN61.

IV.1.4 Plasmides

pGEX-6P1

Le vecteur pGEX-6P1 (GE healthcare) de 4,9 Kbp comporte une origine de répllication reconnue dans *E. coli*. Ce vecteur porte le gène codant pour la β -lactamase qui confère aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline ce qui permet de sélectionner les transformants. La séquence codante le site de clivage reconnu par la Precission protéase est située entre la cassette de clonage et le gène codant pour la glutathion S-transférerase (GST). Le site de fixation des ribosomes (RBS) se trouve en amont du gène codant la GST. En aval du site de clonage se trouve un terminateur transcriptionnel. Le gène codant pour la GST est placé sous le contrôle du promoteur *lac* inductible par l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) qui en se liant avec le répresseur lacI^s permet l'initiation de la transcription. Les protéines recombinantes produites à partir du plasmide recombinant possèdent en N-terminal la protéine GST qui permettra par la suite leur purification (Figure 35).

pBIN61

Ce plasmide de 12,9 kbp (Voinnet *et al.*, 2000) dérive du plasmide pBIN19 (Bevan, 1984) et est utilisé pour obtenir des cellules transgéniques. Il possède à l'intérieur de la séquence de l'ADN-T une cassette d'expression sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur 35S, dérivés du virus de la mosaïque du chou-fleur. Ce plasmide est dit binaire car son origine de réplication RK2 permet la production de plasmides dans *E. coli* et *A. tumefaciens*. Il contient les gènes NPT II et NPT III qui confèrent la résistance à la kanamycine. Le gène NPT II permet la sélection des cellules végétales transformées et le gène NPT III permet la sélection des bactéries transformées (*E. coli* et *A. tumefaciens*).

pKPMCS

Ce plasmide est dérivé du plasmide pDH51 qui comporte le promoteur 35S du CaMV suivi d'une cassette de clonage et de la séquence de polyadénylation de l'ARN 35S du CaMV. Il contient, à l'intérieur de la cassette de clonage, un codon initiateur ATG situé dans un contexte optimal (AAACATGGCG).

IV.1.5 Milieux de culture

Les cultures d'*E. coli* et d'*A. tumefaciens* sont incubées la nuit respectivement à 37°C et à 28°C sous agitation constante dans le milieu **Luria Bertini** (LB).

Pour l'expression de protéines recombinantes, le milieu LB a été modifié afin d'augmenter la production de protéines solubles. L'ajout de 1% de glucose permet de totalement réprimer le promoteur T7 en absence d'IPTG. Le milieu LB est aussi supplémenté avec 600 mM de sorbitol et 2,5 mM de bétaine afin de produire un stress osmotique favorisant l'expression de protéines chaperones qui aideront au bon repliement des protéines recombinantes (Blackwell et Horgan, 1991).

Milieu Luria Bertini : 0,5% extrait de levure, 1% bactotryptone, 1% NaCl, pH 7,0

IV.2 Méthodes

IV.2.1 Techniques relatives aux plantes

IV.2.1.1 Transformation d'Arabidopsis par la méthode « dip floral »

Le protocole utilisé a été celui décrit par Bechtold and Pelletier (1998) avec quelques modifications. Deux ml d'une préculture d'agrobactéries sont ensemencés dans 250 ml de milieu LB contenant de l'ampiciline. Après incubation la nuit à 28°C, les agrobactéries sont sédimentées par centrifugation à 5 000 g pendant 15 min puis resuspendus avec un volume identique de **milieu d'infiltration**. Lorsque les plantes d'*Arabidopsis* atteignent le stade de floraison, les fleurs et les tiges sont trempées dans le milieu d'infiltration pendant 90 sec. Les plantes sont ensuite recouvertes d'un toit en plastique durant 48 h afin d'y maintenir l'humidité.

Milieu d'infiltration : pour 1 litre : 2,1 g Murashige and Skoog (MS) medium ; 5% saccharose ; 500 µl Silvet L-77 ; 200 µM acetosyringone

IV.2.1.2 Croissance des plantes d'Arabidopsis

Les graines sont stérilisées par un lavage de 15 min dans de l'eau de Javel 30%, suivi d'un lavage de 15 min dans l'éthanol 70% et d'un lavage final de 15 min dans l'eau. Les graines sont vernalisées en les plaçant à 4°C à l'obscurité pendant 48 h puis elles sont mises à pousser sur un milieu MS-agar pendant 3 semaines dans des conditions de photopériode jour/nuit de 12/12 h à 20°C. Les plantules sont ensuite repiquées dans la terre et placées dans des conditions de jours courts (photopériode jour/nuit de 8/16 h) à 18-20°C pendant 2 à 3 semaines.

Le milieu Murashige and Skoog (MS) utilisé pour la culture *in vitro* contient les micro- et macro-éléments ainsi que les vitamines (MO255 Duchefa) et est additionné de saccharose (BDH AnalarR, 1%) et d'agar (Agar-agar, Merck, 0,8%). La sélection des plantes transformées se fait par addition de kanamycine (50 µg/ml) dans le milieu.

IV.2.2 Techniques relatives à la biologie cellulaire

IV.2.2.1 Immunomarquage des cellules de tabac BY-2

Environ 5 ml de cellules BY-2 issues d'une culture de 3-4 jours sont sédimentés par centrifugation à 100 g. Les cellules sont fixées pendant 40 min dans 5 ml de **tampon PEM** contenant 1,5 % de parformaldéhyde et 0,5 % de glutaraldéhyde. Après 3 rinçages des cellules avec du tampon PEM, celles-ci sont déshydratées pendant 10 min en présence de méthanol refroidi à -20°C. Les cellules sont réhydratées en présence de **PBS 1X** pendant 10 min puis sont incubées 60 min dans du PBS 1X contenant du borohydrure de sodium (1 mg/ml) avant d'être mises sur une lamelle polylysinée. La paroi cellulaire est digérée 10 min par les enzymes ACS (pectolyase 0,4% ; Macérozyme 1% ; Driselase 0,2%) diluées au 1/10^{ème} dans le **tampon de digestion**. Après 3 lavage dans du PBS contenant du BSA 0,1%, les sites aspécifiques des cellules sont bloqués en les incubant 60 min dans 250 µl de **sérum normal de chèvre (NGS)** 5%. Après avoir écarté le surnageant, les cellules sont incubées la nuit et à 4°C en présence de l'anticorps dilué dans du PBS 0,1% BSA dirigé contre RISP (1/1000^{ème}) ou contre les protéines P0, P1 et P2 de la sous unité 60S (1/1000^{ème}). Après 3 lavages de 5 min dans du PBS 0,1% BSA, les cellules sont incubées 1h à température ambiante et à l'obscurité en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'alexa 568 puis lavées 3 fois dans du PBS 0,1% BSA.

Tampon PEM : 50 mM Pipes pH 7,2, 2 mM EGTA, 2 mM MgSO₄

PBS 1X : 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3

Tampon de digestion : 25 mM MES, 8 mM CaCl₂ pH 5,5, 600 mM mannitol

NGS : PBS1X, 5% BSA, 5% NGS

IV.2.2.2 Bombardement des cellules de tabac BY-2

a. Recouvrement des billes d'or avec de l'ADN plasmidique

Soixante mg de bille d'or sont ajoutés à 1 ml d'éthanol absolu. Après 3 min d'homogénéisation vigoureuse, la préparation est centrifugée puis le surnageant est éliminé. A deux reprises, les billes sont lavées avec 1 ml d'eau distillée, homogénéisées puis centrifugées. Les billes sont finalement resuspendues dans 500 µl de glycérine 50%. Cinquante µl de billes sont mélangés à 10 µg de plasmide recombinant puis additionnés de

25 μ l de CaCl₂ 2,5 M. L'ADN plasmidique est fixé sur les billes par l'ajout de 10 μ l de spermidine 0,5 M puis précipité par 1 ml d'éthanol absolu. Après un lavage avec l'éthanol 70%, les billes sont resuspendues dans 40 μ l d'éthanol absolu.

b. Préparation des cellules BY-2

Environ 7 ml de cellules BY-2 issues d'une culture de 3-4 jours sont déposés sur un disque de papier filtre stérile à l'aide d'un appareil de filtration Buchner, puis le disque est placé sur une boîte de Petri de 5 cm de diamètre contenant du **milieu BY-2 gélosé**.

c. Principe

Le bombardement est réalisé grâce à un canon à particule PDS-1000/He (Biorad) qui utilise une source d'hélium pressurisé pour introduire dans des cellules des microparticules recouvertes d'ADN. La pression d'hélium libérée par un disque de rupture lorsqu'elle atteint une valeur de 1100 psi ainsi qu'un vide partielle permettent de projeter des millions de particules. Une grille d'arrêt permet de répartir les billes sur la surface de la couche de cellule ou de feuille à bombarder. Pour transformer des cellules de plante, la distance entre le matériel et les billes est de 9 cm, cette distance permettant aux billes d'atteindre le noyau de la cellule. Après bombardement, les cellules sont incubées une nuit à 24°C et à l'obscurité.

IV.2.2.3 Détection de la fluorescence

La localisation intracellulaire des protéines fusionnées à la eGFP ou à la mRFP est déterminée 24 heures après transfection de cellules de tabac BY-2 et de la sous unité 60S et des protéines endogènes RISP après incubation de l'anticorps secondaire.

La fluorescence est localisée grâce au microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 510. Les cellules, entre lame et lamelle, sont observées à l'aide d'un objectif 63X à immersion à eau. L'excitation de la eGFP et de l'alexa 488 s'effectue à 488 nm à l'aide d'un laser Argon (458, 477, 488 et 514 nm) et celle de la mRFP et de l'alexa 568 s'effectue à 561 nm à l'aide du laser DPSS. Le trajet optique du laser est dévié à partir de la source par un miroir dichroïque qui envoie vers les cellules les longueurs d'ondes d'intérêt ainsi que les rayons réfléchies par l'échantillon qui sont de longueurs d'ondes supérieures. La fluorescence émise par l'échantillon traverse le miroir puis est réfléchi par un deuxième miroir dichroïque vers deux

photomultiplicateurs précédés d'un filtre passe-bande (BP 575-615) pour le canal rouge et d'un filtre passe-bande (BP 505-550) pour le canal vert.

IV.2.2.4 Expression transitoire dans *Nicotiana plumbaginifolia*

a. Préparation et transformation de protoplaste de *Nicotiana plumbaginifolia*

Les feuilles provenant de plantes âgées d'environ 6 semaines et issues de culture *in vitro* sont lacérées grossièrement. Afin de digérer la paroi cellulaire, les feuilles sont mises à incuber dans des boîtes de Pétrie en présence d'une solution enzymatique (Driselase, Fluka) pendant 14h-16h à l'obscurité et à une température de 26-28°C. Les boîtes sont délicatement agitées afin de libérer les protoplastes puis sont remis à 26°C pendant 10 min. La préparation est filtrée à travers une grille de 100 µm puis répartie dans différents tubes à raison de 10 ml par tube. Après l'ajout de 1ml de **solution W5**, la préparation est centrifugée 10 min à 80 g. Les protoplastes doivent se retrouver à l'interface des deux solutions puis sont transférés dans un autre tube dans laquelle sont ajoutés 10 ml de solution W5. Après centrifugation de 3 min à 80 g, le surnageant est écarté puis les culots sont réunis et resuspendus dans 10 ml de solution W5. Après quelques heures de repos (6h maximum), la qualité et la quantité des protoplastes sont déterminées par l'observation d'une aliquote au binoculaire. Les protoplastes sont répartis dans différents tubes, sédimentés puis resuspendus dans du **tampon MCM** afin d'obtenir une concentration d'environ 2×10^6 protoplastes/ml.

Trois cent µl de protoplastes sont transformés par l'ADN plasmidique d'intérêt en présence de 300 µl d'une **solution de PEG** et de 4 ml de milieu K3. Après avoir délicatement mélangées, les tubes sont incubés la nuit horizontalement à 25°C et à l'obscurité.

Solution W5 : 150 mM NaCl, 125 mM CaCl₂·2H₂O, 5 mM KCl, 6 mM glucose, pH 6,0

Tampon MCM : 0,1% MES, 0,029% CaCl₂·2H₂O, 0,5 M mannitol, pH 5,6

Solution de PEG : 40% PEG6000 dans du tampon CMS (pour 100 ml : 2,36g Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0,4 M Mannitol)

b. Dosage de CAT et mesure de l'activité GUS

Le dosage de la protéine CAT se fait par test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) selon les recommandations du fabricant (Roche). Les anticorps reconnaissant la

protéine CAT sont préadsorbés sur une microplaque et retiennent les protéines CAT provenant de l'extrait cellulaire. Un deuxième anticorps anti-CAT couplé à la dioxigénin (DG) est ajouté puis sera reconnu par le troisième anticorps anti-DG conjugué à la peroxidase. En présence d'un substrat, la peroxidase catalyse ce dernier libérant ainsi un produit de réaction coloré. L'absorbance de l'échantillon est déterminée par un lecteur de microplaque et est directement corrélée à la quantité de la protéine CAT présent dans l'extrait cellulaire.

Le dosage de l'activité GUS de l'extrait cellulaire se fait selon un dosage fluorimétrique. Cinquante μl d'extrait cellulaire ont alors été soumises au dosage enzymatique de l'activité Gus en présence de 1 mM de substrat (MUG (4-méthylumbelliféryl- β -D- glucuronide) , Sigma®) dans un volume réactionnel de 200 μl . La cinétique d'apparition du produit fluorescent de la réaction enzymatique (MUG, excitation à 365 nm, émission à 455 nm) est réalisée pendant 2 h, avec des lectures à intervalle de 30 min, à l'aide d'un fluorimètre (Fluoroskan fluorimeter, Labsystem). Une gamme étalon de référence est réalisée par la mesure de fluorescence de différentes concentrations de MU. L'activité enzymatique du Gus est exprimée en quantité de produit synthétisée par unité de temps et rapportée à une même quantité de protéines : pmol MU/min/ μg protéine. Les résultats sont normalisés en fonction de la valeur obtenue en présence de la protéine TAV seule ; l'activité GUS de cette dernière est estimée à 100%.

IV.2.3 Techniques relatives aux acides nucléiques

IV.2.3.1 Amplification par PCR (« Polymerase Chain Reaction »)

Il s'agit d'une amplification exponentielle de l'ADN réalisée par une série de cycles de type dénaturation-hybridation-élongation avec deux amorces nucléotidiques spécifiques des extrémités du fragment à amplifier. Le milieu réactionnel de 50 μl contient :

ADN matrice : 100 ng
Amorces : 50 pmoles
dNTP : 200 μM
Tampon PCR 10X (Invitrogen) : 5 μl
Taq ADN polymérase : 2,5 U

La PCR réalisée dans un appareil automatisé (Gene Cycle, Biorad) comprend 30 cycles comme suit :

Etape de dénaturation : 45 sec à 92°C, 3 min lors du premier cycle

Etape d'hybridation des amorces : 45 sec à une température de 55°C

Etape de synthèse de l'ADN : 2 min par Kb amplifié à 72°C, 5 min lors du dernier cycle

IV.2.3.2 Mutagenèse de délétion par PCR

Cette technique a pour objectif d'introduire des délétions dans un ADNc, cloné dans un vecteur plasmidique, en réalisant une réaction de PCR. Elle consiste à utiliser deux oligonucléotides qui s'hybrident de part et d'autre de la séquence à déléter, ces deux amorces permettent la synthèse du plasmide et de l'ADNc à l'exception de la séquence à déléter. La PCR s'effectuant sur un fragment de grande taille (> 6 Kbp), il est indispensable de choisir une ADN polymérase ADN-dépendante possédant une activité 3'-5' exonucléasique ainsi qu'une forte processivité, garants d'une haute fidélité lors de la synthèse de l'ADN. Après la PCR, l'ADN est traité par l'enzyme DpnI qui digère les brins parentaux. En effet, l'ADN provenant de bactéries *E. coli* possède, contrairement aux brins néosynthétisés, des sites de restrictions Dpn I méthylés et qui sont donc reconnus par l'enzyme Dpn I. Les oligonucléotides servant d'amorces pour la PCR n'étant pas phosphorylés, une étape de phosphorylation des extrémités 5' du produit PCR est indispensable pour la ligation future. Cette dernière est réalisée comme décrit précédemment. Les bactéries sont transformées par électroporation puis sélectionnées sur des boîtes de pétrie contenant du milieu LB agar additionné de l'antibiotique adéquat. Les clones recombinants sont sélectionnés grâce à une PCR analytique réalisée sur les colonies bactériennes.

IV.2.3.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les molécules d'ADN sont séparées selon leur taille par migration électrophorétique sur gel d'agarose (entre 1% et 1,5%) préparé dans du **tampon TBE 0,5X** contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Après migration sous une tension de 100 V, les fragments d'ADN sont visualisés par fluorescence sous UV.

Tampon TBE 0,5X : 20 mM Tris-Borate pH 8,6, 0,5 mM EDTA

Tampon de charge : 50% Glycérol (v/v), 1% SDS, 1 mM EDTA, 0,1% bleu de bromophénol

IV.2.3.4 Purification des fragments d'ADN issus de gel d'agarose

Après séparation sur gel d'agarose, le fragment d'ADN d'intérêt est découpé sous UV. L'ADN est ensuite récupéré par simple filtration 5 min 5000 g sur colonne Nucleospin® (Macherey-Nagel).

IV.2.3.5 Technique de clonage

a. Digestion par des enzymes de restriction

Les digestions d'ADN par des enzymes de restriction sont réalisées selon les conditions préconisées par les fournisseurs. En générale, environ 1 µg d'ADN est digéré par 5 unités d'enzyme dans 100 µl de milieu réactionnel contenant le tampon approprié pour l'activité de l'enzyme pendant 3 à 4 h à 37°C ou 30°C (SmaI). Après digestion enzymatique de l'ADN plasmidique ou du produit PCR, l'ADN est purifié sur colonne Nucleospin®.

b. Déphosphorylation du plasmide

Afin de prévenir la recircularisation du plasmide lors de la ligation, les vecteurs linéarisés sont déphosphorylés par de l'alcaline phosphatase (AP) afin d'enlever le phosphate 5' terminal. Cette réaction a lieu dans le milieu de digestion du plasmide en rajoutant 1 µl d'alcaline phosphatase et pendant 30 min à 50°C. L'ADN est ensuite purifié sur gel d'agarose.

c. Ligation

La ligation du plasmide linéarisé et déphosphorylé et du fragment d'ADN d'intérêt (insert) a lieu pendant 1h à température ambiante dans un milieu de réaction de 20 µl. Le milieu réaction de 20 µl contenant:

Vecteur : 10 à 20 ng

Insert : rapport molaire insert/vecteur compris entre 2 et 3

Tampon de ligation 5x : 4 µl

ADN ligase T4: 1 U

Le produit de ligation est purifié sur une colonne Nucleospin® et élué avec 20 µl de tampon d'éluion.

Tampon de ligation 5x : 250 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% PEG 8000 (v/v)

d. Transformation et sélection

Quatre μl du produit de ligation sont ajoutés à 60 μl de bactéries compétentes XL1 blue. Les bactéries sont transformées par électroporation (Electroporateur Bio-Rad, 2,5 kV, 25 μF , 200 W) puis reprises dans 500 μl de milieu LB. Les bactéries transformées sont incubées 30 min à 37°C permettant la régénération de leur paroi bactérienne et l'expression du/des gène(s) de résistance codé(s) par le vecteur. Elles sont par la suite, étalées sur des boîtes de Pétri contenant du **milieu LB-Agar** ainsi que le(s) antibiotique(s) de sélection en concentration adéquate et incubées la nuit à 37°C.

Milieu LB : 0,5% extrait de levure, 1% bactotryptone, 1% NaCl, pH 7,0

Milieu LB-Agar : Milieu LB additionné de 1,5% d'agar

e. Criblage des colonies par PCR

La sélection des clones recombinants se fait par réaction de PCR directement à partir de colonies bactériennes. Pour cela, un milieu de PCR de 20 μl est préparé avec les amorces permettant d'identifier l'insert, puis les bactéries sont transférées dans ce milieu à l'aide d'un cure-dent. Les étapes et le nombre de cycles sont identiques à ceux d'une réaction de la PCR classique (cf paragraphe III.2.2.1), la première étape de dénaturation de 3 min à 94°C étant suffisante à lyser les bactéries et à libérer l'ADN plasmidique sous une forme dénaturée.

IV.2.3.6 Génération et clonage de miRNA artificiel (amiRNA)

Le protocole utilisé pour générer et cloner un miRNA artificiel (amiRNA) a été élaboré par Schawb *et al.* (2005). L'amiRNA de 21 nucléotides s'apparie spécifiquement avec le(s) transcrit(s) cible(s) qui seront par la suite dégradés par la machinerie de silencing. Cet amiRNA est cloné dans un vecteur binaire sous un promoteur fort et constitutif (promoteur 35S) puis inséré par agrobactérie chez *Arabidopsis* où il sera surexprimé dans tous les tissus.

a. Dessin de l'amiRNA

La première étape correspond à dessiner l'amiRNA afin que celui-ci ne reconnaisse que le transcrit cible grâce à l'algorithme développé par l'équipe de Weigel (<http://wmd.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl>). Ce dernier, en se basant sur la séquence de l'ADNc de la cible à silencer et sur les caractéristiques des miRNA, propose une liste

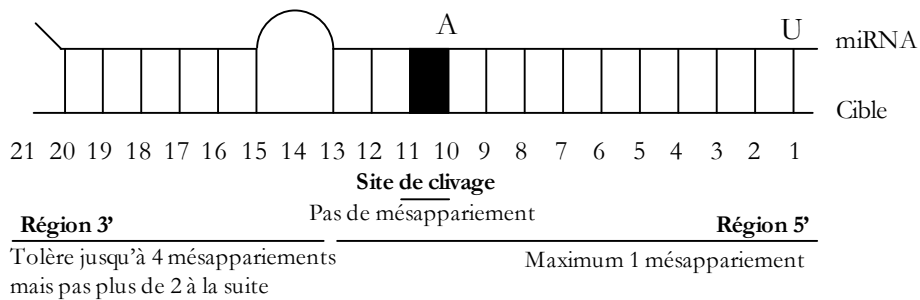


Figure 36 : Paramètres déterminant la reconnaissance du transcrit cible par le miRNA.

Les miRNA sont constitués de 21 nucléotides qui peuvent être répartis en 3 régions différentes selon le degré de mésappariement toléré. La région 3' tolère un certain nombre de mésappariement, alors que la région 5' ne tolère qu'un mésappariement et le site de clivage (+10 +11) aucun. Les nucléotides uracile (U) et adénosine (A), situés respectivement en position +1 et +10, sont surprésentés parmi les miRNA.

D'après Schaub et al. (2006) - Plant Cell 18(5): 1121-1133

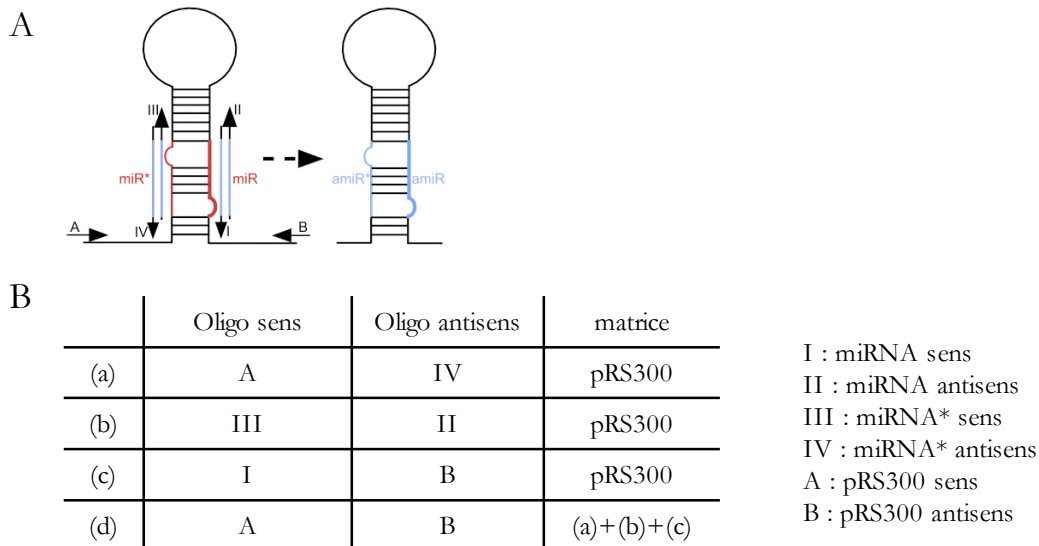


Figure 37 : Stratégie de génération d'un amiRNA en utilisant comme matrice un précurseur de miRNA.

A. Le précurseur du miRNA porté par le plasmide pRS300 est utilisé comme matrice (à gauche) afin de générer le miRNA artificiel (à droite). Les oligonucléotides I à IV sont utilisés pour remplacer les régions miRNA et miRNA* (en rouge) par les régions spécifiques du miRNA artificiel (en bleu). Les oligonucléotides A et B sont basés sur la séquence du plasmide pRS300.

B. La combinaison par PCR chevauchantes des produits PCR, A-IV, III-II et I-B permet de générer le précurseur du miRNA artificiel fonctionnel.

Schaub et al. (2006) - Plant Cell 18(5): 1121-1133

d'amiRNA potentiels ordonnés selon la spécificité de la cible et l'instabilité en 5'. Pour une sélection spécifique des cibles, Schawb *et al.* (2005, 2006) ont pris en compte plusieurs paramètres : (i) un mésappariement maximum dans la région 5' (nt 1 à 12), (ii) pas de mésappariement au site de clivage (nt 10-11), (iii) 4 mésappariements sont tolérés pour la région 3' mais pas plus de deux à la suite, (iv) présence d'uridine en position +1 et d'adénine en position +10 sont favorisés et (v) une énergie libre égale ou supérieure à 70% de l'énergie résultant d'un parfait appariement. Après le choix de l'amiRNA, sa validation se fait en vérifiant que celui-ci ne s'hybride qu'avec le transcrit cible.

b. Génération de l'amiRNA

La génération de l'amiRNA se fait par une série de PCR chevauchantes en utilisant un précurseur de miRNA comme modèle et des oligonucléotides spécifiques de l'amiRNA. Le plasmide pRS300 (don de Detlef Weigel, Tuebingen-Allemagne) (Figure 36) contient le précurseur de miR139a qui sera utilisé comme modèle. Une première série de PCR va générer les brins constituant le précurseur de l'amiRNA qui seront appariés grâce à une deuxième PCR (Figure 37).

c. Clonage de l'amiRNA et transformation des plantes

Les précurseurs des amiRNA obtenus sont insérés dans le plasmide binaire pBIN61 en utilisant les sites de restriction XbaI et BamHI situés respectivement aux extrémités 5' et 3'. Le site XbaI a été rajouté par PCR en 5' du précurseur de l'amiRNA. Les clones obtenus sont ensuite insérés dans l'ADN-T d'*A. tumefaciens* afin de transformer *Arabidopsis thaliana* (cultivar WS) selon la méthode décrite dans le paragraphe IV.2.1.1.

IV.2.4 Techniques relatives aux protéines

IV.2.4.1 Concentration des protéines

a. Précipitation des protéines

Les échantillons sont mélangés à un volume de TCA 20% puis incubés 30 min dans la glace. Après centrifugation à 25 000 g pendant 30 min à 4°C, le surnageant est éliminé et les protéines sont lavées avec 600 µl d'acétone froid puis centrifugées à 25 000 g pendant 30

min à 4°C. Les culots sont mis à séchés puis resuspendus dans du tampon de Laemmli et finalement les protéines sont chauffées à 100°C pendant 10 min avant d'être déposées sur un gel SDS-page.

b. Cellules de concentration (« centrifugal filter devices », Amicon corporation)

Ces cellules renferment une membrane dont le diamètre des pores est variable selon les modèles. Lors d'une centrifugation, seules les protéines plus grandes que les pores sont retenues par la membrane hydrophyle tandis que l'eau, les sels et les petites molécules la traversent. Ces cellules peuvent être utilisées pour concentrer une solution protéique ou pour changer le tampon d'une solution. Ainsi, l'échantillon est simplement chargé dans la cellule et centrifugé à 2 000 g à 4°C jusqu'à obtenir la concentration désirée.

IV.2.4.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation des protéines est réalisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970). Les mailles de la matrice sont définies par le rapport acrylamide/N, N' méthylène bisacrylamide (37,5/1 dans le cas de gel de protéines). Le gel comprend deux parties : un **gel de concentration** (hauteur de 3 cm) et un **gel de séparation** qui se différencie par la réticulation et le tampon.

La polymérisation de l'acrylamide/bisacrylamide est catalysée par l'ajout de persulfate d'ammonium (APS) et de TEMED 0,05% (v/v).

Gel de concentration : 5% Acrylamide/bisacrylamide, 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS

Gel de séparation : 12% Acrylamide/bisacrylamide, 100 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS

Les protéines additionnées de 0,2 volume de **tampon de Laemmli** sont chargées sur le gel et l'électrophorèse s'effectue dans du **tampon de migration** pendant environ 1h30 sous ampérage constant de 25 mA. La migration est contrôlée par la visualisation du front de migration ainsi que du marqueur de taille moléculaire coloré.

Tampon de Laemmli: 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycérol, 2% SDS, 0,1% bleu de bromophénol, 3%β-mercaptoéthanol (v/v)

Tampon de migration : 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM glycine, 0,1% SDS

IV.2.4.3 Détection des protéines après fractionnement électrophorétique

a. Coloration des protéines

α. Bleu de Coomassie

Les protéines sont visualisées avec une **solution de coloration** à base de bleu de Coomassie sous agitation lente pendant une heure puis le gel est décoloré par plusieurs bains dans une **solution de décoloration**.

Solution de coloration : 10% acide acétique (v/v) ; 25% éthanol (v/v) ; 0,125% bleu de Coomassie R250

Solution de décoloration : 10% acide acétique (v/v) ; 20% éthanol (v/v)

β. Bleu colloïdal

La coloration au bleu colloïdal est préférentiellement utilisée lorsque la quantité de protéine est présente en faible quantité. Le gel contenant les protéines est incubé avec une **solution de fixation** sous agitation lente pendant 3 h puis les protéines sont colorées la nuit en présence d'une **solution de coloration**. Le gel est rincé par plusieurs bains successifs d'eau afin d'enlever l'excès de bleu colloïdal.

Solution de fixation : 45% méthanol (v/v) ; 1% acide acétique (v/v)

Solution de coloration : 34% méthanol (v/v) ; 17% sulfate d'ammonium ; 0,5% acide acétique (v/v) ; 0,1% bleu G250

b. Immunodétection de type « western blot »

Cette technique consiste à révéler sur une membrane une protéine particulière à l'aide d'anticorps.

α. Transfert des protéines sur une membrane

Après séparation sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. L'ensemble est disposé en « sandwich » entre 4 feuilles de papier Whatman 3MM imbibées avec du **tampon de transfert** et placé dans une cuve à électrotransfert semi-sec (Biorad). Gel et membrane sont placés de sorte que les protéines se

fixent sur la membrane en migrant de la cathode vers l'anode. Ce transfert est effectué à 0,8 ms par cm² de membrane pendant 90 min à 4°C.

Tampon de transfert : Tris 48 mM, Glycine 39 mM, éthanol 20%

β. Fixation des anticorps

La membrane est équilibrée dans du tampon de lavage et les sites libres sont saturés des protéines du lait par incubation, pendant 1 h sous agitation constante, dans du **tampon bloquant**. L'anticorps primaire spécifique de lapin ou de souris est ajouté à la solution, puis l'ensemble est incubé sous agitation pendant une nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 min dans du **tampon de lavage**, puis saturée, durant 1 h sous agitation constante, dans du tampon bloquant. Les anticorps secondaires (anticorps de chèvre dirigés contre les immunoglobines de lapin ou de souris et couplés à la peroxydase (Kirkegaard & Perry Laboratories) sont ajoutés au tampon bloquant. L'ensemble est agité 3 h à température ambiante, puis lavé 3 fois dans du tampon de lavage.

Tampon de lavage : PBS 1X, Tween 1% (v/v)

Tampon bloquant : tampon de lavage, lait semi-écrémé en poudre 5%

γ. Révélation de la fixation des anticorps

Les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase. On utilise un erévétation au moyen du kit ECL (« Enhanced Chemical Luminescence », Roche) qui consiste en une réaction de chimioluminescence catalysée par la peroxydase et produisant une émission de photons au lieu de fixation des anticorps secondaires. L'émission lumineuse est révélée par autoradiographie à l'aide de film photographique.

IV.2.4.4 Surexpression de protéines recombinantes dans *E. coli*

L'ADNc codant pour une protéine d'intérêt est introduit dans le vecteur d'expression pGEX-6P1 apportant un tag GST en fusion avec l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt. Le vecteur recombinant obtenu est utilisé pour transformer la souche d'*E. coli*, BL21 RIL.

a. Expression chez *E. coli*

Le clone recombinant est mis en préculture dans 500 ml de milieu LB additionné d'ampicilline (300 µg/ml) et de chloramphénicol (50 µg/ml). La préculture est incubée une nuit à 37°C sous agitation. 1,8 L de milieu LB additionné des mêmes antibiotiques sontensemencées par 200 ml de la préculture puis mis sous agitation à 37°C pendant 1 h jusqu'à ce que la culture bactérienne atteigne sa phase exponentielle de croissance (DO à 600 nm de 0,4 environ). L'induction de l'expression des protéines recombinantes se fait par l'addition d'IPTG à une concentration finale de 0,2 mM et les bactéries sont mises sous agitation à 25°C pendant 4 h. Les bactéries sont sédimentées par centrifugation à 7 000 g pendant 15 min puis congelées à -20°C.

b. Purification de protéines

La présence de l'étiquette GST en N-terminal de la protéine de fusion permet à la protéine d'intérêt de fortement interagir avec la glutathion couplée à des billes de sépharose 4B, la technique du « batch » dans des tubes eppendorf est utilisée pour purifier quelques centaines de microgrammes de protéines. En revanche, pour une quantité de protéine de l'ordre du milligramme, la purification s'effectue sur une colonne de billes de sépharose de 1 ml (GST-trap, amersham). L'élution de la protéine d'intérêt se fait par une coupure spécifique entre la GST et la protéine d'intérêt par la protéase PreScission® (Amersham). La GST ainsi séparée reste accrochée aux billes de sépharose alors que la protéine d'intérêt sera éluée car elle n'a aucune affinité pour les billes de sépharose. Toutes les étapes d'extraction et de purification des protéines sont réalisées à 4°C.

α. Purification en « batch »

Un culot bactérien provenant de 500 ml de culture est repris avec 30 ml de **tampon NET** additionné de 2 mM DTT et d'un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les bactéries sont lysées par une sonication douce en pulse durant 10 min, puis elles sont centrifugées à 25 000 g pendant 30 min afin de sédimenter les protéines insolubles. Le surnageant contenant les protéines solubles est filtré à travers un filtre milipore de 0,45 µM pour enlever les éventuels agrégats. Il est ensuite mis à incuber en présence de 60 µl de billes de sépharose pendant 12 h à 4°C sous agitation continue. Les billes sont sédimentées par une brève centrifugation et lavées 3 fois avec 500 µl de tampon NET. Les billes sont alors équilibrées avec le **tampon de clivage**, puis mises en présence de 4 unités de protéase

PreScission 16 h à 4°C. Après sédimentation des billes par centrifugation, le surnageant contenant les protéines éluées est prélevé. Plusieurs lavages des billes avec le tampon de clivage, suivis de centrifugation, permettent d'augmenter le rendement d'éluion des protéines. Les protéines sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Tampon NET : 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5% nonidet P40

Tampon de clivage : 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT

β. Préparations de grandes quantités de protéines

La protéine d'intérêt est exprimée dans une culture bactérienne de 2L. Le culot des bactéries obtenu par centrifugation est repris dans 120 ml de **tampon NT** additionné de 2 mM DTT et DNase (0,1 mg/ml) afin de digérer l'ADN libéré par la lyse des cellules. La dégradation de l'ADN réduit la viscosité de la suspension bactérienne et améliore l'efficacité de lyse des bactéries par la presse de French à une pression de 1200 bars, puis le lysat est centrifugé à 25 000 g pendant 30 min afin d'éliminer les protéines insolubles. Le surnageant contenant les protéines solubles est filtré à travers un filtre millipore de 0,45 µM.

Le surnageant est déposé sur une colonne de sépharose 4B de 1 ml (Amersham), préalablement équilibrée avec 10 ml de tampon PBS 1X, à un débit de 0,2 ml/min. La colonne est ensuite lavée avec 10 ml de tampon PBS 1X, équilibrée avec 5 ml de tampon de clivage, puis incubée avec 1 ml de tampon de clivage contenant 20 unités de la protéase PreScission, pendant 12 h à 4°C. La protéine d'intérêt est éluée par le passage de 10 ml de tampon de clivage sur la colonne à un débit de 0,2 ml/min. Chaque fraction est aliquotée et gardée à -80°C.

Tampon NT : 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM MgCl, 0,1 mg/ml DNase

IV.2.4.5 GST pull-down

La protéine recombinante est incubée en présence de billes de Sepharose 4B-GST couplées au glutathion (Amersham-Pharmacia) la nuit à 4°C sous agitation circulaire. La matrice est ensuite soumise à 3 lavages par des centrifugations brèves à 200 g et remise en suspension dans 1 ml de tampon NET. Les billes sont resuspendues volume à volume dans du tampon NET. Une fraction aliquote est resuspendue dans du tampon de Laemmli, chauffée

à 100°C pendant 5 min puis analysée sur SDS-PAGE afin d'estimer la quantité de protéine de fusion fuxée sur les billes.

Le second partenaire, en excès moléculaire, est mis en présence des billes et le volume final est ajusté à 300 µl avec du tampon NET ou du **tampon d'association** si le second partenaire est une sous unité ribosomique ou une de ses protéine. Les billes sont mises sous agitation pendant la nuit à 4°C. Les billes sont lavées comme décrit auparavant et remises en suspension dans 15 µl de tampon de Laemmli. Après chauffage à 95°C, puis une brève centrifugation, les protéines du surnageant sont séparées par électrophorèse sur un gel SDS-Page 12%, puis colorées au bleu de Coomassie.

Tampon d'association : 50 mM Hepes pH 7,4, 60 mM NaCl, 3 mM MgCl₂

IV.2.4.6 Production d'anticorps

Les anticorps dirigés contre la protéine RISP ont été produits chez le lapin par des injections successives de la protéine RISP. Environ un 100 µg de RISP, purifiée comme décrit dans le paragraphe 2.4.2.b.β, ont été injectés toutes les deux semaines à deux lapins. Afin de stimuler le système immunitaire du lapin, un volume d'adjuvant complet de Freund's a été rajouté à un volume de protéines pour la première injection et un volume d'adjuvant incomplet pour les trois injections suivantes. Après 4 injections, les lapins ont été saignés à blanc et les anticorps ont été testés par la technique du western blot pour estimer leur spécificité et leur affinité.

IV.2.5 Techniques relatives aux ribosomes

IV.2.5.1 Purification des polysomes de navet

Environ 10 g de feuilles apicales, de taille inférieure à 5 cm, provenant de navets sains ou infectés sont broyés dans de l'azote liquide puis resuspendus dans 25 ml de **tampon d'extraction**. Le broyat obtenu est centrifugé 1 ou 2 fois 30 min à 30 000 g afin de précipiter les débris cellulaires. Douze ml de surnageant sont déposés sur un **coussin de saccharose** d'un volume de 10 ml puis soumis à une centrifugation de 200 000 g pendant 6 h à 4°C. Les culots obtenus sont resuspendus dans du **tampon de resuspension** et centrifugés 30 min à

30 000 g afin de sédimenter les agrégats. Quinze do_{254} de polysomes sont déposés sur un **gradient linéaire 10-50% de saccharose** et centrifugés 2h30 à 190 000 g à 4°C. Les gradients sont récoltés par fraction de 1 ml puis les protéines sont analysées comme décrit précédemment.

Tampon d'extraction : 200 mM Tris pH 9,0, 400 mM KCl, 35 mM MgCl_2 , 25 mM EGTA, 200 mM saccharose, 2 mM DTT, tablette inhibiteur protéases (complete)

Coussin de saccharose : 40 mM Tris pH 9,0, 200 mM KCl, 30 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, 1, 75 M saccharose

Tampon de resuspension : 40 mM Tris pH 8,5, 200 mM KCl, 30 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA

Gradient de saccharose 10-50% : 40 mM Tris pH 8,5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10% ou 50% saccharose

IV.2.5.2 Purification des ribosomes 80S

25 g de germes de blé sont broyés dans 100 ml de **tampon d'extraction**. Les débris cellulaires sont éliminés par deux centrifugations successives de 30 000 g pendant 30 min, le culot étant à chaque fois écarté. Les fractions les plus denses contenant les ribosomes sont isolés par gel filtration sur une colonne de sephadex G25. Les premières fractions sont réunies et centrifugées 30 min à 30 000 g. Les ribosomes sont sédimentés par centrifugation du surnageant à 180 000 g durant 2h30. Le surnageant (S180) est aliquoté et conservé à -20°C. Les 3/4 des culots, gardés à -80°C, seront utilisés pour la purification des sous-unités ribosomiques. Le 1/4 restant est resuspendu dans du **tampon de lavage**, puis centrifugé à 30 000 g durant 30 min. Le surnageant est soumis à une centrifugation à travers un coussin de saccharose (1 volume de coussin pour 3 volumes de surnageant) à 300 000 g pendant 2 h. Le culot contenant les ribosomes est resuspendu avec du tampon d'association, aliquoté et conservé à -80°C.

Tampon d'extraction : 50 mM Hepes pH 7,5, 200 mM de NH_4Cl , 20 mM Mg_2Cl , 5 mM β -mercaptoéthanol

Tampon de lavage : 50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM acétate de K^+ , 5 mM acétate de Mg^{2+} , 2 mM DTT

Coussin de saccharose : 50 mM Hepes pH 7,5, 50 mM acétate de K^+ , 5 mM acétate de Mg^{2+} , 30% saccharose



Broyage des germes de blé dans le tampon d'extraction

30 min à 15 000 g

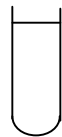


Gel filtration du surnageant S30 sur une colonne sephadex G25



Fractionnement : seules les fractions les plus denses sont rassemblées puis utilisées

30 min à 15 000 g



Le surnageant est mis à centrifuger

2h30 à 180 000 g

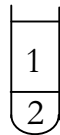
1/4 culot est resuspendu dans du tampon de lavage

3/4 culot sont resuspendus dans du tampon de dissociation

30 min à 15 000 g

Le surnageant (1) est déposé sur un coussin de saccharose (2)

2h à 300 000 g

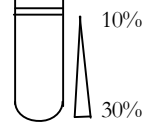


Le culot est resuspendu dans du tampon d'association

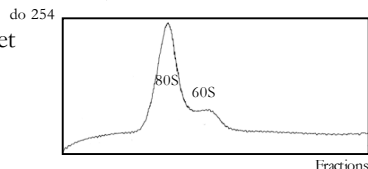
30 min à 15 000 g

Le surnageant est resuspendu puis déposé sur un gradient de saccharose

22h à 50 000 g



Fractionnement du gradient et mesure de la do à 254 nm

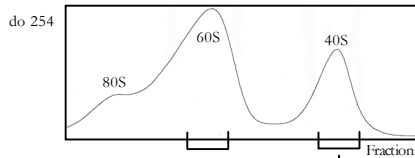


Fractions

30 min à 15 000 g

Le surnageant est déposé sur un gradient de saccharose

16h à 80 000 g



Fractionnement des gradients et mesure de la do à 254 nm



Les fractions « 60S » et « 40S » sont réunies séparément puis sont concentrées dans le tampon d'association

IV.2.5.3 Purification des sous-unités ribosomiques 60S et 40S

Une faible concentration en Mg^{2+} et une concentration élevée en sel favorisent la dissociation des ribosomes 80S en sous unité 60S et 40S. Ces dernières sont séparées selon leur coefficient de sédimentation sur un gradient de saccharose 10 à 30%. Les 3/4 des culots sont resuspendus dans **du tampon de dissociation** puis les granules sont éliminés par une centrifugation de 30 000 g pendant 30 min. 60 unités de do_{260} du surnageant sont chargées sur un gradient de saccharose 10-30% qui est soumis à une centrifugation de 80 000 g durant 16 h. Les gradients sont fractionnés à raison de 1 ml et la do_{254} est mesurée.

Après leur assemblage, les fractions correspondant aux pics 60S et 40S sont concentrées dans le **tampon d'association** dans une cellule de concentration Amicon (voir paragraphe IV.2.3.1.b). Les échantillons sont aliquotés et congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Tampon de dissociation : 50 mM Hepes pH 7,5, 500 mM acétate K^+ , 0,05 mM acétate Mg^{2+}

Tampon d'association : 50 mM Hepes pH 7,5, 60 mM acétate K^+ , 3 mM acétate Mg^{2+}

IV.2.5.4 Lavage des ribosomes et des sous-unités ribosomiques 60S et 40S

Afin de détacher les facteurs et les protéines s'associant aux ribosomes, les culots des ribosomes ou des sous-unités ribosomiques sont resuspendus dans du **tampon de lavage** contenant une concentration élevée de sel (650 mM acétate K^+). Après une centrifugation de 30 000 g pendant 30 min, le surnageant est soumis à une nouvelle centrifugation de 180 000 g pendant 2 h. Le surnageant correspondant à la fraction enrichie en facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction est aliquote et gardé à -20°C. Les culots de ribosome sont lavés avec le tampon de lavage, centrifugés à 30 000 g durant 30 min puis le surnageant est centrifugé à travers un **coussin de saccharose** (1 volume de coussin pour 3 volumes d'échantillon) à 300 000 g pendant 2 h. Cette étape est répétée deux fois. Les culots obtenus sont gardés à -80°C. L'ensemble des étapes pour purifier le ribosome 80S et les sous unités 40S et 60S est résumé dans la Figure 38.

Tampon de lavage : 50 mM Hepes pH 7,5, 650 mM acétate K^+ , 5 mM acétate Mg^{2+} , 2 mM DTT

Coussin de saccharose : 50 mM Hepes pH 7,5, 200 mM NH_4Cl , 300 mM KCl , 20 mM Mg_2Cl , 30% saccharose, 5 mM β -mercaptoéthanol

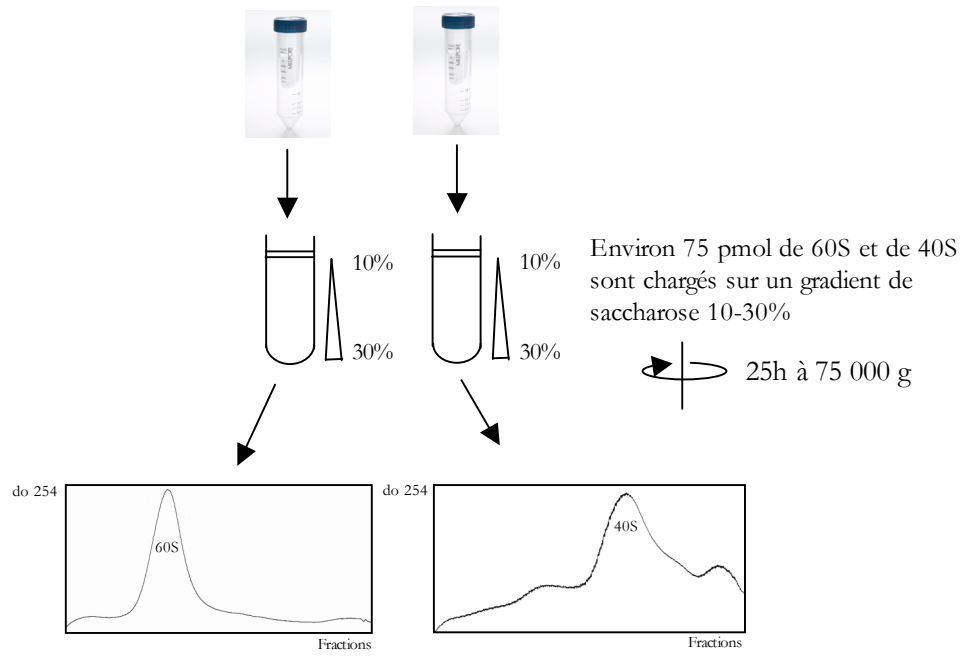


Figure 38 : Représentation schématique des étapes de purification des ribosomes eucaryotiques et des sous unités 40S et 60S à partir de germe de blé.

IV.2.5.5 Formation et analyse des complexes ribosomiques

a. A travers un gradient de saccharose

75 pmoles du ribosome 80S et de sous unités 60S ou 40S sont incubées avec environ 150 pmoles de RISP recombinante dans du tampon d'association à 30°C pendant 30 min. Les complexes formés sont déposés sur un gradient de saccharose linéaire 10-30% (rotor SW41) et soumis à une centrifugation de 50 000 g pendant 22 h à 4°C pour le ribosome 80S et de 75 000 g pendant 25 h à 4°C pour les sous unités 60S et 40S. Le gradient est fractionné à raison de 1 ml et la densité optique est mesurée à 254 nm. Les protéines de chaque fraction sont précipitées au TCA 10% et fractionnées sur un gel SDS-PAGE 12%. La protéine RISP est révélée par western blot par chimioluminescence.

b. A travers un coussin de saccharose

50 pmoles de la sous unité 60S ont été incubées avec environ 100 pmoles de la protéine RISP ou des mutants de délétions de RISP selon la méthode décrite précédemment. Les complexes sont chargés sur 800 µl de coussin de saccharose 30% fait dans le tampon d'association et soumis à une centrifugation de 100 000 g pendant 2h30 à 4°C. Les protéines du surnageant sont précipitées au TCA 10% alors que les culots sont lavés avec du tampon de d'association puis resuspendus dans du tampon de Laemmli. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE 12% et la protéine RISP est révélée par chimioluminescence.

IV.2.6 Formation de complexes impliquant les microtubules

Les microtubules sont purifiés à partir de cerveau de porc et exempts de protéines associées aux microtubules nous ont été fournies par A.-C. Schmit, IBMP Strasbourg.

Trente µg de microtubules sont stabilisés dans du **tampon PEM** en présence de 100 µM de taxol et de 1 mM de GTP (pH 7,5) puis sont incubés à 37°C pendant 10 min. Les microtubules sont ensuite incubés avec la sous unité 60S, la protéine RISP ou le complexe 60S-RISP préformés, dans du tampon d'association en présence de 1 mM de GTP, pendant 20

min à 30°C. Les complexes obtenus sont déposés sur un coussin de saccharose 35% (volume 600 µl) puis centrifugés 20 min à 100 000 g à 22°C. Les culots obtenus sont lavés 2 fois avec du tampon PEM puis resuspendus dans du tampon de Laemmli. Les protéines du surnageant sont précipitées au TCA 10% et le culot est resuspendu dans du tampon de Laemmli. Les protéines sont chargées sur un gel SDS-PAGE 12% et révélées par Western blot.

Tampon PEM : 0,1 M Pipes pH 6,1, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄

Bibliographie

- Acker MG, Shin BS, Dever TE, Lorsch JR** (2006). Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *J Biol Chem* 281(13) : 8469-75
- Ahmadian G, Randhawa JS, Easton AJ** (2000). Expression of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. *EMBO J* 19(11) : 2681-9
- Algire MA, Maag D, Savio P, Acker MG, Tarun SZ Jr, Sachs AB, Asano K, Nielsen KH, Olsen DS, Phan L, Hinnebusch AG, Lorsch JR** (2002). Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *RNA* 8(3):382-97
- Algire MA, Maag D, Lorsch JR** (2005). Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Mol Cell* 20(2) : 251-62
- Algire MA, Lorsch JR** (2006). Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol* 10(5) : 480-6
- Alisch RS, Garcia-Perez JL, Muotri AR, Gage FH, Moran JV** (2006). Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes Dev* 20(2) : 210-24
- Allen GS, Zavialov A, Gursky R, Ehrenberg M, Frank J** (2005). The cryo-EM structure of a translation initiation complex from Escherichia coli. *Cell* 121(5) : 703-12
- Altmann M, Muller PP, Wittmer B, Ruchti F, Lanker S, Trachsel H** (1993). A Saccharomyces cerevisiae homologue of mammalian translation initiation factor 4B contributes to RNA helicase activity. *EMBO J* 12(10) : 3997-4003
- Anderson EJ, Qui SG, Schoelz JE** (1991). Genetic analysis of determinants of disease severity and virus concentration in cauliflower mosaic virus. *Virology* 181(2) : 647-55
- Anderson P, Kedersha N** (2006). RNA granules. *Journal of cell biology*, 172(6): 803-808
- Asano K, Kinzy TG, Merrick WC, Hershey JW** (1997). Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *J Biol Chem* 272(2) : 1101-9
- Asano K, Clayton J, Shalev A, Hinnebusch AG** (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation. *Genes Dev* 14(19) : 2534-46
- Balakin AG, Smith L, Fournier MJ** (1996). The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 86(5) : 823-34
- Balazs E** (1990). Disease symptoms in transgenic tobacco induced by integrated gene VI of cauliflower mosaic virus. *Virus Genes* 3(3) : 205-11
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA** (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289(5481) : 905-20
- Barakat A, Szick-Miranda K, Chang IF, Guyot R, Blanc G, Cooke R, Delseny M, Bailey-Serres J** (2001). The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the Arabidopsis genome. *Plant Physiol* 127(2) : 398-415
- Barbarese E, Koppel DE, Deutscher MP, Smith CL, Ainger K, Morgan F, Carson JH** (1995). Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J Cell Sci* 108 (Pt 8) : 2781-90
- Baronas-Lowell DM, Warner JR** (1990). Ribosomal protein L30 is dispensable in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* 10(10) : 5235-43

- Baskin TI** (2001). On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215(1-4) : 150-71
- Baskin TI, Beemster GT, Judy-March JE, Marga F** (2004). Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of Arabidopsis. *Plant Physiol* 135(4) : 2279-90
- Bassell GJ, Zhang H, Byrd AL, Femino AM, Singer RH, Taneja KL, Lifshitz LM, Herman IM, Kosik KS** (1998). Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci* 18(1) : 251-65
- Basu U, Si K, Warner JR, Maitra U** (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* 21(5) : 1453-62
- Bayliss CD, Smith GL** (1997). Vaccinia virion protein VP8, the 25 kDa product of the L4R gene, binds single-stranded DNA and RNA with similar affinity. *Nucleic Acids Res* 25(20) : 3984-90
- Bi X, Goss DJ** (2000). Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem* 275(23) : 17740-6
- Bilgin DD, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP** (2003). P58(IPK), a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Dev Cell* 4(5) : 651-61
- Blackwell JR et Horgan R** (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS*, 295 : 10-12
- Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Beknazariants D, Si-Ammour A, Park HS, Vazquez F, Robertson D, Meins F Jr, Hohn T, Pooggin MM** (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res* 34(21) : 6233-46
- Block KL, Vornlocher HP, Hershey JW** (1998). Characterization of cDNAs encoding the p44 and p35 subunits of human translation initiation factor eIF3. *J Biol Chem* 273(48) : 31901-8
- Bokros CL, Hugdahl JD, Kim HH, Hanesworth VR, van Heerden A, Browning KS, Morejohn LC** (1995). Function of the p86 subunit of eukaryotic initiation factor (iso)4F as a microtubule-associated protein in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(15) : 7120-4
- Browning KS, Fletcher L, Lax SR, Ravel JM** (1989). Evidence that the 59-kDa protein synthesis initiation factor from wheat germ is functionally similar to the 80-kDa initiation factor 4B from mammalian cells. *J Biol Chem* 264(15) : 8491-4
- Browning KS, Webster C, Roberts JK, Ravel JM** (1992). Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem* 267(14) : 10096-100
- Browning KS** (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol* 32(1-2) : 107-44
- Burd CG, Matunis EL, Dreyfuss G** (1991). The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol Cell Biol* 11(7) : 3419-24
- Bushell M, Wood W, Clemens MJ, Morley SJ** (2000). Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis. *Eur J Biochem* 267(4) : 1083-91
- Bushell M, Wood W, Carpenter G, Pain VM, Morley SJ, Clemens MJ** (2001). Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages. *J Biol Chem* 276(26) : 23922-8
- Carberry SE, Goss DJ** (1991). Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit alpha-globin mRNA. *Biochemistry* 30(18) : 4542-5

- Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK, Schaad MC** (1996). Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell* 8(10) : 1669-81
- Cecchini E, Gong Z, Geri C, Covey SN, Milner JJ** (1997). Transgenic Arabidopsis lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies. *Mol Plant Microbe Interact* 10(9) : 1094-101
- Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhauser N, Marchisio PC, Biffo S** (2006). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426(6966) : 579-84
- Cerritelli SM, Fedoroff OY, Reid BR, Crouch RJ** (1998). A common 40 amino acid motif in eukaryotic RNases H1 and caulimovirus ORF VI proteins binds to duplex RNAs. *Nucleic Acids Res* 26(7) : 1834-40
- Chabanon H, Mickleburgh I, Hesketh J** (2004). Zipcodes and postage stamps: mRNA localisation signals and their trans-acting binding proteins. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3(3) : 240-56
- Champagne J, Benhamou N, Leclerc D** (2004). Localization of the N-terminal domain of cauliflower mosaic virus coat protein precursor. *Virology* 324(2) : 257-62
- Chen JJ, London IM** (1995). Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem Sci* 20 : 105-108.
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R** (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447(7146) : 823-8
- Cheng S, Gallie DR** (2006). Wheat eukaryotic initiation factor 4B organizes assembly of RNA and eIFiso4G, eIF4A, and poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 281(34) : 24351-64
- Child SJ, Miller MK, Geballe AP** (1999). Translational control by an upstream open reading frame in the HER-2/neu transcript. *J Biol Chem* 274(34) : 24335-41
- Chuong SD, Good AG, Taylor GJ, Freeman MC, Moorhead GB, Muench DG** (2004). Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells. *Mol Cell Proteomics* 3(10) : 970-83
- Citovsky V, Zambryski P** (1991). How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections? *Bioessays* 13(8) : 373-9
- Clemens MJ, Elia A** (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* (9) : 503-24
- Clemens MJ** (2005). Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses. *Semin Cell Dev Biol* 16(1) : 13-20
- Cole AB, Kiraly L, Ross K, Schoelz JE** (2001). Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of Nicotiana species to cauliflower mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* 14(1) : 31-41
- Covey SN, Hull R** (1981). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA. Detection of transcripts, properties, and location of the gene encoding the virus inclusion body protein. *Virology* 11, 463-474
- Craig AW, Haghghat A, Yu AT, Sonenberg N** (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392(6675) : 520-3
- Daubert SD, Schoelz J, Debaio L, Shepherd RJ** (1984). Expression of disease symptoms in cauliflower mosaic virus genomic hybrids. *J Mol Appl Genet* 2(6) : 537-47
- Daubert S, Routh G** (1990). Point mutations in cauliflower mosaic virus gene VI confer host-specific symptom changes. *Mol Plant Microbe Interact* 3(5) : 341-5

- Davies E, Abe S, Larkins BA, Clore AM, Quatrano RS, Weidner S** (1998). The role of the cytoskeleton in plant proteinsynthesis. In *A look beyond translation: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants*. Edited by J. Bailey-Serres and D.R. Gallie. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland. pp. 115-124
- Decatur WA, Fournier MJ** (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* 27(7) : 344-51
- Dechampsme AM, Koroleva O, Leger-Silvestre I, Gas N, Camier S** (1999). Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway. *J Cell Biol* 145(7) : 1369-80
- De Tapia M, Himmelbach A, Hohn T** (1993). Molecular dissection of the cauliflower mosaic virus translation transactivator. *EMBO J* 12(8) : 3305-14
- Dever TE, Yang W, Astrom S, Bystrom AS, Hinnebusch AG** (1995). Modulation of tRNA(iMet), eIF-2, and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met-tRNA(iMet) ternary complexes. *Mol Cell Biol* 15(11) : 6351-63
- Dresios J, Derkatch IL, Liebman SW et Synetos D** (2000). Yeast ribosomal protein L24 affects the kinetics of protein synthesis and ribosomal protein L39 improves translational accuracy, while mutants lacking both remain viable. *Biochemistry* 39 : 7236-7244
- Drucker M, Froissart R, Hebrard E, Uzest M, Ravallec M, Esperandieu P, Mani JC, Pugniere M, Roquet F, Fereres A, Blanc S** (2002). Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(4) : 2422-7
- Du TG, Schmid M, Jansen RP** (2007). Why cells move messages: the biological functions of mRNA localization. *Semin Cell Dev Biol* 18(2) : 171-7
- Dube P, Wieske M, Stark H, Schatz M, Stahl J, Zemlin F, Lutsch G, van Heel M** (1998). The 80S rat liver ribosome at 25 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *Structure* 6(3) : 389-99
- Dubowy J, Macdonald PM** (1998). Localization of mRNAs to the oocyte is common in *Drosophila* ovaries. *Mech Dev* 70(1-2) : 193-5
- El-Baradi TT, Raue HA, De Regt CH, Planta RJ** (1984). Stepwise dissociation of yeast 60S ribosomal subunits by LiCl and identification of L25 as a primary 26S rRNA binding protein. *Eur J Biochem* 144(2) : 393-400
- Elmer JS, Brand L, Sunter G, Gardiner WE, Bisaro DM, Rogers SG** (1988). Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Res* 16(14B) : 7043-60
- Farina KL, Singer RH** (2002). The nuclear connection in RNA transport and localization. *Trends Cell Biol* 12(10) : 466-72
- Ferreira-Cerca S, Poll G, Gleizes PE, Tschochner H, Milkereit P** (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* 20(2) : 263-75
- Fraser CS, Lee JY, Mayeur GL, Bushell M, Doudna JA, Hershey JW** (2004). The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits in vitro. *J Biol Chem* 279(10) : 8946-56
- Froissart R, Uzest M, Ruiz-Ferrer V, Drucker M, Hebrard E, Hohn T, Blanc S** (2004). Splicing of Cauliflower mosaic virus 35S RNA serves to downregulate a toxic gene product. *J Gen Virol* 85(Pt 9) : 2719-26

- Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F** (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 14 (313) : 17-42
- Fütterer J, Gordon K, Bonneville JM, Sanfacon H, Pisan B, Penswick J, Hohn T** (1988). The leading sequence of caulimovirus large RNA can be folded into a large stem-loop structure. *Nucleic Acids Res* 16(17) : 8377-90
- Fütterer J, Hohn T** (1991). Translation of a polycistronic mRNA in the presence of the cauliflower mosaic virus transactivator protein. *EMBO J* 10(12) : 3887-96
- Fütterer J, Rothnie HM, Hohn T, Potrykus I** (1997). Rice tungro bacilliform virus open reading frames II and III are translated from polycistronic pregenomic RNA by leaky scanning. *J Virol* 71(10) : 7984-9
- Gadal O, Strauss D, Kessl J, Trumpower B, Tollervey D, Hurt E** (2001). Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21(10):3405-15
- Gallie DR** (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA. *Genes Dev* 5(11) : 2108-16
- Gallie DR, Browning KS** (2001). eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 276(40) : 36951-60
- Gallie DR** (2002). Protein-protein interactions required during translation. *Plant Mol Biol* 50(6) : 949-70
- Geri C, Cecchini E, Giannakou ME, Covey SN, Milner JJ** (1999). Altered patterns of gene expression in Arabidopsis elicited by cauliflower mosaic virus (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Mol Plant Microbe Interact* 12(5) : 377-84
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N** (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13(11) : 1422-37
- Gomez E, Mohammad SS, Pavitt GD** (2002). Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: the guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation. *EMBO J* 21(19) : 5292-301
- Gonzalo P, Reboud JP** (2003). The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. *Biol Cell* 95(3-4) : 179-93
- Gould PS, Easton AJ** (2005). Coupled translation of the respiratory syncytial virus M2 open reading frames requires upstream sequences. *J Biol Chem* 280(23) : 21972-80
- Grandi P, Rybin V, Bassler J, Petfalski E, Strauss D, Marzioch M, Schäfer T, Kuster B, Tschochner H, Tollervey D, Gavin AC, Hurt E** (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* 10(1) : 105-15
- Green R, Noller HF** (1997) Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* 66 : 679-716
- Groft CM, Burley SK** (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* 9(6) : 1273-83
- Guerra-Peraza O, de Tapia M, Hohn T, Hemmings-Mieszczak M** (2000). Interaction of the cauliflower mosaic virus coat protein with the pregenomic RNA leader. *J Virol* 74(5) : 2067-72
- Guilley H, Richards KE, Jonard G** (1983). Observations concerning the discontinuous DNAs of cauliflower mosaic virus. *EMBO J* 2(2) : 277-82

- Haas M, Geldreich A, Bureau M, Dupuis L, Leh V, Vetter G, Kobayashi K, Hohn T, Ryabova L, Yot P, Keller M** (2005). The open reading frame VI product of Cauliflower mosaic virus is a nucleocytoplasmic protein: its N terminus mediates its nuclear export and formation of electron-dense viroplasms. *Plant Cell* 17(3) : 927-43
- Hamada S, Ishiyama K, Sakulsingharoj C, Choi SB, Wu Y, Wang C, Singh S, Kawai N, Messing J, Okita TW** (2003). Dual regulated RNA transport pathways to the cortical region in developing rice endosperm. *Plant Cell* 15(10) : 2265-72
- Hamill D, Davis J, Drawbridge J, Suprenant KA** (1994). Polyribosome targeting to microtubules: enrichment of specific mRNAs in a reconstituted microtubule preparation from sea urchin embryos. *J Cell Biol* 127(4) : 973-84
- Han Y, Yu J, Guo F, Watkins SC** (2006). Polysomes are associated with microtubules in fertilized eggs of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*). *Protoplasma* 227(2-4) : 223-7
- Harding HP, Zhang Y, Ron D** (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397(6716) : 271-4
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D** (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11(3) : 619-33
- Hardtke CS, Berleth T** (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* 17, 1405-11
- Harris TE et Lawrence Jc Jr** (2003). TOR signaling. *Sci STKE* 212 : 1-17
- Hentze MW** (1997). eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science* 275(5299) : 500-1
- Herold J, Andino R** (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* 7(3) : 581-91
- Hershey JWB, Merrick WC** (2000). The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. *Translational Control of Gene Expression*. N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews, editors. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. 33-88.
- Hesketh JE** (1996). mRNA targeting: signals in the 3'-untranslated sequences for sorting of some mRNAs. *Biochem Soc Trans* 24(2) : 521-7
- Hinnebusch AG** (1997). Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J Biol Chem* 272(35) : 21661-4
- Hinnebusch AG** (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* 31(10) : 553-62
- Ho JH, Kallstrom G, Johnson AW** (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* 151(5) : 1057-66
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J** (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123(4) : 569-80
- Horvath CM, Williams MA, Lamb RA** (1990). Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J* 9(8) : 2639-47
- Hoshino S, Imai M, Kobayashi T, Uchida N, Katada T** (1999). The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J Biol Chem* 274(24) : 16677-80

- Huang HK, Yoon H, Hannig EM, Donahue TF** (1997). GTP hydrolysis controls stringent selection of the AUG start codon during translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11(18) : 2396-413
- Huang Z, Han Y, Howell SH** (2001). Effects of movement protein mutations on the formation of tubules in plant protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and Cauliflower mosaic virus movement protein. *Mol Plant Microbe Interact* 14(8) : 1026-31
- Hull R, Covey SN** (1983). Characterisation of cauliflower mosaic virus DNA forms isolated from infected turnip leaves. *Nucleic Acids Res* 11(6) : 1881-95
- Iacono M, Mignone F, Pesole G** (2005). uAUG and uORFs in human and rodent 5'untranslated mRNAs. *Gene* 11 (349) : 97-105
- Im KH, Cosgrove DJ, Jones AM** (2000). Subcellular localization of expansin mRNA in xylem cells. *Plant Physiol* 123(2) : 463-70
- Ishida T, Thitamadee S, Hashimoto T** (2007). Twisted growth and organization of cortical microtubules. *J Plant Res* 120(1) : 61-70
- Jackson RJ** (2005). Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6) : 1231-41
- Jackson RJ, Standart N** (2007). How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE* 2007(367) : re1
- Jacobson A, Peltz SW** (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 65 : 693-739
- Jacquot E, Geldreich A, Keller M, Yot P** (1998). Mapping regions of the cauliflower mosaic virus ORF III product required for infectivity. *Virology* 242(2) : 395-402
- Jansen RP** (1999). RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J* 13(3) : 455-66
- Jansen RP** (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4) : 247-56
- Kapp LD, Lorsch JR** (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73 : 657-704
- Karim MM, Svitkin YV, Kahvejian A, De Crescenzo G, Costa-Mattioli M, Sonenberg N** (2006). A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(25) : 9494-9
- Karimi R, Pavlov MY, Buckingham RH, Ehrenberg M** (1999). Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell* 3(5):601-9
- Karsies A, Hohn T, Leclerc D** (2001). Degradation signals within both terminal domains of the cauliflower mosaic virus capsid protein precursor. *Plant J* 27(4) : 335-43
- Karsies A, Merkle T, Szurek B, Bonas U, Hohn T, Leclerc D** (2002). Regulated nuclear targeting of cauliflower mosaic virus. *J Gen Virol* 83(Pt 7) : 1783-90
- Kasteel DT, Perbal MC, Boyer JC, Wellink J, Goldbach RW, Maule AJ, van Lent JW** (1996). The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells. *J Gen Virol* 77 (Pt 11) : 2857-64
- Kaufman RJ** (2004). Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 29(3) : 152-8

- Kawaguchi R, Bailey-Serres J** (2005). mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 33 : 955-965
- Kerekatte V, Keiper BD, Badorff C, Cai A, Knowlton KU, Rhoads RE** (1999). Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol* 73(1) : 709-17
- Khaleghpour K, Kahvejian A, De Crescenzo G, Roy G, Svitkin YV, Imataka H, O'Connor-McCourt M, Sonenberg N** (2001). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* 21(15) : 5200-13
- Khan MA, Goss DJ** (2005). Translation initiation factor (eIF) 4B affects the rates of binding of the mRNA m7G cap analogue to wheat germ eIFiso4F and eIFiso4F.PABP. *Biochemistry* 44(11) : 4510-6
- Khelifa M, Journou S, Krishnan K, Gargani D, Esperandieu P, Blanc S, Drucker M** (2007). Electron-lucent inclusion bodies are structures specialized for aphid transmission of cauliflower mosaic virus. *J Gen Virol* 88(Pt 10) : 2872-80
- Kim MI, Park SW, Yu SH, Cho HS, Ha HJ, Hwang I, Pai HS** (2001). Molecular characterization of the NeIF2Bbeta gene encoding a putative eIF2B beta-subunit in Nicotiana tabacum. *Mol Cells* 11(1) : 110-4
- Kim TH, Kim BH, Yahalom A, Chamovitz DA, von Arnim AG** (2004). Translational regulation via 5' mRNA leader sequences revealed by mutational analysis of the Arabidopsis translation initiation factor subunit eIF3h. *Plant Cell* 16(12) : 3341-56
- Kim BH, Cai X, Vaughn JN, von Arnim AG** (2007). On the functions of the h subunit of eukaryotic initiation factor 3 in late stages of translation initiation. *Genome Biol* 8(4) : R60
- Kiss T** (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J* 20(14) : 3617-22
- Kiss-László Z, Blanc S, Hohn T** (1995). Splicing of cauliflower mosaic virus 35S RNA is essential for viral infectivity. *EMBO J* 14(14) : 3552-62
- Kiss-László Z, Henry Y, Bachelier JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T** (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85(7) : 1077-88
- Kobayashi K, Nakayashiki H, Tsuge S, Mise K, Furusawa I** (1998). Accumulation kinetics of viral gene products in cauliflower mosaic virus-infected turnip protoplasts. *Microbiol Immunol* 42(1) : 65-9
- Kobayashi K, Tsuge S, Stivolone L, Hohn T** (2002). The cauliflower mosaic virus virion-associated protein is dispensable for viral replication in single cells. *J Virol* 76(18) : 9457-64
- Kobayashi K, Hohn T** (2003). Dissection of cauliflower mosaic virus transactivator/viroplasm reveals distinct essential functions in basic virus replication. *J Virol* 77(15) : 8577-83
- Kobayashi K, Hohn T** (2004). The avirulence domain of Cauliflower mosaic virus transactivator/viroplasm is a determinant of viral virulence in susceptible hosts. *Mol Plant Microbe Interact* 17(5) : 475-83
- Kolupaeva VG, Unbehaun A, Lomakin IB, Hellen CU, Pestova TV** (2005). Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* 11(4) : 470-86
- Kong LJ, Hanley-Bowdoin L** (2002). A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *Plant Cell* 14(8) : 1817-32

- Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Rhoads RE** (2000). Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J Biol Chem* 275(52) : 41369-76
- Kowalak JA, Bruenger E, McCloskey JA** (1995). Posttranscriptional modification of the central loop of domain V in Escherichia coli 23 S ribosomal RNA. *J Biol Chem* 270(30) : 17758-64
- Kozak M** (1984). Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Res* 12(9) : 3873-93
- Kozak M** (1986). Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(9) : 2850-4
- Kozak M** (1987). Effects of intergenic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol Cell Biol* 7(10) : 3438-45
- Kozak M** (2001). Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res* 29(24) : 5226-32
- Krishnamoorthy T, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, Hinnebusch AG** (2001). Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol* (15) : 5018-30
- Kruiswijk T, Planta RJ, Krop JM** (1978). The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast. *Biochim Biophys Acta* 517(2) : 378-89
- Kuyumcu-Martinez NM, Joachims M, Lloyd RE** (2002). Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J Virol* 76(5) : 2062-74
- Kyung-Hoan Im, Daniel J. Cosgrove, and Alan M. Jones** (2000). Subcellular Localization of Expansin mRNA in Xylem Cells. *Plant Physiol* 123 : 463-470
- Langland JO, Langland LA, Browning KS, Roth DA** (1996). Phosphorylation of plant eukaryotic initiation factor-2 by the plant-encoded double-stranded RNA-dependent protein kinase, pPKR, and inhibition of protein synthesis in vitro. *J Biol Chem* 271(8) : 4539-44
- Lazarowitz SG, Beachy RN** (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11(4) : 535-48
- Le H, Tanguay RL, Balasta ML, Wei CC, Browning KS, Metz AM, Goss DJ, Gallie DR** (1997). Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* 272(26) : 16247-55
- Le H, Browning KS, Gallie DR** (1998). The phosphorylation state of the wheat translation initiation factors eIF4B, eIF4A, and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination. *J Biol Chem* 273(32) : 20084-9
- Leclerc D, Chapdelaine Y, Hohn T** (1999). Nuclear targeting of the cauliflower mosaic virus coat protein. *J Virol* 73(1) : 553-60
- Lee JH, Choi SK, Roll-Mecak A, Burley SK, Dever TE** (1999). Universal conservation in translation initiation revealed by human and archaeal homologs of bacterial translation initiation factor IF2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(8) : 4342-7
- Leh V, Jacquot E, Geldreich A, Haas M, Blanc S, Keller M, Yot P** (2001). Interaction between the open reading frame III product and the coat protein is required for transmission of cauliflower mosaic virus by aphids. *J Virol* 75(1) : 100-6

- Leonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF** (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* 74(17) : 7730-7
- Li Y, Leisner SM** (2002). Multiple domains within the Cauliflower mosaic virus gene VI product interact with the full-length protein. *Mol Plant Microbe Interact* 15(10) : 1050-7
- Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC Jr** (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 266(5185) : 653-6
- Linstead PJ, Hills GJ, Plaskitt KA, Wilson IG, Harker CL, Maule AJ** (1988). The subcellular location of the gene 1 product of cauliflower mosaic virus is consistent with a function associated with virus spread. *Journal of General Virology* 69, 1809-18
- Lipshitz HD, Smibert CA** (2000). Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev* 10(5) : 476-88
- Locatelli F, Magnani E, Vighi C, Lanzanova C, Coraggio I** (2002). Inhibitory effect of myb7 uORF on downstream gene expression in homologous (rice) and heterologous (tobacco) systems. *Plant Mol Biol* 48(3) : 309-18
- Lomakin IB, Kolupaeva VG, Marintchev A, Wagner G, Pestova TV** (2003). Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing. *Genes Dev* 17(22) : 2786-97
- López de Heredia M, Jansen RP** (2004). mRNA localization and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 16(1) : 80-5
- Lu PD, Jousse C, Marciniak SJ, Zhang Y, Novoa I, Scheuner D, Kaufman RJ, Ron D, Harding HP** (2004). Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *EMBO J.* 23(1) : 169-79
- Luo Y, Goss DJ** (2001). Homeostasis in mRNA initiation: wheat germ poly(A)-binding protein lowers the activation energy barrier to initiation complex formation. *J Biol Chem* 276(46) : 43083-6
- Groft CM, Burley SK** (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* 9(6) : 1273-83
- Luttermann C, Meyers G** (2007). A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J Biol Chem* 282(10) : 7056-65
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK** (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* 126(3) : 469-81
- Maag D, Lorsch JR** (2003). Communication between eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A on the yeast small ribosomal subunit. *J Mol Biol* 330(5) : 917-24
- Maag D, Fekete CA, Gryczynski Z, Lorsch JR** (2005). A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol Cell* 17(2) : 265-75
- Maden BE** (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 39 : 241-303
- Majumdar R, Bandyopadhyay A, Maitra U** (2003). Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J Biol Chem* 278(8) : 6580-7
- Mallardo M, Schleich S, Krijnse Locker J** (2001). Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol Biol Cell* 12(12) : 3875-91

- Malygin AA, Shauro DD, Karpova GG** (2000). Proteins S7, S10, S16 and S19 of the human 40S ribosomal subunit are most resistant to dissociation by salt. *Biochim Biophys Acta* 1494(3) : 213-6
- Marintchev A, Kolupaeva VG, Pestova TV, Wagner G** (2003). Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4) : 1535-40
- Martinez-Izquierdo J, Hohn T** (1987). Cauliflower mosaic virus coat protein is phosphorylated in vitro by a virion-associated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(7) : 1824-1828
- Mazzolini L, Dabos P, Constantin S, Yot P** (1989). Further evidence that viroplasm are the site of Cauliflower mosaic virus genome replication by reverse transcription during viral infection. *J. Gen. Virol* 70, 3439-3449
- Mehta A, Trotta CR, Peltz SW** (2006). Derepression of the Her-2 uORF is mediated by a novel post-transcriptional control mechanism in cancer cells. *Genes Dev* 20(8) : 939-53
- Menissier J, de Murcia G, Lebeurier G, Hirth L** (1983). Electron microscopic studies of the different topological forms of the cauliflower mosaic virus DNA: knotted encapsidated DNA and nuclear minichromosome. *EMBO J* 2(7) : 1067-71
- Meyers G** (2003). Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem* 278(36) : 34051-60
- Meyers G** (2007). Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 81(18) : 9623-32
- Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE** (1994). Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(16) : 7668-72
- Mochly-Rosen D, Smith BL, Chen CH, Disatnik MH, Ron D** (1995). Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated C-kinase: a role in beta protein kinase C mediated signal transduction. *Biochem Soc Trans* 23(3) : 596-600
- Moissiard G, Voinnet O** (2006). RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(51) : 19593-8
- Moore PB, Steitz TA** (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu Rev Biochem* 72 : 813-50
- Morley SJ, Curtis PS, Pain VM** (1997). eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets. *RNA* 3(10) : 1085-104
- Morris DR, Geballe AP** (2000). Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* 20(23) : 8635-42
- Muench DG, Park NI** (2006). Messages on the move: the role of the cytoskeleton in mRNA localization and translation in plant cells. *Canadian Journal of Botany*, 84 : 572-580
- Nielsen KH, Szamecz B, Valasek L, Jivotovskaya A, Shin BS, Hinnebusch AG** (2004). Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control. *EMBO J* 23(5) : 1166-77
- Nikulin A, Eliseikina I, Tishchenko S, Nevskaya N, Davydova N, Platonova O, Piendl W, Selmer M, Liljas A, Drygin D, Zimmermann R, Garber M, Nikonov S** (2003). Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nat Struct Biol* 10(2) : 104-8
- Nishimura T, Wada T, Yamamoto KT, Okada K** (2005). The Arabidopsis STV1 protein, responsible for translation reinitiation, is required for auxin-mediated gynoecium patterning. *Plant Cell* 17(11) : 2940-53

- Nissan TA, Bassler J, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E** (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J* 21(20) : 5539-47
- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA** (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289(5481) : 920-30
- Nupponen NN, Porkka K, Kakkola L, Tanner M, Persson K, Borg A, Isola J, Visakorpi T** (1999). Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *Am J Pathol* 154(6) : 1777-83
- Ofengand J** (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett* 514(1) : 17-25
- Okita TW, Choi SB** (2002). mRNA localization in plants: targeting to the cell's cortical region and beyond. *Curr Opin Plant Biol* 5(6) : 553-9
- Olsen DS, Savner EM, Mathew A, Zhang F, Krishnamoorthy T, Phan L, Hinnebusch AG** (2003). Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *EMBO J* 22(2) : 193-204
- Olszewski NE, Guilfoyle TJ** (1983). Nuclei purified from cauliflower mosaic virus-infected turnip leaves contain subgenomic, covalently closed circular cauliflower mosaic virus DNAs. *Nucleic Acids Res* 11(24) : 8901-14
- Palacios I, Drucker M, Blanc S, Leite S, Moreno A, Fereres A** (2002). Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *J Gen Virol* 83(Pt 12) : 3163-71
- Palanichelvam K, Cole AB, Shababi M, Schoelz JE** (2000). Agroinfiltration of Cauliflower mosaic virus gene VI elicits hypersensitive response in Nicotiana species. *Mol Plant Microbe Interact* 13(11) : 1275-9
- Palanichelvam K, Schoelz JE** (2002). A comparative analysis of the avirulence and translational transactivator functions of gene VI of Cauliflower mosaic virus. *Virology* 293(2) : 225-33
- Pape T, Wintermeyer W, Rodnina MV** (1998). Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *EMBO J* 17(24) : 7490-7
- Park HS, Himmelbach A, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA** (2001). A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. *Cell* 106(6) : 723-33
- Park HS, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA** (2004). Eucaryotic initiation factor 4B controls eIF3-mediated ribosomal entry of viral reinitiation factor. *EMBO J* 23(6) : 1381-91
- Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG, Algire MA, Lorsch JR, Ramakrishnan V** (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* 26(1) : 41-50
- Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick WC, Sonenberg N** (1994). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J* 13(5) : 1205-1
- Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU** (1996). Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol* 16(12) : 6870-8
- Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU** (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394(6696) : 854-9
- Pestova TV, Hellen CU** (2000). The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 57(4) : 651-74

- Pestova TV, Kolupaeva VG** (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16(22) : 2906-22
- Pfeiffer P, Hohn T** (1983). Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects. *Cell* 33(3) : 781-9
- Pisareva VP, Pisarev AV, Hellen CU, Rodnina MV, Pestova TV** (2006). Kinetic analysis of interaction of eukaryotic release factor 3 with guanine nucleotides. *J Biol Chem* 281(52) : 40224-35
- Planta RJ, Mager WH** (1998). The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(5) : 471-7
- Plisson C, Uzest M, Drucker M, Froissart R, Dumas C, Conway J, Thomas D, Blanc S, Bron P** (2005). Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 346(1) : 267-77
- Ploubidou A, Moreau V, Ashman K, Reckmann I, Gonzalez C, Way M** (2000). Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *EMBO J* 19(15) : 3932-44
- Pooggin MM, Ryabova LA, He X, Futterer J, Hohn T** (2006). Mechanism of ribosome shunting in Rice tungro bacilliform pararetrovirus. *RNA* 12(5) : 841-50
- Pöyry TA, Kaminski A, Jackson RJ** (2004). What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes Dev* 18(1) : 62-75
- Qiu SG, Schoelz JE** (1992). Three regions of cauliflower mosaic virus strain W260 are involved in systemic infection of solanaceous hosts. *Virology* 190(2) : 773-82
- Rabindran SK** (2005). Antitumor activity of HER-2 inhibitors. *Cancer Lett* 227(1) : 9-23
- Rajkowitsch L, Vilela C, Berthelot K, Ramirez CV, McCarthy JE** (2004). Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *J Mol Biol* 335(1) : 71-85
- Ramakrishnan V** (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108(4) : 557-72
- Richert-Poggeler KR, Shepherd RJ** (1997). Petunia vein-clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology* 236(1) : 137-46
- Robaglia C, Caranta C** (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci* 11(1) : 40-5
- Rogers GW Jr, Richter NJ, Merrick WC** (1999). Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem* 274(18) : 12236-44
- Roll-Mecak A, Cao C, Dever TE, Burley SK** (2000). Universal conservation in translation initiation revealed by human and archaeal homologs of bacterial translation initiation factor IF2. *Proc Natl Acad Sci USA*
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S** (1998). Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J* 15(2) : 253-63
- Rothnie HM, Chapdelaine Y, Hohn T** (1994). Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies. *Adv Virus Res* 44 : 1-67
- Roy AL, Chakrabarti D, Datta B, Hileman RE, Gupta NK** (1988). Natural mRNA is required for directing Met-tRNA^f binding to 40S ribosomal subunits in animal cells: Involvement of Co-eIF-2A in natural mRNA-directed initiation complex formation. *Biochemistry* 27 : 8203-9

- Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N** (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol* 10(3) : 1134-44
- Ryabova LA, Hohn T** (2000). Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes Dev* 14(7) : 817-29
- Ryabova LA, Pooggin MM, Hohn T** (2006). Translation reinitiation and leaky scanning in plant viruses. *Virus Res* 119(1) : 52-62
- Sachs MS, Geballe AP** (2006). Downstream control of upstream open reading frames. *Genes Dev* 20(8) : 915-21
- Sanger M, Daubert S, Goodman RM** (1991). The regions of sequence variation in caulimovirus gene VI. *Virology* 182(2) : 830-4
- St Johnston D** (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81(2) : 161-70
- St Johnston D** (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(5) : 363-75
- Sanvito F, Piatti S, Villa A, Bossi M, Lucchini G, Marchisio PC, Biffo S** (1999). The beta4 integrin interactor p27(BBP/eIF6) is an essential nuclear matrix protein involved in 60S ribosomal subunit assembly. *J Cell Biol* 144(5) : 823-37
- Saveanu C, Bienvenu D, Namane A, Gleizes PE, Gas N, Jacquier A, Fromont-Racine M** (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J* 20(22) : 6475-84
- Schaad MC, Anderberg RJ, Carrington JC** (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273(2) : 300-6
- Schluenzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A** (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* 102(5) : 615-23
- Schneider RJ, Mohr I** (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* 28(3) : 130-6
- Schoelz J, Shepherd RJ, Daubert S** (1986). Region VI of cauliflower mosaic virus encodes a host range determinant. *Mol Cell Biol* 6(7) : 2632-7
- Schoelz JE, Shepherd RJ** (1988). Host range control of cauliflower mosaic virus. *Virology* 162(1) : 30-7
- Schüler M, Connell SR, Lescoute A, Giesebrecht J, Dabrowski M, Schroerer B, Mielke T, Penczek PA, Westhof E, Spahn CM** (2006). Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA. *Nat Struct Mol Biol* 13(12) : 1092-6
- Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, Cate JH** (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310(5749) : 827-34
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D** (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 8(4) : 517-27
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D** (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(5) : 1121-33
- Sedman SA, Gelembiuk GW, Mertz JE** (1990). Translation initiation at a downstream AUG occurs with increased efficiency when the upstream AUG is located very close to the 5' cap. *J Virol* 64(1) : 453-7

- Senger B, Lafontaine DL, Graindorge JS, Gadal O, Camasses A, Sanni A, Garnier JM, Breitenbach M, Hurt E, Fasiolo F** (2001). The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol Cell* 8(6) : 1363-73
- Sessions, R.A., Nemhauser, J.L., McCall, A., Roe, J.L., Feldmann, K.A., and Zambryski, P.C.** (1997). ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* 124, 4481-91
- Sharma K, Tollervey D** (1999). Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 5' end of 18S rRNA is required for pre-rRNA processing. *Mol Cell Biol* 19(9) : 6012-9
- Shepherd RJ, Richins RD, Shalla TA** (1979). Isolation and properties of the inclusions bodies of Cauliflower mosaic virus. *Virology* 102, 389-400
- Shin BS, Maag D, Roll-Mecak A, Arefin MS, Burley SK, Lorsch JR, Dever TE** (2002). Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell* 111(7) : 1015-25
- Si K, Maitra U** (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Mol Cell Biol* 19(2) : 1416-26
- Singh CR, He H, Li M, Yamamoto Y, Asano K** (2004). Efficient incorporation of eukaryotic initiation factor 1 into the multifactor complex is critical for formation of functional ribosomal preinitiation complexes in vivo. *J Biol Chem* 279(30) : 31910-20
- Singh CR, Curtis C, Yamamoto Y, Hall NS, Kruse DS, He H, Hannig EM, Asano K** (2005). Eukaryotic translation initiation factor 5 is critical for integrity of the scanning preinitiation complex and accurate control of GCN4 translation. *Mol Cell Biol* 25(13) : 5480-91
- Singh CR, Lee B, Udagawa T, Mohammad-Qureshi SS, Yamamoto Y, Pavitt GD, Asano K** (2006). An eIF5/eIF2 complex antagonizes guanine nucleotide exchange by eIF2B during translation initiation. *EMBO J* 25(19) : 4537-46
- Siridechadilok B, Fraser CS, Hall RJ, Doudna JA, Nogales E** (2005). Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* 310(5753) : 1513-5
- Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC, Shatkin AJ** (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(10) : 4843-7
- Spahn CM, Beckmann R, Eswar N, Penczek PA, Sali A, Blobel G, Frank J** (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107(3) : 373-86
- Spirin AS** (2002). Ribosome as a molecular machine. *FEBS Lett* 514(1) : 2-10
- Srivastava S, Verschoor A, Frank J** (1992). Eukaryotic initiation factor 3 does not prevent association through physical blockage of the ribosomal subunit-subunit interface. *J Mol Biol* 226(2) : 301-4
- Stavolone L, Villani ME, Leclerc D, Hohn T** (2005). A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(17) : 6219-24
- Stern S, Powers T, Changchien LM, Noller HF** (1989). RNA-protein interactions in 30S ribosomal subunits: folding and function of 16S rRNA. *Science* 244(4906) : 783-90
- Suprenant KA, Tempero LB, Hammer LE** (1989). Association of ribosomes with in vitro assembled microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 14(3) : 401-15

- Suprenant KA, Dean K, McKee J, Hake S** (1993). EMAP, an echinoderm microtubule-associated protein found in microtubule-ribosome complexes. *J Cell Sci* 104(2) : 445-50
- Suzuki Y, Ishihara D, Sasaki M, Nakagawa H, Hata H, Tsunoda T, Watanabe M, Komatsu T, Ota T, Isogai T, Suyama A, Sugano S** (2000). Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "Oligo-Capped" cDNA libraries. *Genomics* 64(3) : 286-97
- Tarun SZ Jr, Sachs AB** (1995). A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev* 9(23) : 2997-3007
- Tarun SZ Jr, Sachs AB** (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* 15(24) : 7168-77
- Thitamadee S, Tsuchihara K, Hashimoto T** (2002). Microtubule basis for left-handed helical growth in Arabidopsis. *Nature* 417(6885) : 193-6
- Thomas CL, Perbal C, Maule AJ** (1993). A mutation of cauliflower mosaic virus gene I interferes with virus movement but not virus replication. *Virology* 192(2) : 415-21
- Thomas CL, Maule AJ** (1995). Identification of the cauliflower mosaic virus movement protein RNA-binding domain. *Virology* 206(2) : 1145-9
- Thomas CL, Maule AJ** (1999). Identification of inhibitory mutants of Cauliflower mosaic virus movement protein function after expression in insect cells. *J Virol* 73(9) : 7886-90
- Thompson HA, Sadnik I, Scheinbuks J, Moldave K** (1977). Studies on native ribosomal subunits from rat liver. Purification and characterization of a ribosome dissociation factor. *Biochemistry* 16(10) : 2221-30
- Torruella M, Gordon K, Hohn T** (1989). Cauliflower mosaic virus produces an aspartic proteinase to cleave its polyproteins. *EMBO J* 8(10) : 2819-25
- Trapman J, Retel J, Planta RJ** (1975). Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp Cell Res* 90(1) : 95-104
- Uchida N, Hoshino S, Imataka H, Sonenberg N, Katada T** (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* 277(52) : 50286-92
- Uckun FM, Mao C, Jan ST, Huang H, Vassilev AO, Sudbeck EA, Navara CS, Narla RK** (2000). SPIKET and COBRA compounds as novel tubulin modulators with potent anticancer activity. *Curr Opin Investig Drugs* 1(2) : 252-6
- Udem SA, Warner JR** (1972). Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 65(2) : 227-42
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276, 1865-8
- Unbehaun A, Borukhov SI, Hellen CU, Pestova TV** (2004). Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev* 18(24) : 3078-93
- Unbehaun A, Marintchev A, Lomakin IB, Didenko T, Wagner G, Hellen CU, Pestova TV** (2007). Position of eukaryotic initiation factor eIF5B on the 80S ribosome mapped by directed hydroxyl radical probing. *EMBO J* 6(13) : 3109-23
- Valasek L, Hasek J, Nielsen KH, Hinnebusch AG** (2001). Dual function of eIF3j/Hcr1p in processing 20 S pre-rRNA and translation initiation. *J Biol Chem* 276(46) : 43351-60

- Valasek L, Mathew AA, Shin BS, Nielsen KH, Szamecz B, Hinnebusch AG** (2003). The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo. *Genes Dev* 17(6) : 786-99
- Valasek L, Nielsen KH, Zhang F, Fekete CA, Hinnebusch AG** (2004). Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection. *Mol Cell Biol*. 24(21) : 9437-55
- Valenzuela DM, Chaudhuri A, Maitra U** (1982). Eukaryotic ribosomal subunit anti-association activity of calf liver is contained in a single polypeptide chain protein of Mr = 25,500 (eukaryotic initiation factor 6). *J Biol Chem* 257(13) : 7712-9
- Vattem KM, Wek RC** (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(31) : 11269-74
- Venema J, Tollervey D** (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33 : 261-311
- Verschoor A, Warner JR, Srivastava S, Grassucci RA, Frank J** (1998). Three-dimensional structure of the yeast ribosome. *Nucleic Acids Res* 26(2) : 655-61
- Wang L, Wessler SR** (1998). Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize R gene. *Plant Cell* 10(10) : 1733-46
- Wang L, Wessler SR** (2001). Role of mRNA secondary structure in translational repression of the maize transcriptional activator Lc(1,2). *Plant Physiol* 125(3) : 1380-7
- Warner JR** (1989). Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 53 : 256-271
- Wasteneys GO** (2004). Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 7(6) : 651-60
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Smeekens S** (2004). A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *Plant Cell* 16(7) : 1717-29
- Wilhelm JE, Vale RD** (1993). RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol* 123(2) : 269-74
- Wilson KS, Noller HF** (1998). Molecular movement inside the translational engine. *Cell* 92(3) : 337-49
- Wintermantel WM, Anderson EJ, Schoelz JE** (1993). Identification of domains within gene VI of cauliflower mosaic virus that influence systemic infection of *Nicotiana bigelovii* in a light-dependent manner. *Virology* 196(2) : 789-98
- Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberte JF** (1997). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234(1) : 84-92
- Wool IG, Chan YL, Gluck A** (1995). Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem Cell Biol* 73(11-12) : 933-47
- Yamamoto Y, Singh CR, Marintchev A, Hall NS, Hannig EM, Wagner G, Asano K** (2005). The eukaryotic initiation factor (eIF) 5 HEAT domain mediates multifactor assembly and scanning with distinct interfaces to eIF1, eIF2, eIF3, and eIF4G. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(45) : 16164-9
- Yang ZX, An GY, Zhu ZP** (2001). Rice bicoid-related cDNA sequence and its expression during early embryogenesis. *Cell Res* 11(1) : 74-80

- Yoon HJ, Donahue TF** (1992). The suil suppressor locus in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a translation factor that functions during tRNA(iMet) recognition of the start codon. *Mol Cell Biol* 12(1) : 248-60
- Yot P** (2003). *Caulimoviridae* dans "Viruses and virus diseases of Poaceae" éd. Lapiere H et Signoret P, édition INRA.
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF** (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution.
- Yusupova G, Jenner L, Rees B, Moras D, Yusupov M** (2006). Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome. *Nature* 444(7117) : 391-4
- Zhang Y, Dickinson JR, Paul MJ, Halford NG** (2003). Molecular cloning of an arabidopsis homologue of GCN2, a protein kinase involved in co-ordinated response to amino acid starvation. *Planta* (4) : 668-75
- Zhang Z, Dietrich FS** (2005). Identification and characterization of upstream open reading frames (uORF) in the 5' untranslated regions (UTR) of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 48(2) : 77-87
- Zijlstra C, Schärer-Hernández N, Gal S, Hohn T** (1996). Arabidopsis thaliana expressing the cauliflower mosaic virus ORF VI transgene has a late flowering phenotype. *Virus Genes* 13(1) : 5-17

Université Louis Pasteur – Strasbourg I

• Résumé de la thèse de doctorat •

Discipline :

Science du vivant, 42000 06

Présenté par :

Odon Thiébeauld

Titre :

Réinitiation de la traduction dépendante de TAV au cours de l'infection des plantes par le virus de la mosaïque du chou fleur : caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle protéine cellulaire RISP

Unité de recherche :

UPR 2357 CNRS

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP)

Directrice de thèse :

Lyubov Ryabova (CR1, CNRS)

Chez les eucaryotes, la traduction des protéines se fait principalement à partir de messagers monocistroniques. Cependant, certains messagers contiennent plusieurs ORFs de petites tailles (sORF, < 30 nucléotides) présents dans la région 5' UTR en amont de l'ORF majeur. Plusieurs études, notamment effectuées chez la levure, ont démontré que les ribosomes qui ont préalablement traduit les sORFs réinitient la traduction de l'ORF majeur. En général, ces sORFs exercent une action inhibitrice sur la traduction de l'ORF majeur afin de réguler son expression. Alors que celui s'effectuant après un sORF est assez bien étudié, nous disposons peu d'informations concernant le mécanisme de réinitiation de la traduction après un long ORF (>100 nucléotides). Un des mécanismes les plus étudié est celui mis en oeuvre par le virus de

la mosaïque du chou fleur qui exprime un ARNm polycistronique codant pour la totalité des protéines virales. L'une d'entre elle, la protéine virale P6 (ou TAV), est un facteur essentiel qui agit en trans afin de médier la réinitiation de la traduction. ; nous parlerons ici de transactivation traductionnelle. Afin de mieux connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus, une des approches du laboratoire est d'identifier les facteurs cellulaires interagissant avec TAV et nécessaires à la réinitiation de la traduction.

Il s'avère que la protéine TAV interagit avec la machinerie traductionnelle tels que la sous unité ribosomique 60S, via les protéines L13, L18 et L24, et le facteur d'initiation de la traduction eIF3. Une des fonctions de TAV serait de stabiliser eIF3 sur les ribosomes en cours d'élongation, ce qui favorisera l'acquisition par le ribosome de facteurs nécessaires à la réinitiation de la traduction. Cependant, d'autres facteurs semblent entrer en jeu ; ainsi le criblage par double hybride chez la levure d'une banque d'ADNc provenant d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'isoler un nouveau facteur cellulaire interagissant avec TAV, RISP (Re-Initiation supporting factor). L'objectif principal de ma thèse a été d'établir si la protéine RISP est impliquée dans la réinitiation de la traduction médiée par TAV et d'élucider sa fonction dans la cellule hôte.

Caractérisation de RISP et de son domaine d'interaction avec TAV

RISP est exclusivement présente chez les plantes. Elle est codée par deux copies chez *Arabidopsis thaliana* et une copie chez *Oryza sativa* mais elle ne possède pas d'homologue chez les autres organismes quels que soient les règnes. RISP est une protéine acide d'environ 45 kDa qui possède plusieurs hélices α formant des motifs coiled-coil mais aucun domaine conservé n'a pu être mis en évidence. Une immunolocalisation subcellulaire de RISP établit que celle-ci forme des agrégats de petites et de grandes tailles dans le cytoplasme suggérant que RISP doit former des oligomères et/ou interagir avec des partenaires cellulaires. Nous avons démontré par GST pull down que la protéine RISP interagit avec elle même ; cela a été confirmé par un immunoblot dirigé contre RISP à partir d'un extrait total de protéines démontrant que RISP existe principalement sous forme de dimère. La caractérisation des domaines de TAV et de RISP impliqués dans l'interaction TAV-RISP a été effectuée chez la levure par la technique du double hybride : RISP interagit grâce à sa partie C terminale avec le domaine MAV de TAV, qui correspond au domaine minimal requis pour l'activité de transactivation de la traduction de TAV. L'interaction directe de RISP avec la région

MAV a été confirmée par GST pull-down, et le fait que RISP soit un partenaire de MAV suggère que RISP pourrait jouer un rôle dans la transactivation de la traduction.

RISP est un cofacteur de TAV pour la réinitiation de la traduction et interagit avec la machinerie traductionnelle

Afin d'établir si RISP influence la transactivation de la traduction, nous avons utilisé des protoplastes de *Nicotiana plumbaginifolia* transformés par deux constructions, l'une monocistronique et l'autre bicistronique, exprimant des marqueurs dont le niveau d'expression reflète respectivement l'activité de la traduction et de la réinitiation de la traduction. TAV et/ou RISP sont transitoirement surexprimées dans ces protoplastes. Seule la présence de TAV permet de détecter l'activité résultant de la réinitiation de la traduction et celle-ci augmente significativement si RISP est co-exprimé avec TAV suggérant que RISP est un cofacteur de TAV pour la réinitiation de la traduction.

Afin de connaître la fonction de RISP dans ce mécanisme traductionnel, nous voulions déterminer si RISP, comme TAV, interagit avec la machinerie traductionnelle et en particulier avec les ribosomes. Pour cela, les ribosomes et les sous unités 40S et 60S ont été purifiés à partir de germes de blé et nous avons pu établir que RISP copurifiait avec les ribosomes (80S), en particulier avec la grande sous unité (60S), mais pas avec la petite sous unité (40S). L'interaction de RISP avec 60S est forte et spécifique car elle résiste à des lavages en présence d'une concentration importante en sel. Par ailleurs, et des protéines recombinantes RISP, exprimées chez *E. coli*, peuvent se lier à la sous unité 60S mais pas au ribosome ou à la sous unité 40S, ce qui suggère que RISP doit interagir à l'interface de la sous unité 60S. Une immunolocalisation de RISP et des sous unité 60S dans des cellules de tabac BY2 montre que la majorité des agrégats de RISP colocalisent avec des agrégats de 60S. Enfin, des expériences de GST pull down ont établi une interaction directe entre RISP et 60S via les protéines ribosomales L7 et L24.

Il serait intéressant de déterminer si RISP est associée aux ribosomes en cours d'élongation, formant des polysomes, chez les plantes saines et infectées par le CaMV. En effet, il a été démontré auparavant que TAV stabilisait eIF3 sur les ribosomes en cours de la phase d'élongation (les polysomes) afin que celui-ci soit toujours attaché aux ribosomes lors de la terminaison de la traduction et puisse ainsi favoriser le recrutement de facteurs nécessaires pour réinitier la traduction. Ainsi, RISP et TAV sont détectées seulement dans la fraction polysomale de navets infectés nous

permettant de conclure que TAV doit stabiliser RISP sur les polysomes. Cela suggère également que TAV recrute RISP, et probablement les sous unités 60S afin de favoriser la réinitiation de la traduction.

RISP est associé aux microtubules

Afin de déterminer la fonction cellulaire de RISP dans la plante, nous avons établi des lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* exprimant un miRNA artificiel sous un promoteur fort spécifiquement dirigé contre les deux copies de RISP ou la copie d'intérêt. Ainsi, le miRNA, en ciblant les transcrits cibles, va induire leur dégradation par le mécanisme d'ARN silencing. Il s'avère que la dégradation des deux copies de RISP est létale pour la plante car aucun transformant n'a pu être isolé suggérant que RISP est une protéine essentielle pour la plante. Le silencing de la copie d'intérêt de RISP résulte en des transformants dont les feuilles présentent un phénotype assez caractéristique en forme d'hélice (« left-handed twisted »). Ce phénotype est particulier des mutants de la tubuline α ou γ ou, des mutants des protéines associées aux microtubules (MAP, microtubules-associated protein) impliquées dans la stabilité et la dynamique des microtubules. Ce résultat suggère que RISP est associée aux microtubules et semble être impliquée dans leur dynamique et/ou leur stabilité. *In vitro*, nous avons pu démontrer que RISP interagit avec la tubuline ainsi qu'avec les microtubules stabilisés au taxol. Dans les cellules de *Nicotiana benthamiana*, des expériences d'immunolocalisation démontrent qu'une majorité des agrégats de RISP décore les microtubules.

Sachant que RISP interagit avec la sous unité 60S et les microtubules, RISP pourrait être impliquée dans la fixation des ribosomes aux microtubules dans le cytoplasme. Ainsi, nous avons pu démontrer *in vitro* que seule la présence de RISP permet aux sous unité 60S de s'associer aux microtubules. L'immunolocalisation des sous unités 60S dans les cellules de tabac démontre aussi une colocalisation avec les microtubules. Il nous reste à déterminer si RISP est bien associée aux sous unités 60S qui colocalisent avec les microtubules.

Que rôle pourrait jouer les microtubules dans le cycle infectieux du CaMV, et plus précisément lors de la synthèse des protéines virales. La localisation des messagers est un mécanisme développé chez les eucaryotes afin de réguler la production locale de certaines protéines, proches du lieu de leur fonction. Cette localisation spécifique de ces messagers est régulée par la présence de protéines qui s'associent aux ARNm dans le noyau qui sont guidés le long du cytosquelette vers leur destination finale. Sachant que

la protéine virale TAV est une protéine nucléo-cytoplasmique qui possède une séquence de liaison aux ARN double brin et deux séquences de liaison à l'ARN simple brin, nous postulons que TAV peut se lier à l'ARNm viral 35S dans le noyau afin de le transporter dans le cytoplasme où il pourra s'associer aux microtubules via TAV. Par la suite, TAV interagit avec RISP probablement lié aux sous unités 60S, sur les microtubules, formant ainsi des « points chauds » de la traduction de l'ARNm 35S.

Nous avons pu isoler, par double hybride chez la levure, un partenaire de TAV qui correspond à une protéine de fonction similaire à la kinésine (TH 65) qui joue le rôle de protéine moteur des microtubules. Nous sommes entrain de confirmer cette interaction *in vitro* et d'établir que la présence de TH 65 permet l'association de TAV avec les microtubules. Nous envisageons de détecter l'ARNm 35S, en contexte infectieux, avec un oligonucléotide couplé à un fluorochrome afin de déterminer si le transcrit viral colocalise avec les microtubules et si cette colocalisation est dépendante de TAV.