



HAL
open science

Étude de complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans la régulation de l'expression des protéines au cours de l'initiation de la traduction

Marie Ménade

► To cite this version:

Marie Ménade. Étude de complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans la régulation de l'expression des protéines au cours de l'initiation de la traduction. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00278756

HAL Id: tel-00278756

<https://theses.hal.science/tel-00278756>

Submitted on 13 May 2008

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

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

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1

École doctorale ÉDISCE

Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Spécialité : Biotechnologies, santé, management

Présentée et soutenue publiquement par

Marie Ménade

Le mardi 18 septembre 2007

**Étude de complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans la régulation de
l'expression des protéines au cours de l'initiation de la traduction**

Président du jury : **Alain FAVIER**
Rapporteurs : **Théophile OHLMANN**
Stéphan VAGNER
Examinatrice : **Micheline FROMONT-RACINE**
Directeurs de thèse : **Emmanuel DROUET**
Pascal CHARTRAND

Thèse préparée à l'unité de Biologie structurale des interactions entre virus et cellule hôte (UVHCI), UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS et au Laboratoire du Dr Pascal Chartrand département de biochimie, faculté de médecine, Université de Montréal, Québec, Canada

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mes directeurs de thèse, le Professeur Emmanuel Drouet et le Docteur Pascal Chartrand pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs et pour avoir dirigé mes travaux de recherche pendant ces quatre années.

Je voudrais tout particulièrement souligner le soutien tout au long de ce parcours que m'a accordé Emmanuel Drouet et la confiance qu'il a su garder dans des choix parfois périlleux que j'ai faits.

Je remercie énormément Pascal Chartrand d'avoir pris en route cette aventure et de m'avoir chaperonnée jusqu'au bout de façon extrêmement professionnelle.

Je remercie vivement les Docteurs Stéphan Vagner et Théophile Ohlmann de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et tant que rapporteurs, le Docteur Micheline Fromont-Racine en tant qu'examinatrice et le Professeur Alain Favier d'avoir accepté d'être le président du jury.

Merci à Larissa pour tout ce qu'elle m'a permis d'apprendre et l'ouverture avec laquelle elle a su me confier des tâches qui impliquaient des responsabilités.

Merci à Sandrine qui m'a beaucoup soutenue pendant les longs débuts de cette aventure à Grenoble et surtout pour toute son amitié.

Merci à Nicolas avec qui j'ai appris énormément et grâce à qui nous avons pu mener à bout cet énorme et fort passionnant projet sur Khdl.

Merci à Catherine et Anne-Laure qui ont su me pousser ...à me dépasser!!!

Merci aussi à Olivia, Guillaume avec qui j'ai eu un très grand plaisir à travailler.

Merci à Kareen et Manon pour tout tout tout!!

Le plus grand merci à mes parents et à mon frère qui furent mes plus fervents supporteurs tout au long de cette difficile épreuve et pour leur soutien sans condition.

Merci à toi Pedrito qui m'a toujours poussée à progresser et à me relever dans les moments les plus pénibles et surtout pour tous les autres moments que nous passons chaque jour.

À mes parents

Sommaire

ABREVIATIONS	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. INTRODUCTION.....	9
1. <i>L'expression génique et la traduction</i>	9
2. <i>La maturation des ARN messagers</i>	11
a. L'épissage.....	11
b. La poly-adénylation de l'extrémité 3' de l'ARNm.....	12
c. La coiffe des ARN messagers.....	12
3. <i>L'expression des protéines</i>	14
II. INITIATION DE LA TRADUCTION.....	17
1. <i>Initiation de la traduction dépendante de la coiffe</i>	17
a. Reconnaissance de la coiffe de l'ARNm.....	17
1) Formation du complexe ternaire eIF2•GTP•ARNt _i ^{Met}	17
2) Formation du complexe de pré-initiation 43S.....	19
3) La coiffe est reconnue par le complexe hétérotrimérique eIF4F.....	19
4) Chargement du complexe 43S sur l'ARN messager.....	20
b. Le balayage.....	21
c. Assemblage du ribosome 80S et fin de l'initiation.....	24
d. Les facteurs canoniques impliqués dans l'initiation de la traduction (Tableau 1).....	26
2. <i>Initiation de la traduction par entrée interne des ribosomes</i>	27
a. Initiation de la traduction chez les picornavirus : première IRES identifiée.....	27
b. Initiation sans ARNt _i ^{Met} : Les virus de la paralysie du cricket (CrPV):.....	29
c. Initiation de la traduction chez le virus de l'hépatite C.....	30
Le génome du virus de l'hépatite C.....	30
Initiation de la traduction du HCV.....	32
d. Les IRES des messagers cellulaires.....	32
3. <i>Les facteurs canoniques eIF3 et eIF4G</i>	38
a. Le facteur eucaryote d'initiation de la traduction 3.....	38
b. Le facteur eucaryote d'initiation de la traduction 4G.....	39
Le facteur eIF4G de mammifère.....	40
Le facteur eIF4G de levure.....	41
Homologue mammifère de la protéine eIF4G.....	43
c. La stimulation de l'interaction des facteurs eIF4G et eIF3 est une étape déterminante pour l'initiation de la traduction.....	43
4. <i>Régulation de l'initiation de la traduction</i>	46
a. Le facteur eIF4G, un élément clé de l'initiation dépendante de la coiffe.....	46
b. Régulation de PABP par les protéines Paip1, Paip2A et Paip2B.....	47
c. Les protéines 4E-BP.....	48
d. Régulation de la traduction par des éléments <i>cis</i> de l'ARN messager.....	49
e. Mécanismes de régulation par des facteurs <i>trans</i>	51
Blocage stérique par les protéines IRP et le motif ribonucléique IRE.....	51
Exemple de contrôle dans la différenciation cellulaire : Maskin.....	52
La traduction de l'ARNm de la 15-lipoxygénase exprimée au cours de la différenciation des réticulocytes est régulée par les protéines hnRNP K et hnRNP E1/E2.....	53
La traduction de l'ARNm localisé de β -actine est régulée par la protéine ZBP1.....	54

III. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR LOCALISATION DE LEURS ARNm	57
1. Localisation des ARN messagers <i>nanos</i> , <i>oskar</i> , <i>bicoid</i> et <i>gurken</i> chez <i>Drosophila melanogaster</i>	57
2. Localisation de l'ARN messenger <i>Vg1</i> chez <i>Xenopus</i>	59
3. Localisation de l'ARN messenger de β -actine dans le fibroblaste	60
4. Localisation de l'ARN messenger <i>ASH1</i> chez <i>S. cerevisiae</i>	61
IV. <i>ASH1</i> : MODÈLE D'ÉTUDE DE RÉGULATION D'UN ARN MESSAGER LOCALISÉ	63
1. <i>Ash1p</i> répresseur transcriptionnel de l'endonucléase <i>HO</i>	63
2. Transport et localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>	64
a. Éléments <i>cis</i> : les éléments de localisation de l'ARN messenger <i>ASH1</i>	66
b. Les facteurs <i>trans</i> impliqués dans la régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	67
◆ La protéine <i>Loc1</i>	67
◆ La protéine <i>Puf6</i>	67
◆ La protéine <i>Khd1</i>	68
V. LES DOMAINES FONCTIONNELS DE LIAISON À L'ARN	69
1. Les domaines fonctionnels de liaison à l'ARN	69
2. Le motif de reconnaissance de l'ARN	70
a. Structure du motif de reconnaissance de l'ARN	70
b. Exemple de la protéine <i>U1A</i>	71
c. Séquence et structure des ARN ciblés par les RRM	72
3. Domaine "K Homology"	73
4. Méthodes particulières d'étude de complexes ARN-protéine	74
OBJECTIFS DE LA THESE	79
MATERIEL ET METHODES	87
I. ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE LE FACTEUR <i>EIF3</i> ET LA PETITE SOUS-UNITÉ RIBOSOMIQUE 40S	89
1. Clonage, expression et purification du motif de reconnaissance de l'ARN de la sous-unité p44 du facteur <i>EIF3</i> : <i>EIF3RRMp44</i>	89
a. Clonage du <i>RRMp44</i> dans le plasmide d'expression <i>pET30b</i>	89
b. Expression et purification de la protéine recombinante <i>RRMp44-(His)₆</i>	90
2. Construction de la banque de fragments de l'ARN ribosomique 18S	90
a. Clonage de l'ARN ribosomique 18S humain	90
b. Construction de la banque	91
c. Préparation de la banque de fragments aléatoires de l'ARN ribosomique 18S	91
3. <i>SERF</i> : sélection de fragments spécifiques du <i>RRMp44</i>	92
<i>SERF</i> : « Selection of random RNA fragments »	92
4. Analyse des séquences sélectionnées par retard sur gel	93
a. Synthèse des ARN	93
b. Formation du complexe	93
c. Analyse des complexes	93
II. ÉTUDE DE LA LOCALISATION DE L'ARNm <i>ASH1</i>	95
1. Immunoprécipitation de fragments d' <i>ASH1</i> avec <i>Khd1-TAP</i>	95
a. Constructions des fusions <i>Ash1-LacZ</i>	95

b.	Souche S288C-Khd1-TAP	95
c.	Immunoprécipitation des complexes ARN-Khd1TAP	95
2.	<i>Retards sur gels natifs avec l'élément E1</i>	97
a.	Constructions	97
L'élément de localisation E1 et l'IRE	97	
La protéine fusion GST-Khd1	97	
Les protéines fusions GST-eIF4G1 et GST-eIF4G1-Cter	97	
b.	Production et purification des protéines recombinantes GST-fusion	97
Production et purification de GST-Khd1	97	
Production et purification des protéines recombinantes GST-eIF4G1 et GST-eIF4G1-Cter	98	
c.	Transcriptions	98
ARN transcrits avec $\alpha^{32}\text{P}$	98	
ARN non-marqués (froids)	99	
d.	Phosphorylation de la protéine recombinante GST-Khd1	99
e.	Protocole du retard sur gel	99
3.	<i>« Pulldown » de Khd1-His avec GST-eIF4G</i>	100
a.	Constructions	100
La protéine fusion GST-Khd1-His	100	
La protéine fusion GST-eIF4G1	100	
b.	Production des protéines recombinantes	100
Production de GST-eIF4G	100	
Production et purification de Khd1-HIS	100	
c.	« GST-pulldown »	101
4.	<i>Triple hybride chez S. cerevisiae et dosage de la β-galactosidase</i>	101
a.	Constructions	101
Clonage du C-terminal du facteur eIF4G1 dans le pGADT7	101	
Clonage des éléments E1, E1M5, E2BD1 et E2BD2 dans le pIII-MS2-2	101	
b.	Préparation de la souche YBZ1 <i>khd1</i>	102
Amplification de la séquence codant pour la kanamycine par PCR	102	
Préparation des levures YBZ1 compétentes	103	
Transformation	104	
Extraction des ADN génomiques	104	
c.	Étude de l'interaction par triple-hybride	105
d.	Quantification de l'interaction par quantification de la β -galactosidase	105
III.	INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES	107
1.	<i>Synthèse des constructions utilisées</i>	107
2.	<i>Souches de levure</i>	107
3.	<i>Site de clonage multiple du vecteur pGEM-Teasy</i>	108
4.	<i>Tampons et milieux de culture</i>	108
	RESULTATS	111
I.	ÉTUDE D'UNE INTERACTION PUTATIVE ENTRE LE FACTEUR EUCARYOTE D'INITIATION DE LA TRADUCTION 3 ET LA SOUS-UNITÉ RIBOSOMIQUE 40S	113
1.	<i>Clonage, expression et purification du RRM de la sous-unité p44 du facteur eIF3</i>	113
a.	Analyse de la séquence de la sous-unité p44 du facteur eIF3	113
b.	Clonage de la séquence codante pour le RRMp44	115

c. Purification de la protéine recombinante RRMp44-His.....	115
2. Construction de la banque d'ARNr 18S.....	117
a. Clonage de l'ARN ribosomique 18S humain.....	117
b. Construction de la banque.....	117
3. SERF : Criblage de la banque de fragments de l'ARNr 18S contre le RRMp44.....	119
a. Sélection des fragments de l'ARNr 18S.....	119
b. Résultats du criblage.....	121
4. Analyse des fragments sélectionnés.....	123
Interaction du RRMp44 avec les fragments des groupes I, II, III et IV.....	123
5. Conclusion.....	128
II. ÉTUDE D'INTERACTIONS MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉES DANS LE MÉCANISME DE	
RÉGULATION DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION DE L'ARN MESSAGER <i>ASH1</i>	131
1. Interaction de <i>Khd1p</i> avec l'ARNm <i>ASH1</i>	131
a. <i>Khd1p</i> interagit avec E1.....	131
b. L'interaction entre <i>Khd1p</i> et l'élément E1 est directe <i>in vitro</i>	132
c. L'interaction de <i>Khd1p</i> avec l'élément E1 est spécifique.....	134
d. L'interaction de <i>Khd1p</i> avec la boucle apicale.....	135
2. <i>Khd1p</i> interagit avec le domaine C-terminal du facteur canonique <i>eIF4G1</i>	138
<i>Khd1p</i> et <i>eIF4G</i> interagissent <i>in vitro</i>	138
3. Le facteur <i>eIF4G</i> interagit avec l'élément E1 de l'ARNm <i>ASH1</i>	140
a. Le facteur canonique <i>eIF4G</i> interagit avec l'élément E1 de l'ARNm <i>ASH1</i>	140
b. Le domaine impliqué dans l'interaction du facteur <i>eIF4G1</i> avec E1 est la partie C-terminale (acides aminés 850-952).....	141
c. Le facteur <i>eIF4G</i> interagit avec l'élément E1 <i>in vivo</i> et cette interaction est indépendante de <i>Khd1p</i>	142
d. L'interaction entre le C-terminal du facteur <i>eIF4G</i> et E1 est faible.....	144
4. L'interaction avec l'élément E1 est modulée par l'état de phosphorylation de <i>Khd1p</i>	148
La phosphorylation de <i>Khd1</i> abolit son interaction avec l'élément E1.....	149
5. Conclusion.....	150
DISCUSSION	151
La sous-unité p44 du facteur <i>eIF3</i> et son interaction avec l'ARN.....	153
Les interactions ARN-RRM.....	153
Régulation traductionnelle de l'ARNm <i>ASH1</i> par <i>Khd1p</i>	158
Rôle de l'interaction du facteur <i>eIF4G</i> avec l'ARN.....	159
Rôle des interactions <i>eIF4G-Khd1p-E1</i> dans la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	162
Conclusion.....	166
RÉFÉRENCES	169
ANNEXE	193
PUBLICATION.....	195

ABRÉVIATIONS

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ARNt_i^{Met}	ARNt initiateur
ASH1	“Asymmetric synthesis of <i>HO</i> ”
ATP	Adénosine triphosphate
cpm	Coups par minute
CrPV	“Cricket Paralysis Virus”
eIF	« eukaryotic translation Initiation factor », Facteur d’initiation de la traduction
EMCV	“Encephalomyocarditis Virus”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F	Phénylalanine
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GST	« Glutathione S-transferase »
GTP	Guanosine triphosphate
HCV	« Hepatitis C Virus », virus de l’hépatite C
His	Histidine
hnRNP	« heterogenous nuclear ribonucleoprotein »
IgG	Immunoglobuline G
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRE	« Iron response element »

IRES	« Internal ribosome entry site », site d'entrée interne des ribosomes
IRP	« Iron regulatory element »
ITAF	« IRES-specific trans-acting factor »
KH	« hnRNP K Homology domain »
Khd1	« KH-domain protein 1 »
Leu	Leucine
MCS	« Multiple cloning site », site de clonage multiple
nt	nucléotide
ORF	« Open Reading Frame », Séquence codante
pb	paires des bases
PCR	« Polymerase chain reaction »
qsp	quantité suffisante pour
RNP	ribonucléoprotéique
rpm	rotations par minute
RRM	« RNA recognition motif », Motif de reconnaissance de l'ARN
RT	Retro-transcription
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	« polyacrylamide gel electrophoresis », Gel dénaturant de polyacrylamide
SHE	« Swi5p-dependent HO expression »
snRNP	« small nuclear ribonucleoprotein », complexes RNP du spliceosome
TAP	« Tandem affinity purification »
uORF	« upstream ORF », séquence située en amont l'ORF principale
Ura	Uracile

UTR « Untranslated Region », Non-traduite

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INTRODUCTION

1. L'expression génique et la traduction

La vie de la cellule eucaryote est régie par un ensemble de mécanismes qui concernent la naissance, la croissance, la multiplication des cellules, la division ou encore la mort cellulaire. Toutes ces réponses à des stimulations venant parfois du milieu extérieur impliquent l'expression des gènes ainsi que leur régulation.

L'information génétique est renfermée par les molécules d'ADN qui composent principalement le noyau. Pour que l'information soit exprimée, la molécule d'ADN est transcrite en ARN et l'ARN est traduit en protéines. De nombreux facteurs sont impliqués, leurs régulations sont autant de points de contrôle.

La synthèse des protéines est l'étape ultime de l'expression des gènes. C'est un mécanisme important qui permet aux cellules de répondre à toute sorte de stress, de stimuli, et de croître grâce aux nutriments (Mathews et al., 2000). Pour cela, les protéines impliquées dans chaque processus biologique doivent être exprimées au moment opportun et en un lieu précis. La cellule eucaryote, qui est compartimentée, voit une partie de ses ARN localisés. Ils sont transportés jusqu'à leur destination ; pendant ce temps leur traduction est régulée.

Pour exprimer l'information contenue dans sa séquence, l'ADN est transcrit dans le noyau (Figure 1). Le produit de cette synthèse est une première molécule d'ARN appelée transcrit primaire ou ARN pré-messager. Après la transcription, ces ARN subissent des modifications post-transcriptionnelles. Ils sont épissés, coiffés et poly-adénylés pour parvenir à une molécule d'ARN messenger mature (ARNm) (Figure 1).

Le noyau, entouré par une double membrane, communique avec le cytosol par les pores nucléaires par lesquels passent les ARNm pour se rendre dans le cytoplasme afin d'être traduits. Dans le noyau se trouve un autre compartiment, le nucléole, lieu de production des pré-ribosomes. Les ARNm qui arrivent dans le cytoplasme peuvent être directement traduits, ou transportés jusqu'à leur destination pour y être exprimés. Certains sont vite dégradés afin de maintenir une régulation très fine de l'expression génique (Figure 1).

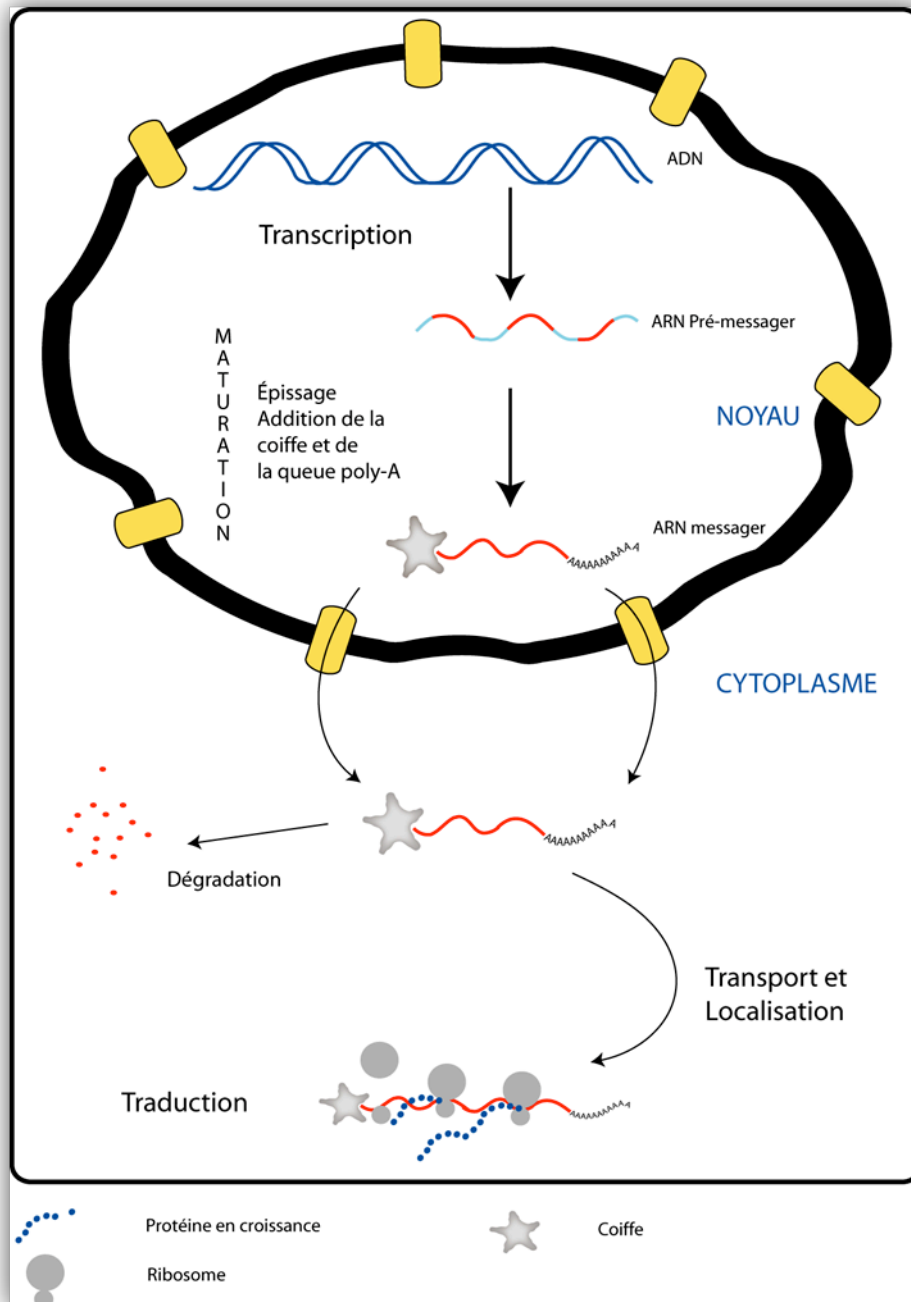


Figure 1 : L'expression des gènes dans la cellule eucaryote.

L'ADN est transcrit dans le noyau en ARN pré-messenger. Pour donner un ARNm mature, l'ARN pré-messenger est épissé, coiffé et polyadénylé. Cet ARNm est activement transporté dans le cytoplasme par les pores nucléaires pour être traduit en protéine. Pour réguler l'expression des protéines de façon spatio-temporelle, l'ARNm est transporté et localisé. Il est ensuite dégradé.

2. La maturation des ARN messagers

Pour que les ARN passent du noyau au cytoplasme, ils doivent être maturés. Ils subissent des modifications dites « post-transcriptionnelles » qui leur permettent d'être protégés et transportés jusqu'au cytoplasme puis traduits. La maturation des ARNm consiste à ajouter une coiffe du côté 5' et une queue poly-adénylée du côté 3' de l'ARN. Ces modifications qui étaient connues pour avoir lieu après la transcription de l'ARNm commencent en réalité avant la terminaison de la transcription.

a. L'épissage

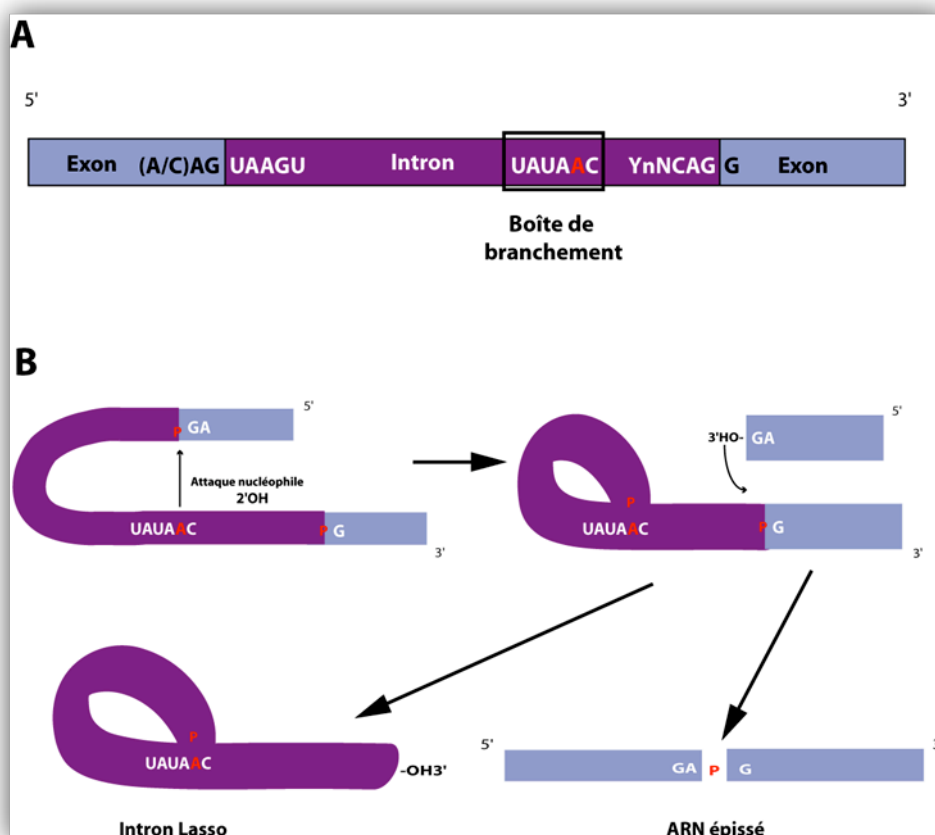


Figure 2 : Schéma représentant le mécanisme d'épissage des ARNm.

A. Schéma de l'organisation des jonctions exon (en bleu)-intron (en violet). **B.** La séquence située au niveau de la jonction de l'exon amont et l'intron subit une attaque nucléophile de la part d'une adénine de la boîte de branchement de l'intron. La liaison catalysée permet la formation du « Lasso » au niveau de l'intron éliminé. L'extrémité 3'OH de l'exon amont attaque la séquence de la jonction entre l'exon aval et l'intron. La liaison entre l'intron et l'exon aval est clivée, les deux exons forment alors l'ARNm épissé.

Les gènes sont composés d'une suite d'exons et d'introns de façon alternée. L'épissage consiste à exciser les introns et relier les exons qui constituent la séquence

codante. Il est réalisé par un ensemble de protéines et d'acides nucléiques : le « spliceosome ». Les complexes qui catalysent l'épissage sont les snRNP (« small nuclear ribonucleoproteins »).

Au niveau des jonctions exon-intron, se trouvent des séquences nucléotidiques conservées (Figure 2A). Elles sont reconnues par le spliceosome. L'épissage commence par une attaque nucléophile du 2'OH du ribose de l'adénosine de la boîte de branchement sur le phosphate de la jonction intron-exon (Figure 2B). Puis, le 3'OH de l'exon attaque le phosphate de la jonction et forme la liaison entre les deux exons (Figure 2B).

À partir d'un même ARN, l'épissage peut permettre la formation de différents ARN matures. En effet, les ARN pré-messagers comportent une alternance de plusieurs exons et de plusieurs introns. Quand la réorganisation entre les exons est variable, on appelle ce mécanisme l'épissage alternatif.

b. La poly-adénylation de l'extrémité 3' de l'ARNm

Du côté 3' de l'ARNm une queue est ajoutée aux ARNm. Elle est constituée d'un enchaînement d'adénines. Elle compte 25 à 200 unités d'adénines et protège les ARNm contre les attaques des nucléases. Cette addition est concomitante à la terminaison de la transcription. En effet, des facteurs de maturation en 3' de l'ARNm jouent aussi un rôle dans la terminaison de la transcription (Buratowski, 2005).

c. La coiffe des ARN messagers

Les ARN messagers eucaryotes sont aussi pourvus d'une coiffe ajoutée dans le noyau du côté 5' du transcrit. La coiffe (m^7GpppN) est composée d'une guanosine méthylée en position 7, de groupements phosphates (p), et d'une base quelconque (N) (Figure 3). Elle a un rôle d'initiateur dans la traduction et protège l'extrémité 5' de l'ARNm contre les nucléases. L'ajout de la coiffe sur l'ARNm est cotranscriptionnel. Lorsque la queue poly(A)_n atteint une taille de 25 à 30 nucléotides, la coiffe est additionnée à l'ARNm via le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (McCracken et al., 1997).

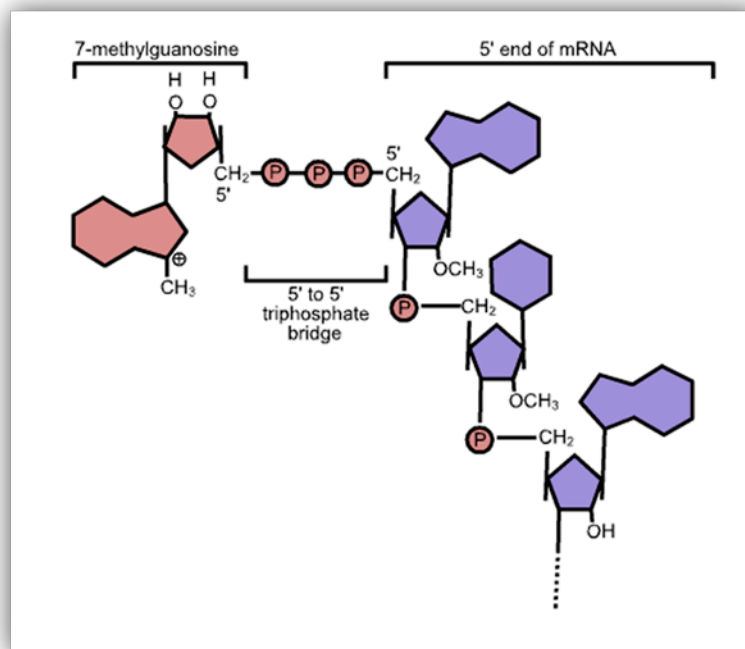


Figure 3 : La coiffe des ARN messagers.

L'extrémité 5' des ARNm est pourvue d'une guanosine méthylée en position 7. Elle est liée à l'extrémité 5' de l'ARNm par un pont constitué de trois groupements phosphates accrochés sur le méthyl situé en position 5'.

Lorsque toutes les modifications de maturation sont apportées, les ARNm sont transportés par les pores nucléaires. Ils vont du noyau, où ils sont synthétisés, jusqu'au cytoplasme, où ils sont traduits, sous la forme de particules : les hnRNPs (« heterogeneous nuclear ribonucleoparticules ») (Hershey and Merrick, 2000). Ces modifications sont importantes pour l'initiation dépendante de la coiffe dite «classique».

3. L'expression des protéines

La synthèse des protéines ou mécanisme de traduction comporte trois étapes: l'initiation, l'élongation, la terminaison. Une quatrième étape qui permet d'augmenter l'efficacité est le recyclage du ribosome (Figure 4).

Pendant l'initiation, la petite sous-unité du ribosome reconnaît le codon d'initiation aidée le plus souvent par plusieurs des facteurs d'initiation. Ensuite, la grande sous-unité va s'associer au complexe pour former un ribosome fonctionnel qui commence la synthèse protéique : cette seconde étape est l'élongation. Lors de la reconnaissance du codon non-sens (ou Stop), le ribosome arrête la synthèse protéique et relâche le polypeptide. La troisième étape est la terminaison de la traduction.

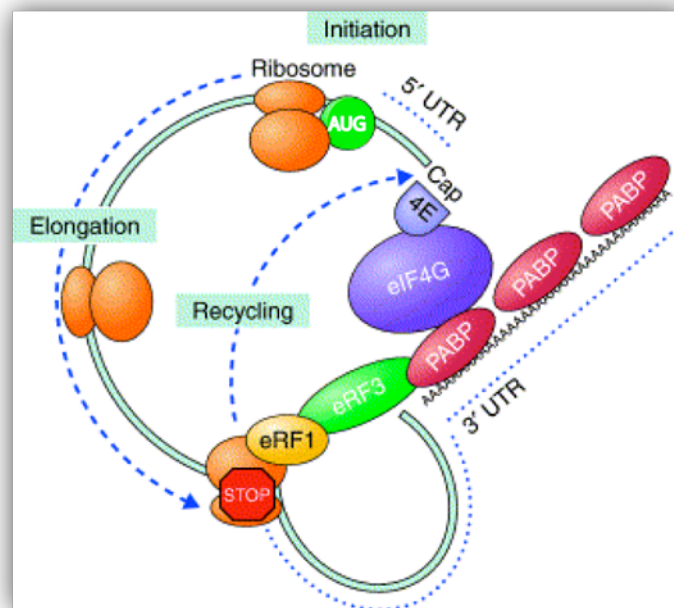


Figure 4 : Traduction des ARNm dépendante de la coiffe adapté de (Sonenberg and Dever, 2003).

Les trois étapes de la traduction sont l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation implique la reconnaissance de la coiffe et démarre le plus souvent au niveau d'un codon AUG. Après l'élongation de la chaîne polypeptidique se produit la terminaison. Certains facteurs permettent la circularisation de l'ARNm ce qui stimule la traduction en augmentant l'efficacité de l'initiation par recyclage (« recycling ») immédiat du ribosome.

Les ARNm sont circulaires grâce à la présence des facteurs protéiques eIF4E, eIF4G au niveau de la coiffe et PABP situé sur la queue poly-A (Figure 4). Le ribosome, lorsqu'il est de nouveau dissocié, est prêt pour un nouveau cycle de synthèse. La proximité des deux extrémités de l'ARNm lui permet d'être réutilisé de façon efficace: cette étape est le recyclage (Kapp and Lorsch, 2004b).

II. INITIATION DE LA TRADUCTION

Deux grands types d'initiations existent dans la cellule eucaryote. La première est l'initiation dépendante de la coiffe ou initiation classique. Elle implique la coiffe et la queue poly-adénylée de l'ARNm. La seconde approche d'initiation de la traduction est l'initiation interne ou indépendante de la coiffe. Elle a lieu grâce à des structures secondaires adoptées par les ARN : les IRES (« Internal ribosome entry site »).

1. Initiation de la traduction dépendante de la coiffe

Les données présentées sont principalement issues d'études des protéines de mammifères. Dans certains cas, des parallèles sont effectués avec les facteurs eucaryotes de levure en particulier lorsque le mécanisme diffère de celui des mammifères.

a. Reconnaissance de la coiffe de l'ARNm

1) Formation du complexe ternaire eIF2•GTP•ARNt_i^{Met}

L'initiation classique de la traduction commence par la formation du complexe ternaire constitué par le facteur eIF2, une molécule de GTP et un ARN de transfert initiateur chargé de méthionine (ARNt_i^{Met}): eIF2•GTP•ARNt_i^{Met} (Kapp and Lorsch, 2004b). Pour être formé, le complexe ternaire a besoin de cette molécule de GTP. La présence d'une molécule de GDP entraîne au contraire la dissociation du facteur eIF2 de ce complexe (Hershey and Merrick, 2000; Kapp and Lorsch, 2004a).

Le facteur eIF2 est recyclé

Le facteur eIF2 est composé de trois sous-unités α , β et γ . La sous-unité γ lie l'ARNt_i^{Met} ainsi qu'une molécule de GTP (Cigan et al., 1989; Donahue et al., 1988; Naranda et al., 1995). La sous-unité α est impliquée dans la reconnaissance du codon d'initiation AUG. La sous-unité β permet la liaison aux facteurs eIF2B, eIF5 et à l'ARNm (Hershey and Merrick, 2000). Le facteur eIF2, couplé au GTP qui interagit avec l'ARNt_i^{Met}, perd son affinité particulière pour la méthionine quand le GTP est hydrolysé en GDP. Ceci participe au mécanisme de relâchement de l'ARNt_i quand le codon d'initiation est reconnu et empêche notamment les ARNt désacétylés d'entrer dans le cycle d'initiation de la traduction (Kapp and Lorsch, 2004a). Quand le complexe ternaire atteint le codon d'initiation, et avant que la grande sous-unité ribosomique ne rejoigne le site d'initiation de la traduction, la molécule de

GTP est hydrolysée. Le facteur eIF2 quitte alors le ribosome sous la forme d'un complexe binaire eIF2-GDP (Figure 5) (Kapp and Lorsch, 2004a).

Le facteur eIF2 est recyclé après un cycle d'initiation. Pour que ce facteur soit de nouveau actif, la molécule de GDP est échangée pour une molécule de GTP (Kapp and Lorsch, 2004a). Cette réaction est catalysée par le facteur eIF2B (Hinnebusch, 2000) (Figure 5).

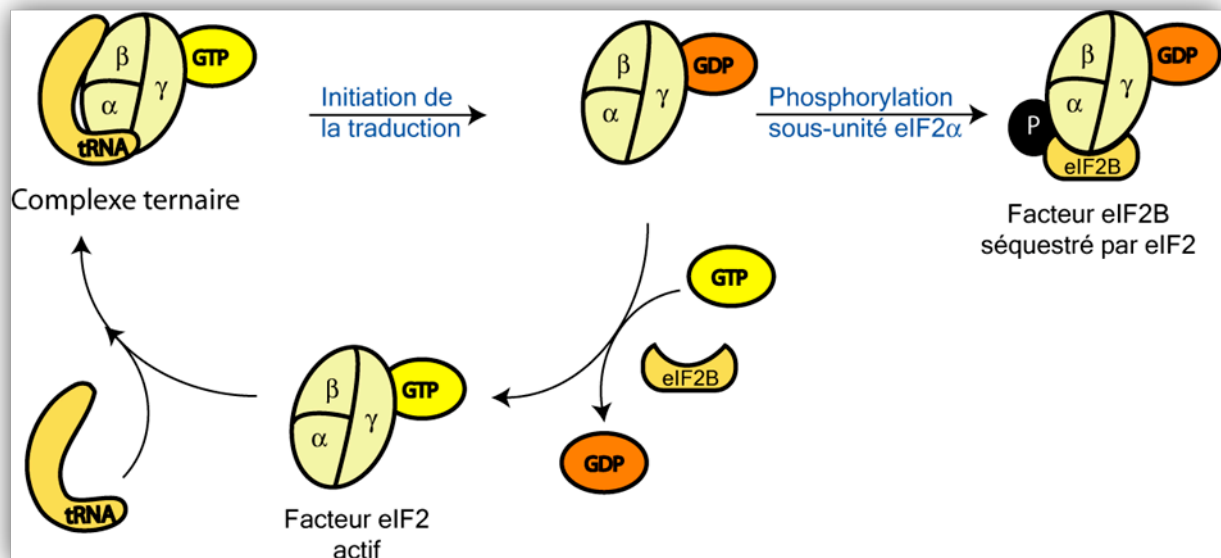


Figure 5 : Recyclage du facteur eIF2 et contrôle de la traduction par la phosphorylation de sa sous-unité α . Le facteur eIF2 fait partie du complexe ternaire eIF2•GTP•ARN_i^{Met}. Il comporte 3 sous-unités : α , β et γ . La sous-unité γ est associée à une molécule de GTP. Pendant la reconnaissance du codon d'initiation, la molécule de GTP est hydrolysée en GDP. Pour que le facteur eIF2 entre dans un nouveau cycle d'initiation, il est recyclé grâce au facteur eIF2B qui catalyse l'échange de GDP pour du GTP. Le facteur eIF2 couplé à une molécule de GTP peut lier à nouveau un ARN_i^{Met}. D'autre part, si la sous-unité α est phosphorylée, le facteur eIF2B est séquestré, le recyclage des autres facteurs eIF2 n'a plus lieu.

Lors de l'apparition de stress dans l'environnement, les cellules reprogramment leur machinerie traductionnelle. L'arrêt de la traduction d'une partie des ARNm est initié par la phosphorylation du facteur eIF2 α qui entraîne la diminution des complexes ternaires disponibles pour l'initiation de la traduction (Kedersha et al., 2002; Kedersha et al., 1999; Stohr et al., 2006). Quand la sous-unité α est phosphorylée (sur son résidu Ser51), l'échange de GTP ne peut pas avoir lieu car ceci empêche la dissociation du complexe eIF2-eIF2B. La quantité de facteur eIF2B disponible est très diminuée ce qui réduit le taux d'échange de GDP-GTP. La traduction est ainsi régulée négativement car le taux de facteur eIF2 est en

excès par rapport au taux de facteur eIF2B (Figure 5) (Gebauer and Hentze, 2004; Rowlands et al., 1988).

2) Formation du complexe de pré-initiation 43S

Ensuite, la sous-unité 40S du ribosome, aidée par des facteurs d'initiation va lier le complexe ternaire (Kapp and Lorsch, 2004b). Les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 sont les facteurs requis pour ce recrutement (Chaudhuri et al., 1999; Chaudhuri et al., 1997; Majumdar et al., 2003). Le facteur eIF1A joue un rôle dans l'association de l'ARN_t^{Met} à la sous-unité ribosomique 40S par la reconnaissance du complexe ternaire eIF2-GTP-ARN_t^{Met}. Sa capacité de lier la sous-unité ribosomique 40S affecte aussi l'état dissocié du ribosome. Chez la levure, un système reconstitué *in vitro*, a permis d'identifier que seuls les facteurs eIF1 et eIF1A sont indispensables (Algire et al., 2002). En revanche eIF3 affecte ce recrutement *in vivo* (Valasek et al., 2002). Ces facteurs forment le complexe de pré-initiation 43S avec le facteur eIF5 qui affecte le recrutement du complexe ternaire et/ou la liaison à l'ARNm de la sous-unité 40S (He et al., 2003; Kapp and Lorsch, 2004b).

Les facteurs eIF3 et eIF1A empêchent les deux sous-unités ribosomiques de s'associer de façon prématurée, ce qui conduirait à un ribosome non fonctionnel (Hershey and Merrick, 2000).

3) La coiffe est reconnue par le complexe hétérotrimérique eIF4F

D'autre part, le facteur eIF4F reconnaît la coiffe située du côté 5' de l'ARNm (Figure 6). Il permet aussi la dissolution des structures secondaires, situées dans la partie 5'UTR de l'ARNm, grâce à la sous-unité eIF4A (Kapp and Lorsch, 2004b).

Le complexe eIF4F

Le complexe eIF4F est un hétérotrimère composé par les sous-unités eIF4A, eIF4G et eIF4E (Gingras et al., 1999b). Le facteur eIF4A est une hélicase. Il catalyse de façon dépendante de l'ATP, en conjonction avec le facteur eIF4B, la dissolution des structures secondaires de l'ARNm (Grifo et al., 1984; Rogers et al., 2001). Le facteur eIF4E a pour propriété de lier directement la coiffe méthylée de l'ARNm. Son interaction avec le facteur eIF4G permet de recruter le complexe 43S sur l'ARNm pour former le complexe 48S (Lamphear et al., 1995; Prevot et al., 2003a). Le facteur eIF4E fait partie des facteurs limitants de la traduction dans la cellule. Il est régulé par la serine-thréonine kinase Mnk qui le phosphoryle (Gingras et al., 1999a; Pyronnet et al., 1999). Le facteur eIF4G peut lier

plusieurs des partenaires impliqués dans la traduction : entre autres eIF4E, eIF4A, eIF3 et PABP (« poly-A binding protein »). C'est une protéine d'échafaudage qui permet de rassembler des facteurs capables d'interagir à la fois avec la coiffe mais aussi avec la queue poly(A) de l'ARNm afin d'augmenter de façon synergique l'efficacité de l'initiation (Prevot et al., 2003a).

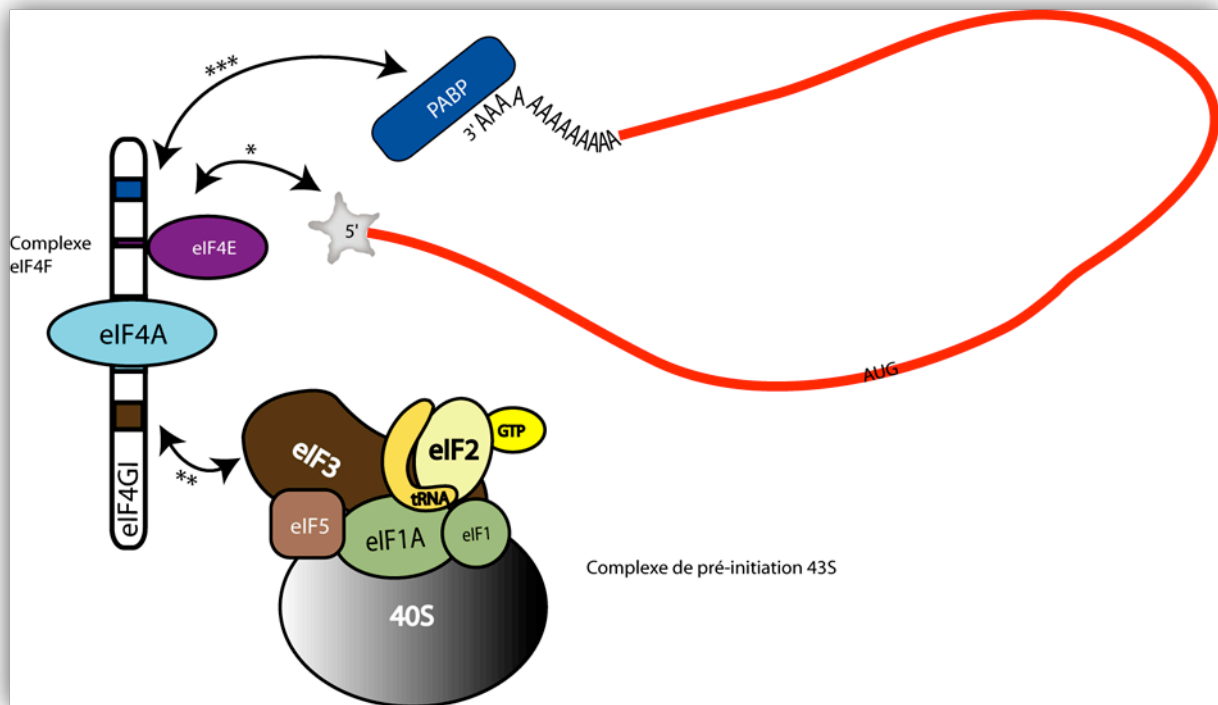


Figure 6 : Reconnaissance de la coiffe de l'ARNm.

(*) Le facteur eIF4F reconnaît la coiffe de l'ARNm par l'interaction directe de sa sous-unité eIF4E avec la coiffe de l'ARNm. (**) Le complexe ternaire eIF2•GTP•ARNt_i^{Met}, lié à la sous-unité ribosomique 40S et aux facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5, forme le complexe 43S. Il est recruté sur l'ARNm par l'interaction directe entre le facteur eIF3 et la sous-unité eIF4G du complexe eIF4F. (***) Parallèlement le facteur PABP lié à la queue poly-(A)_n contribue à circulariser l'ARNm et stabilise le facteur eIF4G.

4) Chargement du complexe 43S sur l'ARN messenger

Le complexe 43S se lie à la coiffe du messenger de façon dépendante de l'ATP et grâce au complexe eIF4F. Lorsqu'il est associé à l'ARNm, il devient le complexe 48S. Par son interaction directe avec la sous-unité ribosomique 40S et avec le facteur eIF4G, le facteur eIF3 permet le lien entre le ribosome et l'ARNm (Figure 6) (Prevot et al., 2003b).

Chez la levure, l'interaction du facteur eIF3 avec la sous-unité eIF4G n'a jamais été montrée. Elle semble se produire *via* le facteur eIF5 (Asano et al., 2001). De plus, le facteur eIF5 montre une interaction avec la sous-unité p93 (NIP1) du facteur eIF3 qui permet le recrutement du complexe ternaire sur la sous-unité ribosomique 40S (Valasek et al., 2004).

Chez la levure, la liaison de la sous-unité 40S à l'ARNm peut avoir lieu avec seulement deux facteurs : eIF3 et eIF2, et ce de façon indépendante du facteur eIF4G (Jivotovskaya et al., 2006).

L'initiation de la traduction implique aussi l'extrémité 3' de l'ARNm. La protéine PABP (« poly(A)-binding protein ») stimule la traduction des ARN messagers polyadénylés (Kahvejian et al., 2001; Sachs, 2000). En effet la queue poly-(A)_n, associée à plusieurs facteurs PABP, eux-mêmes capables d'interagir avec le facteur eIF4G, produit un effet allostérique sur l'affinité du facteur eIF4E pour la coiffe de l'ARNm (Kahvejian et al., 2005). Elle permet aussi la circularisation de l'ARN messenger grâce à son interaction avec d'une part le facteur eIF4G et d'autre part la queue poly-adénylée située à l'extrémité 3'UTR de l'ARNm. Ceci permet le recyclage des ribosomes après la terminaison de la traduction par une de ses interactions avec le facteur eRF3 (« eukaryotic release factor 3 ») (Uchida et al., 2002).

b. Le balayage

Après la liaison du complexe 43S sur l'ARNm, la sous-unité 40S et les facteurs qui lui sont associés effectuent l'étape caractéristique de la traduction dépendante de la coiffe : le balayage. Ce mécanisme permet d'identifier le codon initiateur de la traduction (Figure 7). La sous-unité 43S « glisse » le long du messenger dans le sens 5'-3'. Ce mécanisme nécessite de l'énergie, il utilise l'hydrolyse de l'ATP. Grâce à ses propriétés de liaison à l'ARN, le facteur eIF4A est impliqué dans le mécanisme de balayage pendant lequel il aide le facteur eIF1 à dissocier les structures secondaires de l'ARN (Battiste et al., 2000). Ce facteur déroule l'ARN sur une distance de 3 à 5 paires de bases et le facteur eIF4B, protéine de liaison à l'ARN, maintient les ARN simple-brins pour les rendre accessibles lors de l'initiation de la traduction; il induit aussi la liaison du ribosome sur l'ARNm (Hershey and Merrick, 2000; Méthot et al., 1996). Ses deux domaines de liaison à l'ARN lient des séquences de façon non-spécifique, mais sont essentiels pour l'activité hélicase du facteur eIF4A (Méthot et al., 1994).

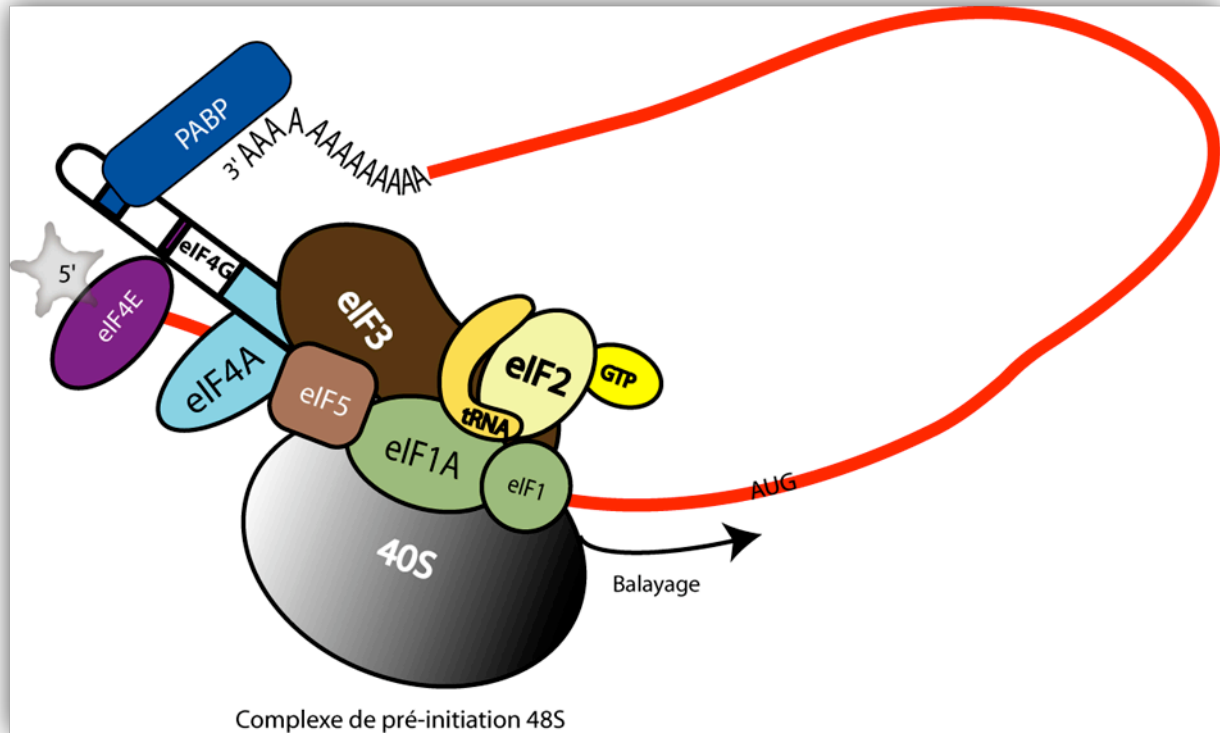


Figure 7 : Balayage de l'ARN messager par le complexe 43S.

Le complexe 43S balaye l'ARNm dans le sens 5'-3' pour identifier le codon initiation. Il est aidé par des facteurs qui permettent la reconnaissance du codon AUG (eIF2, eIF1) alors que d'autres empêchent son association prématurée avec la sous-unité 60S (eIF3, eIF1 et eIF1A).

Le facteur eIF4H est homologue de la partie N-terminale du facteur eIF4B principalement au niveau du RRM. Il est aussi impliqué dans la stimulation de l'activité hélicase du facteur eIF4A (Rogers et al., 2001).

Le facteur eIF4G, protéine d'échafaudage, est aussi impliqué dans le mécanisme de balayage. Ce facteur, qui comporte des sites de liaison à l'ARN, contient une séquence d'une quarantaine d'acides aminés (642-681) cruciale pour ce mécanisme. Il pourrait être impliqué dans le guidage de la sous-unité ribosomique 40S et de ses facteurs associés le long de l'ARNm (Prevot et al., 2003b).

Choix du codon d'initiation

La variation dans le choix du codon d'initiation au sein d'un même ARNm contribue à la diversité des protéines générées (Touriol et al., 2003). Une étude portant sur quelques centaines d'ARNm permis d'observer que dans 90% des cas l'initiation avait lieu au niveau d'un codon d'initiation AUG (Kozak, 1987). Ce modèle, admis depuis plusieurs années par

une partie de la communauté scientifique et qui semble être le plus couramment utilisé est le suivant :

Le codon AUG est reconnu par l'anticodon de l'ARNt_i^{Met} qui fait partie du complexe ternaire. L'interaction se fait par une reconnaissance ARN-ARN entre le codon AUG et l'anticodon CAU de l'ARNt_i^{Met}. La sous-unité 40S choisit de préférence un codon AUG situé dans un contexte riche en purines (Hershey and Merrick, 2000).

Le codon AUG n'est pas le seul reconnu par la sous-unité 40S. De nombreux ARNm sont traduits de façon alternative. Ce mécanisme fut découvert chez les virus « Sadai virus » (Curran and Kolakofsky, 1988) et « Moloney murine leukemia virus » (Prats et al., 1989). Leur traduction est initiée au niveau de codons non-AUG, dans un cadre de lecture différent pour le premier et dans le même cadre de lecture pour le second.

Le contexte qui pourrait influencer la sélection d'un AUG ou CUG est : la position +5 qui augmenterait l'efficacité avec un A ou un C et la position +6 avec un U (Boeck and Kolakofsky, 1994; Grunert and Jackson, 1994). En revanche, ces résultats ont été contestés en démontrant que les séquences qui influencent la sélection sont des purines en position -3 et +4 (avec A le +1 du codon AUG) et non les positions +5 et +6 (Kozak, 1997).

De plus en plus d'ARNm cellulaires eucaryotes initient leur traduction au niveau d'un codon d'initiation non-AUG situé en amont d'un codon AUG (Touriol et al., 2003). Des structures secondaires de l'ARN en « épingles à cheveux » situées en aval d'un codon non-AUG augmentent l'efficacité de l'initiation au niveau de ce codon (Kozak, 1990; Prats et al., 1992).

Dans le cas où le contexte n'est pas favorable, le ribosome passe parfois sans initier la traduction jusqu'à ce qu'il rencontre un autre codon situé dans un contexte plus favorable (Kozak, 1987). C'est le « leaky scanning » (Kozak, 1995). En effet, un codon AUG situé trop proche de la coiffe ne sera pas reconnu efficacement par le complexe 43S (Kozak, 1991; Sedman et al., 1990).

Les facteurs d'initiation influencent aussi cette sélection. Le facteur eIF1 influence la sélection du codon d'initiation AUG (Lomakin et al., 2006). Lors de la rencontre de codons non-AUG, son interaction avec le facteur eIF5 empêche l'hydrolyse du GTP du complexe ternaire afin de ne pas commencer la traduction (Valasek et al., 2004). Le facteur eIF1A permet le maintien de la fidélité de reconnaissance du codon d'initiation avec une préférence pour la séquence AccAUGG (Pisarev et al., 2005). Le facteur eIF2 influence la sélection du codon par rapport à son contexte (Dasso et al., 1990)

Lorsque le codon est reconnu, le facteur eIF1 est relâché : c'est une étape clé pour la sélection de ce codon d'initiation (Cheung et al., 2007). Le facteur eIF5 stimule l'activité GTPase de la sous-unité γ du facteur eIF2. Elle a lieu suite à l'établissement de l'interaction entre l'anticodon de l'ARNt_i^{Met} et le codon initiateur de l'ARNm (Hershey and Merrick, 2000).

Lorsque le codon d'initiation est identifié, le GTP associé au facteur eIF2 est hydrolysé. Il est aidé par le facteur eIF5. Le facteur eIF2•GDP relâche l'ARNt_i^{Met} dans le site P de la sous-unité ribosomique 40S (Kapp and Lorsch, 2004b; Kolupaeva et al., 2005).

c. Assemblage du ribosome 80S et fin de l'initiation

Alors, les autres facteurs d'initiation sont expulsés et la grande sous-unité ribosomique 60S lie la petite sous-unité 40S pour former un ribosome fonctionnel 80S (Figure 8). La réaction nécessite la présence du facteur eIF5B•GTP pour catalyser cette liaison (Pestova et al., 2000; Unbehaun et al., 2004). En présence du ribosome, il hydrolyse sa molécule de GTP et provoque ainsi la liaison de la grosse sous-unité (Acker et al., 2006). L'hydrolyse du GTP semble apporter l'énergie nécessaire au recyclage du facteur eIF5B.

Le complexe eIF5•GTP déplace les autres facteurs encore présents ce qui permet leur relâchement. En l'absence du facteur eIF5, le facteur eIF5B stimule l'activité GTPase du facteur eIF2 (Hershey and Merrick, 2000).

Le facteur eIF1A peut aussi lier le facteur eIF5B impliqué dans la stimulation de l'association des sous-unités ribosomiques 40S et 60S (Olsen et al., 2003). Cette interaction permet le relâchement du facteur eIF1A lors de la formation du ribosome 80S.

Le facteur eIF6 se lie à la sous-unité 60S du ribosome. Il empêche ainsi l'association des deux sous-unités ribosomiques de façon prématurée. Le relâchement du facteur eIF6 est une des étapes qui stimule la formation du ribosome fonctionnel 80S (Ceci et al., 2003).

L'ARNt_i^{Met} occupe alors le site P du ribosome qui peut commencer l'élongation de la chaîne polypeptidique (Gray and Wickens, 1998). L'étape d'initiation est accomplie (Figure 8).

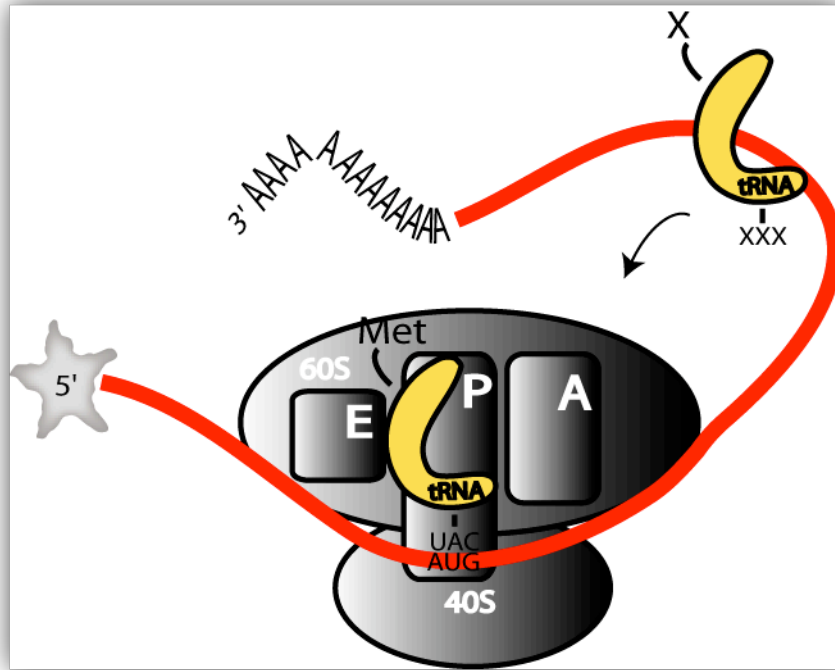


Figure 8 : Le ribosome 80S.

L'ARNt^{Met} s'installe dans le site P (« PEPTIDYL ») et la sous-unité 60S est assemblée à la sous-unité 40S pour former un ribosome fonctionnel. Les ARNt suivants se logent dans le site A (« AMINOACYL »). Lorsque la liaison peptidique est synthétisée entre les sites A et P, l'ARNt sort par le site E (« EXIT »).

Le ribosome comporte trois sites dans lesquels les ARN de transfert peuvent se loger. Le premier ARN de transfert, l'ARNt^{Met}, s'installe directement au niveau du site P (« peptidyl ») du ribosome lorsqu'il est reconnu par l'ensemble des facteurs canoniques (Figure 8). L'ARNt^{Met} contient une paire de bases AU située au bout de la tige de sa partie acceptrice. Il est l'unique ARNt qui comporte trois paires GC. Elles sont importantes pour sa liaison au ribosome dans la boucle de l'anticodon (Kapp and Lorsch, 2004b).

Les ARNt suivants vont tout d'abord dans le site A (« aminoacyl ») du ribosome et la liaison peptidique est synthétisée entre les deux acides aminés. Ensuite il y a un mécanisme de translocation : les deux ARNt se décalent d'un site et l'ARNt sortant passe par le site E (« exit ») avant d'être expulsé (Kapp and Lorsch, 2004b) (Figure 8).

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique constitué par des protéines ribosomiques et des ARN ribosomiques (ARNr). Pour le ribosome eucaryote, la petite sous-unité 40S est constituée de 33 protéines ribosomiques et d'un ARNr 18S d'une taille

d'environ 1800 nucléotides. La grande sous-unité 60S comprend une cinquantaine de protéines ribosomiques et trois ARNr : 5S, 5,8S et 25S/28S (4700 nucléotides).

La synthèse du ribosome commence dans un domaine nucléaire spécialisé : le nucléole. C'est à cet endroit que les ARNr sont transcrits et qu'ils sont associés aux protéines ribosomiques. Le processus démarre par la synthèse des pré-ARNr 5S et 35S. Par la suite, des protéines ribosomiques sont importées du cytoplasme. Les composantes matures (5,8S, 25S pour les eucaryotes inférieurs/28S pour les eucaryotes supérieurs et 5S pour la grande sous-unité ribosomique 60S et 18S pour la petite sous-unité ribosomique 40S) sont issus de différentes digestions par des endonucléases et des exonucléases. La maturation de la sous-unité 60S se poursuit dans le noyau alors que celle de la sous-unité pré-40S se déroule dans le cytoplasme (Fromont-Racine et al., 2003).

d. Les facteurs canoniques impliqués dans l'initiation de la traduction (Tableau 1)

Le tableau suivant est une synthèse des fonctions qui ont été décrites précédemment.

Tableau 1 : Les facteurs d'initiation de la traduction mammifères adapté de (Hellen and Sarnow, 2001)

Nom	Sous-unités	Masse (kD)	Fonction
eIF1A	1	16,5	Reconnaissance du complexe ternaire Balayage Dissociation du ribosome
eIF1	1	12,6	Balayage Sélection du codon AUG
eIF2	3	126	Appartient au complexe ternaire Reconnaissance du codon AUG
eIF3	13	800	Assemblage du complexe ternaire Recrutement de la sous-unité 43S à la coiffe État dissocié du ribosome
eIF4A	1	44	Hélicase
eIF4E	1	26	Reconnaissance de la coiffe de l'ARNm
eIF4G	1	154	Protéine d'échafaudage ; liaison à PABP, eIF4E, eIF4A, eIF3 Balayage
eIF5	1	49	Stimule l'activité GTPase de eIF2
eIF4B	1	70	Stimule l'activité hélicase de eIF4A, eIF4F Liaison du ribosome sur l'ARNm
eIF4H			Stimule l'activité hélicase de eIF4A, eIF4F
eIF5B	1	139	Association des sous-unités ribosomiques
eIF6			Liaison à 60S État dissocié du ribosome
PABP	1		Liaison de la queue poly(A)

2. Initiation de la traduction par entrée interne des ribosomes

L'initiation de la traduction par un mécanisme d'entrée interne des ribosomes a lieu au niveau d'une structure secondaire généralement adoptée par l'ARN en amont du codon initiateur AUG. Cette structure s'appelle une IRES (« Internal Ribosome Entry Site »).

L'initiation interne de la traduction fut découverte chez les picornavirus : « petits virus à ARN » (Jackson and Kaminski, 1995). Depuis, de nombreuses IRES ont été détectées sur des ARN d'autres virus, notamment chez le virus de l'Hépatite C (HCV) et chez différents pestivirus comme le virus de la peste porcine CSFV (« *Classical Swine Fever Virus* »), de la diarrhée virale bovine BVDV (« *Bovine Viral Diarrhea Virus* ») et le virus GBV-B apparenté au HCV (Grace et al., 1999; Rijnbrand et al., 1997; Wang et al., 1993).

Avant que le mécanisme d'entrée interne des ribosomes ne fût établi, les bases de l'initiation classique étaient en cours d'élaboration. L'importance de l'extrémité 5'UTR des ARNm eucaryotes (Kozak, 1979) et l'inaptitude du ribosome eucaryote à initier la traduction sur un ARN circulaire (ceci contrairement à son homologue procaryote) étaient découverts (Konarska et al., 1981). Par ailleurs, l'étude des génomes des picornavirus suggérait un mécanisme différent de celui des ARN messagers eucaryotes car cet ARN viral ne possède pas de coiffe (Pelletier and Sonenberg, 1988). Les picornavirus dont le génome à ARN est non coiffé contiennent de nombreux AUG où la traduction peut être initiée, mais un élément de la séquence est impératif pour initier la traduction: un **site d'entrée interne des ribosomes (IRES)** (Jang et al., 1988).

Trois mécanismes d'initiation interne ont été bien étudiés et présentent trois approches différentes dans l'initiation de la traduction de leur génome : l'initiation chez les picornavirus, l'initiation du virus de l'hépatite C (VHC) et celle du virus de la paralysie du cricket (CrPV).

a. Initiation de la traduction chez les picornavirus : première IRES identifiée

Il est connu depuis longtemps que les ARN positifs de la famille des *picornaviridae*, munis d'une longue région 5'UTR (650 à 1300 nt) riche en codons d'initiation et structures secondaires, peuvent être traduits de façon efficace dans les cellules infectées (Kaariainen and Ranki, 1984). L'infection par les picornavirus entraîne généralement l'inhibition spécifique de la traduction de la cellule hôte (Bushell and Sarnow, 2002). Ces observations ont suggéré que les ARN viraux de picornavirus étaient traduits par un mécanisme différent de celui de la

traduction dépendante de la coiffe (adopté dans les cellules hôtes). Il fut démontré que l'initiation interne de la traduction d'ARN de poliovirus avait lieu par un mécanisme alternatif : l'entrée interne des ribosomes au niveau de régions hautement structurées de la région 5'UTR: les IRES (Jackson et al., 1990; Jang et al., 1988; Martinez-Salas and Fernandez-Miragall, 2004).

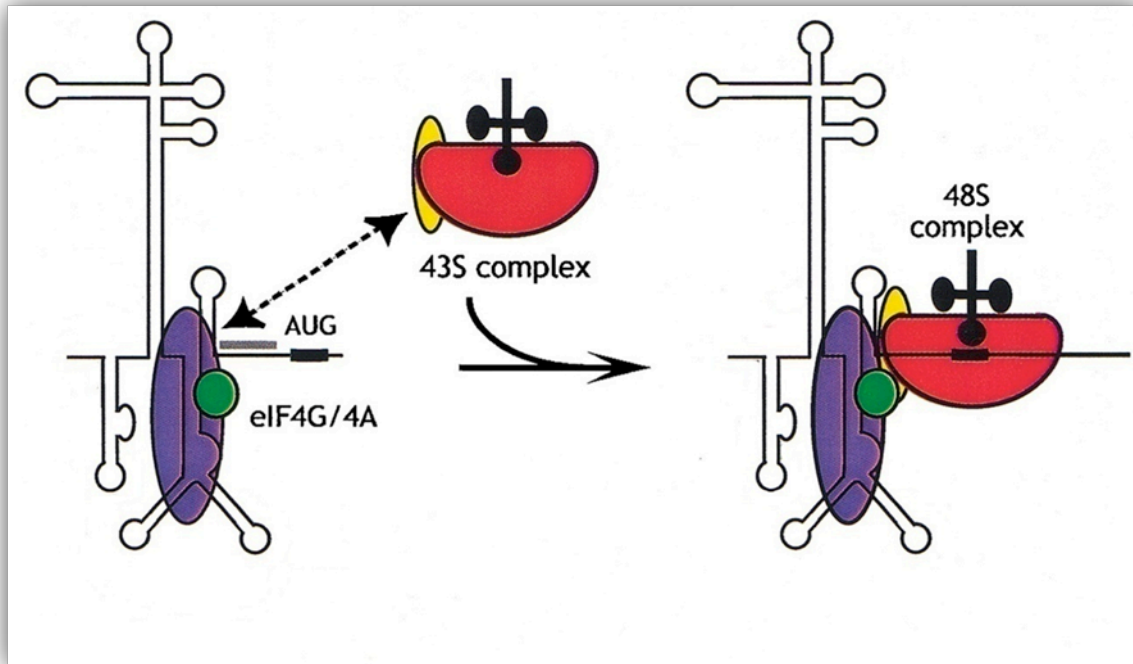


Figure 9 : Initiation de la traduction chez le virus EMCV (picornavirus) adapté de (Hellen and Sarnow, 2001)

Modèle d'assemblage du complexe 43S sur une IRES de picornavirus. Le facteur eIF4G (bleu) et le facteur eIF4A (Vert) sont localisés sur une tige-boucle de l'IRES. Le complexe 43S est recruté sur l'IRES grâce à l'interaction du facteur eIF3 (jaune) avec la protéine d'échafaudage eIF4G.

Pour initier la traduction du virus EMCV, les facteurs eIF4A et eIF4G se lient directement en amont du codon d'initiation AUG et induisent la fixation de la sous-unité ribosomique 43S (Figure 9). Il n'y a pas de mécanisme de balayage, les facteurs eIF1, eIF1A et eIF4E ne sont pas nécessaires (Pestova et al., 2001).

L'initiation interne permet en particulier aux picornavirus de contourner le cycle de traduction des ARN messagers de la cellule. La traduction est paralysée durant l'infection picornavirale en partie à cause du clivage du facteur eIF4G. Le fragment C-terminal issu de ce clivage se substitue au facteur eIF4G et empêche une traduction dépendante de la coiffe efficace. En effet, la partie de liaison au facteur eIF4E (qui reconnaît la coiffe) est séparée du reste du facteur eIF4G (Ohlmann et al., 1996; Pestova et al., 1996b).

b. Initiation sans ARN_t^{Met} : Les virus de la paralysie du cricket (CrPV):

De la famille des *Dicistroviridae* (Lancaster et al., 2006) le virus CrPV est un modèle d'initiation de la traduction très différent des autres initiations indépendantes de la coiffe. Il est constitué d'un génome en deux parties : chacune d'entre elles est traduite de façon séparée. La première séquence code pour les protéines non structurales et la seconde séquence code pour les protéines structurales du virus. Ces deux parties sont traduites de façon indépendante de la coiffe grâce à une IRES.

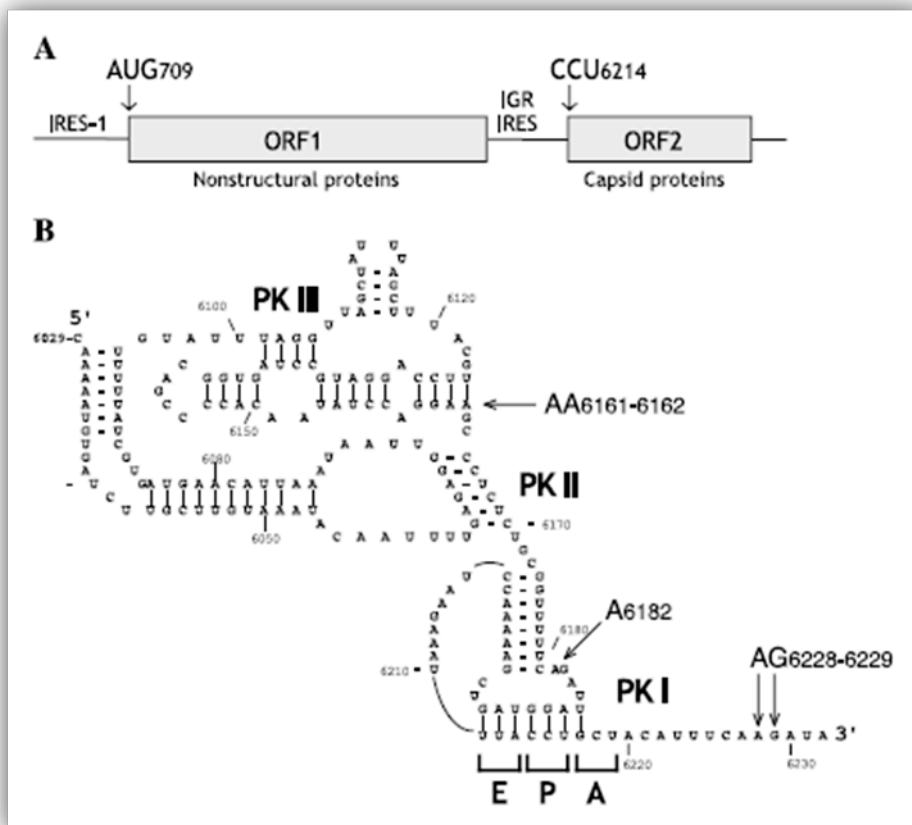


Figure 10 : Représentation schématique du génome du virus CrPV (Pestova and Hellen, 2005)

(A) Le génome du virus CrPV est composé de deux parties distinctes. Chacune est traduite de façon indépendante grâce à une IRES. La première IRES permet l'expression des protéines non-structurales du virus et l'IRES de la région intergénique (IGR) permet l'expression des protéines de la capsid.

(B) La représentation de la structure secondaire de l'IRES de la région IGR possède trois pseudonoeuds (PK). Les régions de l'IRES qui s'installent dans les sites E, A et P du ribosome sont également indiquées.

Contrairement à la majorité des situations décrites auparavant, dans le cas du virus CrPV la traduction de la partie codant pour les protéines de la capsid commence au niveau d'un codon qui diffère d'une méthionine. Cette IRES est liée directement par la sous-unité 40S

sans l'intervention d'aucun autre facteur de la machinerie traductionnelle mammifère. Il ne nécessite pas non plus d'ARNt^{Met}. L'IRES de la région IGR, au niveau du pseudonoeud I, adopte une structure secondaire qui occupe le site P du ribosome normalement occupé par l'ARNt^{Met} (Pestova et al., 2004).

c. Initiation de la traduction chez le virus de l'hépatite C

Le virus de l'Hépatite C est un virus à ARN positif, appartenant à la famille des *Flaviridae*. Il est responsable de l'infection de plus de 170 millions de personnes à travers le monde. Dans 50 à 80% des cas, il cause des hépatites chroniques pouvant évoluer en cirrhose et en hépatocarcinome (Pawlotsky, 2004).

Les IRES du HCV et des pestivirus ont été définies comme des IRES de type IV. Les IRES du HCV, de BVDV et CSFV ont des longueurs respectives de 342, 385 et 372nt. Elles présentent une homologie de séquence d'environ 50%. L'aspect le plus remarquable de fonctionnement de l'IRES de type IV est qu'elle se lie directement à la sous-unité 40S d'une façon stable et spécifique indépendamment des facteurs d'initiation (Pestova et al., 1998).

Le génome du virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C est un virus enveloppé dont le génome est constitué d'une molécule d'ARN de 9600nt. Une importante variabilité génétique est retrouvée sur l'ARN viral suite aux nombreuses mutations introduites à chaque cycle de réplication. Ainsi un individu est infecté par une population virale formée de quasi-espèces (Soler et al., 2002).

Contrairement aux ARNm, l'ARN du virus de l'hépatite C ne possède pas de coiffe méthylée et la traduction de l'ARN viral est initiée indépendamment des facteurs cellulaires eIF4E et eIF4G. Le génome du virus de l'hépatite C est constitué d'un brin d'ARN positif (Rosenberg, 2001). Les séquences situées en 5'UTR et en 3'UTR de part et d'autre de la séquence codante sont très conservées d'un génotype à l'autre.

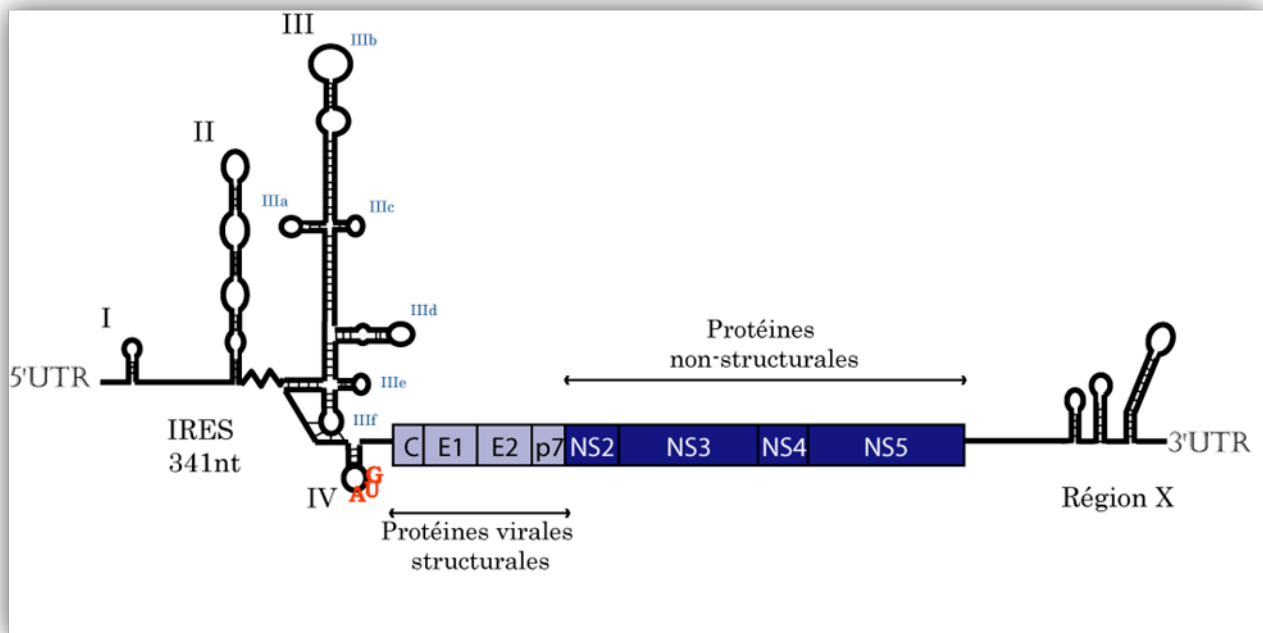


Figure 11 : Schéma représentant le génome du virus de l'hépatite C (Adapté de (Rosenberg, 2001))

Le génome de virus de l'hépatite C comprend une séquence codant pour une polyprotéine virale qui contient pour une partie des protéines structurales (C : nucléocapside, E1 et E2 : enveloppe et p7 en bleu clair) et pour une seconde partie des protéines non-structurales (NS en bleu foncé). Elles codent pour des protéases, hélicase et ARN polymérase. La région 5'UTR contient un site d'initiation de la transcription et une IRES qui sert à la traduction de la polyprotéine virale. Le codon d'initiation est un AUG situé dans la boucle IV de l'IRES. La région 3'UTR est constituée de deux parties : une partie variable de 40 bases riche en régions poly-UC et une région très conservée de 98 bases qui est propre au HCV, elle sert à sa réplication.

L'IRES du virus de l'hépatite C, située dans sa région 5'UTR, lui sert à initier la traduction des protéines structurales et non-structurales. Elle a une longueur de 341nt (Figure 11). Elle est composée de quatre domaines structuraux dont trois principaux pour lesquels l'importance au cours de l'initiation a été montrée. Ces domaines adoptent une structure secondaire conservée dans la famille des virus *Flaviridae*. Les domaines IIIId et IIIe sont importants pour l'initiation dépendante de l'IRES (Lukavsky et al., 2000).

Le génome du virus HCV ne porte pas de queue poly(A) en 3'UTR, mais une séquence polypyrimidique poly(U/C) conservée d'environ 80nt (Figure 11). Cette séquence est suivie d'une région structurée et conservée de 98nt appelée région X. Elle comporte trois structures en tige-boucle : les 46 derniers nucléotides du génome viral constituent la partie la plus stable. La partie 3'UTR est indispensable à l'infectivité du HCV *in vivo* et pourrait stimuler la réplication virale (Friebe and Bartenschlager, 2002; Kolykhalov et al., 1996).

Initiation de la traduction du HCV

L'initiation de la traduction du virus de l'hépatite C se fait grâce à son IRES. Elle débute par la formation du complexe binaire composé de la sous-unité 40S et du domaine III de l'IRES. Ensuite, le facteur eIF3 est recruté, et le complexe eIF2-GTP-ARNi^{Met} vient s'ajouter pour former la sous-unité 48S. Après l'hydrolyse de la molécule de GTP du facteur eIF2, celui-ci est relâché, la sous-unité 60S rejoint la petite sous-unité ribosomique pour former le complexe ribosome 80S-IRES (Ji et al., 2004; Pestova et al., 1998).

Un système d'initiation de la traduction, constitué de facteurs purifiés, a permis de montrer que cette IRES était capable de former un complexe binaire stable avec la sous-unité 40S tout en plaçant son AUG au niveau du site P du ribosome et sans l'intervention d'autre facteur d'initiation de la traduction (Pestova et al., 1998). La structure secondaire de l'IRES du HCV est donc très finement adaptée à la structure du ribosome pour placer directement le codon initiation dans le site P de la petite sous-unité du ribosome (Fraser and Doudna, 2007). Même si le facteur eIF3 n'est pas indispensable pour la fixation de la sous-unité 40S sur l'IRES, celui-ci est capable de lier l'IRES de façon spécifique et stable.

Sous certaines conditions, notamment de magnésium, l'IRES du virus de l'hépatite C permet l'initiation de la traduction de façon totalement indépendante des facteurs canoniques (Lancaster et al., 2006), ce qui avait auparavant été montré seulement chez CrPV (Hellen and Sarnow, 2001; Pisarev et al., 2005). Ce mécanisme permet fort probablement au virus de contourner à la fois la réponse antivirale de l'hôte, en échappant au système d'initiation dépendante de la coiffe, et de ne dépendre d'aucun facteur d'initiation. Ce mécanisme est similaire à celui de l'IRES de la région IGR du virus CrPV (Lancaster et al., 2006). Il est capable d'initier la traduction au niveau d'un codon non AUG présent dans une seconde ORF (Jan and Sarnow, 2002; Pestova and Hellen, 2003; Wilson et al., 2000).

d. Les IRES des messagers cellulaires

Les ARN viraux ne sont pas les seuls dotés de structures secondaires au niveau desquelles la traduction est initiée de façon indépendante de la coiffe. Jusqu'à aujourd'hui, 85 IRES sur des ARNm cellulaires et 39 IRES sur des ARN viraux ont été décrites (Baird et al., 2006).

Les initiations à l'aide d'une IRES ont lieu dans des situations de stress comme l'inflammation, l'angiogenèse, (Johannes et al., 1999; Johannes and Sarnow, 1998), la

privation de nutriments ou les chocs thermiques (Kaufman, 1999). Les initiations dépendantes de l'IRES ont aussi été identifiées pendant la croissance de la cellule et pendant l'apoptose. Elles permettent la synthèse de facteurs impliqués dans la mort cellulaire programmée de facteurs de survie et d'oncogènes (Holcik et al., 2000). Grâce à ces structures secondaires, l'expression de messagers cellulaires a lieu lorsque la traduction dépendante de la coiffe est inhibée (Baird et al., 2007).

Parmi les IRES cellulaires, il en existe sur l'ARNm du facteur d'initiation de la traduction DAP5 (Henis-Korenblit et al., 2000), du facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Johannes and Sarnow, 1998), du facteur de croissance FGF2 (Vagner et al., 1995) ou encore de la protéine hnRNPA/B (Qin and Sarnow, 2004). On retrouve également l'IRES de l'ARNm codant pour la protéine XIAP (« X-linked inhibitor of apoptosis protein ») (Baird et al., 2007).

Contrairement aux ARN viraux pour lesquels des classes sont établies, les études sur les IRES cellulaires n'ont pas permis de déterminer de structures secondaires communes ou encore moins des structures primaires.

Des études statistiques ont conduit à l'identification des motifs qui pourraient être communs à différentes IRES cellulaires et qui sont présentes chez certaines IRES virales (Le et al., 1996) (Figure 12).

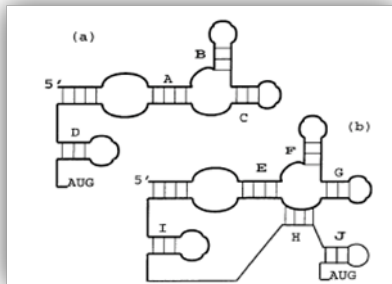


Figure 12 : Schéma d'un motif commun d'IRES (Le and Maizel, 1997)

Motif présent chez l'IRES de picornavirus (b) qui pourrait être adopté par différentes IRES cellulaires (a) comme celle de la protéine BiP exprimée en réponse à des stress.

Les structures secondaires de onze IRES cellulaires ont été analysées de façon systématique par empreinte à l'aide de ribonucléases ou de certaines modifications chimiques mais aucune similarité ne fut distinguée parmi celles-ci (Baird et al., 2007; Bonnal et al., 2003; Jang et al., 2004; Jopling et al., 2004; Le Quesne et al., 2001; Martineau et al., 2004; Mitchell et al., 2005; Mitchell et al., 2003; Pedersen et al., 2002; Pickering et al., 2004; Yaman et al., 2003).

Des travaux récents ont été entrepris pour essayer de percer le mystère de la structure secondaire des IRES cellulaires. Pour cela l'IRES de l'ARNm codant pour la protéine XIAP a été étudiée par empreinte enzymatique. Elle a ensuite été utilisée pour identifier des IRES d'autres messagers qui auraient une structure secondaire du même type dans une banque de 5'UTR à l'aide du programme RSEARCH (Baird et al., 2007; Klein and Eddy, 2003). Il permet l'identification de structures secondaires d'ARN simple brin.

Les résultats ont livré plusieurs ARN qui furent testés *in vivo* pour leurs capacités d'initiation de la traduction indépendante de la coiffe. Seulement deux en sont capables, AQP4 et ELG1, et lors de l'étude par empreinte enzymatique de leur structure secondaire seules quelques parties de leur IRES montrent une similarité de structure avec l'IRES de l'ARNm XIAP (Baird et al., 2007) (Figure 13).

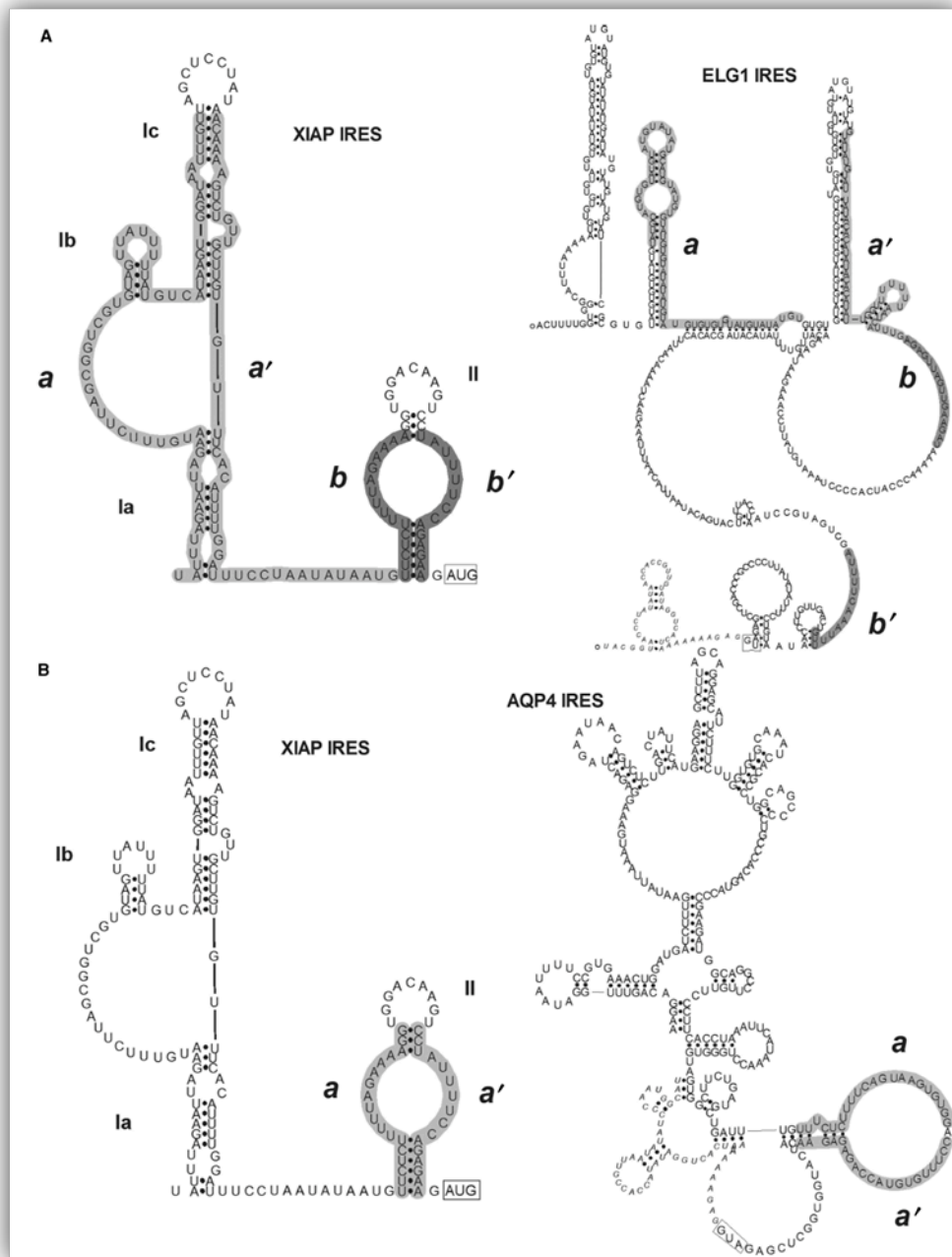


Figure 13 : Résultats des études de structure secondaire par empreinte à la RNase ((Baird et al., 2007))

(A) Les IRES de XIAP et de l'ARNm ELG1 sont comparées. En gris clair (a et a') et en gris foncé (b et b') sont surlignées les séquences communes prédites par le logiciel RSEARCH.

(B) Les IRES de XIAP et de l'ARNm AQP4 sont comparées. En gris clair (a et a') sont surlignées les séquences communes prédites par le logiciel RSEARCH

En revanche ces IRES ont certains facteurs *trans* ITAF en commun. Un modèle proposé actuellement pour classer les IRES cellulaires serait de prendre en compte les facteurs ITAF qui les régulent ainsi que des petits éléments structuraux qui les composent.

Les IRES cellulaires pourraient aussi fonctionner comme dans les organismes procaryotes. En effet l'hypothèse avait déjà été émise pour l'initiation de la traduction indépendante de la coiffe du virus de l'hépatite C mais aucune interaction directe n'a été détectée entre l'IRES du HCV et l'ARNr 18S (Pestova et al., 1998). Or un ARNm cellulaire a été identifié avec neuf nucléotides qui agissent comme une IRES et parfaitement complémentaires d'une séquence de l'ARN ribosomique 18S (Chappell et al., 2000).

La traduction des IRES est ainsi régulée par un groupe de protéines de liaison à l'ARN. Ce sont les facteurs ITAF « IRES-specific cellular *trans-acting* factors ».

Des ITAF sont impliqués dans la régulation de l'initiation des ARN viraux mais aussi des ARNm cellulaires (Hellen and Sarnow, 2001). Certains sont retrouvés dans la famille des protéines hnRNP. Ils ont un rôle dans la protection des ARN pré-messagers, l'export des ARNm, la localisation des ARNm, leur stabilité et leur traduction (Dreyfuss et al., 2002) (Figure 14).

ITAF	Target	Reference
PTB/nPTB	Apaf-1	Mitchell <i>et al.</i> ⁴⁴
	Bag-1	Pickering <i>et al.</i> ⁴⁶
	Mnt	Our unpublished data
	Myb	Our unpublished data
	MTG8a	Our unpublished data
	BiP	Kim <i>et al.</i> ⁵³
	IGF1R	Giraud <i>et al.</i> ⁵²
PCBP1/2	c-myc	Evans <i>et al.</i> ⁶¹
	hnRNPK	Evans <i>et al.</i> ⁶¹
La	BiP	Kim <i>et al.</i> ⁵⁴
	XIAP	Holcik <i>et al.</i> ⁷³
Unr	Apaf-1	Mitchell <i>et al.</i> ⁴⁴
	hnRNPC1/2	Holcik <i>et al.</i> ⁷⁴
DAP5	HIAP	Warnakulasuriyarachchi <i>et al.</i> ⁷⁵
	XIAP	Henis-Korenblit <i>et al.</i> ⁵⁰
	Apaf-1	Henis-Korenblit <i>et al.</i> ⁵⁰
	c-myc	Henis-Korenblit <i>et al.</i> ⁵⁰
eIF4GI fragment	Apaf-1	Nevins <i>et al.</i> ⁶⁸
	DAP5	Nevins <i>et al.</i> ⁶⁸
ELAV/Hu	p27	Kullmann <i>et al.</i> ⁷⁶

Figure 14 : Liste non exhaustive de facteurs ITAF et l'ARN qui contient leur IRES cible (Spriggs et al., 2005)

Les ITAF peuvent être des chaperonnes, stabiliser ou remodeler les structures des ARN.

La protéine PTB (« polypyrimidine tract binding protein ») appartient à la famille des hnRNPI. Elle est principalement retrouvée dans le noyau de la cellule, mais elle est aussi capable de se rendre dans le cytoplasme (Domitrovich et al., 2005). Dans le noyau, PTP régule l'épissage d'ARN pré-messagers. Dans le cytoplasme, elle facilite la traduction sous le

contrôle d'une IRES de picornavirus (Gosert et al., 2000) et stimule l'initiation de la traduction au niveau de l'IRES de rhinovirus (Hunt and Jackson, 1999). Cette régulation est effectuée avec l'aide de la protéine unr (« upstream of N-ras ») (Hunt et al., 1999). La protéine PTB agit en se liant à l'ARN. Elle reconnaît les séquences riches en pyrimidines (Kolupaeva et al., 1996). Elle se lie à trois domaines du génome du HCV: une de ces séquences est située dans la partie 5'-UTR (Ali and Siddiqui, 1995; Perez et al., 1997) qui est requise pour le HCV *in vivo* (Anwar et al., 2000); les deux autres séquences sont situées dans la partie 3'-UTR dont une au niveau de la région X (Ito et al., 1998).

Dans le noyau, la protéine « La autoantigen » interagit avec les transcrits de l'ARN polymérase III nouvellement synthétisés (Maraia, 2001). 80% se situe dans le noyau mais cela varie en fonction des conditions de stress. Par exemple ceci se produit après transfection avec le HCV (Izumi et al., 2004; Maraia, 2001). Elle se lie à l'extrémité 5'UTR du HCV près du codon AUG et avec son extrémité 3'UTR au niveau de la région poly(U) et l'interaction avec le 5'-UTR est importante pour la traduction du virus (Ali and Siddiqui, 1997). Elle interagit aussi avec l'IRES de poliovirus (Meerovitch et al., 1993).

Les ITAF PTB et La autoantigen sont tous les deux requis pour une traduction efficace du virus, en revanche La autoantigen stimule la réplication alors que PTB la réprime (Domitrovich et al., 2005).

Dans la régulation d'ARNm cellulaires, un autre facteur ITAF est la protéine hnRNP A1. Elle peut avoir les propriétés de stimuler ou bien de réprimer la traduction de certains messagers. Cette protéine contrôle l'initiation de l'ARNm FGF-2 dans le choix du codon d'initiation (Bonnal et al., 2005).

En revanche hnRNP A1 est aussi un inhibiteur de la traduction dans certaines circonstances. Dans le cas de l'ARNm XIAP, elle interagit au niveau du même site de liaison que l'ITAF La autoantigen qui régule de façon positive sa traduction. Mais ils ne semblent pas entrer en compétition. (Lewis et al., 2007).

Les hypothèses du mode de fonctionnement des ITAF est qu'ils peuvent aider soit le recrutement de la sous-unité 40S sur l'IRES, soit stabiliser l'IRES pour permettre l'initiation de la traduction (Bonnal et al., 2005). Ils sont certainement impliqués dans des réorganisations des repliements des IRES de façon à stimuler ou inhiber la traduction des ARNm cellulaires.

3. Les facteurs canoniques eIF3 et eIF4G

a. Le facteur eucaryote d'initiation de la traduction 3

Le facteur eIF3 est le plus grand de tous les facteurs canoniques identifiés. Chez les mammifères, le facteur eIF3 est composé d'au minimum 13 sous-unités (de *a* à *m*) (Browning et al., 2001) dont deux possèdent un RRM : eIF3b et eIF3g (Tableau 2). La masse apparente du facteur eIF3 est de 800kDa, la taille des sous-unités varie de 25kDa à 170kDa (Damoc et al., 2007).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, on retrouve seulement cinq orthologues du facteur eIF3 de mammifère (Phan et al., 1998) (Tableau 2). Le noyau du facteur eIF3 est constitué de cinq sous-unités assemblées de façon stœchiométrique 1:1:1:1:1 (*a*, *b*, *c*, *g*, *i*) auxquelles se rajoute un élément non stœchiométrique, la sous-unité *j*. Ces cinq sous-unités constituant le noyau sont requises pour la survie de la levure (Hinnebusch, 2000).

Tableau 2 : Sous-unités du facteur eIF3 présentes chez les mammifères et chez la levure *S. cerevisiae*.
Sur une même ligne sont présentées les sous-unités homologues.

sous-unité	<i>H. Sapiens</i>	Masse (kDa)	Référence	<i>S. cerevisiae</i>	Masse (kDa)	Référence
a	p170	166,7	(Johnson et al., 1997)	TIF32/ p110	111,1	(Vornlocher et al., 1999)
b	p116	93	(Methot et al., 1997)	PRT1/ p90	88.1	(Keierleber et al., 1986)
c	P110	106,1	(Asano et al., 1997a)	NIP1/p93		(Gu et al., 1992)
d	p66	63,9	(Asano et al., 1997c)			
e	p48	52,1	(Asano et al., 1997b)			
f	p47	37,5	(Asano et al., 1997c)			
g	p44	35,6	(Block et al., 1998b)	TIF35/ p33	30.5	(Hanachi et al., 1999)
h	p40	40	(Asano et al., 1997c)			
i	p36	36,5	(Asano et al., 1997a)	TIF34/ p39	38.8	(Naranda et al., 1997)
j	p35	29,3	(Block et al., 1998b)	HCR1/ p16		(Valasek et al., 1999)
k	P28	25	(Mayeur et al., 2003)			
l	P67	66,6	(Morris-Desbois et al., 2001)			
m	GA17	42,5				
				SUI1	12.3	
				GCD10/ p62	54.4	
				TIF31/ p135	145.2	

La sous-unité b du facteur eIF3 qui possède un RRM est une protéine très importante de ce complexe. Elle interagit avec les sous-unités : eIF3a, eIF3g, eIF3i et eIF3j et chez la levure avec les sous-unités eIF3a, eIF3g, eIF3i, eIF3j et eIF3e (ElAntak et al., 2007). Le rôle de protéine d'échafaudage et d'organisation de la structure de la sous-unité b du facteur eIF3 est très conservé. Chez la levure, eIF3a et eIF3j interagissent directement avec le RRM de la sous-unité b (Valasek et al., 2001). De plus, la sous-unité eIF3j est située directement dans le

centre de décodage du ribosome et joue un rôle dans la formation du complexe 43S (Fraser et al., 2007).

Parmi ses nombreuses fonctions dans l'initiation de la traduction, le facteur eIF3 induit l'assemblage du complexe ternaire $ARNt_i^{Met} \cdot eIF2 \cdot GTP$. Il joue un rôle essentiel dans l'initiation classique en liant directement la sous-unité 40S du ribosome en l'absence d'autre facteur de la traduction (Pestova et al., 2001). Cette aptitude est augmentée par la présence de sa sous-unité eIF3j (Fraser et al., 2004). Ainsi, il induit la formation du complexe de pré-initiation 43S (Chaudhuri et al., 1999; Hinnebusch, 2006).

Le facteur eIF3 permet de maintenir les sous-unités 40S et 60S dans un état dissocié, en prévenant la formation prématurée du ribosome 80S avant que le complexe 48S ne soit formé (Kolupaeva et al., 2005), ce qui conduirait à l'arrêt du processus de traduction.

Le facteur eIF3 interagit directement avec l'ARNm (Kolupaeva et al., 2005). Grâce à son interaction avec le facteur eIF4G, il permet le recrutement de l'ARNm sur le complexe 43S (Korneeva et al., 2000; Lamphear et al., 1995). Cette capacité semble due à la sous-unité eIF3j située dans le site de décodage du ribosome (Fraser and Doudna, 2007).

Le facteur eIF3 interagit aussi avec plusieurs des facteurs d'initiation de la traduction : eIF1, eIF1A, eIF2, eIF4B, eIF4G et eIF5 (Asano et al., 2000; Bandyopadhyay and Maitra, 1999; Fletcher et al., 1999; Methot et al., 1996; Olsen et al., 2003; Valasek et al., 2002).

Le facteur eIF3 est également un élément clé dans l'initiation de la traduction indépendante de la coiffe chez le virus de l'hépatite C (HCV) et chez les Pestivirus comme le CSFV (« classical swine fever virus ») ou BVDV (« bovine viral diarrhea virus »). Ces virus enveloppés possèdent une entrée interne des ribosomes (IRES) dans leur génome constitué d'une molécule d'ARN brin positif (Hellen and Pestova, 1999; Sizova et al., 1998a).

b. Le facteur eucaryote d'initiation de la traduction 4G

Le facteur eIF4G est un des éléments déterminants de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. Il possède des domaines d'interaction avec plusieurs des facteurs impliqués dans la régulation de la traduction : c'est une protéine d'échafaudage.

Lors de l'initiation dépendante de la coiffe, il interagit avec le facteur eIF3 et aide ainsi le complexe de pré-initiation 43S à lier la coiffe de l'ARNm.

La protéine d'échafaudage eIF4G comporte deux isoformes (Prevot et al., 2003a). Chez les levures, eIF4G1 et eIF4G2 ont 53% d'identité de séquence et sont respectivement encodées par les gènes *TIF4631* et *TIF4632* (Goyer et al., 1993). Chez les mammifères, les homologues sont eIF4GI et eIF4GII avec 46% d'identité de séquence et sont fonctionnellement identiques (Gradi et al., 1998). Il existe une protéine supplémentaire dans la famille « eIF4G » des mammifères dont la séquence est homologue à la partie C-terminale du facteur eIF4GI : p97/DAP-5/NAT-1 (Imataka et al., 1997; Levy-Strumpf et al., 1997; Yamanaka et al., 1997). Comme ses homologues eIF4GI et eIF4GII, cette protéine est exprimée de façon constitutive.

Le facteur eIF4G de mammifère

Pour le facteur eIF4GI de mammifère, trois domaines de tailles comparables sont définis (Figure 15). Dans la partie N-terminale (acides aminés 1-720), se situe le site de liaison de la protéine PABP (acides aminés 132 à 160) et du facteur eIF4E (acides aminés 572 à 578). Cette partie est requise pour la traduction dépendante de la coiffe (Imataka et al., 1998; Lamphear et al., 1995; Mader et al., 1995).

La partie centrale (acides aminés 720-1200) lie le facteur eIF3 par sa sous-unité p48/e (LeFebvre et al., 2006) au niveau des acides aminés 975 à 1065 du facteur eIF4GI (Korneeva et al., 2000) ainsi que le facteur eIF4A (Imataka and Sonenberg, 1997).

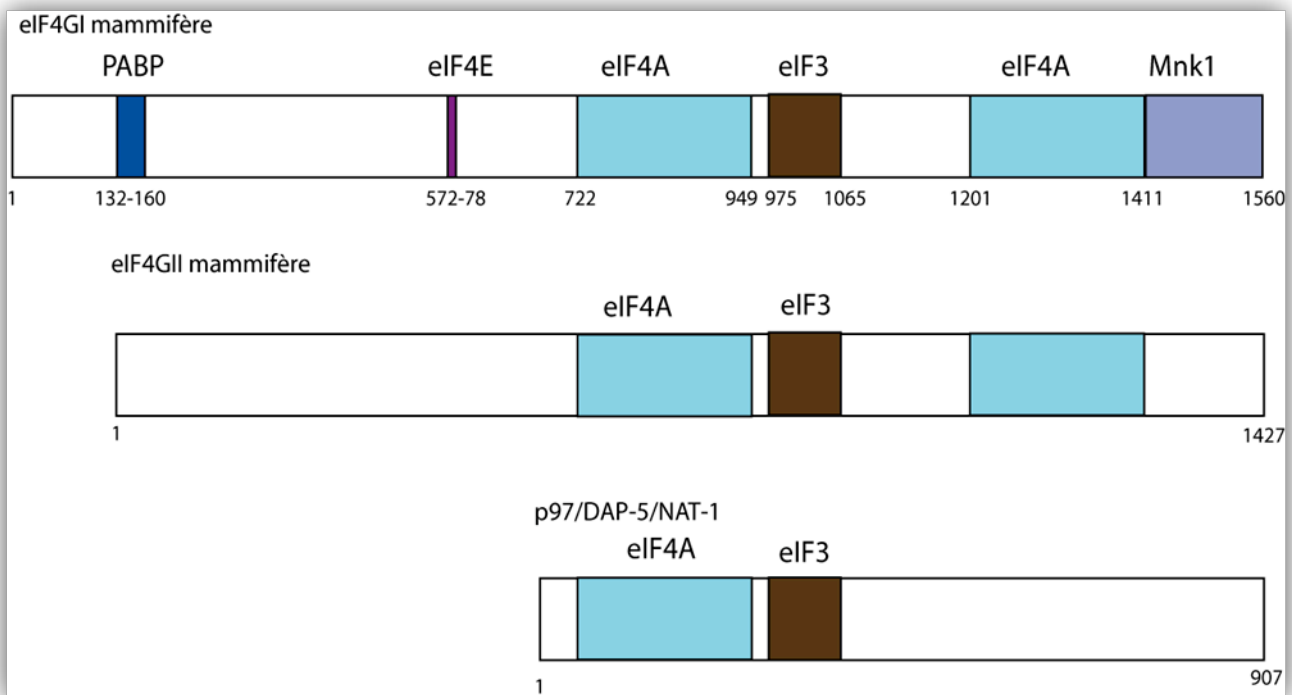
Le facteur eIF4G possède aussi un site de liaison à l'ARN situé dans les 2/3 de la région C-terminale de sa séquence. Cette partie est suffisante pour initier la traduction indépendante de la coiffe en l'absence du complexe eIF4F (Ohlmann et al., 1996).

La partie centrale forme un complexe avec l'IRES du virus EMCV et initie sa traduction (Pestova et al., 1996a). Elle stimule généralement la traduction d'ARNm non coiffés (De Gregorio et al., 1998). Dans cette partie se trouvent aussi des domaines HEAT (cinq paires d'hélices antiparallèles) impliqués dans la liaison de l'ARN (Andrade and Bork, 1995; Marcotrigiano et al., 2001).

La troisième partie (acides aminés 1200-1560) possède un second site de fixation pour le facteur eIF4A (Imataka and Sonenberg, 1997) et peut lier la sérine-thréonine kinase Mnk, qui phosphoryle le facteur eIF4E (Pyronnet et al., 1999).

Figure 15 : Les facteurs eIF4GI et eIF4GII mammifères et leur homologue p97.

Sur ce schéma sont représentés les sites de liaison aux facteurs canoniques PABP, eIF4E, eIF4A (2 sites), eIF3 et pour la kinase Mnk1 qui phosphoryle eIF4E.



La séquence minimale requise pour initier la traduction est comprise entre les acides aminés 550 et 1090. Elle inclut le site de liaison au facteur eIF4E et le domaine central du facteur eIF4G (Morino et al., 2000).

La partie C-terminale, absente de la séquence de l'homologue de *S. cerevisiae* semble moduler la traduction, mais n'est pas indispensable (Morino et al., 2000).

Il existe un second facteur eIF4GII qui possède les mêmes propriétés biochimiques que le facteur eIF4GI et les mêmes sites de liaison sont présents sur sa séquence (Lamphear et al., 1995).

Le facteur eIF4G de levure

De la même façon que chez les mammifères, le facteur eIF4G1 de levure contient un site de liaison pour le facteur eIF4A au niveau des acide aminés 542 à 883 (Figure 16) (Dominguez et al., 1999; Dominguez et al., 2001; Neff and Sachs, 1999). Ce domaine est

conservé dans sa séquence en acides aminés avec le facteur eIF4G1 de mammifère mais seulement pour le 1^{er} site car le second site est unique (Imataka and Sonenberg, 1997).

Le facteur eIF4G1 interagit avec le facteur eIF4E (acides aminés 409 à 457) (Mader et al., 1995) et avec la protéine Pabp1, homologue chez la levure de la protéine humaine PABP (acides aminés 201 à 315) (Tarun and Sachs, 1996).

Ce facteur est pourvu de plusieurs sites de liaison à l'ARN. Les propriétés de liaison à l'ARN de différents fragments de eIF4G ont été caractérisées à l'aide de la méthode de « filter binding assay » (Berset et al., 2003). Les auteurs ont déduit de ces expériences la présence d'au moins trois sites de liaison à l'ARN. Le premier est contenu dans la séquence d'acides aminés 1 à 82. Le second est situé au milieu de la séquence du facteur eIF4G, au niveau des acides aminés 492 à 539. Le troisième est compris dans la séquence en acides aminés 883 à 952, située tout à fait dans la partie C-terminale de la protéine (Berset et al., 2003).

Chez la levure, l'interaction du facteur eIF3 avec la sous-unité eIF4G n'a jamais été montrée. La fonction de recrutement du complexe 43S passe par son interaction avec le facteur eIF5 (Asano et al., 2001).

Il existe aussi chez la levure *S.cerevisiae*, une protéine qui présente une homologie de séquence avec le facteur eIF4G au niveau de son site de liaison avec le facteur eIF4E : la protéine p20. Elle est impliquée dans la régulation de l'initiation classique, elle empêche l'interaction du facteur eIF4G avec le facteur eIF4E (Altmann et al., 1997).

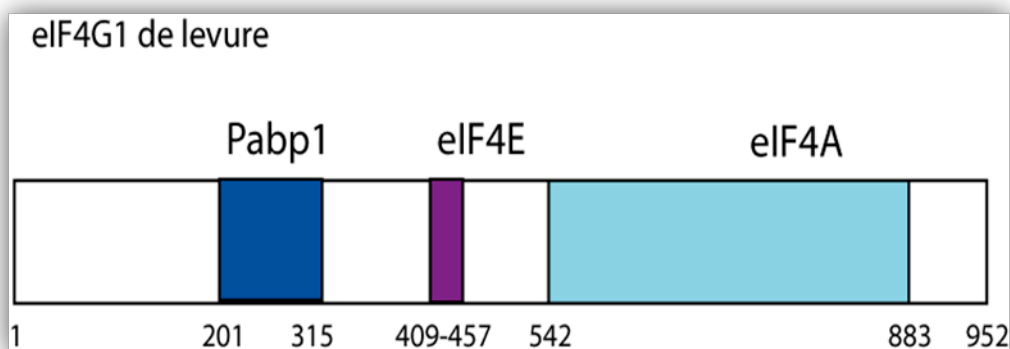


Figure 16 : Le facteur eIF4G1 de levure.

Le facteur eIF4G1 possède des sites de liaison avec les facteurs eIF4A (bleu ciel), eIF4E (violet) et Pabp1 (bleu foncé).

Homologue mammifère de la protéine eIF4G

La protéine p97/DAP-5/NAT-1 est homologue des parties centrale et C-terminale du facteur eIF4G1 de mammifère (Figure 15). Elle présente 30% d'homologie avec le facteur eIF4G1 et peut interagir avec les facteurs eIF3 et eIF4A (Imataka and Sonenberg, 1997; Yamanaka et al., 1997).

Tout comme pour le facteur eIF4G1, dans son domaine C-terminal se trouve un site de liaison pour la kinase Mnk1 (Pyronnet et al., 1999). En revanche, elle ne possède pas de site de liaison pour les facteurs eIF4E et PABP (Imataka and Sonenberg, 1997; Marash and Kimchi, 2005).

Le facteur p97 est tout d'abord connu pour inhiber la traduction. Sa surexpression dans des cellules entraîne l'inhibition des traductions dépendantes et indépendantes de la coiffe (Imataka et al., 1997; Yamanaka et al., 1997).

La traduction indépendante de la coiffe est déclenchée lors du stress, de la mitose ou encore de l'apoptose (Holcik and Sonenberg, 2005; Komar and Hatzoglou, 2005). Pendant l'apoptose, elle implique la protéine p86, produit du clivage de la protéine p97 par la Caspase-3 (Morley et al., 2005; Marash and Kimchi, 2005).

Il a été montré récemment que le facteur p97 est aussi un activateur de la traduction avec un rôle essentiel lorsque les cellules ne sont pas stressées (Nousch et al., 2007).

En revanche, la présence du facteur eIF4E semble diminuer l'efficacité de l'initiation indépendante de la coiffe (Hernandez et al., 2004).

c. La stimulation de l'interaction des facteurs eIF4G et eIF3 est une étape déterminante pour l'initiation de la traduction.

Le facteur eIF3 et le facteur eIF4G1 sont deux partenaires très importants dans la traduction. Au cours de l'initiation dépendante de la coiffe, ces deux facteurs permettent le recrutement de la sous-unité 43S grâce à leur interaction directe. Cette interaction est régulée par l'insuline qui permet l'association de mTOR avec eIF3, en particulier avec la sous-unité eIF3f (Harris et al., 2006; Holz et al., 2005).

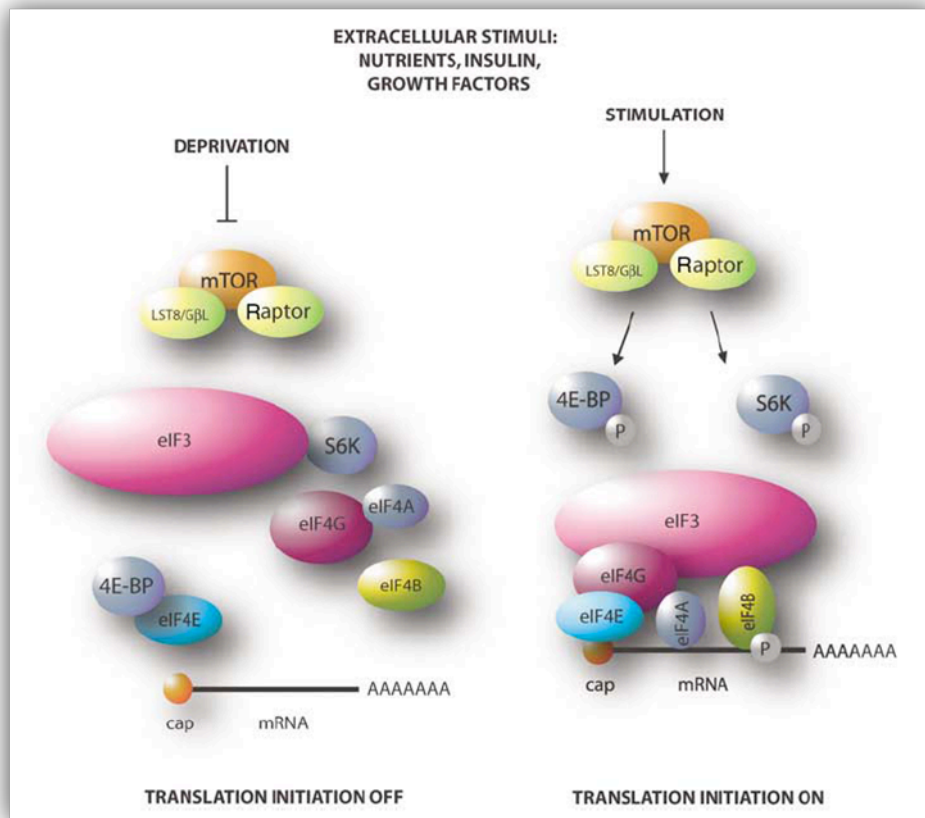


Figure 17 : Activation de la traduction par mTOR (Mamane et al., 2006)

Les nutriments, des hormones et des facteurs de croissance activent mTOR en complexe avec raptor et LST8/GβL. La kinase mTOR phosphoryle au minimum deux cibles qui sont 4E-BP et SK6 (les plus étudiées). La phosphorylation de 4E-BP entraîne le relâchement du facteur eIF4E et la phosphorylation de S6K entraîne le relâchement du facteur eIF3. S6K est activée, elle phosphoryle la protéine ribosomique S6 ainsi que le facteur eIF4B qui peut s'associer à eIF3. De plus mTOR stimule l'association des facteurs eIF3 et eIF4G.

La stimulation de l'initiation de la traduction par l'insuline passe par l'activation d'une cascade de signalisation dont fait partie la kinase mTOR. Elle implique la phosphorylation de la protéine 4EBP-1 (Gingras et al., 1999a). Cette modification post-traductionnelle entraîne la dissociation de 4EBP-1 du facteur eIF4E. D'ailleurs le motif qui permet à 4EBP-1 d'interagir avec eIF4E est retrouvé dans le domaine d'interaction du facteur eIF4G (Mader et al., 1995).

Les domaines d'interaction du facteur eIF4G pour ses différents partenaires ont été étudiés pour leur implication dans l'initiation de la traduction *in vivo*. Des constructions pour lesquelles les sites d'interaction pour PABP, pour eIF4A et pour eIF3 ont respectivement été

délétés ou leurs capacités de liaison de l'ARN ont été supprimées. Il en ressort que l'abolition de la liaison pour PABP n'a pas affecté les propriétés du facteur eIF4G dans l'initiation de la traduction. La suppression des deux domaines de liaison à eIF4A empêche une bonne initiation dans les lysats de reticulocytes. En revanche, une information pour la compréhension de l'importance de l'interaction entre les facteurs eIF3 et eIF4G au cours de l'initiation diminue l'aptitude du facteur eIF4G à lier eIF4E même si ce dernier est présent dans les fractions de polysomes (Hinton et al., 2007).

Ces travaux montrent que les mécanismes d'initiation sont redondants, les interactions qui ont été abolies sont certainement compensées par d'autres mécanismes.

4. Régulation de l'initiation de la traduction

Le contrôle traductionnel est une des clés de la régulation de l'expression génique. Il est impliqué dans les premiers stades du développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, et le métabolisme (Gebauer and Hentze, 2004). L'étape la plus souvent régulée est l'initiation.

Le contrôle de la traduction implique le plus souvent des modifications comme la phosphorylation ou la déphosphorylation de facteurs canoniques.

Par exemple pour le facteur eIF2, quand la sous-unité α est phosphorylée (sur son résidu Ser51), l'échange de GTP ne peut pas avoir lieu car ceci empêche la dissociation du complexe eIF2-eIF2B qui réduit le taux d'échange de GDP-GTP. La traduction est ainsi régulée négativement car le taux de facteur eIF2 est en excès par rapport au taux de facteur eIF2B (Figure 5) (Gebauer and Hentze, 2004; Rowlands et al., 1988)

a. Le facteur eIF4G, un élément clé de l'initiation dépendante de la coiffe

Le facteur eIF4G est ciblé durant l'apoptose. Il est clivé par la protéine pro-apoptotique caspase-3 (Marissen and Lloyd, 1998). Ceci permet l'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe dans les cellules.

Lors de l'infection par les picornavirus et les lentivirus, des protéases virales clivent des facteurs canoniques de la traduction. Elles permettent aux virus d'empêcher la traduction des ARNm cellulaires coiffés et poly-adénylés, d'utiliser les facteurs cellulaires canoniques afin d'initier leur propre traduction. De cette façon, ils peuvent se propager. Lorsque la partie N-terminale du facteur eIF4G est clivée par la protéase virale de picornavirus le complexe ternaire ne peut plus reconnaître la coiffe (Lamphear et al., 1993). Ce clivage sépare la partie de liaison au facteur eIF4E de celle du facteur eIF4A (Lamphear et al., 1995). Les fonctions de dissolution des structures d'ARN et de liaison au ribosome étant séparées, cela entraîne l'inactivation de la traduction de la plupart des ARN messagers cellulaires qui sont coiffés (Ohlmann et al., 1995).

b. Régulation de PABP par les protéines Paip1, Paip2A et Paip2B

La protéine PABP est aussi dégradée par la protéine pro-apoptotique caspase-3 (Marissen et al., 2004). De la même façon que pour le facteur eIF4G, ceci permet de diminuer considérablement la traduction des ARNm coiffés et poly-adénylés.

La protéine PABP contient quatre domaines de liaison à l'ARN (RRM) en N-terminal. Ces domaines RRM servent aux liaisons avec les protéines Paip (« PABP-interacting »)-1, Paip-2, eIF4G (Imataka et al., 1998), avec l'ARNm et de nombreux autres facteurs qui régulent les fonctions de PABP (Figure 18).

Les protéines Paip régulent l'activité de la protéine PABP. Paip1 est un activateur de la traduction (Craig et al., 1998). Paip2A et Paip2B sont deux inhibiteurs de la traduction (Berlanga et al., 2006; Khaleghpour et al., 2001b). La protéine Paip2A contrôle le niveau cellulaire de PABP. Lorsqu'il est trop bas, la protéine Paip2A est ubiquitinylée puis dégradée ce qui permet l'arrêt de son activité de répression sur la protéine PABP.

La protéine Paip1 interagit avec les facteurs eIF4A et eIF3. Ceci permet une activation de la traduction. Paip2 inhibe la formation du ribosome 80S par compétition avec Paip1 au niveau de son site de liaison sur PABP (Khaleghpour et al., 2001a). Paip2 est aussi en compétition avec le facteur eIF4G pour son interaction sur la protéine PABP (Karim et al., 2006).

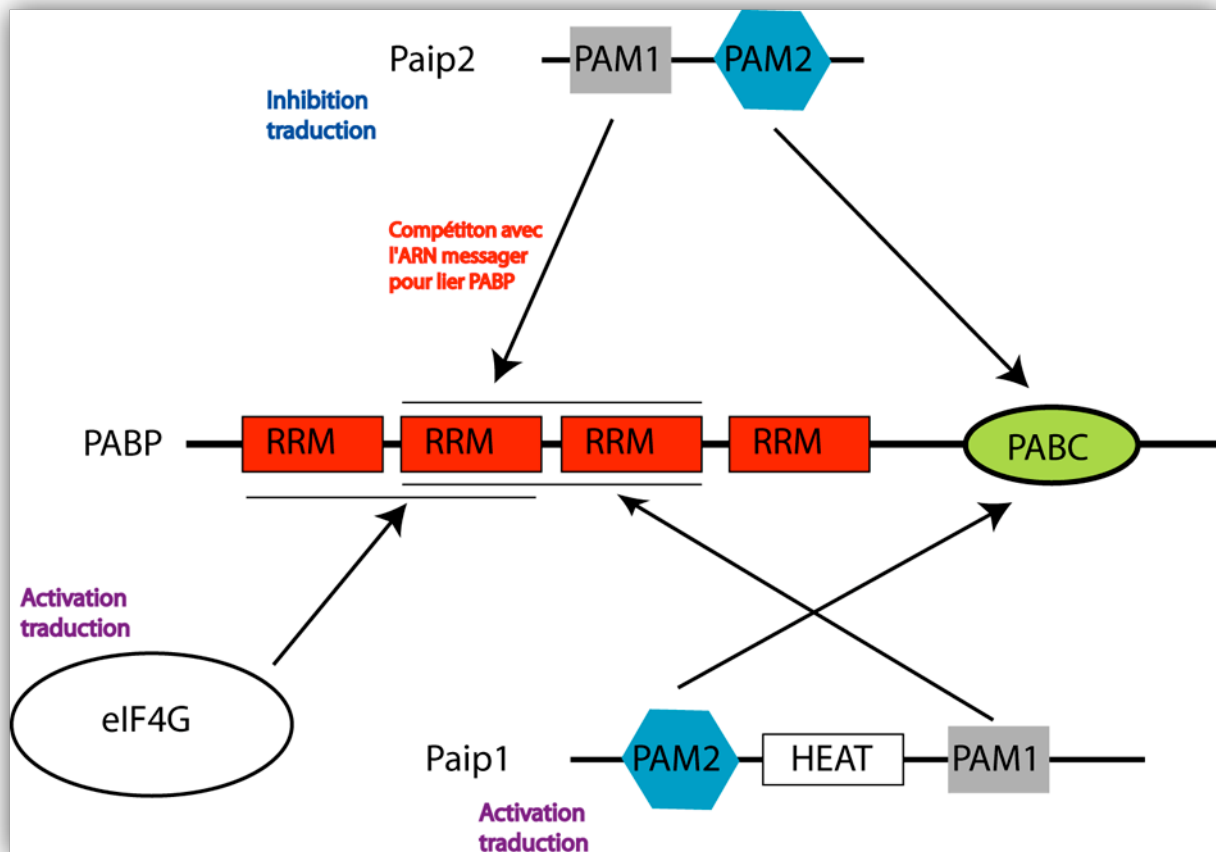


Figure 18 : Schéma représentant les interactions des protéines Paip et eIF4G avec la protéine PABP

La protéine PABP comporte quatre RRM (« RNA recognition motif ») et un domaine PABC (domaine capable de reconnaître un domaine PAM). Elle interagit avec le domaine PAM1 de Paip2 au niveau de son RRM2 et avec le domaine PAM2 au niveau de son domaine PABC. Paip2 compétitionne le site de liaison à l'ARNm de PABP. C'est un répresseur de la traduction. La protéine Paip1 interagit avec le RRM2-3 de PABP et avec son domaine PABC. C'est un activateur de la traduction.

c. Les protéines 4E-BP

Le facteur eIF4E est requis pour la liaison de la sous-unité 40S avec la coiffe de l'ARNm. Il fait partie du complexe eIF4F avec le facteur eIF4G avec lequel il interagit. Il existe dans la séquence de la protéine eIF4G un petit domaine aussi présent chez des facteurs de régulation de la traduction appelés 4E-BP pour « protéine de liaison au facteur eIF4E » (Matsuo et al., 1997). Lorsque ces protéines sont peu phosphorylées, elles sont capables de lier le facteur eIF4E et entrent en compétition avec le facteur eIF4G. Comme le facteur eIF4E est limitant, en le ciblant, les protéines 4E-BP peuvent exercer un certain contrôle sur le niveau de facteur eIF4F actif en empêchant l'interaction de la sous-unité eIF4G avec la sous-unité eIF4E. Ainsi la traduction dépendante de la coiffe est réprimée car le complexe 43S ne peut plus être recruté à la coiffe par le facteur eIF4E (Figure 19) (Gebauer and Hentze, 2004).

L'hyperphosphorylation des protéines 4E-BP peut être le résultat de l'activation d'une cascade par des éléments extracellulaires comme certaines hormones, par exemple l'insuline (Pause et al., 1994). La phosphorylation de ces protéines les dissocie du facteur eIF4E et permet la reprise de la traduction dépendante de la coiffe.

Ce mécanisme général de régulation du facteur eIF4E dépend de différentes classes de « protéine de liaison au facteur eIF4E ». Des exemples sont détaillés dans le chapitre suivant.

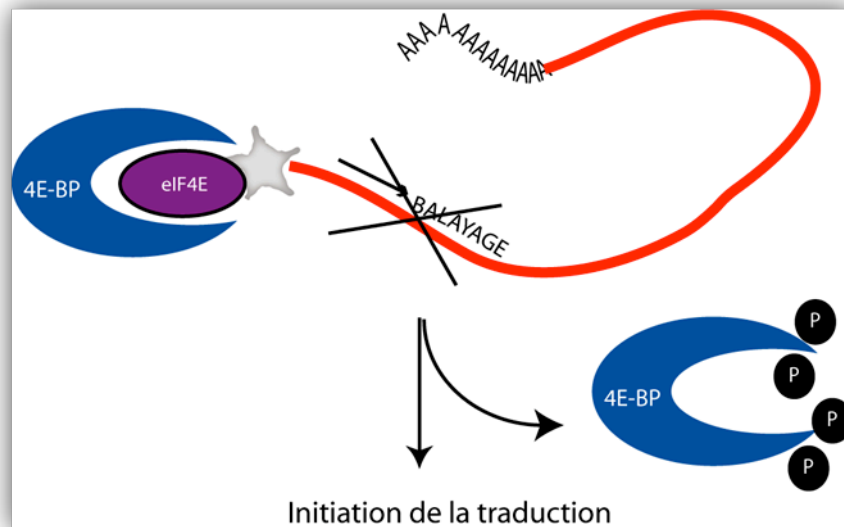


Figure 19 : Le facteur eIF4E est régulé par les 4E-BP

Des protéines capables de lier le facteur eIF4E permettent de réguler l'initiation de la traduction. Elles empêchent le recrutement de la sous-unité 43S en séquestrant le facteur eIF4E. Lorsqu'elles sont phosphorylées, elles permettent de libérer le facteur eIF4E et la traduction peut reprendre.

d. Régulation de la traduction par des éléments *cis* de l'ARN messager

Les ARNm sont pourvus de différents éléments dans leur séquence qui permettent leur traduction : les extrémités 5'UTR et 3'UTR, les structures secondaires adoptées par les ARN, des IRES, des séquences traduites ou non qui peuvent recruter des ribosomes (uORF) (Figure 20).

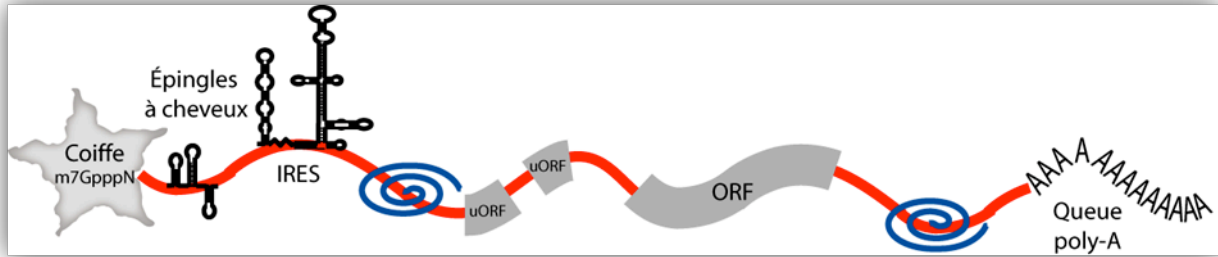


Figure 20 : Les éléments de l'ARNm ou éléments *cis* sont impliqués dans l'initiation de la traduction et dans sa régulation.

La traduction est initiée de deux façon : au niveau de la coiffe ou au niveau d'IRES. La séquence comporte des ORF (« Open Reading Frame ») et des uORF (« upstream ORF ») (en gris). Des séquences *cis* principalement situées dans les domaines 5'-UTR et 3'-UTR sont reconnues par des éléments *trans* qui permettent la régulation de la traduction.

L'extrémité 5'UTR de l'ARNm

L'extrémité 5'UTR des ARNm coiffés est en moyenne de 50 à 70 nt. Plus la distance entre la coiffe et le codon d'initiation AUG est grande, plus l'efficacité de traduction peut augmenter. Ceci est dû au nombre plus grand de ribosomes qui peuvent lier ce site. Cependant, les ARNm peuvent adopter des structures secondaires. Si l'extrémité 5'UTR est masquée par ces structures, il sera traduit mais moins efficacement car le balayage est moins accessible (Kozak, 1991). De plus des uORF (« upstream open reading frame ») peuvent apparaître et retenir un certain nombre de ribosomes sur leur codon AUG.

Les uORF sont de courtes séquences potentiellement traduites situées en amont de la séquence codante. Elles peuvent affecter le taux de traduction de la séquence principale en recrutant et séquestrant un certain nombre de ribosomes (Vilela and McCarthy, 2003). Elles peuvent parfois stimuler la traduction en cachant des éléments *cis* impliqués dans l'inhibition de la traduction mais le plus souvent ce sont des répresseurs (Neafsey and Galagan, 2007). Pour bloquer la traduction les uORF ont plusieurs mécanismes : blocage du ribosome par le peptide synthétisé, séquestration du ribosome au niveau du site de terminaison de l'uORF, induction de la dégradation par NMD (« non sense mediated decay »), échec de la réinitiation du ribosome au niveau de l'ORF qui suit (Gaba et al., 2001).

Deux approches de régulations peuvent être considérées. Une première approche est globale, c'est-à-dire qu'elle est appliquée à la majorité des ARNm de la cellule. Elle concerne la modification de facteurs canoniques. Une seconde approche est spécifique, elle touche un groupe précis d'ARNm sans affecter la synthèse protéique générale. Elle est menée par des

protéines et complexes qui reconnaissent des éléments particuliers de certains ARN et situés principalement dans les parties 5'UTR et 3'UTR de ces ARNm.

e. Mécanismes de régulation par des facteurs *trans*

Blocage stérique par les protéines IRP et le motif ribonucléique IRE

Les protéines IRP (« IRON regulatory proteins ») 1 et 2 contrôlent le taux de Fer en régulant la traduction des ARNm codants pour les chaînes lourde et légère de la ferritine. En effet, la ferritine a pour rôle de constituer les réserves de fer de l'organisme en le maintenant sous une forme disponible et non toxique pour l'organisme.

Lorsque les cellules sont en déficit de Fer, les protéines IRP1 et IRP2 sont capables de se lier au motif IRE (« Iron response element »). Il est constitué d'une tige-boucle située 40 nucléotides en aval de l'extrémité 5'UTR l'ARNm codant pour la ferritine. La liaison des IRP sur cet élément bloque le recrutement du complexe 43S, la coiffe étant déjà liée par le facteur eIF4F. Ce blocage a pour but l'arrêt de la synthèse de ferritine.

Lorsque qu'il est de nouveau nécessaire de stocker du fer, les protéines IRP1 et IRP2 vont être régulées ou dégradées pour permettre la synthèse de ferritine (Rouault, 2006).

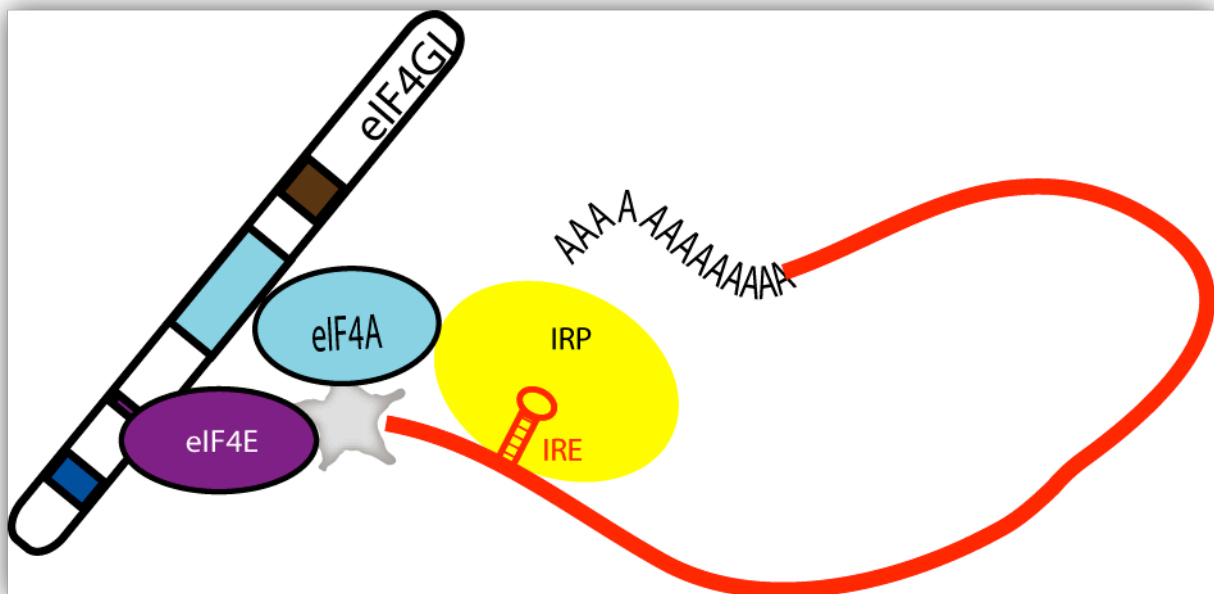


Figure 21 : Blocage stérique de l'initiation de la traduction par les protéines IRP.

Les protéines IRP reconnaissent l'élément *cis* IRE. Le recrutement de la sous-unité 43S est bloqué de façon stérique.

Exemple de contrôle dans la différenciation cellulaire : Maskin

Le facteur Maskin est impliqué dans le contrôle traductionnel au cours du développement de l'oocyte chez *Xenopus* (Haccard and Jessus, 2006). Il régule l'expression de l'ARNm codant pour la cycline B1 et pour c-Mos.

Pour cela, il interagit avec la protéine CPEB (« CPE (« cytoplasmic polyadenylation element »)-binding protein») et avec le facteur canonique eIF4E (Cao and Richter, 2002; Meijer et al., 2007).

L'activation de la traduction de ces ARNm est le résultat de la phosphorylation de la protéine CPEB qui conduit à la dissociation de la déadénylase PARN (« poly(A) ribonucléase ») ainsi qu'à la polyadénylation de l'ARNm par une poly(A) polymérase cytoplasmique Gld-2 (Kim and Richter, 2006) (Figure 22).

La phosphorylation de la protéine Maskin et la liaison de la protéine PABP à la queue poly(A) permettent aussi l'activation de la traduction (Barnard et al., 2005; Cao and Richter, 2002).

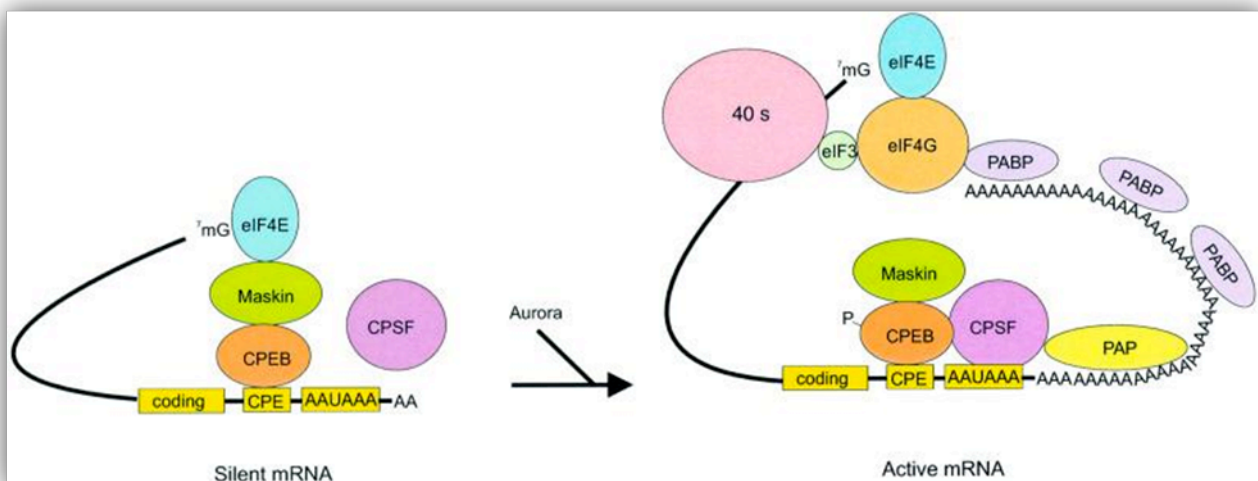


Figure 22 : Modèle d'induction de la traduction suite à la polyadénylation (Cao and Richter, 2002)

La traduction des ARNm comme ceux codant pour la cycline B1 ou pour c-Mos est inhibée dans les oocytes immatures. Cette répression est faite par l'intermédiaire du facteur CPEB qui reconnaît CPE un l'élément *cis* situé dans la partie 3'-UTR de son ARNm. La protéine CPEB est elle-même liée par le facteur Maskin qui interagit avec le facteur eIF4E au niveau de son site d'interaction avec eIF4G. Ceci empêche la formation du complexe eIF4F impliqué dans l'initiation de la traduction. Un autre élément *cis* de l'ARNm dont la séquence est AAUAAA est reconnu par le facteur CPSF (« cleavage and polyadenylation specificity factor ») de façon plus ou moins forte.

La stimulation par des progestérones active la kinase Aurora qui phosphoryle CPEB capable de recruter CPSF qui recrute PAP (« poly(A)-polymérase ») qui catalyse la synthèse de la queue poly(A).

PABP peut ainsi lier la queue poly(A) puis le facteur eIF4G qui déplace Maskin pour lier eIF4E. Le facteur eIF4G par son interaction avec eIF3 permet le recrutement de la sous-unité 40S.

De la même façon que Maskin, la protéine Ngd (Neuroguidin) participe à la régulation traductionnelle grâce à son interaction avec eIF4E et CPEB. Cette protéine est détectée dans les cônes de croissance des filopodes au cours du développement des synapses chez la drosophile (Jung et al., 2006).

L'expression de l'ARNm de Maskin est elle aussi régulée pendant les premiers stades du développement. Elle est réprimée au stade 4 oocytes et non au stade 6 oocytes. Son activation correspond aussi à l'élongation de sa queue poly(A). Trois éléments *cis* sont situés au niveau de son 3'UTR (Meijer et al., 2007). Un des facteurs capables de lier l'ARNm de Maskin a été identifié : EDEN-BP (« embryonic deadenylation element binding protein ») l'homologue de CUG-BP1 impliquée dans l'épissage lorsqu'elle est dans le noyau, dans l'activation de la traduction de certains ARNm comme par exemple celui codant pour p21 ou dans le contrôle du choix du codon d'initiation (Marquis et al., 2006). Son homologue EDEN-BP est responsable de la déadnylation rapide de certains ARNm maternels afin de réprimer leur traduction (Paillard et al., 1998).

La traduction de l'ARNm de la 15-lipoxygénase exprimée au cours de la différenciation des réticulocytes est régulée par les protéines hnRNP K et hnRNP E1/E2

Dans la moelle osseuse rouge, se déroule la synthèse des érythrocytes (Hématies ou Globules rouges) impliqués dans le transport de l'oxygène dans le sang. Ils sont dépourvus d'organite et de noyau. Les érythrocytes sont issus de la différenciation des réticulocytes qui a lieu à la périphérie de la moelle rouge au cours de l'érythropoïèse.

La 15-lipoxygénase (LOX) est une enzyme qui dégrade des phospholipides qui constituent la mitochondrie. L'ARN codant pour cette enzyme est présent dès les premiers stades de l'érythropoïèse, mais sa traduction est réprimée jusqu'à la différenciation des réticulocytes en érythrocytes (Ostareck-Lederer et al., 1994).

Les protéines hnRNP K et hnRNP E1/E2 qui jouent un rôle important dans la régulation de la traduction d'ARNm cellulaires et viraux sont impliquées dans la régulation de la traduction de l'ARNm LOX. Ces protéines interagissent avec un élément *cis* situé dans la région 3'UTR du messager de certaines enzymes impliquées dans la différenciation. Parmi celles-ci, l'ARNm codant pour l'enzyme LOX contient un élément *cis* situé dans sa partie 3'UTR, l'élément DICE (« Differentiation control element »). Il est reconnu par des domaines KH des protéines hnRNP K et hnRNP E1 (Ostareck-Lederer et al., 1994).

Ils forment des complexes ribonucléoprotéiques qui empêchent la traduction de l'ARNm codant pour cette enzyme durant la période où l'érythrocyte est immature. Le complexe hnRNP K•DICE•hnRNP E1 bloque l'assemblage du ribosome en empêchant l'accès de la sous-unité 60S à la petite sous-unité ribosomique (Ostareck et al., 2001) (Figure 23).

En C-terminal, la protéine hnRNP K contient un domaine riche en proline qui lui permet d'interagir avec le domaine SH3 des kinases de la famille Src, notamment avec la protéine c-Src qui phosphoryle la protéine hnRNP K sur un résidu tyrosine, ce qui entraîne l'inhibition de son interaction avec le domaine DICE et conduit à la reprise de la traduction (Ostareck-Lederer et al., 2002).

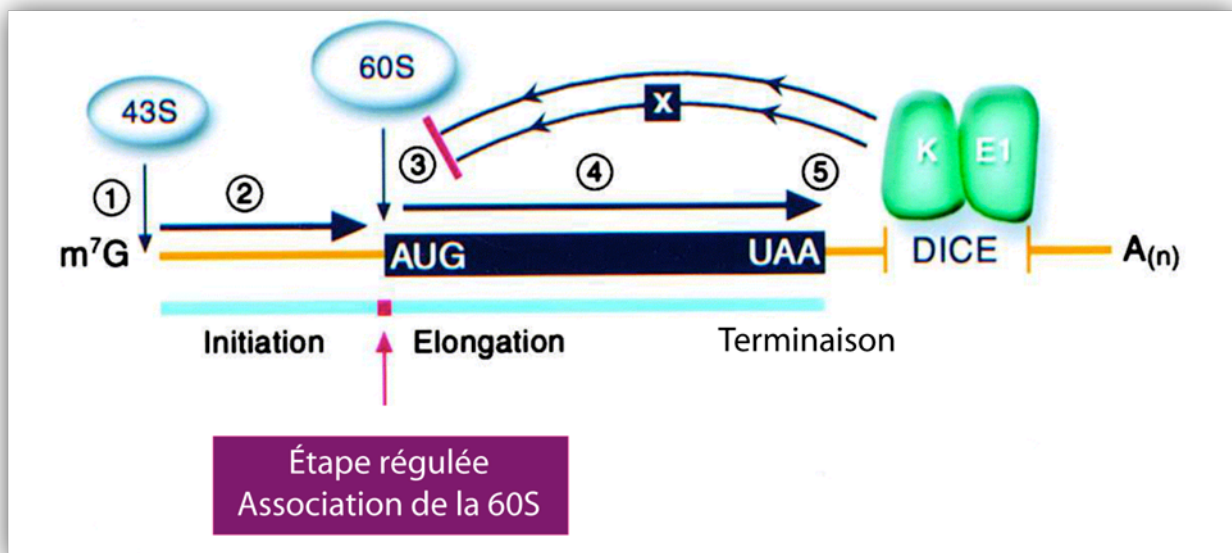


Figure 23 : Mécanisme de régulation de l'initiation de la traduction de l'ARNm de la 15-lipoxygénase

L'ARNm LOX est exprimé au cours de la différenciation du réticulocyte en érythrocyte. Avant cette étape, la traduction de cet ARNm est réprimée par les protéines hnRNP K et hnRNP E1 (en vert). Elles reconnaissent la séquence située en 3'-UTR de l'ARNm DICE (« Differentiation control element ») et empêchent l'assemblage de la sous-unité 60S du ribosome.

La traduction de l'ARNm localisé de β -actine est régulée par la protéine ZBP1

La localisation de l'ARNm de β -actine au niveau des sites actifs de polymérisation de l'actine module la migration cellulaire pendant l'embryogenèse, la différenciation cellulaire et possiblement certains cancers (Shestakova et al., 2001; Shestakova et al., 1999). Dans les neurones primaires, la protéine ZBP1 (« Zipcode-binding protein 1 ») régule la traduction de

l'ARNm localisé de β -actine (Huttelmaier et al., 2005). Cette protéine est aussi présente dans les granules de stress et module l'expression d'ARNm ciblés lors de la réponse à certains stress (Farina et al., 2003).

La protéine ZBP1 s'associe avec l'ARNm de β -actine au noyau afin d'empêcher sa traduction de façon prématurée en bloquant l'étape d'initiation (Huttelmaier et al., 2005) (Figure 24).

Dans ce mécanisme de répression l'initiation de la traduction de l'ARNm de la β -actine, la protéine ZBP1 se lie à de l'ARNm (Ross et al., 1997) depuis le noyau jusqu'au point de la cellule où il doit être traduit. La séquence reconnue par ZBP1 située à l'extrémité 3'UTR de l'ARNm est une séquence « zipcode » de 54 nucléotides (Huttelmaier et al., 2005).

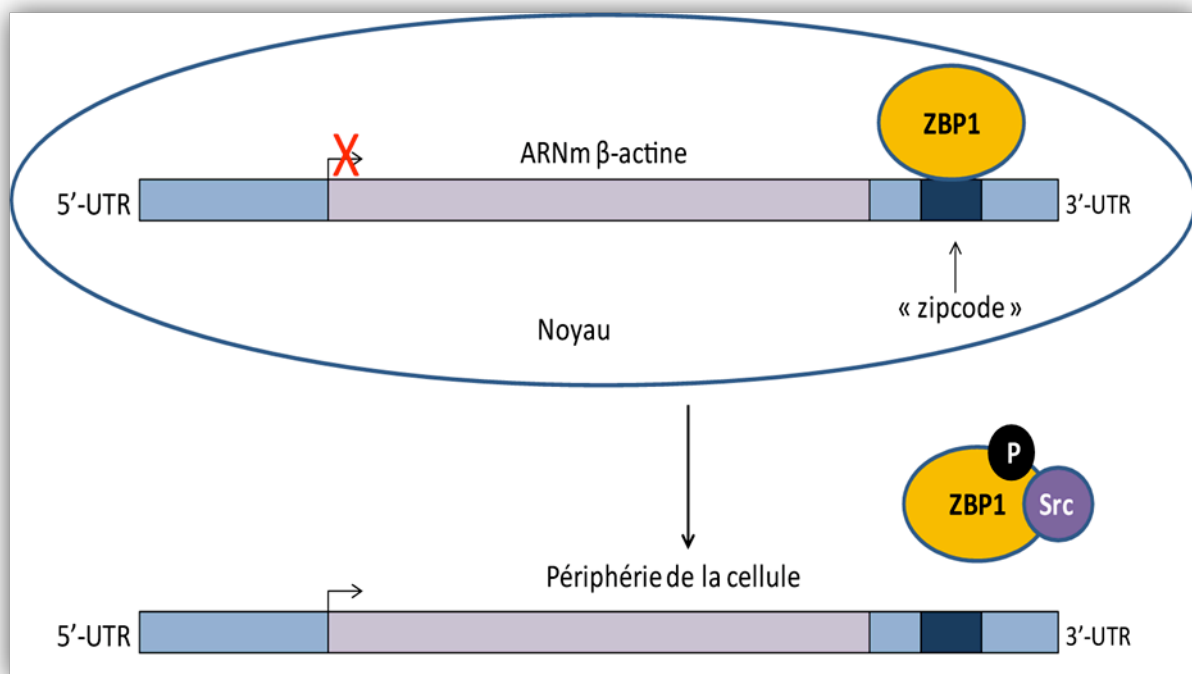


Figure 24 : Régulation de l'expression de la β -actine par le facteur trans ZBP1

La traduction de l'ARNm de β -actine est réprimée au niveau de l'initiation par la protéine ZBP1. Elle reconnaît un élément *cis* de la partie 3'-UTR de l'ARNm appelée « zipcode ». La répression a lieu lorsque l'ARNm est dans le noyau ainsi que pendant son transport dans le cytoplasme et ce jusqu'à la périphérie de la cellule. Lors de son arrivée aux points de polymérisation de l'actine, situés à la périphérie de la cellule, la protéine ZBP1 est phosphorylée sur tyrosine par la kinase Src. Elle perd ses capacités de lier la séquence « zipcode », la traduction est activée.

Le domaine KH impliqué dans la liaison de la protéine ZBP1 au « zipcode » est situé proche d'un domaine fonctionnel de liaison protéine-protéine SH3 site de liaison pour la

kinase Src identifié auparavant chez la protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire paxilline (Farina et al., 2003; Schaller, 2001). Lors de son arrivée à destination, c'est-à-dire au point de polymérisation de l'actine, la protéine ZBP1 est phosphorylée sur une tyrosine particulière par la protéine kinase Src (Huttelmaier et al., 2005). De cette façon, ZBP1 perd ses capacités d'interaction avec l'ARNm et la traduction peut démarrer. L'étape de l'initiation qui est impliquée dans cette régulation est l'association de la sous-unité 60S pour former un ribosome fonctionnel (Huttelmaier et al., 2005).

III. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR LOCALISATION DE LEURS ARNm

La répartition asymétrique des protéines dans la cellule est indispensable pour sa survie. Elle permet d'une part de polariser la cellule, mais aussi de déterminer son devenir grâce à la différenciation. Pendant le développement embryonnaire, ce mécanisme participe au développement des différents tissus embryonnaires et à la polarisation des embryons. Un des mécanismes utilisés pour cette expression asymétrique est la localisation de certains ARNm.

Ce processus de régulation est retrouvé chez différents organismes. Les ARNm sont localisés pour permettre l'expression d'une protéine uniquement dans une région précise de la cellule. La traduction des ARNm est habituellement réprimée pendant leur trajet jusqu'à ce qu'ils atteignent leur destination (Gray and Wickens, 1998). Cette localisation permet de déléguer le contrôle de la traduction de l'ARNm localisé à des régions particulières du cytoplasme (St Johnston, 2005).

Le plus souvent, les ARNm localisés font partie intégrante de complexes composés de facteurs protéiques. Généralement, les ARNm qui viennent d'être transcrits sont liés par des protéines capables de reconnaître des éléments de localisation contenus dans la partie 3'UTR de ces messagers. Des complexes protéiques moteurs transportent alors ces ARN jusqu'au lieu cellulaire où ils doivent être traduits. Ces facteurs vont aussi contrôler la traduction de ces ARN pendant leur transport pour qu'ils soient exprimés uniquement au moment opportun (Shav-Tal and Singer, 2005). Tous ces mécanismes impliquent de nombreux complexes ribonucléoprotéiques.

1. Localisation des ARN messagers *nanos*, *oskar*, *bicoid* et *gurken* chez *Drosophila melanogaster*

Chez la drosophile, les axes de l'embryon sont définis par la localisation et la restriction de certains éléments. Parmi ceux-ci, les ARNm *nanos*, *oskar*, *bicoid* et *gurken* sont localisés à différents pôles de l'œuf durant le développement embryonnaire (Macdonald and Smibert, 1996; Riechmann and Ephrussi, 2001; St Johnston, 1995).

Un des premier ARNm transcrits est l'ARNm *nanos*, il est localisé de façon transitoire au pôle antérieur de l'œuf au stade 8 cellules puis commence sa localisation postérieure au stade 9 cellules et enfin sa traduction (Figure 25) (Ephrussi et al., 1991; Gavis and Lehmann, 1994;

Kim-Ha et al., 1995; Markussen et al., 1995; Rongo et al., 1995). Il code pour la protéine Nanos impliquée dans la formation de l'axe antéro-postérieur du corps de la drosophile (Tautz, 1988). Les ARNm *nanos* qui ne sont pas localisés au pôle postérieur voient leur traduction réprimée (Bergsten and Gavis, 1999). Dans certains cas ces ARN sont dégradés (Bashirullah et al., 1999). En revanche, l'ARNm localisé au pôle postérieur est stable et traduit. Contrairement à certains ARNm activement transportés, *nanos* semble diffuser dans l'œuf. Il est aidé par les microtubules jusqu'à ce qu'il atteigne la région postérieure et qu'il s'ancre sur le cytosquelette d'actine (Forrest and Gavis, 2003). Certaines régions situées dans la partie 3'UTR de l'ARNm *nanos* sont nécessaires pour sa localisation (Dahanukar and Wharton, 1996; Gavis et al., 1996). Un élément structural de l'ARNm, une tige boucle, est un site de liaison de la protéine Smaug (*smg*) qui réprime la traduction de *nanos* (Crucis et al., 2000).



Figure 25 : L'ARNm *nanos* est localisé au pôle postérieur de l'embryon.

Le facteur protéique Oskar est impliqué dans la localisation de l'ARNm *nanos* (Ephrussi et al., 1991). L'ARNm codant pour cette protéine est aussi localisé au pôle postérieur de l'embryon, où il est transporté par une kinésine de type I (Brendza et al., 2000). Sa région 3'UTR joue aussi un rôle pour sa localisation (Kim-Ha et al., 1993). Avant que l'ARNm *oskar* n'arrive à sa destination, le pôle postérieur de l'embryon, sa traduction est réprimée par la protéine Bruno, liée sur une séquence BRE (« Bruno response element ») de sa partie 3'UTR (Kim-Ha et al., 1995; Webster et al., 1997). La protéine Cup qui interagit avec Bruno est aussi capable de lier le facteur eIF4E ce qui prévient son interaction avec le facteur eIF4G essentiel pour l'initiation dépendante de la coiffe (Nakamura et al., 2004; Nelson et al., 2004). Le mécanisme de répression se produit très certainement à l'étape de l'initiation de la traduction (Nakamura et al., 2004). La protéine Bruno semble aussi réprimer l'expression de la protéine Oskar en permettant la formation de particules d'accumulation d'ARNm *oskar* (Chekulaeva et al., 2006), ce qui est en accord avec de précédentes évidences que la répression de la traduction pouvait être indépendante de la coiffe de l'ARNm (Lie and Macdonald, 1999). Après sa localisation au pôle postérieur, la traduction de l'ARNm *oskar* est déréprimée (Gunkel et al., 1998).

Contrairement aux ARNm *nanos* et *oskar*, l'ARNm *bicoid* est localisé au pôle antérieur de l'embryon pendant la phase tardive de la genèse de l'œuf (Figure 26). La protéine Bicoid est un facteur de transcription réparti en gradient le long de l'embryon du pôle antérieur au pôle postérieur. Sa régulation est due en partie à la protéine Staufén qui interagit avec un élément structural de sa partie 3'UTR (Ferrandon et al., 1994; St Johnston et al., 1991).

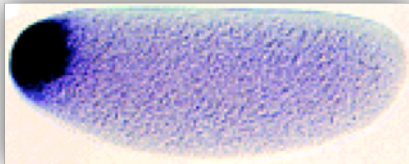


Figure 26 : L'ARNm *bicoid* est localisé au pôle antérieur de l'embryon de drosophile. http://www.library.csi.cuny.edu/~davis/Bio_327/lectures/Post_Tx_Processes/RNA_localization.html

L'ARNm *gurken* est transporté par une dynéine le long des microtubules jusqu'au pôle antérieur, puis se rend jusqu'au noyau de l'œuf (MacDougall et al., 2003). La protéine Gurken est impliquée dans l'établissement des deux polarisations : antéropostérieure ainsi que dorso-ventrale.

2. Localisation de l'ARN messager Vg1 chez *Xenopus*

Chez la grenouille *Xenopus*, plusieurs ARNm impliqués dans l'établissement des axes sont localisés aux pôles des œufs (Kloc and Etkin, 2005). L'asymétrie de distribution de ces ARNm permet le développement de cellules filles uniques avec un premier axe. La protéine Vg1 est impliquée dans la différenciation tissulaire embryonnaire. L'ARNm *Vg1* est localisé dans le cortex végétal des œufs de grenouille pendant le développement de l'œuf (Figure 27) (Melton, 1987). Il contient une séquence *cis* de 366nt Vg1LE (« Vg1 localization element ») située en 3'UTR de l'ARNm suffisante pour localiser un ARNm non localisé (Mowry and Melton, 1992). En amont de cette séquence, un élément de 250nt TCE (« translational control element ») est impliqué dans la régulation de la traduction (Otero et al., 2001; Wilhelm et al., 2000). La séquence Vg1LE contient deux motifs VM1 et E2 répétés à plusieurs reprises dans la séquence et leur mutation abolit les propriétés de localisation de cet élément (Deshler et al., 1997; Gautreau et al., 1997; Kwon et al., 2002). Des facteurs *trans* identifiés interagissent avec Vg1LE. Parmi eux, trois lient les motifs VM1 et E2. Les protéines *Xenopus* hnRNP I (VgRBP60) et Vg1RBP/Vera ont été identifiées et elles lient directement VM1 et E2 (Cote et al., 1999; Deshler et al., 1998; Havin et al., 1998; Kress et al., 2004; Kwon et al., 2002; Lewis et al., 2004). Une troisième protéine, 40LoVe de la famille des hnRNP-D, a les capacités de

liaison à VgLE qui passent par les éléments VM1 et E2 mais aucune interaction n'a été démontrée, elle pourrait passer par des interactions avec les protéines VgRBP60 et Vg1RBP/Vera (Czaplinski et al., 2005; Czaplinski and Mattaj, 2006).

La protéine Vg1-RBP/Vera interagit grâce à ses domaines KH de liaison de l'ARN (Git and Standart, 2002). Elle fait partie d'une famille proche de celle de ZBP1 de mammifère.

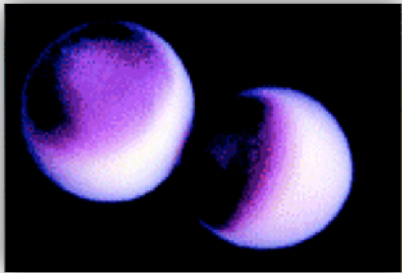


Figure 27 : L'ARNm Vg1 est localisé au pôle végétatif de l'oocyte (Stade 6 de division)
http://www.library.csi.cuny.edu/~davis/Bio_327/lectures/Post_Tx_Processes/RNA_localization.html

La protéine Vg1-RBP interagit avec l'ARNm d'actine. La protéine Netrin-1 régule la localisation de l'ARNm ce qui résulte en une localisation asymétrique. Elle active aussi la protéine 4EBP-1 qui réprime l'initiation de la traduction. De la même façon que pour ZBP1, Vg1-RBP est phosphorylée lorsqu'elle au point de polymérisation et les ARNm sont traduits (Leung et al., 2006).

3. Localisation de l'ARN messager de β -actine dans le fibroblaste

Chez les mammifères, l'ARNm de β -actine est localisé dans le pôle de croissance du fibroblaste (Figure 28) (Lawrence and Singer, 1986). Cette localisation a lieu grâce aux séquences « zipcode » situées au niveau de la partie 3'UTR de l'ARNm de β -actine, juste en aval du codon STOP (Kislauskis et al., 1993; Kislauskis and Singer, 1992). Ces séquences sont reconnues par une protéine du groupe VICKZ (Vg1-RBP/Vera ; IMP-1,2,3 ; CRD-BP, KOC, ZBP-1) (Yisraeli, 2005) : ZBP-1 (Zipcode binding protein 1) par l'intermédiaire de ses domaines fonctionnels KH (Farina et al., 2003; Ross et al., 1997). Les protéines VICKZ sont impliquées dans des processus très différents, mais toutes possèdent des domaines de liaison à l'ARN très conservés comme les domaines RRM et KH.

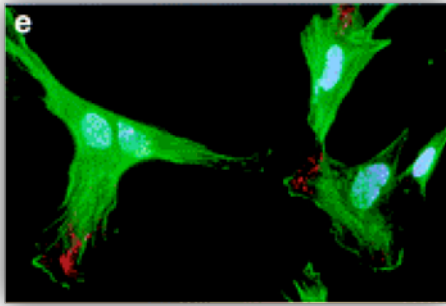


Figure 28 : L'ARNm de β -actine (Rouge) est localisé au niveau du cône de croissance des fibroblastes d'embryons de poulet.

Les noyaux sont colorés en bleu et l'actine est en vert.

http://www.library.csi.cuny.edu/~davis/Bio_327/lectures/Post_Tx_Processes/RNA_localization.html

La protéine ZBP-1 recrute l'ARNm de β -actine au niveau du noyau en liant sa séquence 3'UTR et empêche que l'expression de la protéine ait lieu de façon prématurée et pendant son transport jusqu'aux pôles de croissance dans les fibroblastes et les neurones primaires (Huttelmaier et al., 2005). La traduction se produit lorsque le complexe atteint la périphérie de la cellule.

Les ARNm sont transportés dans des granules de stress qui les protègent des dégradations (Stohr et al., 2006). Ce phénomène correspond à un besoin de la cellule qui doit rapidement croître et se déplacer. Les ARNm stockés dans les granules sont prêts à être traduits lorsqu'ils rejoignent les points de croissance.

4. Localisation de l'ARN messenger *ASH1* chez *S. cerevisiae*

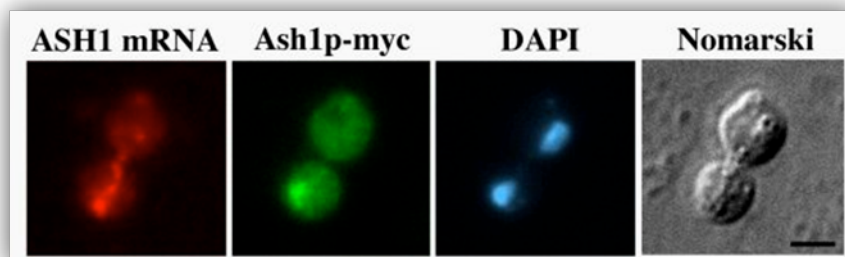


Figure 29 : Localisation de la protéine Ash1 et de son ARNm

<http://www.mcw.edu/display/router.asp?docid=7837>

L'ARNm ASH1 (Rouge), la protéine Ash1-myc (Vert), le noyau (bleu) et Nomarski permet de visualiser les contours de la cellule.

Chez la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, des ARNm localisés au bourgeon (Figure 29) sont transportés activement *via* le cytosquelette d'actine (Darzacq et al., 2003; Gonsalvez et al., 2005). Un des plus étudiés, l'ARNm *ASH1* est localisé au bourgeon en fin d'anaphase (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997). Il est considéré comme système modèle pour comprendre les mécanismes impliqués dans le transport et la localisation d'ARNm cytoplasmiques (Chartrand et al., 2001). Ce modèle est développé dans le paragraphe suivant.

IV. ASH1 : MODÈLE D'ÉTUDE DE RÉGULATION D'UN ARN MESSAGER LOCALISÉ

Dans les levures de type bourgeonnant comme chez *Saccharomyces cerevisiae*, de nombreux ARNm sont localisés et s'accumulent au niveau du bourgeon de la cellule fille (Shepard et al., 2003). En particulier, l'ARNm *ASH1* est localisé au bourgeon de la cellule fille en fin d'anaphase (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997). Ceci conduit à l'expression de la protéine Ash1 seulement au noyau de la cellule fille. La protéine Ash1 est un répresseur transcriptionnel du gène codant pour la protéine HO impliquée dans le mécanisme de changement de type sexuel de la levure (Bobola et al., 1996; Sil, 1996).

1. Ash1p répresseur transcriptionnel de l'endonucléase HO

Durant son cycle de réplication, la levure *S. cerevisiae* passe par plusieurs ploïdies. Elle est parfois haploïde **a**, haploïde **α** ou bien diploïde **a/α** en fonction du moment du cycle de réplication. Durant la partie du cycle végétatif, la levure diploïde **a/α** subit une méiose puis une sporulation pour arriver à l'état d'asque contenant quatre spores haploïdes (Figure 30).

Les spores subissent une germination qui donne quatre levures, dont deux sont haploïdes **a** et deux sont haploïdes **α**. Chacune d'entre elles se divise pour donner une cellule mère de grosse taille et une cellule fille de plus petite taille du même type sexuel que la levure mère (Cosma, 2004). La cellule mère (levure de grosse taille) subit une recombinaison qui entraîne son changement de type sexuel alors que celui de la cellule fille est inhibé (Figure 30).

Le type de cellule est déterminé par le locus MAT. Le changement entre MAT_a et MAT_α est provoqué par l'expression dans le noyau de l'endonucléase HO (Herskowitz, 1988; Nasmyth, 1982). Le changement de type MAT se produit seulement dans la cellule mère car la protéine HO est exclusivement exprimée chez les levures issues de la cellule mère en fin de phase G1 du cycle cellulaire. L'expression asymétrique de la protéine HO entre les cellules fille et mère est la conséquence directe de l'expression du gène « *HO*-specific repressor ». Le produit de l'expression de ce gène est la protéine Ash1 (« *asymmetric synthesis of HO* ») (Cosma, 2004).

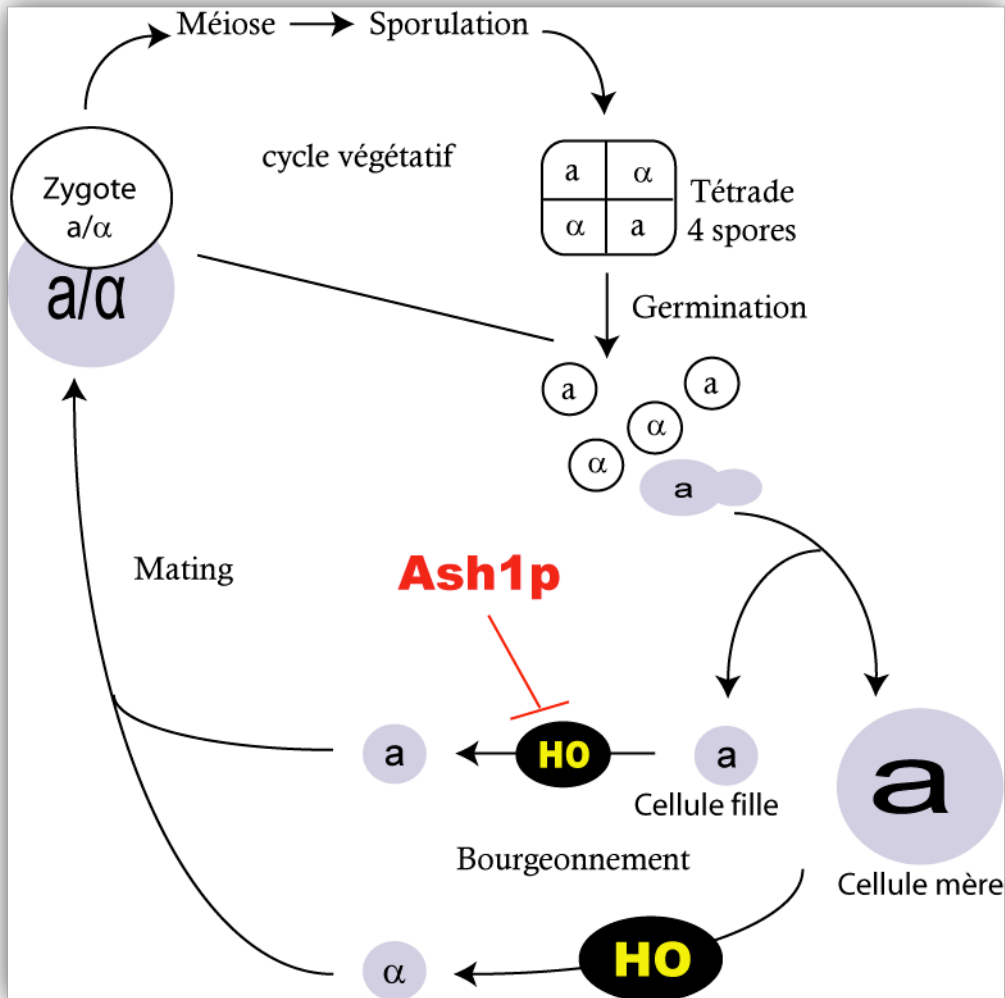


Figure 30 : Rôle du répresseur transcriptionnel Ash1 sur le changement de type sexuel au cours du cycle de répllication de la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*.

La protéine Ash1 réprime la transcription de la protéine HO chez les levures filles. Ainsi, la cellule mère sera la seule à pouvoir changer de type sexuel.

2. Transport et localisation de l'ARNm *ASH1*

L'ARNm *ASH1* est localisé au bourgeon de la cellule fille. Le transport des ARN messagers dans le cytoplasme est réalisé grâce à trois classes de molécules : les dynéines et les kinésines qui se déplacent le long des microtubules, et les myosines moteurs qui transitent le long des filaments d'actine (Muller et al., 2007). Chez la levure *S. cerevisiae*, tous les ARNm localisés au bourgeon sont transportés activement *via* le squelette d'actine (Darzacq et al., 2003; Gonsalvez et al., 2005).

L'implication de la protéine She2 dans le transport de l'ARNm codant pour le répresseur transcriptionnel Ash1 a été identifiée grâce à des mutants du gène SHE2 présents lors d'un

criblage de gènes affectant l'expression de la protéine HO. D'autres protéines identifiées lors de ce criblage sont aussi impliquées dans la localisation de l'ARNm *ASH1* : She1, She3, She4 et She5 (Jansen et al., 1996).

La protéine She1, aussi appelée Myo4p, est une myosine de type V qui possède une activité moteur pour le transport de l'ARNm *ASH1* (Munchow et al., 1999). La protéine She3 fait le lien entre She2p, qui lie l'ARNm *ASH1*, et Myo4p qui s'accroche au cytosquelette d'actine (Long et al., 2000; Takizawa and Vale, 2000). Le complexe formé par l'ARNm *ASH1*, la protéine Myo4, les protéines She2 et She3 constituent le locasome (Figure 31) (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000; Takizawa and Vale, 2000). Il est transporté le long du cytosquelette d'actine jusqu'au bourgeon de la levure où l'ARNm *ASH1* est traduit. Les protéines She4 et She5 sont quant à elles impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine (Jansen et al., 1996).

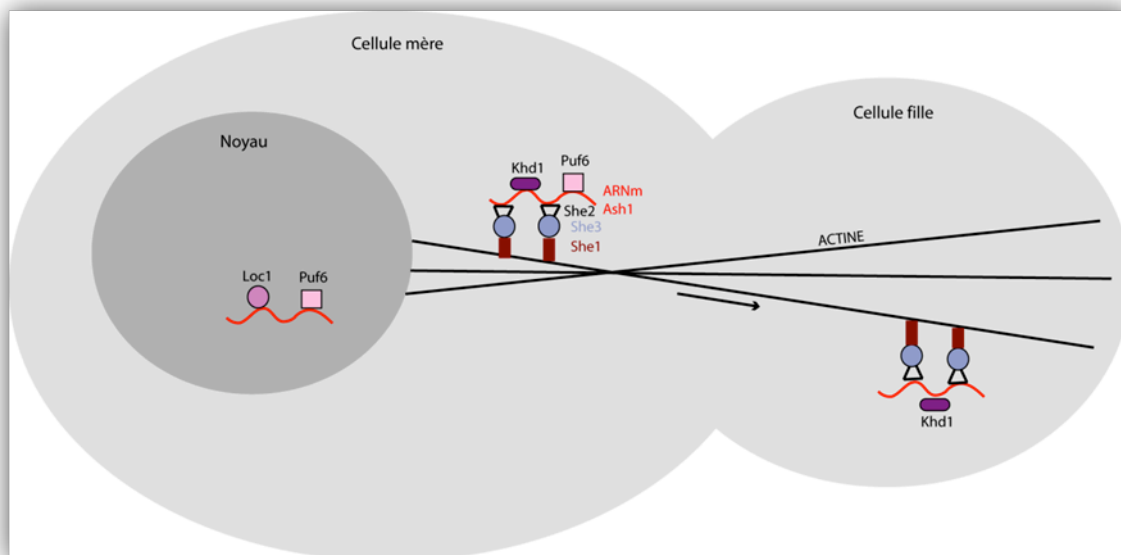


Figure 31 : Le locasome et son transport

Le locasome est composé de trois protéines. La protéine She1 ou Myo4p sert de moteur le long des filaments d'actine. La protéine She3 interagit de façon directe avec She1p et avec la protéine She2 qui lie l'ARNm *ASH1* au niveau des ses éléments de localisation. Pendant le transport, des facteurs *trans* Loc1, Puf6 et Khd1p régulent l'expression de l'ARNm.

La localisation de l'ARNm *ASH1* au cours de l'anaphase résulte en une distribution asymétrique de la protéine Ash1, qui s'accumule uniquement dans le noyau de la cellule fille (Chartrand, 2002; Long et al., 1997) où elle empêche le changement de type sexuel (Sil, 1996).

a. Éléments *cis* : les éléments de localisation de l'ARN messenger *ASH1*

Cette localisation est régulée grâce à des éléments structuraux de sa séquence : les éléments *cis*. Ce sont des séquences reconnues par des protéines impliquées dans la régulation de l'expression durant le transport : les facteurs *trans*.

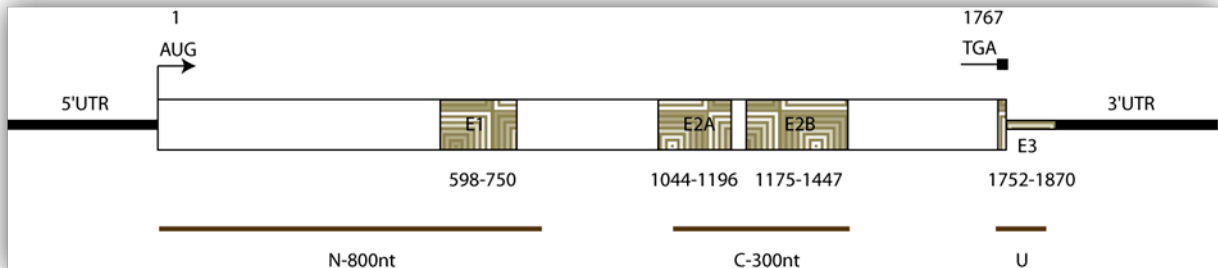


Figure 32 : L'ARN messenger *ASH1* et ses éléments de localisation.

L'ARNm *ASH1* localisé chez *S. cerevisiae* comporte quatre éléments de localisation. Les éléments E1, E2A, E2B sont situés dans la séquence codante et E3 inclut le codon stop.

Dans la séquence de l'ARNm *ASH1*, quatre éléments de localisation ont été identifiés. Ces éléments induisent de façon indépendante le transport et la localisation d'un ARNm au bourgeon ; ils sont indispensables pour la bonne localisation de l'ARNm *ASH1* (Chartrand, 2002).

Trois de ces éléments sont situés dans la séquence codante : l'élément **E1** (nucléotides 598 à 750), l'élément **E2A** (nucléotides 1044 à 1196) et l'élément **E2B** (nucléotides 1175 à 1447) (Figure 32) (Chartrand et al., 1999; Gonzalez et al., 1999). Un quatrième élément **E3** (nucléotides 1752 à 1870) est en partie situé dans la partie 3'UTR et contient le codon STOP (Figure 32) (Long et al., 1997). Chacun des quatre éléments de localisation est reconnu par la protéine She2 (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000). La structure secondaire en tige-boucle de ces éléments est indispensable pour une bonne localisation de l'ARNm *ASH1* (Chartrand, 2002; Gonzalez et al., 1999). Un motif composé d'une cytosine conservée dans une des boucles et un triplet CGA dans l'autre boucle est retrouvé dans chacun des éléments de localisation E1, E2A et E2B (Figure 33) (Olivier et al., 2005).

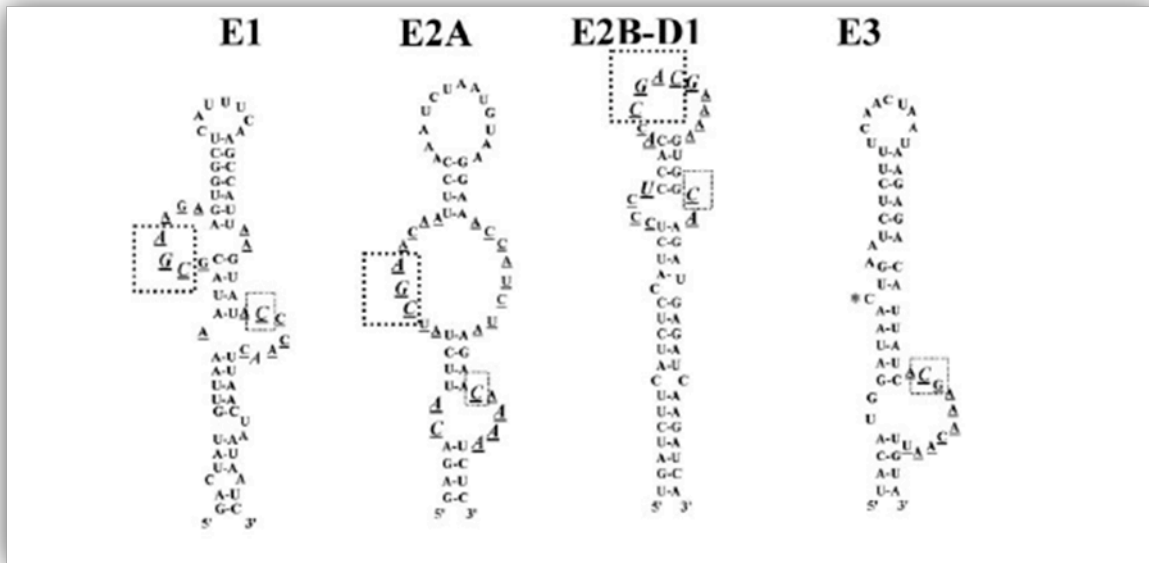


Figure 33 : Structure secondaire des éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* (Olivier et al., 2005)

Les structures secondaires des quatre éléments de localisation ont les éléments structuraux reconnus par la protéine She2 encadrés de pointillés.

b. Les facteurs *trans* impliqués dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*

Parmi les facteurs déjà identifiés, trois facteurs *trans* sont particulièrement intéressants : les protéines Loc1, Puf6 et Khd1.

◆ La protéine Loc1

La protéine Loc1 (**l**ocalisation de l'ARNm) se lie directement à l'ARNm *ASH1* au niveau de sa partie 3'UTR avec l'élément E3 (Figure 32 ; Figure 33). C'est une protéine capable de lier les ARN double-brins. Dans des levures *loc1* la protéine Ash1 n'est presque plus répartie de façon asymétrique (Long et al., 2001). Cette protéine joue donc un rôle dans la localisation asymétrique de l'ARNm *ASH1*. La protéine Loc1, nucléaire, reconnaît l'ARNm *ASH1* qui est ensuite pris en charge par la protéine She2 pour être transporté par les pores nucléaires jusqu'au cytoplasme.

◆ La protéine Puf6

La protéine Puf6 est un membre de la famille des protéines PUF (homologue de Pumilio chez la drosophile), impliquées dans la régulation de la traduction. Lors de l'inactivation du gène codant pour la protéine Puf6, les localisations asymétriques de l'ARNm *ASH1* et de la

protéine Ash1 sont très diminuées. La protéine Puf6 réprime la traduction de l'ARNm *ASH1* en liant une séquence située dans la partie 3'UTR de cet ARNm (Gu et al., 2004).

◆ **La protéine Khd1**

La protéine Khd1 (KH-domain protein 1) est un facteur protéique de liaison à l'ARN de la famille des protéines à domaines KH. Il est requis pour la localisation de l'ARNm *ASH1* au bourgeon de la cellule fille, une souche inactivée pour Khd1p entraînant la délocalisation de cet ARNm (Irie et al., 2002). De plus, la surexpression de Khd1p dans la levure entraîne une baisse de l'expression de la protéine Ash1. Le contrôle produit par la protéine Khd1 se situe au niveau traductionnel car le niveau d'ARNm *ASH1* reste inchangé. La régulation se produit grâce à une interaction directe entre la protéine Khd1 et l'ARNm *ASH1* au niveau des 800 premiers nucléotides de la séquence codante de cet ARNm.

V. LES DOMAINES FONCTIONNELS DE LIAISON À L'ARN

Les motifs de liaison à l'ARN sont parmi les domaines fonctionnels protéiques les plus répandus. Dans leurs séquences, quelques acides aminés sont basiques. Ils interagissent avec les charges négatives des groupements phosphates des ARN. Mais ils contiennent généralement des acides aminés de type aromatique qui s'intercalent entre les bases des acides nucléiques par des interactions de Van der Waals. Elles représentent plus de 92% des interactions observées au sein d'un complexe ARN-protéine (Jones et al., 2001).

Il existe plusieurs familles de protéines qui possèdent des domaines capables de reconnaître et lier avec plus ou moins d'affinité les ARN (Tableau 3). En 1993, près d'une dizaine étaient recensées, chacune étant caractérisée par un même motif ou une séquence commune (Mattaj, 1993). Chaque famille peut contenir une ou plusieurs copies du motif. Parfois elles sont une combinaison de plusieurs motifs. Les domaines de liaison à l'ARN sont impliqués dans de nombreux processus biologiques.

1. Les domaines fonctionnels de liaison à l'ARN

Les protéines qui interagissent avec l'ARN sont constituées de différents domaines de liaison à l'ARN. Il existe une liste de domaines fonctionnels capables de se lier à l'ARN dans le cadre de différentes fonctions biologiques (Perez-Canadillas and Varani, 2001). Par exemple, le domaine RS (« serine/arginine-rich ») est une répétition de dipeptides arginine-sérine. Ils sont généralement trouvés dans les facteurs d'épissage. Le domaine RS, qui est basique, peut interagir soit avec une protéine soit avec un ARN (Fu, 1995). Les résidus d'Arginine contribuent fortement à l'interaction du domaine RS avec l'ARN car ils peuvent former un réseau de liaisons hydrogènes avec le squelette de sucre-phosphate et les bases de l'ARN (Burd and Dreyfuss, 1994). Ce domaine est différent du domaine RGG qui contient des dipeptides de Glycine avec les Arginines. On retrouve ce domaine dans les facteurs d'épissage, dans les protéines hnRNP ou encore dans des hélicases (Birney et al., 1993; Lukasiewicz et al., 2007). Parmi les domaines impliqués dans la formation de complexes avec l'ARN, les plus connus et les plus étudiés sont le motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) et le domaine « K-homology » (KH). Ces deux domaines sont développés dans les paragraphes suivants.

Tableau 3 : Familles de motifs protéiques capables de lier les acides nucléiques (Adapté de (Mattaj, 1993)).

Motif	Longueur en (acides aminés)	Exemples
RNP/RRM/RBD	80	PABP
RGG ("Arg-Gly-Gly" box)	20-300	hnRNP K
KH (hnRNP K homology")	~70	PCBP2
("Zinc finger") Cys-Cys-His-His	~23	TFIIIA
("Zinc knuckle") Cys-Cys-His-Cys	~14	
Cys-Cys-Cys-His	~17	ZF
Riche en arginine	~12-18	TAT
dsRBM ("Double-stranded RNA binding motif)	~65-68	DICER
Domaine "OB-fold"	70-150	Rho (<i>E. coli</i>)

2. Le motif de reconnaissance de l'ARN

Le motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) ou domaine ribonucléoprotéique (RNP) ou domaine de liaison à l'ARN (RBD) est de loin le mieux caractérisé des domaines qui lient l'ARN ainsi que le plus répandu. Il est impliqué dans un grand nombre de fonctions biologiques (Varani and Nagai, 1998). On le trouve notamment dans les facteurs canoniques de traduction, comme dans les facteurs eIF3, eIF4B ou encore la protéine PABP (Block et al., 1998b; Melo et al., 2003; Methot et al., 1994). C'est un motif fort probablement associé à des fonctions essentielles car il est très conservé.

Ce motif est retrouvé seul ou associé à d'autres RRM. Les cas étudiés jusqu'à présent peuvent contenir jusqu'à quatre unités de ces domaines fonctionnels. La caractérisation des protéines PABP et hnRNP C ont permis de délimiter le domaine RRM et d'estimer sa taille à 90 acides aminés.

a. Structure du motif de reconnaissance de l'ARN

Le RRM a une taille de 90 acides aminés organisés en structures secondaires de type feuillet β et hélice α . Quatre feuillets β sont disposés de façon antiparallèle dans l'ordre suivant : $\beta_4\beta_1\beta_3\beta_2$ et deux hélices α sont situées de part et d'autre des feuillets β (Figure 34). Les résidus les plus conservés sont situés dans la partie centrale hydrophobe du RRM (Nagai et al., 1990).

Le motif de reconnaissance de l'ARN possède deux signatures appelées RNP1 et RNP2. La séquence consensus RNP1 contient huit acides aminés (Figure 34): cette séquence est située proche de la partie C-terminale du domaine fonctionnel au sein du troisième feuillet β . Une seconde séquence consensus de six acides aminés qui semble moins conservée que la première fut identifiée, la signature RNP2 (Figure 34).

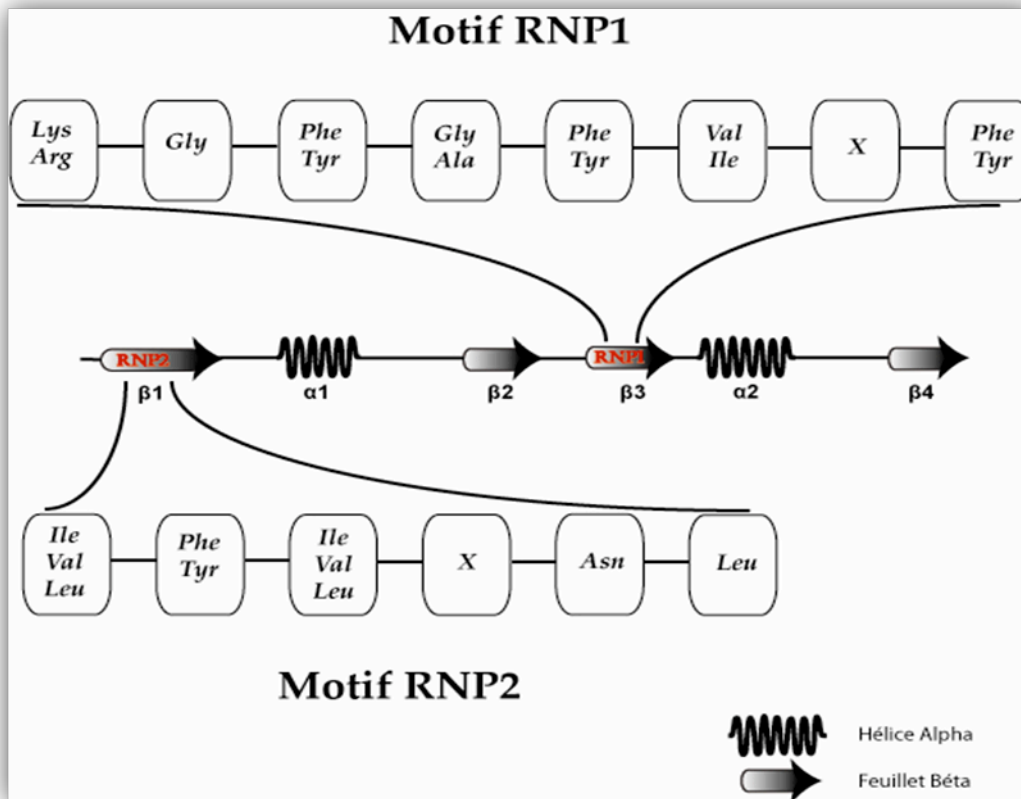


Figure 34 : Signatures RNP2 et RNP1 du motif de reconnaissance de l'ARN.

Le RRM est constitué de l'enchaînement des domaines structuraux organisés $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$. Les signatures RNP1 (8 résidus) et RNP2 (6 résidus) sont caractéristiques du domaine fonctionnel RRM. Elles se situent dans les feuillets β_1 (RNP2) et β_3 (RNP1) du RRM

La boucle située entre β_2 et β_3 présente une forte variabilité, elle est donc susceptible de conférer au motif une certaine spécificité. On peut classer les RRM en deux groupes : d'une part ceux qui fixent l'ARN de façon spécifique, comme les protéines U snRNP, et d'autre part ceux qui ont des séquences pour lesquelles ils présentent une certaine affinité mais dont l'interaction n'est pas spécifique, comme les hnRNP. Cette classification peut paraître arbitraire car elle ne prend pas en compte la capacité de ces motifs à reconnaître une structure secondaire de façon spécifique.

b. Exemple de la protéine U1A

La première structure en trois dimensions d'un domaine RRM a été déterminée par cristallographie du fragment N-terminal du RRM1 de la protéine U1A, facteur impliqué dans l'épissage alternatif (Oubridge et al., 1994). Tous les RRM décrits jusqu'à aujourd'hui montrent une topologie de structure identique (Figure 35). Les quatre feuillets β numérotés de 1 à 4 dans l'ordre $\beta_4\beta_1\beta_3\beta_2$ et les hélices α en violet qui sont appelées A et B représentent l'organisation en trois dimensions des RRM. Nous pouvons noter la présence d'une hélice α

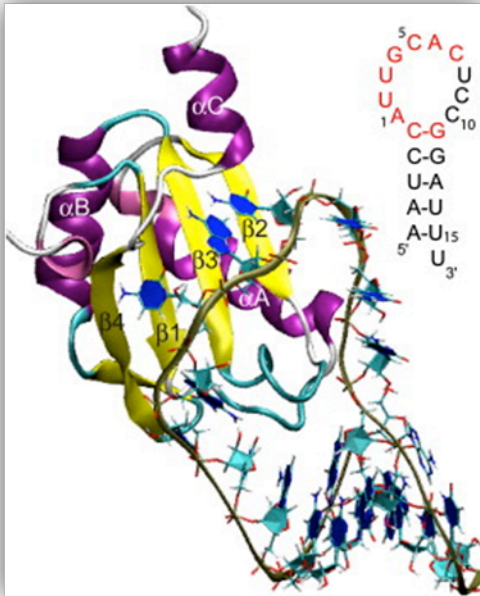


Figure 35 : Structure du RRM1 de la protéine U1A. Le RRM1 de la protéine U1A est complexé avec la boucle d'ARN présentée ci-dessus. Les hélices α sont clairement situées de part et d'autre des feuillets β organisés de façon anti-parallèle (Kormos et al., 2007; Spriggs et al., 2005).

supplémentaire qui n'appartient pas au domaine structural mais qui faisait partie du domaine étudié (Kormos et al., 2007). La structure de la protéine U1A a été caractérisée sous forme libre ainsi que complexée avec l'ARN. Sous forme libre, l'hélice α située en C-terminal est compactée contre le feuillet β au niveau duquel l'ARN est reconnu. Pour lier l'ARN, cette hélice α se déplace pour permettre l'accès au feuillet β et former le complexe.

c. Séquence et structure des ARN ciblés par les RRM

Les protéines de liaison de l'ARN reconnaissent à la fois la structure et la séquence de celui-ci afin d'interagir de façon spécifique avec leur ARN cible et pour parvenir à effectuer correctement leur fonction biologique (Maris et al., 2005). Des études de structure ont montré que de nombreuses protéines capables de lier l'ARN le font au travers d'une séquence ribonucléique simple brin proche d'une région contenant une hélice (Antson, 2000; Maris et al., 2005).

Les types de structures d'ARN sur lesquels se fixent les RRM sont très diverses. Les séquences de ces ARN varient de simples poly(A) ou poly(U), à de beaucoup plus complexes comme des tiges-boucles.

Une caractéristique qui renforce la diversité de cette famille est la capacité pour certains motifs RRM de reconnaître leur motif d'ARN indépendamment de son repliement; alors que d'autres ont besoin d'aide provenant soit d'un autre domaine de la protéine soit d'un autre partenaire protéique. On peut citer en exemple le cas de la protéine U2B qui est très spécifique mais seulement en présence de la protéine U2A avec laquelle il forme un hétérodimère en solution (Price et al., 1998).

Pour le RRM de la protéine U1A situé en N-terminal, sept nucléotides ont été identifiés dans cette interaction. Le K_D pour la structure tige-boucle est de 10^{-10} M alors que lorsque la séquence d'ARN lui est présentée sous forme linéaire, le K_D passe à 10^{-6} M (Hall, 1994).

3. Domaine “K Homology”

Le domaine KH (« hnRNP K homology ») est un domaine de reconnaissance de l'ARN très répandu. Il est retrouvé aussi bien chez les organismes eucaryotes que chez les eubactéries. Les domaines KH sont contenus dans des protéines impliquées dans la régulation de l'expression génique à plusieurs niveaux : transcriptionnel avec la protéine hnRNP K (Krecic and Swanson, 1999), traductionnel avec la protéine FMRP (« Fragil X mental retardation protein ») (Perrone-Bizzozero and Bolognani, 2002) ; les protéines qui contiennent ces domaines sont aussi impliquées dans l'épissage alternatif avec la protéine Nova-1 (Jensen et al., 2000a) ainsi que dans le transport et la stabilisation des ARNm (Perrone-Bizzozero and Bolognani, 2002). Les domaines KH sont présents dans de nombreuses protéines et en nombre variable. La protéine Vigilin contient quinze domaines KH (Musco et al., 1996) alors que la protéine Nova en contient trois (Buckanovich et al., 1993).

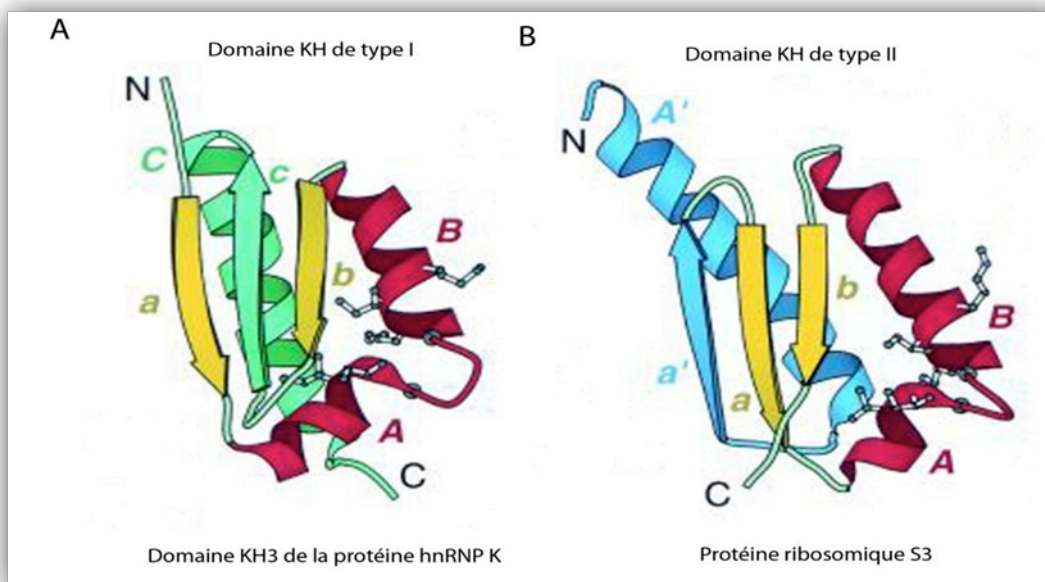


Figure 36 : Domaines KH de type I (maxi) et de type II (mini) réalisées avec Bobscrip (Esnouf, 1997)

(A) Domaine KH3 de la protéine hnRNP K avec l'organisation $\beta a A \alpha B \beta b \beta c \alpha C$. (B) Domaine N-terminal de la protéine ribosomique de la petite sous-unité S3 avec l'organisation $\alpha A \beta a \beta a \alpha A \alpha B \beta b$. Les feuillets β sont annotés en minuscule et les hélices α en majuscule. (Grishin, 2001)

Les domaines fonctionnels KH ont une taille d'environ 70 résidus. Ils contiennent trois feuillets β compactés sur trois hélices α . Ils peuvent être organisés de deux manières différentes : type I (ou maxi) et type II (ou mini), mais gardent leur core principal sous la forme $\beta a \alpha \beta$. Un exemple de type I est le domaine KH3 de la protéine hnRNP K (Figure 36A). Il est organisé sous la forme $\beta a \alpha \beta \beta a$. Le type II est représenté dans la partie N-terminale de la

protéine ribosomique de la petite sous-unité S3 (Figure 36B) et voit ses domaines structuraux organisés sous la forme : $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$. Le domaine KH contient au milieu du domaine une séquence consensus :

¹Ile•Leu•Val²Ile³Gly⁴X⁵X⁶Gly⁷X⁸X⁹Ile•Leu•Val

Les séquences d'acides nucléiques impliquées dans ces interactions sont principalement des séquences poly(C) simples brins avec des K_D compris entre $10^{-6}M$ pour la liaison de la séquence poly(C) par le domaine KH3 de la protéine hnRNP K (Braddock et al., 2002) jusqu'à $10^{-9}M$ pour le domaine KH3 de la protéine Nova avec une séquence ARN simple brin pour lequel il a une haute affinité (Jensen et al., 2000b).

4. Méthodes particulières d'étude de complexes ARN-protéine

La formation d'un complexe ARN-protéine est le résultat d'une reconnaissance spécifique entre les bases de l'ARN structuré ou non, et des domaines protéiques particuliers. Un des exemples très caractéristiques est le ribosome.

La compréhension des bases moléculaires et atomiques de ces interactions commence par l'identification des fragments d'ARN directement impliqués dans la fixation d'une protéine. À une échelle plus réduite, la détermination des bases précisément impliquées permet de comprendre cette organisation macroscopique. Et enfin, ces informations permettent dans des conditions particulières, d'étudier la structure de ces complexes.

Pour identifier des séquences d'ARN qui interagissent avec une protéine, une des techniques de criblage, SELEX (« Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment »), permet de cribler une banque de fragments totalement aléatoires (Tuerk and Gold, 1990). Cette technique consiste à sélectionner par filtration sur une membrane de nitrocellulose les complexes ARN-protéine. Les protéines sont retenues sur la membrane et les ARN qui interagissent également. Ils sont extraits, retro-transcrits, et amplifiés par PCR. Cette étape permet d'enrichir en fragments ayant de l'affinité pour la protéine. Après plusieurs tours de sélection, les séquences sont séquencées pour être analysées.

Pour identifier de courtes séquences issues d'un ARN de grande taille, une approche dérivée de SELEX est l'approche combinatoire SERF (« Selective Evolution of Randomized Fragments »). Elle offre un moyen puissant et précis pour identifier le site de fixation d'une

protéine sur un ARN *in vitro* (Stelzl and Nierhaus, 2001). Cette méthode consiste à générer une banque de fragments aléatoires à partir d'un ARN d'intérêt de grande taille.

Cette approche a été tout d'abord appliquée pour la grande sous-unité du ribosome de la bactérie *E. coli* en identifiant les sites de liaison des protéines ribosomiques L4 et L6 sur l'ARN ribosomique 23S (Stelzl et al., 2000).

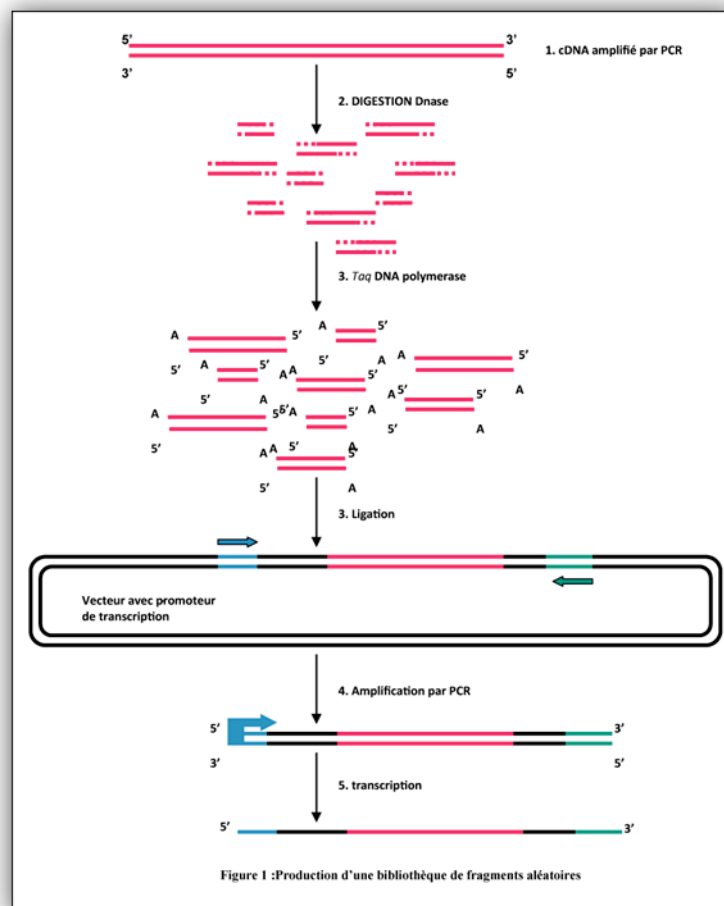


Figure 37 : Construction de la banque de fragments d'ARN.

Les fragments issus de la digestion avec la DNaseI sont incubés avec une DNA polymérase qui complète les fragments qui ne sont pas francs. Dans cet exemple, la Taq polymérase ajoute des A aux extrémités pour cloner les fragments dans un vecteur préparé pour le « T/A cloning ».

Pour construire la banque de fragments d'ARN, l'ADNc est digéré de façon aléatoire avec la DNaseI. Les fragments sont clonés sous le contrôle d'un promoteur de transcription pour synthétiser les ARN de la banque. Ces différents fragments sont mis en sélection contre une protéine d'intérêt. Pour cela, les complexes ARN-protéine sont filtrés sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane a la propriété de retenir les protéines. Les ARN en complexe

avec la protéine d'intérêt sont également retenus. Ils sont extraits, rétro-transcrits puis amplifiés par PCR. Un tour de sélection est accompli (Figure 38).

Après plusieurs tours de sélection suivis par une amplification, les séquences sont analysées pour déterminer le site préférentiel de fixation de la protéine.

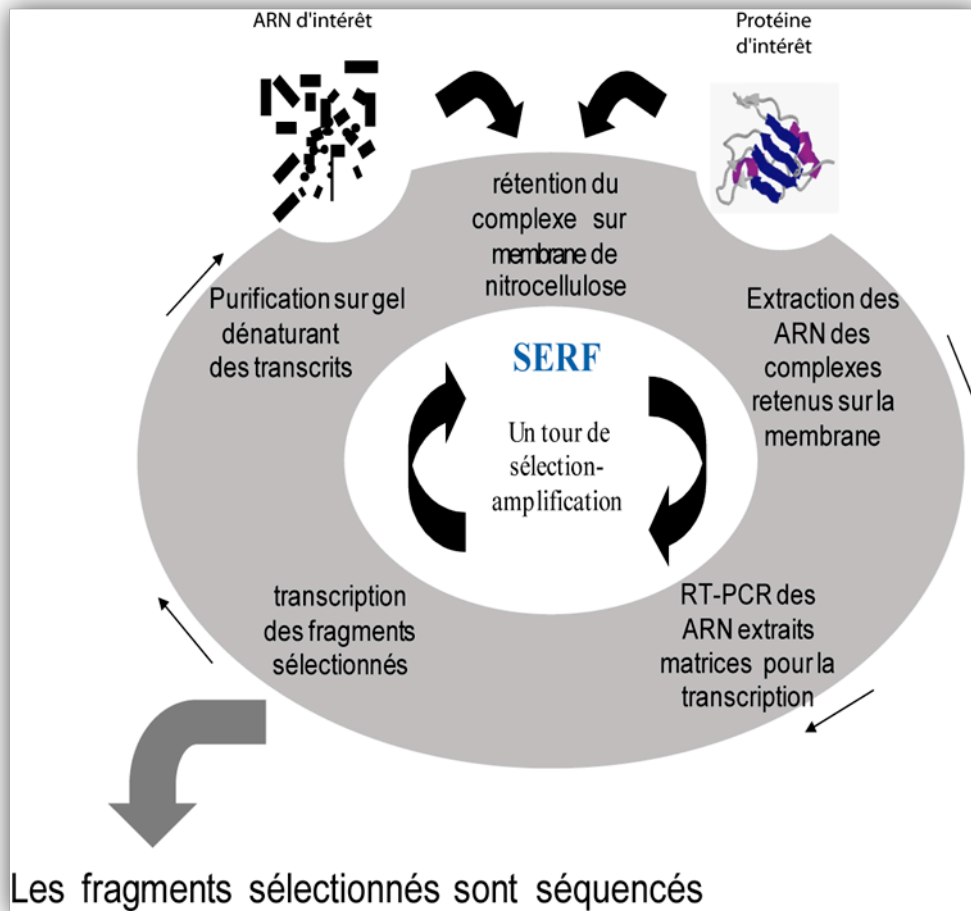


Figure 38 : Schéma représentant un cycle de sélection par SERF.

Une autre approche très puissante est le triple hybride chez la levure *S. cerevisiae*. Elle permet l'étude des interactions ARN-protéine *in vivo*. Cette technique a été développée en 1996 en même temps par deux équipes (Putz et al., 1996; SenGupta et al., 1996). Ce système a déjà été utilisé pour détecter des interactions ARN-protéine connues auparavant entre la protéine virale Gag (HIV-1) et le signal d'encapsidation du virus (Bacharach and Goff, 1998).

Le principe utilise un *trans*-activateur Gal4p capable de recruter la machinerie transcriptionnelle et d'activer la transcription. Ce facteur comporte deux domaines distincts : un domaine de liaison à l'ADN (LexA) et un domaine d'activation de la transcription (Gal4AD) qui sont indépendants.

Le domaine de liaison à l'ADN LexA est fusionné à un domaine de liaison à l'ARN bien caractérisé : « MS2-coat protein » (MCP). La deuxième protéine fusion contient le domaine d'activation de la transcription fusionné à notre protéine d'intérêt avec les propriétés de liaison à l'ARN. Les deux fusions de protéines seront rapprochées grâce à une fusion d'ARN contenant d'une part l'ARN lié par MS2-coat protein et d'autre part l'ARN d'intérêt. Nous avons alors les trois « hybrides » impliqués. Si l'interaction se produit entre les deux partenaires d'intérêt ARN et protéine, l'activateur de la transcription est reconstitué et fonctionnel (Figure 39).

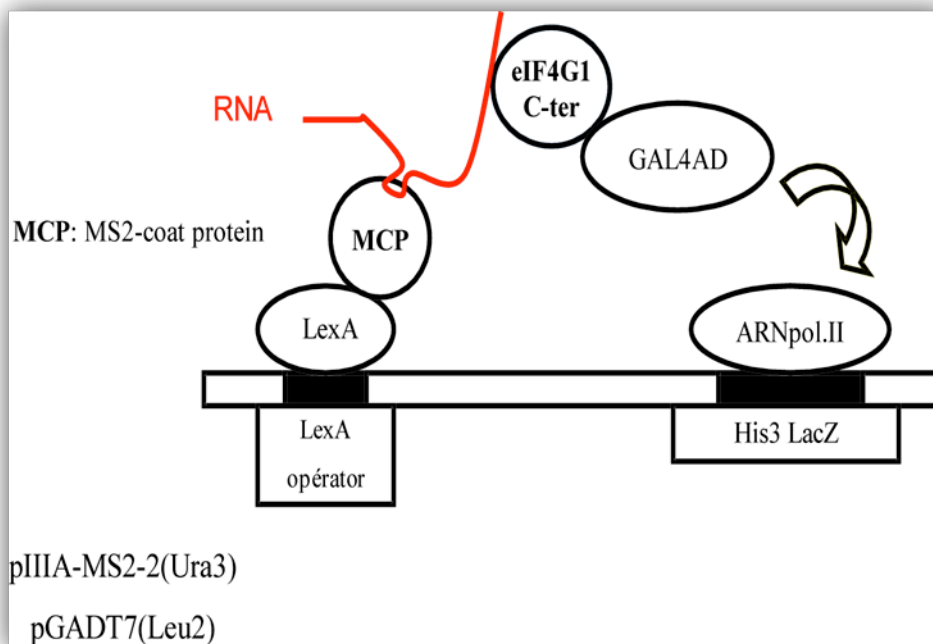


Figure 39 : Principe de sélection du triple hybride chez la levure *S. cerevisiae*.

Le site de liaison à l'ADN est placé en amont d'un gène rapporteur. Dans notre cas le site de liaison est l'opérateur LexA et le gène rapporteur est constitué de His3 précédé du gène codant pour la Beta-galactosidase. Un gène codant pour la protéine de fusion « LexA-MS2 coat protein » est intégré au génome dans son chromosome. Elle va lier l'opérateur LexA.

La levure est transformée avec deux constructions. La première (pIIIA-MS2-2) va lui permettre d'exprimer un ARN hybride, ARN d'intérêt fusionné à deux domaines de liaison à la protéine MS2. La seconde permet d'exprimer une protéine hybride composée de la protéine d'intérêt et du domaine d'activation Gal4AD (pGADT7).

La liaison peut être détectée soit grâce à la sélection sur milieu sans Histidine soit par la détection de l'activité de la β -galactosidase exprimée par le gène rapporteur.

Ce système d'étude d'interactions ARN-protéine à l'avantage d'être assez rapide et sa mise en place est facile. On peut alors, tout comme dans l'approche SELEX, envisager des criblages (SenGupta et al., 1996) en clonant des banques d'ADNc afin d'identifier les partenaires d'interaction avec des protéines contenant des domaines de liaison à l'ARN. Un avantage de cette méthode est qu'il n'est pas nécessaire de purifier la protéine recombinante. On se place directement dans des conditions natives (Bernstein et al., 2002).

Pour augmenter la sensibilité du système, on peut ajouter du 3-aminotriazole (3-AT) dans les milieux gélosés. Il inhibe l'activité enzymatique basale de His3 ce qui élimine certains faux positifs. De plus il permet d'évaluer la force de l'interaction en fonction de la concentration utilisée dans le milieu.

La souche de levures YBZ1, a été modifiée afin de diminuer le K_D de la protéine MCP et le nombre de faux positifs (Hook et al., 2005).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Mon travail de doctorat porte sur l'étude et l'identification de complexes ribonucléoprotéiques, mais aussi protéine-protéine impliqués dans la régulation de l'initiation de la traduction des ARNm.

Le facteur eIF3 joue un rôle déterminant dans l'initiation de la traduction. Il intervient pendant la formation du complexe ternaire (constitué par le facteur eIF2, un ARNt_i^{Met} et une molécule de GTP). Il stabilise aussi la liaison de l'ARNt_i^{Met} à la sous-unité ribosomique 40S et permet le recrutement du complexe 43S sur la coiffe de l'ARN messenger. Il interagit directement avec la petite sous-unité ribosomique, mais le mécanisme d'interaction des deux partenaires n'est pas encore connu.

Ce facteur canonique est le plus gros identifié jusqu'à présent. Il compte treize sous-unités (Damoc et al., 2007) dont deux possèdent un motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) : les sous-unités eIF3p44/g et eIF3p116/b. La sous-unité eIF3p116 est connue pour son rôle dans la liaison du facteur eIF3 sur l'IRES du VHC (Sizova et al., 1998b).

La sous-unité eIF3p44 a été clonée et caractérisée (Bandyopadhyay and Maitra, 1999; Block et al., 1998a). La séquence de cette protéine a été alignée avec celle de son homologue de souris *Mus musculus* (Figure 40). Elle montre une homologie de séquence en acides aminés de 97%. Son homologue de levure *S. cerevisiae* eIF3p33 présente 33% d'identité de séquence et 42% de similarité. Les régions de la protéine qui sont les plus conservées sont certainement les plus importantes pour ses fonctions. La recherche de domaines fonctionnels avec Prosite (Block et al., 1998b) signale la présence d'un RRM situé dans la région la plus conservée de la protéine eIF3p44.

L'étude des propriétés de liaison de l'ARN de la protéine eIF3p44 par « north-western blot » a montré que cette protéine était capable d'interagir avec l'ARNr 18S et avec l'ARNm de la β -globine *in vitro*. La force de l'interaction de la protéine eIF3p44 avec l'ARNr 18S est estimée quatre fois supérieure à celle du contrôle utilisé dans l'expérience (Block et al., 1998b). Cette interaction semble spécifique.

```

H.sapiens      1  -MPTGDFDSKPSWADQVEEGEDDKCVTSELLKGIPLATGDTSPFELLPGAPLPP
M.musculus    1  -MPTGDFDSKPSWADQVAEEGEDDKRVTSELLKGIPLPTGDTSPFELLPGDPLPP
S.pombe       1  --SSKSLD-----WADD-----ED-----YGTGLPSIQIFDNE-----
S.cerevisiae  1  -----MSEVAPEEIEENA-----
C.elegans     1  MAPAPEVVS--WAEAVE--QD-----NAPHIQEGA-----

H.sapiens      56  PKEVINGNIKTVTEYKIDEDGKKKIVRTER--IETRKASKAVARRKNWKKFGNSE
M.musculus    56  PKEVSNGNIKTVTEYKIDSDGKKKIVRTER--IETRKASKAVARRKNWKKFGNSE
S.pombe       27  -----DG-TKMIEERIDDNGKKVTVRIRKTVLTERVQHAVAARRKKWKKFGKEA
S.cerevisiae  14  -----DG-SRSIITYKIED-GVKKITQKVKEVKVLEKVKVAARRKNWKKFGSEK
C.elegans     27  -----DG-TRTETAFTVD-GVRKVVTOEK--VINKRVPKVVAARRKKWVKFGSCK

H.sapiens      110  FDPPGPNVATTVSDDVSMTFITSKEDLNCQEEEDPMN-----KLKGQKIVSCRI
M.musculus    110  FDPPGPNVATTVSDDVSMTFITSKEDLNCQEEEDPMN-----KLKGQKIVSCRI
S.pombe       77  RKNSGVDARTTSVGENVQLRLQLGWTTK-EEQDEAALAAKVKAKGSSVRCRA
S.cerevisiae  63  GSPAGPSAVTARLGEVEVLRRLSRNWQAEERIQKEKA-----SLTKTGLQCR
C.elegans     74  GEPAGPQVATTYVAEEVDMQFTRNRAGEQILDVQEDKQ-----TAKTTSREHCRH

H.sapiens      160  CKG-DHWTRCPYKDTLGP---MQKELAEQLGLSTGEKEKLPGELEPVQATQNKTG
M.musculus    160  CKG-DHWTRCPYKDTLGP---MQKELAEQLGLSTGEKEKLPGELEPVQAAQSKTG
S.pombe       132  CKG-NHTAQCPYKSIIGP---VDEPPLDASPVSS---RASCALG-----EKG
S.cerevisiae  112  CGN-DHMTMNCPEKTIILSELSALEDPATNEGGVEAAS-EKAGQVG---GAGSIPG
C.elegans     124  CKGNDHWSTHCPYKVMYQL---DEEADADK--DTE---KDRMANG-----

H.sapiens      212  KYVPPSLRDGASRR-GESMQPNRRAADDNATIRVTNLSEDTRETDLQ-ELFRPFGSI
M.musculus    212  KYVPPSLRDGASRR-GESMQPNRRAADDNATIRVTNLSEDTRETDLQ-ELFRPFGSI
S.pombe       173  RYLAPHLRAGSGRESGDSMFK-RRRDDSATIRVTNLSDDTREETLR-DLFRRFGGI
S.cerevisiae  163  QYVPPSRRAGARDPSSDAYRDSRRRDDMCTIKIMOVNENADENSLREELLFFPAPI
C.elegans     161  --MRPD--G---RQ-----ID-RNRSIDENTCRVTNLPQEMNEDELRLDLFGKIGRV

H.sapiens      266  SRIYLAKDKTTGQSKGFAFISFHREDRARAIAGVSGGYDHLILNVEWAKPSTN-
M.musculus    266  SRIYLAKDKTTGQSKGFAFISFHREDAARAIAGVSGGYDHLILNVEWAKPSTN-
S.pombe       227  QRVYLAKDKETGRAKGFAVSYDRDCALKARDRLDGYGNLILRCESKPRD--
S.cerevisiae  219  PRVSVVENKETGKSRGLAFVFSSEVAEQARFLDGRGYMNLILRVEWSKPKVKE
C.elegans     203  IRIFARDKVTGLPKGFAFVFSRDAARAIAELNDIRMYHVLKVEWTRPSN--

```

Figure 40 : Alignement des séquences des sous-unités eIF3p44 de différentes espèces

Les séquences alignées proviennent des espèces *M. musculus*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* et *C. elegans*. Les alignements sont réalisés avec le programme Clustal X (Block et al., 1998b). Les carrés les plus foncés présentent les homologies les plus importantes entre ces différentes espèces.

Son homologue eIF3p33 chez *S. cerevisiae* a également été cloné (Verlhac et al., 1997). C'est un gène essentiel chez la levure (Hanachi et al., 1999). Ses propriétés de liaison à l'ARN ont été analysées. De la même façon que pour eIF3p44, la protéine interagit avec l'ARNr 18S mais également avec l'ARNm de la β -globine.

Les résultats cités ci-dessus montrent que l'interaction entre le facteur eIF3 et la sous-unité ribosomique 40S pourrait se produire par l'intermédiaire de la sous-unité p44 du facteur eIF3.

Nous avons émis l'hypothèse que la protéine eIF3p44 pourrait avoir certains sites préférentiels de fixation sur l'ARNr 18S.

Les objectifs étaient les suivants :

- 1) Confirmer *in vitro* que le facteur eIF3p44 possède un RRM
- 2) Identifier le (ou les) sites préférentiels de fixation de p44 sur l'ARNr 18S
- 3) Étudier la structure des complexes

Pour étudier plus en détail cette interaction, j'ai cloné le motif de liaison à l'ARN de cette protéine et l'ARNr 18S. J'ai ensuite effectué une étude de type SERF (SElection of Random RNA Fragments) (Stelzl and Nierhaus, 2001) dérivée de la méthode SELEX pour identifier le (ou les) site(s) de l'ARN ribosomique 18S sur lequel il pourrait se fixer.

Ces travaux s'inscrivaient dans l'étude plus générale de l'initiation de la traduction d'ARNm cellulaires et viraux. Nous voulions appliquer des méthodes de criblage (SERF, Phage display) pour identifier des complexes ARN-protéine, protéine-protéine ou ARN-ARN ainsi que leurs sites d'interaction les plus réduits possibles. Le but était de réaliser des études de structure de ces complexes impliqués dans la traduction. Nous avons pensé à d'autres candidates pour interagir avec l'IRES du virus HCV, notamment les protéines ribosomiques S2, S27 (Otto et al., 2002). Malheureusement je n'ai pu mener aucune étude d'interaction avec ces protéines car après les avoir clonées, j'ai été confrontée à des mises au point d'expression et de purification qui me permettaient seulement de les détecter par Western-blot.

L'initiation de la traduction est aussi régulée par d'autres protéines que les facteurs canoniques. Au cours de la localisation d'ARNm, l'expression des protéines est réprimée pour permettre leur expression dans des régions particulières de la cellule. Chez la levure *S. cerevisiae*, Ash1p réprime la transcription de la protéine HO, impliquée dans le changement de type sexuel. Lors de la division cellulaire, en fin d'anaphase, l'ARNm *ASH1* est localisé au bourgeon de la levure, ce qui assure que l'expression d'Ash1p se déroule seulement au noyau de la cellule fille.

L'ARNm *ASH1* est transporté grâce à un complexe de plusieurs protéines, le locosome (voir p.64). Il voit sa traduction réprimée pendant son transport afin de maintenir une bonne expression spatio-temporelle de la protéine.

Des facteurs *trans* impliqués dans cette régulation ont été identifiés : Khd1p (Irie et al., 2002) et Puf6p (Gu et al., 2004). Nous nous intéressons plus précisément à la protéine à trois domaines KH Khd1 (voir p.73).

La protéine Khd1 a tout d'abord été identifiée par inactivation de gènes candidats pour la régulation de la localisation de l'ARNm *ASH1* (Irie et al., 2002). Des études de microscopie ont montré la co-localisation de Khd1p avec l'ARNm *ASH1* (Irie et al., 2002). Dans cette étude, l'équipe d'Irie a testé des éléments de localisation identifiés auparavant : les éléments N (800nt), C (300nt) et U (80nt) de l'ARNm *ASH1* qui correspondent aux éléments E1, E2A/B et E3, respectivement pour vérifier leur co-localisation avec Khd1p (Voir p.66) (Chartrand et al., 1999; Gonzalez et al., 1999). La protéine Khd1 co-localise avec un ARNm contenant l'élément N, qui inclut les 800 premiers nucléotides de la séquence codante de l'ARNm *ASH1*, alors que ce n'est pas le cas des deux autres éléments de localisation C et U.

La séquence de l'ARNm *ASH1* a été étudiée en détails pour identifier et délimiter d'une façon plus précise les éléments de localisation. Dans les séquences N, C et U, quatre éléments de localisation distincts (E1 dans N, E1A et E2B dans C et E3 dans U) ont montré qu'ils pouvaient respectivement permettre la localisation de l'ARNm *ASH1* (Chartrand, 2002). La mutation de chacun des quatre éléments de localisation, tout en maintenant la séquence de la protéine, a montré une augmentation de l'expression de la protéine Ash1 (Chartrand, 2002). La traduction de l'ARNm *ASH1* semble être régulée grâce à l'un de ces éléments. Puisqu'un ARNm contenant l'élément E1 (nt 598-750) co-localise avec Khd1p, cet élément serait un bon candidat comme cible de ce régulateur traductionnel.

De plus, des études de précipitation d'affinité avec Khd1p *in vivo* ont permis d'isoler plusieurs protéines impliquées dans l'initiation de la traduction : les facteurs eIF4E, eIF4G1, eIF4G2 et Pabp1 (Gavin et al., 2006; Gavin et al., 2002).

Notre hypothèse de travail est que Khd1p est un régulateur de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Khd1p réprime la traduction d'Ash1 grâce à son interaction avec l'élément de localisation E1 situé dans la séquence codante de cet ARNm. Cette régulation se produit pendant son transport jusqu'au bourgeon où elle est alors activée.

Notre objectif était de découvrir par quel mécanisme la traduction de l'ARNm *ASH1* est réprimée pendant son transport, et comment sa traduction est ensuite activée :

- 1) Comment Khd1p interagit-elle avec l'ARNm *ASH1*?
- 2) Quels sont les facteurs canoniques impliqués dans cette régulation?

3) Existe-t-il un mécanisme particulier de relâchement pour activer la traduction?

Dans le cadre de ce travail, j'ai étudié des interactions macromoléculaires impliquées dans cette régulation. Pour cela, j'ai utilisé des approches *in vitro* de retard sur gel et d'immunoprécipitation, et des approches *in vivo*, de triple hybride chez la levure *S. cerevisiae*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE LE FACTEUR eIF3 ET LA PETITE SOUS-UNITÉ RIBOSOMIQUE 40S

1. Clonage, expression et purification du motif de reconnaissance de l'ARN de la sous-unité p44 du facteur eIF3 : eIF3RRMp44

a. Clonage du RRMp44 dans le plasmide d'expression pET30b

Le fragment codant pour la protéine eIF3_{RRMp44} (NP_003746; acides aminés 227 à 313) est amplifié par PCR sur les ADNc (ADN complémentaires) obtenus à l'aide des ARNm purifiés de cellules humaines (lignées de lymphome B : Namalwa). La séquence (NM_003755) est amplifiée avec les amorces spécifiques sens RRMp44fwdNde (P1 : 5'CATATGGAGTCCATGCAGCCCAACCGCAGAGCCGAC3') et anti-sens RRMp44revXho (P2 : 5'GTGCTCGAGGTTGGTGGACGGCTTGCCCACTCGACG3') conçues à l'aide du logiciel oligo6. Ils contiennent les sites de restriction *NdeI* et *XhoI*. La PCR en deux étapes (68°C/95°C) est réalisée avec la *Pfu* HotStart ADN-polymerase (Stratagene) car la séquence amplifiée est très riche en nucléotides G et C.

Réaction PCR	Conditions PCR
5µL tampon "yield ace" 10X	1min à 95°C 1 cycle
1,25µL P1(10µM)	
1,25µL P2 (10µM)	
1,25µL 25mM dNTP	30s à 95°C puis 35 cycles
1µL 100mM MgCl ₂	
2µL ADNc	
1µL <i>pfu</i> turbo Hot Start	1min à 68°C
H ₂ O qsp 50µL	7min à 68°C 1 cycle

Le produit de PCR (297bp) purifié sur gel est incubé 8 minutes à 72°C avec 1µL de polymérase *Taq* (Roche) qui a les propriétés d'ajouter des A aux extrémités 3' de l'ADN, 0,5µL d'adénosine (100µM) et 10µL de tampon 10X de *Taq* polymerase (Promega).

Le produit de PCR est cloné dans le pTrcHis2 (Invitrogen) afin de faciliter les analyses des digestions. Le plasmide et le vecteur pET30b (Novagen) sont digérés de façon séquentielle à 37°C avec les enzymes de restriction *NdeI* et *XhoI*. Entre chaque digestion, les ADN sont purifiés avec les colonnes cleanup (Qiagen).

Le vecteur pET30b digéré est déphosphorylé avec l'enzyme CIAP (« Calf intestinal alkaline phosphatase ») (promega) 1 heure à 37°C. L'insert et le vecteur sont purifiés sur gel d'agarose, dosés et ligués avec la Quick T4 DNA ligase (BioLabs) 5min à 25°C.

La construction est vérifiée par séquençage.

b. Expression et purification de la protéine recombinante RRMp44-(His)₆

La protéine recombinante est exprimée dans les bactéries *E.coli* BL21 transformées par le vecteur pET30b-RRMp44. Elles sont cultivées dans un milieu 2YT en présence de kanamycine. L'expression de RRMp44-(His)₆ est induite avec 1mM IPTG pendant 3 heures à 37°C en phase exponentielle de croissance à DO_{600nm}=0.8 sous agitation. Les bactéries sont lysées dans le tampon B (20mM Tris pH 7.9, 500mM NaCl, 10mM Imidazole) par ultrasonication et centrifugées à 15000g à 4°C pour séparer la fraction soluble des débris membranaires.

La protéine recombinante RRMp44-(His)₆ est purifiée par chromatographie d'affinité de métal immobilisé avec les billes Ni-NTA-agarose (Qiagen). Elle est éluée avec des concentrations croissantes d'imidazole, dialysée contre PBS, concentrée avec un Centricon YM-3 puis aliquotée et congelée à -80°C.

2. Construction de la banque de fragments de l'ARN ribosomique 18S

a. Clonage de l'ARN ribosomique 18S humain

L'ADNc de l'ARNr 18S (nucléotides 1-1737) est obtenu par retro-transcription sur l'ARN total purifié de cellules HeLa à l'aide de l'amorce 18SRev, 50 unités d'« AMV reverse transcriptase » (Stratagene), 0,8µM de 10mM dNTP, 0.1mM DTT à 37°C pendant 1H. L'ADNc est amplifié avec les amorces 18Sfwd (P1 : 5'TACTTGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCT3') et 18Srev (P2 : 5'TCACTAAACCATCCAATCGGTAGTAGCGAC3'), *Pfu* Hotstart polymerase, en présence de *Taq* Extender (Stratagene), à une température d'alignement de 55°C. Les produits de la réaction de PCR sont purifiés sur un gel d'agarose 1% à l'aide du kit Qiaquick gel extraction (Qiagen) et clonés dans le plasmide pBlunt.

b. Construction de la banque

Le produit PCR amplifié avec les amorces 18Sfwd et 18Srev sur la construction pBlunt-18S donnent un fragment de 1737pb de l'ARN ribosomique 18S.

Réaction PCR	Conditions PCR	
30µL tampon taq extender 10X	1min à 95°C	1 cycle
7,5µL P1(10µM)		
7,5µL P2 (10µM)		
6µL 25mM dNTP	30s à 95°C puis	35 cycles
6µL 100mM MgCl ₂	30S à 55°C puis	
150ng de plasmide	1min à 68°C	
3µL <i>pfu</i> turbo Hot Start		
3µL Taq extender	7min à 68°C	1 cycle
H ₂ O qsp 50µL		

4µg de ce produit sont digérés avec 0,5 unités de *DnaseI* (Roche) dans un tampon contenant 2,5mM MgCl₂, 15min à 37°C. La *DnaseI* est immédiatement inactivée 5min à 95°C. Les produits de cette réaction sont incubés 10min à 72°C avec la *Taq DNA* polymérase, purifiés avec MinElute PCR purification Kit (Qiagen) puis clonés dans le pGEM-T easy (Promega) entre les promoteurs de transcription T7 et SP6 (Voir p.108) avec la T4 DNA ligase du kit Quick ligation Kit (Biolabs). L'ensemble de ces constructions constitue la matrice de la banque de départ pGEM-18S-SERF0.

c. Préparation de la banque de fragments aléatoires de l'ARN ribosomique 18S

Les ARN sont synthétisés par transcription *in vitro* avec la T7 ARN polymérase du kit T7 Megascript (Ambion), en présence de α -³²P-UTP pendant la nuit à 37°C. L'ADN qui a servi de matrice est digéré avec la *DnaseI* 15min à 37°C.

Les produits de la réaction de transcription sont purifiés sur gel dénaturant 8M urée 6% d'acrylamide-bisacrylamide (19:1). Les bandes sont découpées et éluées du gel dans une solution d'extraction (0,3M NaOAc pH5, 0,2% SDS) sur la nuit à la température de la pièce et précipités avec 1mL d'éthanol absolu pour 400µL de solution d'extraction. Les ARN sont repris dans le tampon TKM (25mM Tris pH 7.4, 150mM KCl, 5mM MgCl₂) et stockés à -20°C.

3. SERF : sélection de fragments spécifiques du RRMp44

SERF: « Selection of random RNA fragments »

Les ARN dilués dans le tampon TKM sont incubés 2min à 70°C et laissés 10min à la température de la pièce pour se replier puis sur glace. Ensuite, la protéine est ajoutée, et le complexe est incubé 10min à la température de la pièce. Pendant ce temps, la membrane est équilibrée avec 200µL de tampon TKM, et 200µL de complexe (pour chaque puits) sont filtrés. La membrane est lavée avec 4 X 200µL de tampon TKM.

Les points sont découpés et les ARN sont élués dans la solution d'extraction (0,3M NaAc, 0,2% SDS) 1h heure à 37°C sur une roue puis précipités avec éthanol.

Les ARN sélectionnés sont rétro-transcrits avec la « Reverse Transcriptase Stratascript » (Stratagene) pendant 50min à 37°C, avec l'amorce SP6. Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par PCR avec les amorces SP6 (P1 : 5'TATTTAGGTGACACTATAGAA3') et T7+SERF (P2 : 5'TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATG3'). Cette dernière amorce reconstitue un promoteur T7 intègre pour le cycle suivant de transcription.

Les produits PCR servent alors de matrice pour la transcription du tour de sélection suivant. Quatre tours de sélection sont effectués (Tableau 4).

Retro-trancrption		Réaction PCR	Conditions PCR
30µL d'ARN	5min à 65°C	5µL 10X buffer	5min à 94°C 1 cycle
+3µL SP6 (10µM)		0,5µL P1	
1µL random hexamères	1h à 37°C	0,5µL P2	30s à 94°C
+10µL 10mM dNTP		1µL 25mM dNTP	1min 48°C 35 cycles
+2µL RNAsine		10µL de RT	1min à 72°C
+5µL tampon RT 10X		0,5µL Taq	
+2µL RTase		H ₂ O qsp 50µL	7min à 72°C 1 cycle

Les derniers ADNc obtenus sont amplifiés par PCR avec les amorces SP6 et T7+SERF et séquencés.

Tableau 4 : Conditions de sélection des fragments d'ARNr 18S avec le RRMp44.

Tour de sélection	RRMp44 à 3,4ng/μL	banque de l'ARNr 18S	volume total (μL)
SERF0	10μL	130μL (7,4ng/μl)	950
SERF1	5μL	100μl (30ng/μL)	605
SERF2	5μl	50μl (40ng/μL)	550
SERF3	5μl	100μl (40ng/μL)	605
SERF4	Séquençage		

4. Analyse des séquences sélectionnées par retard sur gel

a. Synthèse des ARN

Les plasmides pGEM-4-65, pGEM-3-16, pGEM-4-60 et pGEM-3-15 sont linéarisés avec *SpeI* (pGEM-X-Y avec X : dernier tour de sélection avant le séquençage. Y : le numéro du clone séquencé). Le plasmide utilisé comme contexte est linéarisé avec *SacI*.

Les ARN sont transcrits 2H à 37°C en présence de α -³²P-CTP avec la T7 ARN polymérase. Les produits sont purifiés sur un gel dénaturant 8M Urée, 6% AA-bis (19 :1).

b. Formation du complexe

10000 cpm d'ARN dilués dans 10μL de TKM-4% glycérol sont incubés 2min à 65°C, 10min à la température de la pièce et laissés sur glace pour faciliter leur repliement.

La protéine est diluée dans le tampon TKM-4% glycérol.

Les différentes dilutions de protéine sont ajoutées à l'ARN, le complexe est incubé 20min à 4°C, puis 2μL d'héparine (10mg/mL) sont ajoutés (pour diminuer les interactions non spécifiques), le complexe est incubé 10min supplémentaires à 4°C.

c. Analyse des complexes

Après une pré-migration de 30min, les complexes sont analysés sur un gel dénaturant 5% AA-bis (29:1) à 150V, pendant 2H à 4°C dans du TBE 0,5X comme tampon de cuve. Le gel est séché puis exposé sur la nuit avec un film d'autoradiographie à -80°C.

II. ÉTUDE DE LA LOCALISATION DE L'ARNm *ASH1*

1. Immunoprécipitation de fragments d'*ASH1* avec Khd1-TAP

a. Constructions des fusions Ash1-LacZ

Les plasmides utilisés pour les co-immunoprécipitations sont constitués de fragments de l'ARNm *ASH1* fusionné à la séquence LacZ. Ils sont clonés dans le plasmide YEP195lac-*LacZ-ADHII* (Chartrand et al., 1999; Chartrand, 2002).

Les constructions utilisées contiennent les fragments de l'ARN *ASH1* :

Nucléotides 598-750: élément E1

Nucléotides 1-846: élément N

Nucléotides 237-538: début de l'élément N

Nucléotides 1221-1378: élément E2B

b. Souche S288C-Khd1-TAP

Les levures sont génétiquement modifiées pour exprimer la protéine en fusion avec le tag TAP (« tandem affinity purification ») (Figure 41) (Rigaut et al., 1999). L'intérêt de cette approche est de travailler avec des protéines exprimées de façon constitutive et dans des conditions natives. Grâce à la partie Protéine A, les protéines exprimées en fusion avec l'étiquette TAP peuvent être immunoprécipitées avec des billes d'agar couplées à une Ig-G (immunoglobuline G).

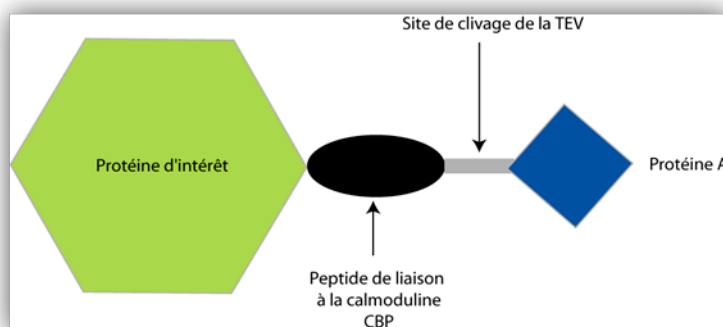


Figure 41 : Schéma d'une protéine fusion avec un tag TAP.

Le tag TAP est composé de trois entités : la protéine CBP (« clamodulin binding peptide »), un site de clivage pour la protéase TEV (« Tobacco Etch Virus ») et la protéine A capable d'interagir avec des IgG.

c. Immunoprécipitation des complexes ARN-Khd1TAP

Les levures S288C-Khd1-TAP transformées par les plasmides fusions LacZ (YEP195lac-*LacZ-ADHII*) sont mises dans 5ml de préculture dans un milieu YEP^{-URA+Glc} pour la nuit. Le

jour suivant, les cultures sont diluées dans 50mL de milieu YEP^{-URA+Gal} toute la nuit pour induire l'expression sous contrôle du promoteur Gal. Le lendemain, 100 DO_{600nm} de levure sont centrifugées 5min à 13000rpm puis reprises dans 1mL de tampon PBS-0,1% triton X-100, cocktail antiprotéases (PMSF+Pepstatine+Aprotinine+Leupeptine), 2µL RNAGuard et brisées avec 250µL de billes de verre 5 X 30s alternées par 5 X 30s sur glace. Le tout est centrifugé 2min à 13000rpm pour éliminer les débris et récupérer le surnageant.

500µL de surnageant sont incubés avec 30µL de bille IgG-agar à 4°C sur une roue pendant 2H. Les billes sont lavées 5 fois avec 500µL de PBS froid 1min et centrifugées 1min à 3000rpm.

Les ARN sont élués des billes dans 200µL de PBS-DEPC par chauffage 5min à 95°C. Après une première extraction au phénol-chlorophorme-isoamyl (PCI), les ARN élués sont traités avec la *DNaseI*.

Traitement à la *DNaseI* : le culot est repris dans
45µL H₂O DEPC 2min à 65°C
+5µL 10X buffer (400mM Tris pH 7.5, 60mM MgCl₂)
+2µL de *DnaseI* (Roche)
1H à 37°C
Inactivation 2min à 95°C
PCI+ précipitation avec 10µL de NaOAc 3M et 500µL d'éthanol absolu.

Après ce traitement, les culots sont repris dans 10µL d'eau DEPC. 1µL est utilisé pour la retro-transcription (RT). Les ADNc sont ensuite amplifiés par PCR avec les amorces LacZSeq1 (P1) et LacZSeq2 (P2) qui amplifient un fragment de LacZ en fusion avec les ARN.

Pour le témoin PCR sans RT, une fraction des ARN élués est diluée au 1/50ème pour respecter les mêmes proportions que pour la RT.

Retro-transcription		Réaction PCR	Conditions PCR
1µL d'ARN		5µL 10X buffer	5min à 95°C 1 cycle
+9µL H ₂ O	5min à 70°C puis sur glace	0,5µL P1	
1µL random hexamères		0,5µL P2	30s à 95°C
+5µL 5X buffer		1µL 25mM dNTP	1min 55°C 30 cycles
+1µL 25mM dNTP		1µL Matrice	30 cycles
+0,5µL RNAGuard	5min à 37°C	0,5µL Vent	
+7µL H ₂ O		H ₂ O qsp 50µL	7min à 72°C 1 cycle
+0,5µL RTase	50 à 60min 42°C		

2. Retards sur gels natifs avec l'élément E1

a. Constructions

L'élément de localisation E1 et l'IRE

L'élément de localisation E1 (70nt) et l'élément IRE (« iron responsive element ») (60nt) sont clonés dans le vecteur pGEM-4Z entre les sites de restriction *HindIII* et *EcoRI*. Ils sont transcrits sous le contrôle du promoteur T7.

La protéine fusion GST-Khd1

La protéine GST-Khd1 (acides aminés 1-381) est clonée dans le pGEX-4T-1 entre les sites de restriction *EcoRI* et *XhoI*. Elle est exprimée en fusion avec la GST en N-terminal.

Les protéines fusions GST-eIF4G1 et GST-eIF4G1-Cter

Les protéines eIF4G1 (acides aminés 1-952) et eIF4G1-Cter (acides aminés 850-952) sont clonées dans le vecteur d'expression pGEX-2T. Ils sont en fusion avec la GST en N-terminal.

b. Production et purification des protéines recombinantes GST-fusion

Production et purification de GST-Khd1

La protéine recombinante GST-Khd1 est surexprimée dans les bactéries *Escherichia coli* BL21 (Rosetta 2) transformées par le plasmide pGEX-4T-1-Khd1. Les cellules sont récoltées après 3 heures d'induction avec 1mM d'IPTG à 30°C. Elles sont reprises dans du PBS-triton-X100 0,1%, 1M NaCl, 1mg/ml de lysozyme et un cocktail de protéases

(PMSF+pepstatine+leupeptine+aprotinine) puis incubées sur glace 30min et ultrasoniquées. Le lysat est centrifugé 15min à 15000g, à 4°C, pour isoler le surnageant qui contient la protéine soluble surexprimée.

La protéine fusion-GST est purifiée avec des billes de glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare). Après deux lavages avec PBS- triton X100 0,1% puis avec PBS, la protéine fusion-GST est éluée avec 10mM de glutathione réduite dans PBS. Les fractions de protéine (3mL) sont dialysées sur la nuit contre 4L de PBS et concentrées à l'aide d'une unité de filtration de MWCO (« Molecular Weigh Cut Off») de 10KDa (Centricon Millipore). La protéine est aliquotée et stockée à -80°C.

Les protéines sont dosées avec la technique de Bradford.

Production et purification des protéines recombinantes GST-eIF4G1 et GST-eIF4G1-Cter

Les protéines recombinantes GST-eIF4G1 et GST-eIF4G1-Cter sont surexprimée et purifiées dans les mêmes conditions que GST-Khd1. Elles sont concentrées à l'aide d'une unité de filtration de MWCO de 50KDa pour eIF4G1 et 10kDa pour eIF4G1-Cter (Centricon Millipore).

c. Transcriptions

Pour produire les ARN, les plasmides pGEM-E1 et pGEM-IRE sont linéarisés avec *EcoRI* 3-4H et traités à la protéinase K.

ARN transcrits avec $\alpha^{32}\text{P}$

1µg de matrice digérée est mise en transcription en présence de 0,5mM de mix ATP, UTP, GTP, 12µM de CTP et 25µC de ^{32}P - αCTP , 0,05µg de BSA (« Bovin Serum Albumin »), 15u de RNAGuard dans le tampon de transcription (tampon de transcription 5X : 200mM Tris pH8, 150mM MgCl₂, 50mM DTT), 2µL de T7 ARN polymérase, pendant 2H à 37°C.

Les ARN sont purifiés sur un gel dénaturant 8M urée, 6% AA-bis (19 :1), 1X TBE, puis extraits dans la solution d'extraction (0,2% SDS, 0,3M NaOAc) sur la nuit. Après avoir été précipités avec l'éthanol, ils sont purifiés sur une colonne de G-25 (roche) et dosés au compteur Beta.

ARN non-marqués (froids)

10µg de matrice sont mis en transcription avec 3mM de ATP, UTP, GTP, CTP, 0,5u/µL de RNAGuard, 2µL de T7 ARN polymérase dans le tampon de transcription (Tampon de transcription 5X : 400mM HEPES pH 7.5, 60mM MgCl₂, 10mM spermidine, 200mM DTT) pendant 2h à 37°C.

La matrice ADN est digérée avec la *DNaseI* et les ARN sont extraits avec du PCI puis précipités. Ils sont purifiés avec une colonne de G-25 avant d'être dosés.

d. Phosphorylation de la protéine recombinante GST-Khd1

La protéine recombinante GST-Khd1 purifiée est phosphorylée dans le tampon de phosphorylation (50mM Tris pH 7.5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT) avec la kinase caséine de rat CKI (NEB) en présence de 200µM ATP, 30min à 30°C. La protéine recombinante non phosphorylée utilisée comme contrôle est traitée dans les mêmes conditions en l'absence d'ATP.

e. Protocole du retard sur gel

Les ARN dosés au compteur Beta sont dilués dans le tampon « Binding » (10mM Hépès pH 7.4, 150mM KCl, 1mM DTT, 5mM MgCl₂, 4% glycérol) à 10000cpm par 10µL. Ils sont chauffés 2min à 85°C et laissés 10min à la température de la pièce puis sur glace.

Les protéines sont diluées dans le même tampon.

Pour le complexe, 10µL d'ARN et 10µL de chaque dilution de protéine sont incubés 30min à 4°C. Puis 2µL d'héparine (10mg/mL) sont ajoutés pour diminuer les interactions non-spécifiques, le complexe est incubé 10min supplémentaires à 4°C.

Pour les gels d'interaction de GST-Khd1, GST-eIF4G et GST-eIF4G1-Cter avec l'élément E1, 10 à 50ng d'ARN de transfert d'*E.coli* sont ajoutés dans le tube de la réaction avec les protéines avant d'ajouter les ARN d'intérêt.

Pour les gels de compétitions, les ARN froids sont ajoutés avant la protéine et incubés avec celle-ci pendant 5min sur glace.

Les complexes sont analysés sur un gel natif de polyacrylamide à 4% (29:1), TBE 0,5X, à 4°C.

Après une pré-migration de 30min, les échantillons sont déposés et laissés pour une migration de 4H à 120V à 4°C. Le gel est séché 2H et exposé sur la nuit avec un film d'autoradiographie à -80°C.

3. « Pulldown » de Khd1-His avec GST-eIF4G

a. Constructions

La protéine fusion GST-Khd1-His

La séquence codant pour la protéine Khd1 (acides aminés 1-381) en fusion avec six histidines est clonée entre les sites *XhoI* et *EcoRI* dans le plasmide pGEX-5X-3. La protéine exprimée est en fusion avec la GST en N-terminale et l'étiquette de six histidines en C-terminal.

La protéine fusion GST-eIF4G1

La construction utilisée est la même que pour les études de retard sur gel (voir p.97).

b. Production des protéines recombinantes

Production de GST-eIF4G

1L de GST-eIF4G est exprimé comme dans le paragraphe précédent (voir p.97). Les bactéries sont récoltées et reprises dans 10mL de PBS, aliquotées par fractions de 2mL puis stockées à -80°C.

Production et purification de Khd1-HIS

La protéine GST-Khd1-His est produite dans les bactéries BL21DE3 (rosetta2) transformées par le plasmide pGEX5X-3-Khd1HIS dans du milieu LB. 500mL de culture à une $DO_{600nm}=0,8$ sont induits pendant 3H à 30°C avec 1mM IPTG à 37°C. Les bactéries sont reprises dans 30mL de tampon de lyse (PBS, 0,1%triton, cocktail d'antiprotéases, 1M NaCl, 1mg/mL lysozyme) et incubées 10min sur glace. Les bactéries sont ultrasoniquées 5 fois 30s puis centrifugées 20min à 15000 rpm à 4°C. Le surnageant est incubé avec 2mL de billes Glutathionne-sepharose 4B (GE Healthcare) sur une roue à 4°C. Les billes sont lavées avec 30mL de PBST, 30mL de PBS puis avec 15mL de tampon de clivage (1mM $CaCl_2$, 100mM NaCl, 50mM Tris pH8). La protéine est ensuite digérée sur la colonne, dans 5mL de tampon de clivage et 2 unités de facteur Xa (Pharmacia) sur la nuit (20H) à la température de la pièce.

c. « GST-pulldown »

Un culot de bactéries additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, 0,1% de tritonX100, est ultrasoniqué 5 X 10s sur glace. Le lysat est centrifugé 10min à 13000rpm, et le surnageant est récupéré puis incubé avec 120µL de billes Glutathionne-sepharose 4B (GE Healthcare) une heure sur une roue à 4°C. Les billes sont lavées avec du PBS-triton 0,1% 3 X 500µL, 1min à 3000rpm.

30µL de billes couplées à la GST-eIF4G sont utilisés pour chaque réaction d'interaction.

Les protéines retenues sur les billes sont analysées par « western-blot » avec un anticorps dirigé contre l'étiquette His₆.

Les billes sont reprises dans le tampon de charge, incubées 5min à 95°C et chargées sur un gel dénaturant SDS-PAGE. Les protéines séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose 45min, à 15V dans le tampon de transfert (25mM Tris, 195mM Glycine, 20% Méthanol).

La membrane est bloquée toute la nuit à 4°C dans du PBS-lait 5%. Après trois lavages de 15min avec 100mL PBS-tween20 (tw) 0.3%, elle est incubée 1H à la température de la pièce, avec un anticorps dirigé contre l'étiquette His₆ de souris, lavée trois fois avec 100mL de PBS-tw 0,3%, puis incubée avec l'anticorps secondaire, anti-souris couplé à la peroxydase. La membrane est lavée quatre fois avec 100mL de PBS-tw et une fois avec 100mL de PBS puis révélée avec ECL (Amersham).

4. Triple hybride chez *S. cerevisiae* et dosage de la β-galactosidase

a. Constructions

Clonage du C-terminal du facteur eIF4G1 dans le pGADT7

Le domaine C-terminal (acides aminés 850 à 952) est cloné dans le vecteur pGADT7 entre les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI (pGAD-eIF4G-Cter). La sélection de ce plasmide se fait sur un milieu privé d'uracile.

Clonage des éléments E1, E1M5, E2BD1 et E2BD2 dans le pIII-MS2-2

Les éléments de localisation sont clonés dans le plasmide pIII-MS2-2 linéarisé par le site de restriction *Sma*I. La sélection de ce plasmide se fait sur un milieu privé de Leucine.

b. Préparation de la souche YBZ1 *khd1*

Pour préparer les levures inactivées pour le gène codant pour la protéine Khd1, elles sont transformées par un fragment amplifié par PCR qui contient le gène *kanMX*. Il confère la résistance à l'Antibiotique G418. Il est intégré au génome de la levure par recombinaison et sera utilisé comme marqueur de sélection (Figure 42).

Amplification de la séquence codant pour la kanamycine par PCR

Pour que la recombinaison ait lieu sur le gène de *KHD1*, les amorces utilisées contiennent deux parties de la séquence de Khd1 fusionnées aux séquences flanquantes de la kanamycine (Figure 42). Le fragment est amplifié par PCR, avec les amorces 5'Khd1-Kan (P1) et 3'Khd1-Kan (P1). 300µL de réaction PCR avec le plasmide pUG6 qui contient la séquence de la kanamycine sont préparés.

Réaction PCR	Conditions PCR
5µL 10X buffer	1min à 98°C 1 cycle
0,5µL P1(50pmol)	
0,5µL P2 (50pmol)	1min à 98°C
1µL 25mM dNTP	1min à 50°C 40 cycles
7µL 25mM MgSO ₄	2min30 à 72°C
1µL Matrice (1µg/µL)	
0,5µL Vent	7min à 72°C 1 cycle
H ₂ O qsp 50µL	

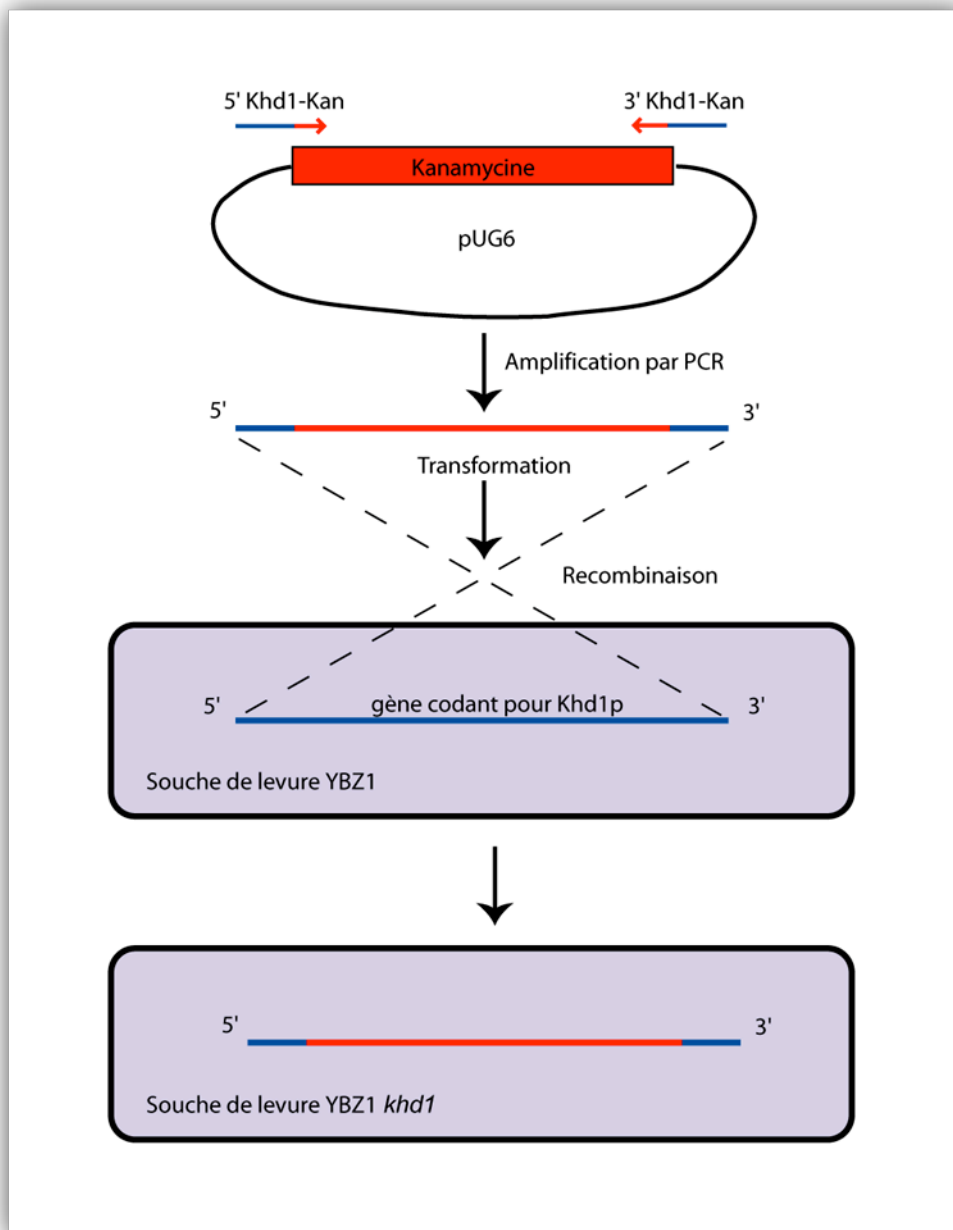


Figure 42 : Inactivation du gène codant pour la protéine Khd1 de la levure YBZ1 par recombinaison.

Préparation des levures YBZ1 compétentes

Une préculture de levures YBZ1 est lancée dans 5mL de milieu YPD. Quand la $DO_{600nm}=5$, 1mL de cette préculture est dilué dans 50 mL de YPD puis à $DO_{600nm}=0.8$, les cellules sont

centrifugées 5min à 3700rpm, lavées avec 5mL de SORB et reprises dans 350µL de SORB. Elles sont aliquotées et stockées à -80°C.

Transformation

Dans un environnement stérile, 10µL d'ADN de sperme de saumon sont dénaturés 5-10min à 95°C, puis refroidis sur glace 2min. Le fragment PCR purifié avec Qiaquick gel extraction (Qiagen) est ajouté à 50µL de levures compétentes et 6 volumes de solution PEG (300µL). L'ensemble est incubé 30min à 30°C sous agitation.

40µL de DMSO sont ajoutés puis les levures sont incubées 1 min à 42°C.

800µl d'eau stérile sont ajoutés, les levures sont récoltées et reprises dans 800µl de YPD et incubées 2-3H à 30°C.

La transformation est étalée sur une boîte de Pétri de milieu gélosé YPD^{G418}.

Lorsque les levures ont poussé, un réplica est transféré sur une autre boîte YPD^{G418}. Pour cela elles sont imprégnées sur un tissu stérile qui est appliqué sur la nouvelles boîte de Pétri. Cette technique permet de diminuer le nombre de clones faux positifs.

La souche YBZ1 *khd1* est vérifiée après extraction des ADN génomiques qui sont analysés par réaction de PCR.

Extraction des ADN génomiques

Plusieurs clones sont mis en préculture dans 5mL de milieu YPD, sur la nuit à 30°C sous agitation. Les levures sont récoltées, reprises dans 500µL de solution sorbitol (0,9M sorbitol, 0,1M Tris pH8, 0,1M EDTA) puis additionnées de 50µL de zymolase (6µL de lytiase (1000u/µL) + 294µL de solution sorbitol), 50µL de solution 2-ME (19,6µL de beta-mercaptoéthanol dans 1mL d'eau). Les levures sont centrifugées et reprises dans 500µL de tampon (50mM Tris pH8, 20mM EDTA) + 50µL de 10% SDS et incubés 20min à 65°C, additionnées de 200µL de KOAc 5M et laissés sur glace 30min. Le mélange est centrifugé 3min à 13000 rpm pour garder le surnageant qui est précipité avec 1 mL d'EtOH absolu.

Le culot sec est repris dans 300µL de TE (10mM Tris pH 8, 10mM EDTA pH8), 20min à 65°C puis traité avec 50µL de RNase A (1mg/ml) et précipité à l'isopropanol. Le culot est alors repris dans 150µL de TE, extrait par PCI et précipité avec éthanol absolu et NaOAc 3M puis repris dans 60µL d'eau.

Les ADN génomiques sont utilisés pour amplifier par PCR la séquence de kanamycine flanquée des parties restantes de la séquence de Khd1. Les amorces utilisées sont 5'Khd1 et 3'Khd1 situées aux extrémités de la séquence génomique de la protéine Khd1.

Réaction PCR	Conditions PCR	
10µL 10X buffer	1min à 98°C	1 cycle
1µL P1(50pmol/µL)		
1µL P2 (50pmol/µL)	1min à 98°C	
2µL 25mM dNTP	1min à 55°C	40 cycles
4µL 100mM MgSO ₄	2min à 72°C	
10µL ADN génomique		
0,5µL Vent	7min à 72°C	1 cycle
H ₂ O qsp 100µL		

c. Étude de l'interaction par triple-hybride

Les souches YBZ1 et YBZ1 *khd1* sont transformées avec les plasmides pGAD-eIF4G-Cter et les différentes constructions de pIII-MS2-2.

Pour la transformation, sont ajoutés : 10µl d'ADN de sperme de saumon, 10µl de chaque plasmide, et 500µl de solution « yeast transfo buffer ». L'ensemble est vortexé puis mélangé à des levures récoltées sur un Pétri.

Le tout est laissé sur la nuit à température de la pièce.

Les levures sont étalées sur des pétri YPD^{-Leu-Ura}.

Lorsque les levures ont poussé, une colonie de chaque transformation est étalée sur un Pétri YPD^{-Leu-Ura-His}. La troisième sélection, avec l'histidine, permet de réaliser un crible positif.

Seules les levures dans lesquelles les complexes ARN-protéine sont formés vont pousser.

Dans certains cas, du 3-AT (3-amino-1, 2, 4-triazole) est ajouté au milieu gélosé.

d. Quantification de l'interaction par quantification de la β-galactosidase

5mL de préculture sont lancés dans du milieu YEP^{-Ura-Leu+Glc} sur une roue à 30°C, pendant la nuit. 2ml sont dilués dans 8 ml de milieu YPD. Lorsque la DO_{600nm}=0.5-0.8, 8mL de culture sont récoltés, additionnés de 1,5mL de Tampon Z (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄), vortexé et centrifugés.

Pour briser les levures, elles sont reprises dans 300 μ L de tampon Z, 3 gouttes de CHCl_3 et 3 gouttes de 0,1% SDS. L'ensemble est vortexé.

Pour la réaction de dosage de l'enzyme, 100 μ L de la phase supérieure sont additionnés de 700 μ L de tampon Z+2-ME (135 μ L de β -mercaptoéthanol dans 50mL de Tampon Z) et 160 μ L de tampon Z+ONPG (38mg ONPG + 9,5ml de Tampon Z), les tubes sont incubés à 30°C. Quand le mélange devient jaune, après 15H, la solution est arrêtée avec 400 μ L de Na_2CO_3 1M. Le mélange est centrifugé 10min à 13000rpm et le surnageant est dosé au spectrophotomètre pour une absorbance à une $\text{DO}_{420\text{nm}}$.

III. INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

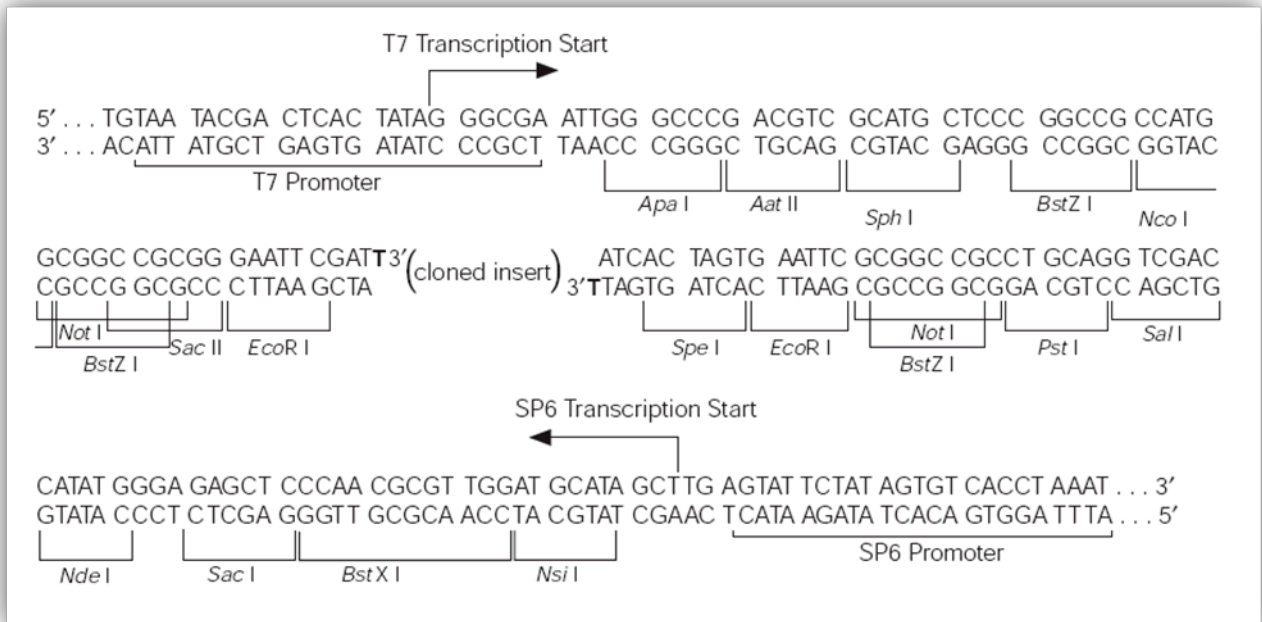
1. Synthèse des constructions utilisées

Constructions	Sujet
pET-RRMp44	RRM de la sous-unité p44 du facteur eIF3 en fusion avec une étiquette (His) ₆ en C-terminal
pGEX-4T1-Khd1	GST-Khd1p en fusion avec la GST en N-terminal
pGEX-5X3-Khd1-His	GST-Khd1-His ₆ en fusion avec la GST en N-terminal
pGEX-2T-eIF4G1	Acides aminés 1-952 du facteur eIF4G1 de levure en fusion avec la GST en N-terminal
pGEX-5X-3-eIF4G-Cter	Acides aminés 850-952 du facteur eIF4G1 de levure en fusion avec la GST en N-terminal
YEP195Lac-lacZADHII	Plasmide dans lequel sont clonées les différentes séquences de l'ARNm <i>ASH1</i> utilisées pour les immunoprécipitations avec Khd1-TAP
pBlunt-18S	ARNr 18S
pIIIA-MS2-2	Plasmide pour la construction de l'ARN fusion dans le triple-hybride
pGADT7	Plasmide pour la construction de la protéine fusion dans le triple-hybride
pGEM-E1	Plasmide pour la transcription de l'élément E1
pGEM-IRE	Plasmide pour la transcription de l'IRE
pGEM-E1M6	Plasmide pour la transcription du mutant E1M6

2. Souches de levure

Souche	Génotype
S288C-Khd1-TAP	S288C, <i>KHD1-TAP :: HIS3</i>
YBZ1	<i>MATa, ura 3-52, leu 2-3, 112, his3-200, trp1-1, ade2, LYS2:: (LezAop)-lacZ, LexA-MS2 coat (N55K)</i>
YBZ1- <i>khd1</i>	YBZ1, <i>khd1 :: KAN</i>

3. Site de clonage multiple du vecteur pGEM-Teasy



4. Tampons et milieux de culture

2YT (1 litre)	16g de Tryptone 10g de yeast extract 5g NaCl
LB (1 litre)	10g de Tryptone 5g de yeast extract 10g NaCl
PBS (1 litre)	80g NaCl 2g KCl 14,4g Na ₂ HPO ₄ 2,4g KH ₂ PO ₄

TBE (1 litre)	108g de Tris 55g d'acide borique 40mL de 0,5N EDTA
YEP	1% Bacto yeast extract (10g) 2% Bacto peptone (20g)
YPD	YEP + 2 % Dextrose (glucose)
Yeast transfo buffer	40,5% PEG (3350) 100mM LiOAc 10mM Tris-HCl pH 7.5 1mM EDTA

RÉSULTATS

I. ÉTUDE D'UNE INTERACTION PUTATIVE ENTRE LE FACTEUR EUCARYOTE D'INITIATION DE LA TRADUCTION 3 ET LA SOUS-UNITÉ RIBOSOMIQUE 40S

1. Clonage, expression et purification du RRM de la sous-unité p44 du facteur eIF3

a. Analyse de la séquence de la sous-unité p44 du facteur eIF3

La sous-unité eIF3p44/g est une protéine de 320 acides aminés pour une masse de 35,6 kDa (Damoc et al., 2007). Elle contient, dans sa partie C-terminale, un motif de reconnaissance de l'ARN de 73 acides aminés (Figure 43).

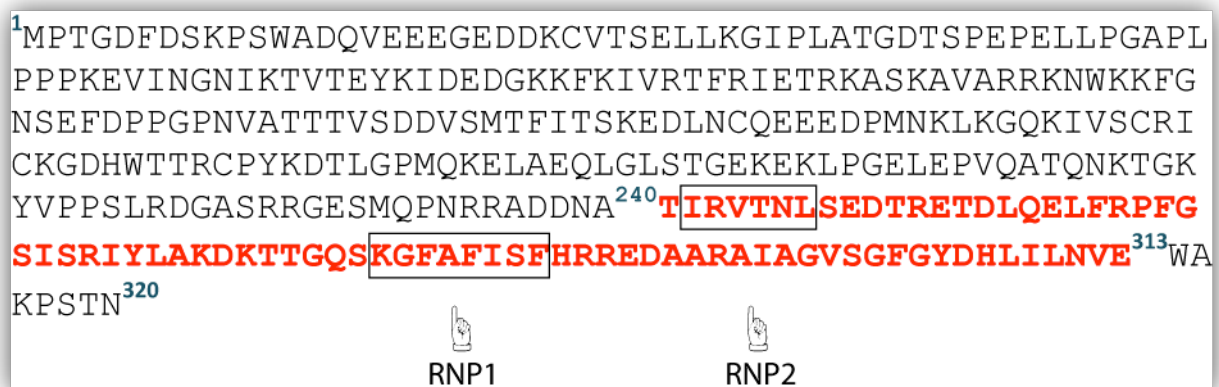


Figure 43 : Séquence en acides aminés de la protéine eIF3p44 (NP_003746)

Le domaine fonctionnel RRM est représenté par l'ensemble des lettres rouges. Les deux étiquettes caractéristiques de ce domaine RNP2 et RNP1 sont encadrées.

Le Motif de Reconnaissance de l'ARN est partagé chez un grand nombre de protéines ligands d'ARN comme les protéines snRNP (« small nuclear ribonucleoprotein ») impliquées dans l'épissage ou hnRNP (« heterogenous nuclear ribonucleoprotein ») impliquées entre autres dans le transport nucléaire des ARNm. Les structures tridimensionnelles de plusieurs RRM ont été résolues par cristallographie et RMN (Résonance magnétique nucléaire). Leur structure secondaire se présente généralement sous la forme de quatre feuillets β contenant les signatures RNP-1 et RNP-2 et de deux hélices α . L'agencement se fait dans l'ordre **β 1- α 1- β 2- β 3- α 2- β 4**.

D'après les résultats d'alignement de séquences (Blast effectué contre la banque « Swissprot »), la sous-unité p44 du facteur eIF3 contient un domaine RRM. Il est situé dans la partie C-terminale de la protéine (acides aminés 240-317). La séquence en acides aminés prédit

une structure secondaire de la forme $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$. Au sein des feuillets β sont présents les motifs RNP-2 et RNP-1 caractéristiques des RRM.

Ces protéines sont parmi les premiers résultats de Blast du RRMp44 contre la banque « Swissprot ». Le RRMp44 montre une homologie substantielle avec ces RRM bien caractérisés fonctionnellement et structurellement.

J'ai aligné la séquence du RRMp44 avec celles des RRM des protéines suivantes (Figure 44) :

- eIF3p33 (TIF 35) l'homologue de p44 chez *S. cerevisiae*,
- *sxl* (« Sex-lethal ») un facteur d'épissage et régulateur de la traduction impliqué dans le déterminisme sexuel chez la drosophile,
- hnRNPA1 impliquée dans le transport nucléo-cytoplasmique des ARNm,
- et U2AF facteur impliqué dans l'épissage.

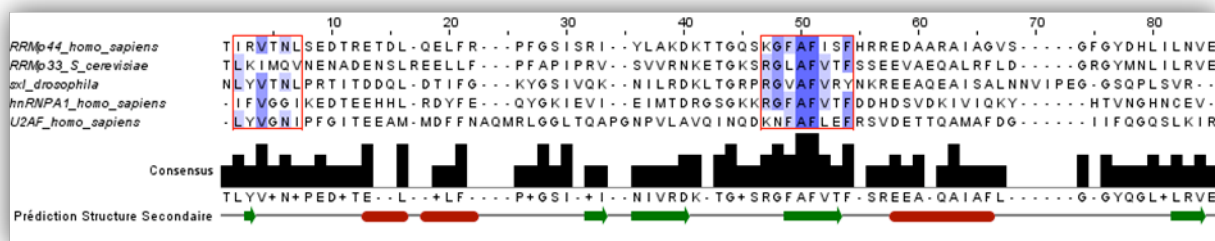


Figure 44 : Alignement de la séquence du RRMp44 avec d'autres domaines RRM déjà caractérisés.

Les motifs RNP des domaines RRM de la protéine eIF3p33 de *S. cerevisiae*, de la protéine *sxl* de *Drosophila*, des protéines humaines hnRNPA1 et U2AF, sont encadrés en rouge. La structure secondaire de ces domaines est schématiquement représentée sur la ligne du bas ; les hélices alpha sont en rouge et les feuillets beta sont en vert.

Les prédictions des structures secondaires de chacun des RRM donnent l'organisation $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$.

L'alignement de ces séquences présente les motifs RNP encadrés en rouge. Les acides aminés les plus souvent représentés sont surlignés en dégradé de bleu. Les plus foncés sont les plus conservés. Dans le domaine RNP-1, généralement le plus conservé, nous pouvons noter la présence de l'acide aminé aromatique phénylalanine (F). Cet acide aminé a un rôle prépondérant dans la reconnaissance de l'ARN. Il est presque tout le temps retrouvé à ces mêmes places dans le motif RNP-2.

- Dans la partie C-terminale, la sous-unité p44 contient une séquence caractéristique des RRM (acides aminés 240 à 317). J'ai décidé de cloner cette séquence afin d'étudier les propriétés de liaison à l'ARN de ce domaine.

b. Clonage de la séquence codante pour le RRMp44

J'ai cloné l'ADN codant pour les acides aminés 227 à 320 de la protéine eIF3p44 en fusion avec l'étiquette poly-histidine du côté C-terminal. Cette séquence qui contient le RRM identifié précédemment (acides aminés 240 à 313) est clonée à partir de l'ARN total purifié de cellules Namalwa (Figure 45). Les lignées cellulaires Namalwa sont des lymphocytes B issus d'une tumeur de Burkitt africaine qui comporte deux copies du virus EBV intégrées au génome.

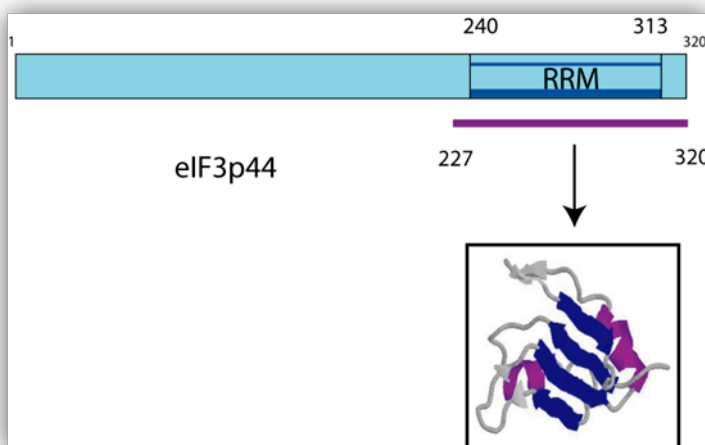


Figure 45 : Schéma de la séquence protéique eIF3p44 avec son RRM
Le RRM est situé dans la partie C-terminale (240-313). La partie clonée contient les acides aminés 227 à 320.

c. Purification de la protéine recombinante RRMp44-His

La protéine recombinante a été exprimée dans les bactéries *E. coli* BL21DE3 transformées par le plasmide pET-RRMp44. Cette protéine est exprimée en grandes quantités dans la fraction soluble.

La protéine est purifiée par chromatographie d'affinité avec des billes de nickel dans des conditions natives. Elle est éluée pour une concentration d'imidazole de 60mM (Figure 46). Le profil d'éluion de RRMp44-His montre que toute la protéine attachée sur les billes

semble être éluée. De plus sa pureté est assez bonne. Les fractions 2, 3, 4 et 5 qui sont les plus pures sont rassemblées puis concentrées pour le criblage.

La taille de la fusion RRMp44-His est évaluée à 11772 Da (<http://ca.expasy.org/>). Sur le gel dénaturant SDS-PAGE, elle migre entre les marqueurs de poids moléculaire 6,5 kDa et 16,5 kDa.

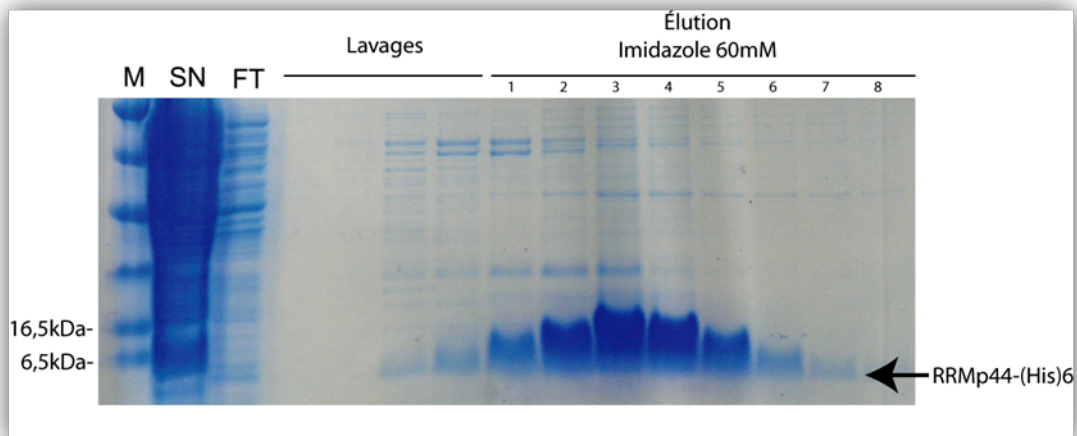


Figure 46 : Profil d'éluion de la protéine RRMp44 produite dans les bactéries *E. coli* BL21

Le surnageant (SN) est la fraction bactérienne soluble dans laquelle est retrouvée la protéine recombinante surexprimée. Elle se situe entre les marqueurs de poids moléculaire (M) de taille 6,5kDa et 16,5kDa. L'ensemble des protéines bactériennes qui ne s'accrochent pas à la colonne de billes de nickel est dans le «flow-through» (FT). Les lavages sont effectués avec des concentrations croissantes d'imidazole (10mM à 40mM). La protéine est éluée à une concentration d'imidazole de 60mM. Les fractions les plus pures sont 2, 3, 4 et 5.

Les fractions les plus pures sont utilisées pour les études d'interaction.

- ✓ La sous-unité p44 du facteur eIF3 contient un domaine caractéristique de liaison de l'ARN de type RRM
- ✓ Le RRM se situe dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 240 et 313
- ✓ La protéine recombinante RRMp44-His est soluble et peut être purifiée dans des conditions natives

2. Construction de la banque d'ARNr 18S

a. Clonage de l'ARN ribosomique 18S humain

L'ADNc de l'ARNr 18S (nucléotides 1-1737) a été obtenu par rétro-transcription d'ARN total purifié à partir de cellules HeLa (Figure 47A). Le produit d'amplification obtenu par PCR est utilisé pour préparer la banque de fragments aléatoires d'ARNr 18S.

b. Construction de la banque

Le produit PCR de 1737pb de l'ARNr 18S est digéré par la *DNAseI*. Cette enzyme coupe spécifiquement les double-brins d'ADN de façon aléatoire.

L'analyse des produits de digestion sur un gel d'agarose montre une trainée d'ADN (Figure 47A). Les fragments ont une taille majoritairement comprise entre 100 et 400 paires de bases.

Les fragments d'ADN sont clonés entre les promoteurs de transcription T7 et SP6 du vecteur pGEM-T-easy (Promega) (Figure 47B). Ce vecteur a l'avantage d'avoir une forte efficacité de ligation. En revanche, nos fragments sont clonés indistinctement dans les deux sens. Nous construisons donc une banque qui comporte des ADNc codants pour des fragments d'ARNr 18S sens mais aussi anti-sens. Cette réaction de ligation est la base de départ de la banque.

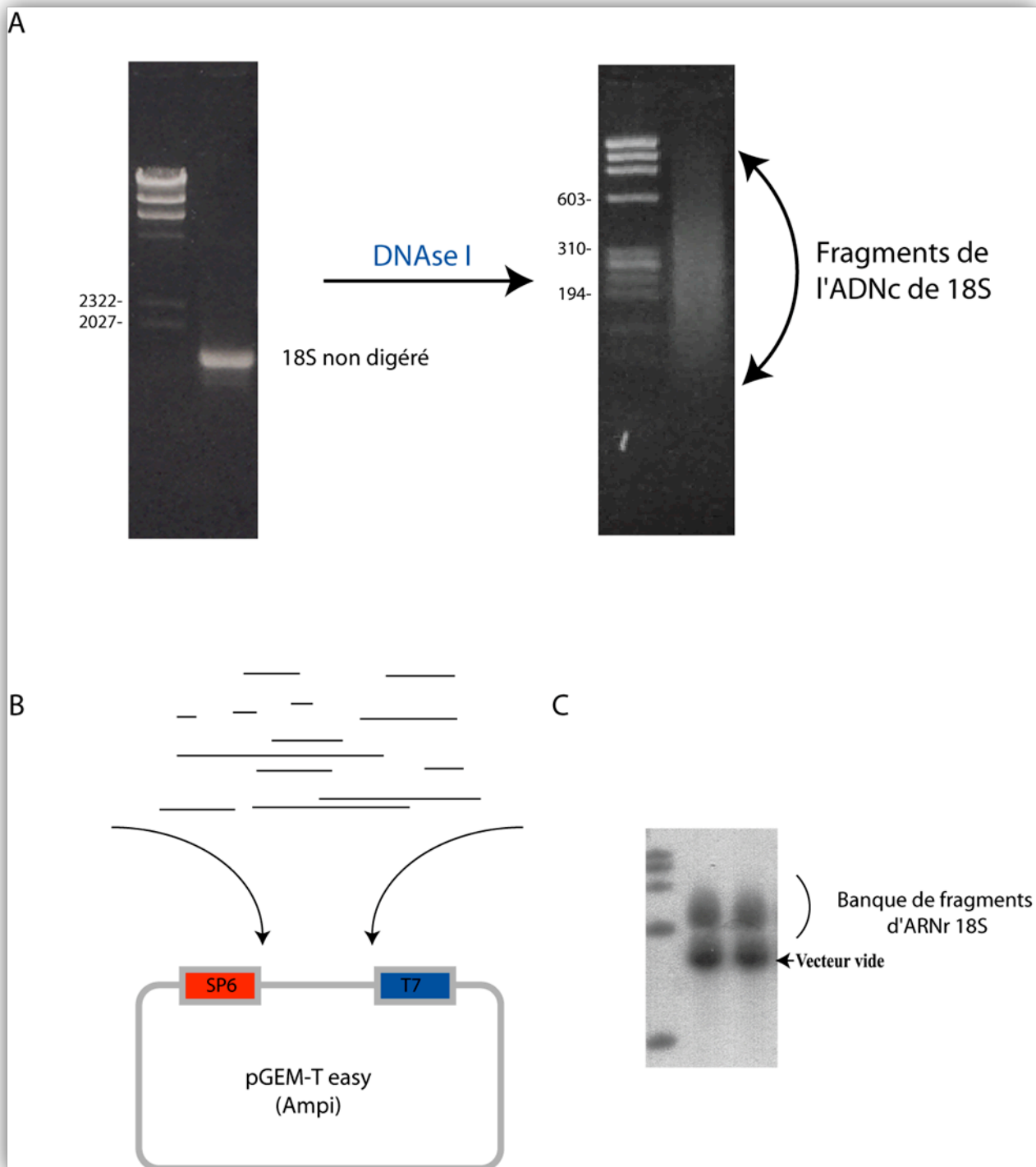


Figure 47 : Préparation de la banque de fragments de l'ARN ribosomique 18S.

(A) L'ADNc de 18S est cloné par RT-PCR. Il est amplifié par PCR puis digéré par la *DNaseI*. (B) Ces produits de digestion sont clonés entre deux promoteurs de transcription SP6 et T7 dans le vecteur pGEM-Teasy. (C) Les ARN qui possèdent un fragment de l'ARNr 18S sont purifiés sur un gel dénaturant.

La majorité des vecteurs qui se sont refermés contiennent des ADNc de la séquence de 18S, alors qu'une autre partie s'est recircularisée. En effet, dans la réaction de ligation, le vecteur est en excès pour cloner toutes les séquences. La banque est amplifiée par PCR avec les amorces qui correspondent aux promoteurs T7 et SP6. Ce produit PCR est utilisé comme matrice pour la transcription. J'ai choisi d'utiliser le promoteur T7 qui a une efficacité de transcription supérieure au promoteur SP6.

Afin de travailler avec les fragments d'ADNc de 18S d'une taille permettant de minimiser un site de potentiel de liaison de la protéine, seuls certains produits de transcription sont purifiés du gel dénaturant. Les fragments de l'ARNr de taille comprise entre 30 et 150 sont découpés du gel dénaturant et utilisés pour le criblage. En pratique, après la première transcription les ARN obtenus ont des tailles comprises entre 160nt, transcrit du contexte du vecteur pGEM vide, et 560nt qui sont les ARN issus des clones qui ont un insert de 400pb. Pour m'affranchir des ARN issus des vecteurs vides et de ceux qui sont issus des clones avec des inserts de trop grande taille, je purifie les fragments sur gel dénaturant (Figure 47C). Au cours de la purification, les ARN qui possèdent des fragments de 18S compris entre 30 et 150 paires de base (c'est-à-dire les transcrits d'une taille de 190 à 310) sont découpés. Ces ARN constituent la banque de départ pour le criblage.

- ✓ L'ARNr 18S est cloné à partir d'ADNc.
- ✓ La banque aléatoire de fragments de 18S conçue par digestion avec la *DNAseI* donne un ensemble de fragments d'une taille comprise entre 30 et 150pb.

3. SERF : Criblage de la banque de fragments de l'ARNr 18S contre le RRMp44

a. Sélection des fragments de l'ARNr 18S

Les fragments de l'ARNr 18S sont utilisés pour la sélection *in vitro* avec la protéine recombinante RRMp44.

La méthode SERF est dérivée du SELEX. Elle consiste à sélectionner au sein d'une banque de fragments d'ARN celui (ou ceux) qui ont de l'affinité pour une protéine d'intérêt. Plusieurs cycles sont effectués afin d'enrichir l'ensemble avec le (ou les) fragment (s) qui ont le plus d'affinité pour la protéine d'intérêt.

Dans mon cas, l'ARNr 18S digéré qui constitue ma banque de départ est criblé par le RRMp44 recombinant produit dans les bactéries. La protéine purifiée et les fragments d'ARN sont incubés pour permettre au complexe ribonucléoprotéique de se former. Ce complexe est filtré sur une membrane de nitrocellulose. Grâce aux propriétés de cette membrane de retenir les protéines, les ARN complexés aux protéines sont également retenus (Figure 48).

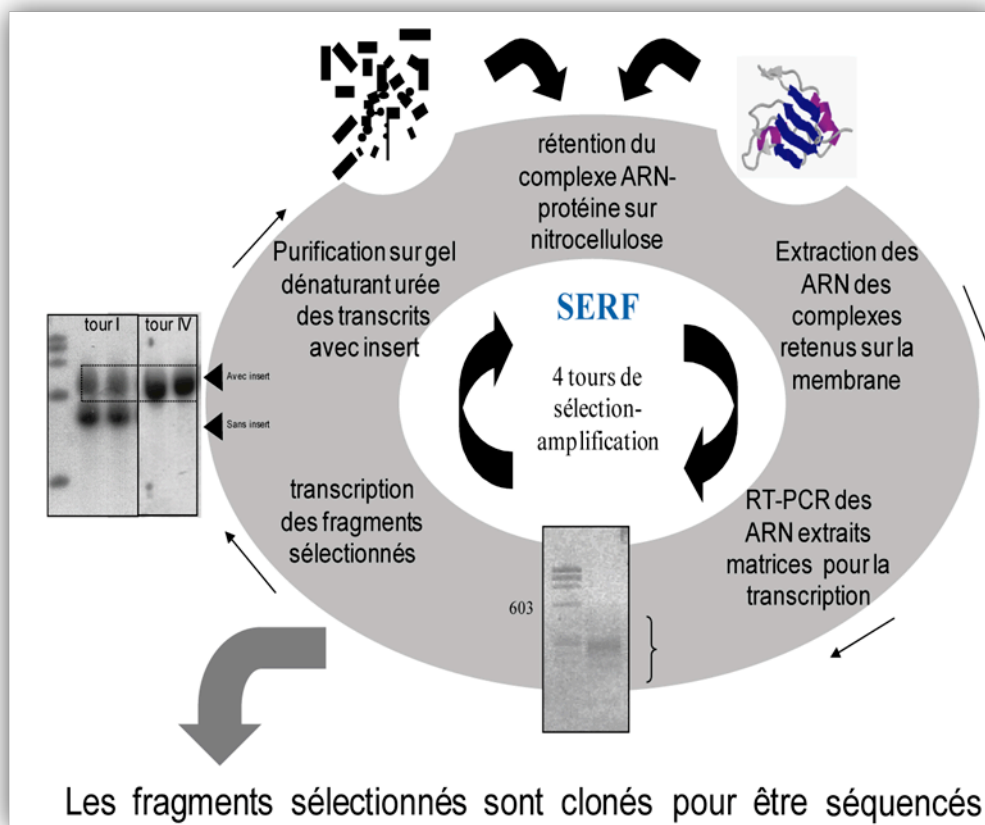


Figure 48 : Schéma d'un cycle de sélection effectué pour le criblage de la banque d'ARNr 18S par la protéine recombinante RRMp44-His

Les ARN des complexes sont extraits puis rétro-transcrits. Les ADNc obtenus sont amplifiés par PCR afin d'être utilisés comme matrice de transcription pour le tour suivant. Cette étape permet d'enrichir la banque en fragments qui ont de l'affinité pour le RRMp44.

La taille des ARN purifiés et utilisés dans les cycles de sélection varie entre 30 et 150nt (plus le contexte de 160nt). La diversité de la bibliothèque correspond au nombre de fragments différents de la banque (Figure 49). Dans le cas de l'ARNr 18S, nous sommes en présence d'un ARN d'une taille de 1800 bases et la taille moyenne des fragments (30 à 150nt) est estimée à 100nt. La complexité de la bibliothèque obtenue correspond à $6,4 \times 10^4$ fragments différents.

Les fragments qui contiennent la séquence consensus de 40 nucléotides représentent environ 0,2 % de la population initiale. Sachant que chaque tour de sélection-amplification permet d'enrichir 10 fois en consensus, la détection du site d'interaction devrait avoir lieu à l'issue du troisième ou du quatrième tour de sélection.

$$D = \frac{2n^2}{a}$$

Figure 49 : Formule de calcul de la diversité de la bibliothèque

b. Résultats du criblage

Les fragments issus des tours 3 et 4 de sélection ont été séquencés. Les résultats du séquençage sont présentés dans le Tableau 5.

La première analyse qui se dégage de cette série de séquençages est la prédominance d'une séquence composée des nucléotides 1700 à 1730 de l'ARNr 18S. Elle est retrouvée dans les 2/5^e des séquences. En revanche cette séquence est anti-sens. En effet la banque de fragments est constituée des deux séries de fragments sens et anti-sens de l'ARNr 18S.

De plus, et contre toute attente, aucune séquence sens ne semble avoir été sélectionnée et amplifiée de façon préférentielle.

J'ai alors regardé si dans ces séquences un motif se répétait. Parmi les 49 séquences, 62% contiennent un consensus de 4 nucléotides **GUAG**. Pour 77% d'entre elles, la séquence est dans un contexte **GUXGUAG**.

Aussi, une partie des séquences comporte un environnement riche en Guanosine et Cytidine.

Tableau 5 : Résultats du criblage de la banque de fragments de l'ARN ribosomique 18S contre le RRM de la protéine eIF3p44.

Voir explications dans le texte.

Clone	Séquence		Orientation	
>4-65	UACCGGUUGAUCCUGCCAGUAGCAUAUGCUUGUCUCAAAGAUAAAGCCAUAGCAUG	1-56	sens	Groupe 2
>4-116	UACCGGUUGAUCCUGCCAGUAGCAUUCUUCUCAAAGAUAAAGCCAUAGCAUGA	1-52	sens	
>4-138	UACCGGUUGAUCCUGCCAGUAGCAUAUGCUUCUCAAAGAUAAAGCCAUAGCAUGCA	1-59	sens	
>4-158	GGCGUGACCCCUUCGCGGGGGGAUGCGUGA	184-201	sens	Groupe 3
>3-22	UGGUCCGCCGCGAGGCGAGCCACCCGCCGUCCCG	704-737	sens	
>4-60	CGAUCAGAUACCGUCGUAGUCCGACCAUAAACGAUGCCGAC	1053-1094	sens	Groupe 4
>4-61	AGAUACCGUCGUAGUCCGACCAUAAACGAUGCC	1058-1091	sens	
>3-16	CGACCAUAAACGAUGCCGACCGGCGAUGCGGCGGCUAAUUC	1075-1116	sens	Groupe 4
>4-19	UGCGAUGCGGCGGCUAAUUCGAUGCCGCGG	1096-1130	sens	
>4-26	GGCGAUGCGGCGGCUAAUUCGAUGCCGCGG	1096-1130	sens	
>4-16	GCUAAUUUGACUCAACACGGGAAACCCUACCCCGCCGACAGGAGUAGCAGAUUGAUAA	1236-1301	sens	Groupe 1
>4-63	CGUGGUGGUGGUGCAUGGCCUUCUUAUUGUUGGAGCGAUUUG	1317-1361	sens	
>4-5	UCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGA	1703-1737	a/s	Groupe 1
>3-15	UCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUACGAAGGGCAGGACUAAAA	1678-1737	a/s	
>4-18	UCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUACGAAGGGCAGGGA	1683-1737	a/s	
>3-21	UCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUACGAAGGGCAGGGA	1683-1737	a/s	
>4-33	UCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUG	1700-1737	a/s	
>4-62	UCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUG	1698-1737	a/s	
>4-67	UCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUACGAAGGGCAGGACUUA	1679-1737	a/s	
>4-68	UCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUG	1700-1737	a/s	
>4-20	ACUAAACCAUCCAUCNCUAUGAGCGACGGCGGUGUGA	1698-1735	a/s	
>4-75	CUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUGUA	1696-1734	a/s	
>4-71	CUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUGUA	1696-1734	a/s	
>4-54	CUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUGUA	1696-1734	a/s	
>4-31	CUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUGUA	1698-1734	a/s	
>4-56	CUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUG	1698-1734	a/s	
>4-72	AACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUG	1698-1731	a/s	
>4-74	AACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUGUA	1696-1731	a/s	
>4-79	AACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUGUA	1696-1731	a/s	
>4-83	AACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUGUA	1696-1731	a/s	
>4-166	UCUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUGUA	1696-1734	a/s	
>3-21	UUCACUAAACCAUCCAUCGUAUGAGCGACGGCGGUGUACGAAGGGCAGGGA	1683-1737	a/s	
>3-5	GGCGGUGUACAAAGGGCAGGGACUAAUAAACGCAAGCUUAGCCCGCACUACUGGGAAUCCUCA	1649-1706	a/s	
>4-9	CAUCACGAAUGGGUUAACGGGUUACCCGCGCCUGCCGGCGUAGGGUAGGCACACGCUA	1545-1603	a/s	
>4-11	AGAAGUUGGGGACGCCACCGCUCGGGGGUCGCGUAAUAGUAGCAUGA	1395-1444	a/s	
>4-155	GGGGACCGCGACCCGUCGGGGUCGCGUAAUUA	1404-1437	a/s	
>4-53	GGACCGCGACCGCUCGGGGGUCGCGUAAUAGUAGCA	1397-1434	a/s	
>4-17	UGGGGUGCGCUAAUAGUUA	1400-1419	a/s	
>4-64	AAACGCUUCGGGCCCGGGGACACUAGCAUAGGAGCAUCGAGGGG	756-801	a/s	
>4-77	CAUCCAUUACAGGGCCUUGAAAGAGUCCUGUAU- UGUUUUUUUCGACUACUCCCGGGGUCGGGAGUGGGUAAUUUG-CGCGCCUCG	474-563	a/s	
>4-78	UGGUCACCAUGGUAGGCACGGCGACUACCAUCGAAAGUUGAUAGGGC	355-401	a/s	
>4-73	UGGUCACCAUGGUAGGCACGGCGACUACCAUCGAAAGUUGAUAGGGC	355-401	a/s	
>4-168	UCACCAUGGUAGGCACAGCGACUACCAUCGAAAGUUGAUAGGGCAGACGUUCGNAUG	342-398	a/s	
>4-141	UCCAUGGUAGGCACAGNGACUACCAUCGAAAGUUGAUAGGGCAGACNUUCGAAUUGNUGUCGCCGCCACGGGG	323-395	a/s	
>4-87	GGGCAGACGUUCGAAUUGGGUUCGCGCCGCCACGGGGG	321-358	a/s	
>4-129	GGGCAGACGUUCGAAUUGGGUUCGCGCCGCCACGGGGGCGUGCA	316-358	a/s	
>4-81	GAAUGGGUCGUCGCCCGCCACGGGGGCGUGCG	315-346	a/s	
>4-70	GGGGCGGUCGAUCGGCCCGAGGUUAUCUAGAGUCACCA	287-325	a/s	

Pour la suite de l'étude, j'ai choisi de m'intéresser à quatre groupes de séquences (Tableau 5).

- La séquence prédominante anti-sens pour les nucléotides 1730 à 1700. Toutes les séquences qui contiennent ces nucléotides constituent le groupe I. Le consensus GUAG est présent deux fois dans la séquence.
- Une séquence qui contient le consensus GUAG (clones 4-65, 4-116, 4-138). Le groupe II est constitué des séquences des nucléotides 1 à 59.

- Le groupe III va représenter les séquences qui ont le consensus GUXGUAG (4-60, 4-61). Les nucléotides impliqués sont 1058 à 1091.
- Enfin le groupe IV n'a aucune des séquences prédominantes (3-16, 4-19, 4-26) mais qui est riche en GC tout comme les séquences du groupe I. Ce sont les nucléotides 1075 à 1116.

- ✓ Les séquences issues du criblage du RRMp44 ont une séquence prédominante qui correspond aux nucléotides 1730 à 1700
- ✓ Malheureusement cette séquence est anti-sens de l'ARNr 18S
- ✓ Il ressort aussi un contexte riche en G et C ainsi qu'une séquence GUXGUAG

4. Analyse des fragments sélectionnés

Interaction du RRMp44 avec les fragments des groupes I, II, III et IV

Après l'analyse des résultats du criblage, j'ai choisi de tester quatre groupes pour leurs capacités d'interagir avec le RRMp44. Pour essayer de discriminer parmi ces quatre groupes celui qui aurait une affinité plus grande, je les ai transcrits en présence de ^{32}P pour faire des analyses de « retard sur gel ».

Un représentant de chaque groupe est incubé avec la protéine recombinante RRMp44-His. Les résultats de ces interactions sont observés sur le gel natif (Figure 50). Des concentrations croissantes de RRMp44 sont ajoutées aux différents clones.

Comme on peut le voir à la Figure 50, la protéine RRMp44 est capable d'interagir avec chacune des séquences des différents groupes.

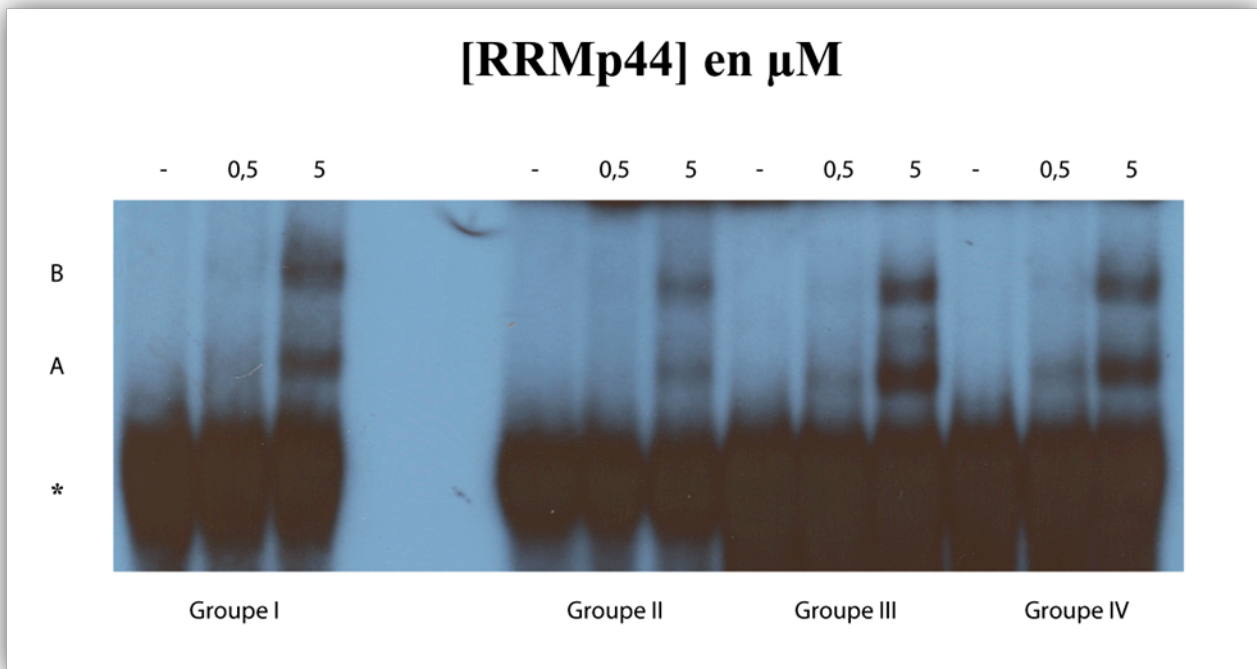


Figure 50 : gel natif des complexes du RRMp44 avec les séquences des groupes I, II, III et IV
A et B : complexes ARN-protéine formés par le RRMp44. * : ARN non lié.

Les affinités semblent sensiblement les mêmes pour ces différentes séquences. Il existe un complexe un peu plus faible avec le représentant du groupe IV. Un complexe ARN-protéine commence à apparaître pour la première concentration de protéine ($0,5\mu\text{M}$). Ce résultat nous donne un ordre de grandeur du K_D du RRMp44 pour ces ARN. Il semble supérieur à $1\mu\text{M}$.

Après l'analyse des groupes sur un gel natif, je n'ai pas réussi à identifier parmi ces clones une séquence qui aurait une meilleure affinité que les autres. Ni pour la séquence du groupe I retrouvée dans les 2/5^e des séquences, ni pour aucune séquence sens de l'ARNr 18S.

J'ai alors émis l'hypothèse que ces fragments avaient une certaine affinité même si le K_D est faible, et je les ai alors comparés à un contrôle. J'ai choisi d'utiliser le contexte dans lequel j'ai cloné mes fragments en le digérant pour avoir une taille équivalente à mes fragments de 18S. (Figure 51).

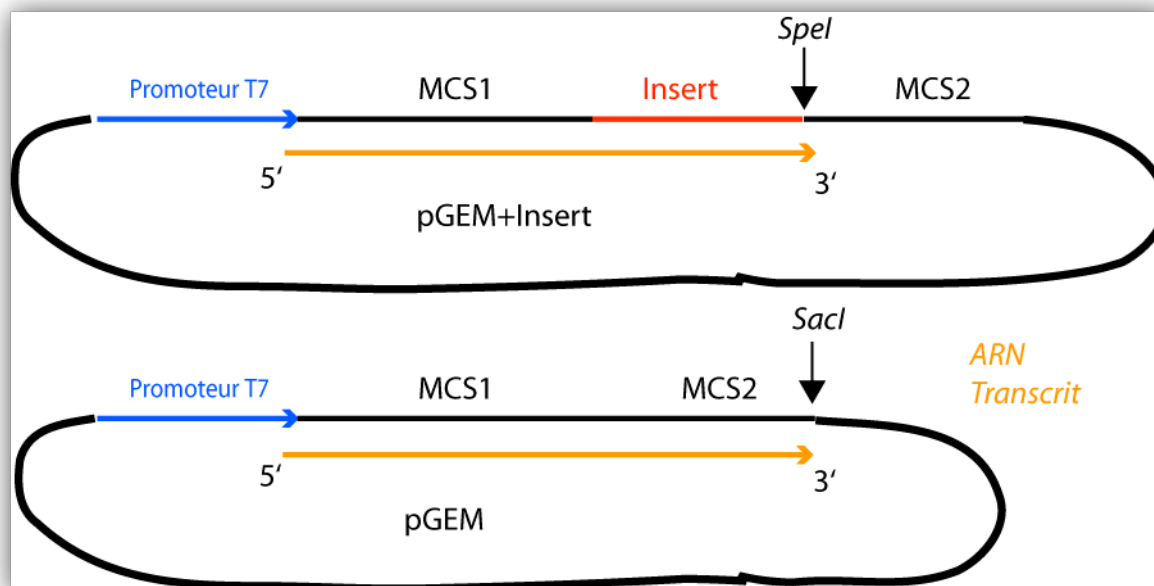


Figure 51 : Constructions des transcrits utilisés pour le retard sur gel avec le RRMp44
Le contrôle est construit sur la base du contexte du site de clonage multiple du pGEM

J'étudie les complexes entre le RRMp44, le contexte, et les ARN des groupes I, III et IV. Les complexes sont analysés sur un gel natif. Il apparaît un complexe pour chacun des transcrits (Figure 52). Le contexte montre avec RRMp44 une affinité au moins aussi bonne que celle qui existe avec les autres transcrits.

Les fragments sélectionnés ne semblent pas l'avoir été directement par leur affinité avec la protéine RRMp44.

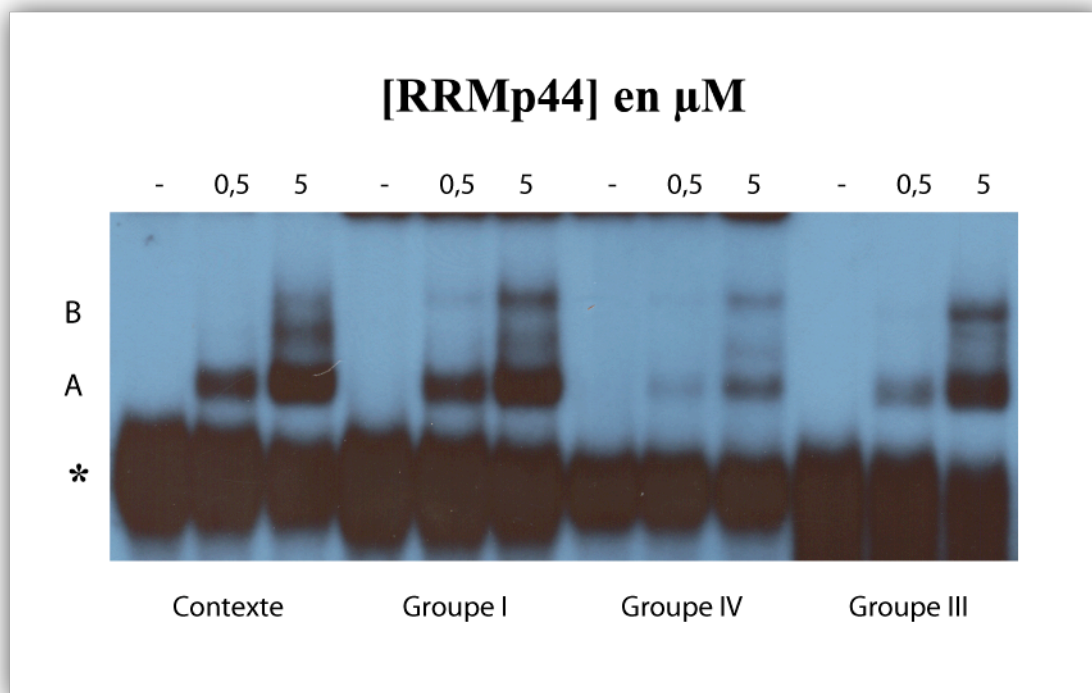


Figure 52 : Retard sur gel natif des ARN des groupes I, III et IV et du contexte de transcription
* : ARN non-lié. A et B : Complexes ARN-protéine.

Pour trouver la raison pour laquelle ces séquences ont été sélectionnées lors du criblage, j'ai testé la formation des complexes à de plus hautes concentrations de RRMp44 purifié. J'ai testé une concentration de RRMp44 allant jusqu'à $10\mu\text{M}$.

Sur les gels précédents (Figure 50 ; Figure 52), une première bande (A) présente correspond fort probablement au complexe 1:1 entre l'ARN et la protéine. Une seconde bande (B) intense apparaît pour des concentrations plus grandes. Dans l'intervalle apparaissent d'autres bandes beaucoup moins fortes peut-être dues à des protéines qui interagissent avec plusieurs ARN.

Afin de savoir si la répartition entre ces deux formes peut varier avec les plus fortes concentrations de protéine j'ai formé les complexes avec le contexte et la séquence du groupe I (Figure 53). Les concentrations allant jusqu'à $10\mu\text{M}$ ne laissent apparaître que deux types de complexes. Il semble qu'ils soient constitués d'un ARN associé à une ou deux molécules de RRMp44 (Figure 53).

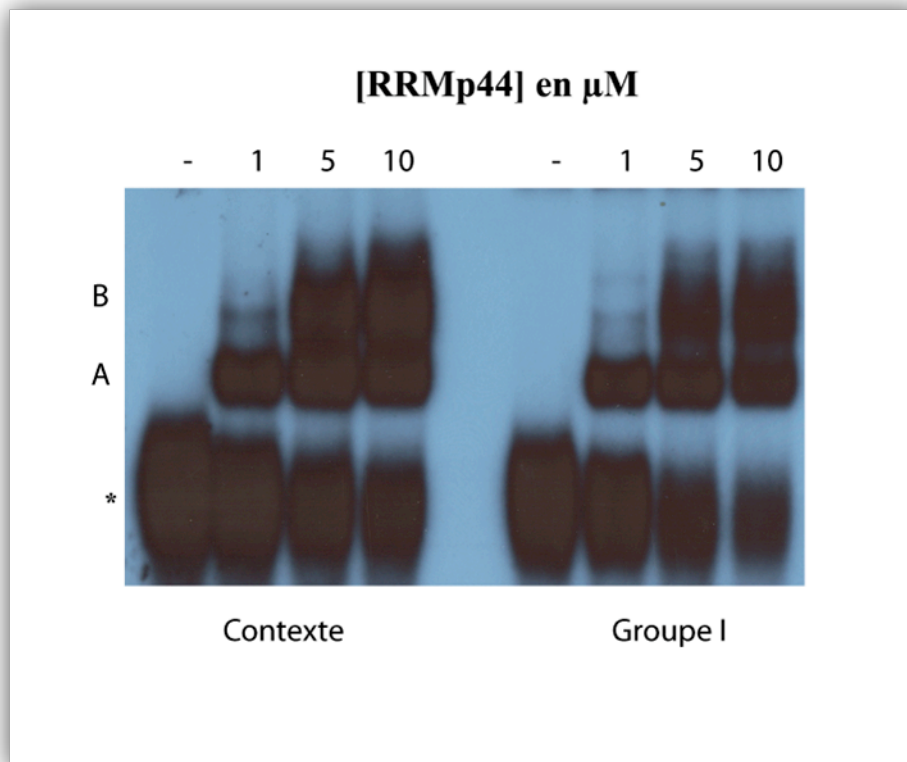


Figure 53 : Retard sur gel natif des complexes du contexte et du groupe I pour des concentrations de RRMp44 de 1 μM , 5 μM et 10 μM .

* : ARN non-lié. A et B : Complexes ARN-protéine.

- ✓ Le RRMp44 est capable d'interagir avec l'ARN
- ✓ Dans la séquence de l'ARNr 18S aucun des domaines ne semble avoir été sélectionné pour une affinité particulière pour RRMp44

5. Conclusion

Dans cette partie, j'ai présenté des travaux menés dans le cadre de l'étude de l'interaction du facteur eIF3 et de la petite sous-unité ribosomique 40S. Pour cela, j'ai cloné l'ARN ribosomique 18S d'une part et le RRM de la sous-unité eIF3p44 d'autre part.

Pour déterminer si une séquence préférentielle existait au sein de l'ARNr 18S, j'ai procédé à la construction d'une banque de fragments aléatoires à partir de sa séquence. J'ai appliqué la technique SERF pour cribler cette banque afin d'identifier les interactions putatives avec le RRMp44 exprimé et purifié dans les bactéries.

Le résultat de ce criblage m'a donné un ensemble de séquences de l'ARNr 18S constitué d'un mélange de fragments sens et d'anti-sens.

L'analyse indépendante de l'orientation m'a permis d'identifier une séquence (GUAG) retrouvée dans 62% des ARN isolés.

L'analyse de séquences qui me semblaient pertinentes par des retards sur gel m'a tout d'abord donné une information. Le RRMp44 est capable d'interagir avec l'ARN. En revanche, je n'ai pas pu déterminer parmi les séquences sélectionnées, celle dont l'affinité serait la meilleure.

***Avant-propos* AU SUJET DES TRAVAUX REALISES SUR LA REGULATION DE LA TRADUCTION DE L'ARNM ASH1 PAR LA PROTEINE KHD1.**

Les résultats des travaux réalisés à Montréal sont le fruit du travail de plusieurs étudiants. Dans cette partie de résultats, j'expose les expériences que j'ai réalisées et lorsque cela est nécessaire, je fais une brève synthèse des expériences et des résultats importants pour la compréhension du cheminement scientifique.

*Ces avant-propos se rapportent à l'article en annexe. Ils seront signalés par un astérisque **

II. ÉTUDE D'INTERACTIONS MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉES DANS LE MÉCANISME DE RÉGULATION DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION DE L'ARN MESSAGER *ASH1*

**Pour établir le rôle de Khd1p dans la régulation de la traduction de l'ARNm ASH1, l'expression de la protéine Ash1-myc endogène a été mesurée dans des souches de levure sauvage et inactivée pour Khd1p. L'expression d'Ash1-myc augmente 2,5 fois dans la souche privée de Khd1 alors que les niveaux d'ARNm restent inchangés.*

1. Interaction de Khd1p avec l'ARNm *ASH1*

a. Khd1p interagit avec E1

Pour identifier un domaine de l'ARNm *ASH1* capable d'interagir avec la protéine Khd1, j'ai effectué des immunoprécipitations de différents fragments de la séquence d'*ASH1* (Figure 54):

- 1) Nucleotides 1-846 : séquence qui englobe l'élément N
- 2) Nucleotides 598-750 : l'élément E1
- 3) Nucleotides 37-284 : une partie de l'élément N (sans E1)
- 4) Nucleotides 1221-1378 : l'élément E2BD1

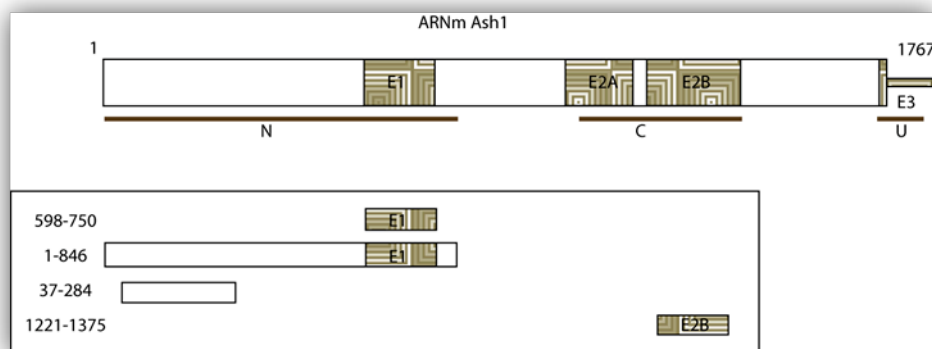


Figure 54 : Fragments utilisés pour les études d'interaction.

Les séquences utilisées pour les essais d'immunoprécipitations dans la souche *Khd1-TAP*.

Les levures qui sont utilisées dans cette expérience expriment de façon constitutive la protéine Khd1 en fusion avec une étiquette TAP (voir p.95). Elles sont transformées avec différentes constructions du plasmide YEp195 dans lequel sont clonés les fragments de l'ARNm *ASH1* sous contrôle du promoteur GAL (Figure 54). Les levures sont tout d'abord

cultivées dans un milieu qui contient du glucose. Lorsqu'elles sont arrivées en phase de croissance, elles sont diluées dans un milieu qui contient du galactose pour induire l'expression des différentes constructions d'ARN en fusion avec la séquence de LacZ.

Les protéines Khd1-TAP sont immunoprécipitées avec des billes couplées à une IgG qui reconnaît une partie de l'étiquette TAP de Khd1 : la protéine A. Les ARN qui se sont liés sont extraits pour être analysés par RT-PCR en amplifiant un fragment de la séquence LacZ.

Tableau 6 : Résultats de l'immunoprécipitation des fragments d'*ASH1* par la protéine Khd1TAP

Séquence d'Ash1	1-846	598-750	37-284	1221-1375
IP+RT	+	+	-	-
IP-RT	-	-	-	-
ARN total	+	+	+	+

Ces immunoprécipitations ont permis d'identifier l'élément E1 comme étant le site d'interaction entre Khd1p et l'ARNm *ASH1* (Tableau 6). Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Irie et al. (2002).

**Dans le but de tester cette interaction et de faire un lien direct avec la traduction, l'effet de Khd1p sur des fusions luciférase contenant les 900 premiers nucléotides d'ASH1 (incluant E1) ou des 621 premiers nucléotides (pas d'élément E1) a été testé. L'activité luciférase est mesurée dans des souches avec et sans Khd1p. En l'absence de l'élément E1, aucune différence n'est observée. En revanche il y a une augmentation de 1,8 fois lorsque l'élément E1 est présent dans la construction, en présence de Khd1p.*

La protéine Khd1 interagit avec l'ARNm *ASH1* au niveau de l'élément E1. Contrairement à de nombreuses protéines de sa classe, Khd1p ne semble pas interagir avec la partie 3'UTR de l'ARNm. Généralement ces séquences contiennent des éléments régulateurs. Dans le cas de la protéine ZBP-1, elle se lie à la partie 3'UTR de l'ARNm de β -actine pour réguler sa localisation aux lamellipodes de la cellule, ce qui permet à la cellule d'être polarisée ainsi que sa motilité (Farina et al., 2003; Kislauskis et al., 1993).

b. L'interaction entre Khd1p et l'élément E1 est directe *in vitro*

Pour confirmer *in vitro* qu'une interaction directe est possible entre Khd1p et l'élément E1, j'ai effectué des essais de retard sur gel en conditions natives entre la protéine recombinante GST-Khd1 et l'élément E1 transcrit *in vitro* (Figure 55).

Lorsque des quantités croissantes de protéine sont ajoutées à l'ARN, un complexe est observé entre *Khd1p* et l'ARN E1. Pour les concentrations les plus élevées, des bandes supplémentaires apparaissent. Elles sont probablement dues à la dimérisation de la protéine. Les domaines KH sont en effet connus pour leur aptitude à former des dimères (Ramos et al., 2002). L'interaction de *Khd1p* avec l'ARN E1 forme un complexe spécifique. Dans les mêmes conditions que pour l'ARN E1, l'élément IRE utilisé comme contrôle négatif ne montre que très peu de complexe avec la protéine.

Afin de vérifier sur le gel si le complexe observé est dû à l'interaction de la protéine avec l'ARN marqué, j'ai effectué des compétitions avec l'élément E1 transcrit *in vitro* froid (Figure 55). Lorsque des quantités croissantes d'ARN froid sont ajoutées, le complexe disparaît peu à peu.

Ces résultats montrent donc que l'interaction entre *Khd1p* et E1 est directe.

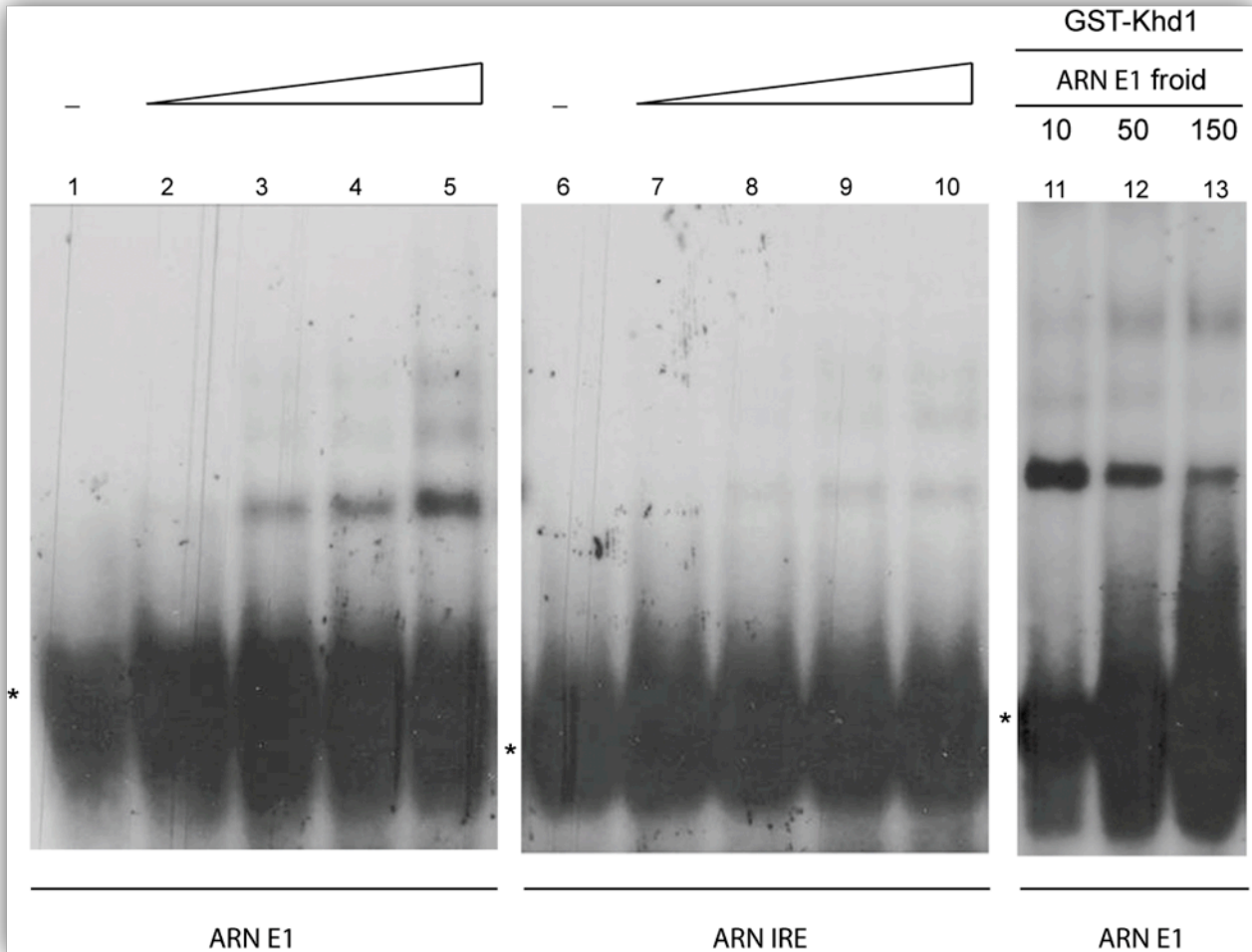


Figure 55 : Retard sur gel natif de l'élément E1 avec GST-Khd1.

Des quantités croissantes de GST-Khd1p (0, 0,3, 0,64, 1,6 et 3,2 μ M pour les lignes 1-5 et pour les lignes 6-10 ; 9,6 μ M pour les lignes 11-13) sont ajoutées aux ARN. L'astérisque indique l'ARN non complexé. Les compétitions des complexes GST-Khd1-E1 sont réalisées avec des excès de l'élément E1 froid (10X, 50X et 150X ; lignes 11-13)

c. L'interaction de Khd1p avec l'élément E1 est spécifique

Afin de m'assurer de la spécificité de l'interaction entre l'élément E1 et la protéine Khd1, j'ai effectué d'autres compétitions. Les ARN E1 et IRE froids sont utilisés pour observer leur effet sur le complexe formé par l'ARN E1 et Khd1p (Figure 56).

Des quantités croissantes de l'élément E1 froid ou de l'IRE froid sont ajoutées à la réaction. Pour la compétition avec E1 froid, dès la première condition (40 fois) la moitié du complexe avec l'ARN E1 disparaît. Il n'est presque plus visible dès qu'il y a 100 fois plus d'ARN froid. En revanche, la compétition avec l'ARN IRE est beaucoup moins efficace. Ces résultats montrent à nouveau que l'affinité de Khd1p pour l'ARN E1 est supérieure à celle pour l'IRE.

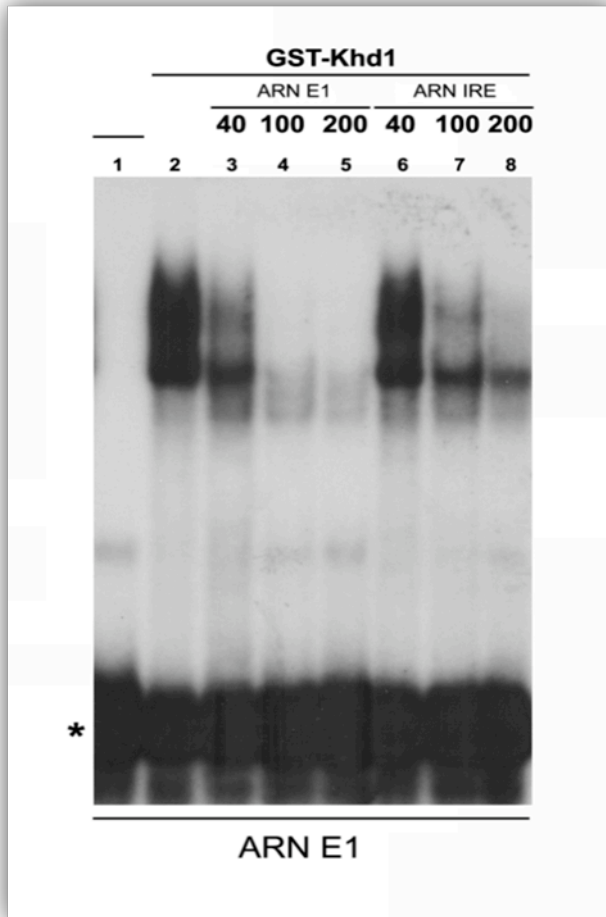


Figure 56 : Retard sur gel natif de l'élément E1 avec GST-Khd1 en compétition avec E1 et IRE froids.

L'ARN E1 seul est marqué par un astérisque (ligne 1). L'ARN E1 est en complexe avec $0,63\mu\text{M}$ de GST-Khd1 (ligne 2). Des quantités croissantes (40, 100 et 200 fois) d'ARN E1 froid sont ajoutées au même complexe E1-Khd1 que ligne 1 (lignes 3-5). Les compétitions sont également réalisées avec l'ARN IRE froid (40, 100 et 200 fois) (lignes 6-8).

d. L'interaction de *Khd1p* avec la boucle apicale

Les protéines qui possèdent des domaines KH ont beaucoup été étudiées. Elles sont connues pour interagir de préférence avec les ARN simples brins. Certaines ont une préférence pour des séquences qui possèdent l'élément UCA (Musunuru and Darnell, 2004). Une étude précédente a montré que *Khd1p* aurait une préférence pour les séquences riches en pyrimidines (Denisenko and Bomsztyk, 2002).

Nous avons remarqué que la boucle terminale de l'élément E1 était riche en pyrimidines offrant ainsi un site potentiel d'interaction avec *Khd1p*.

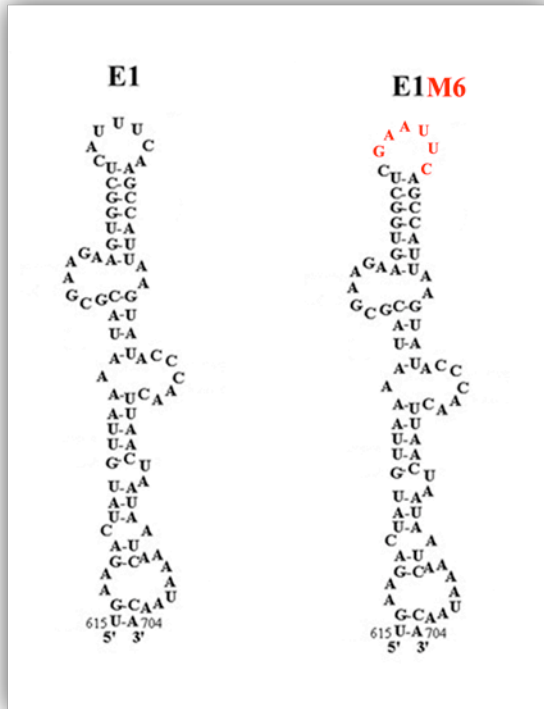
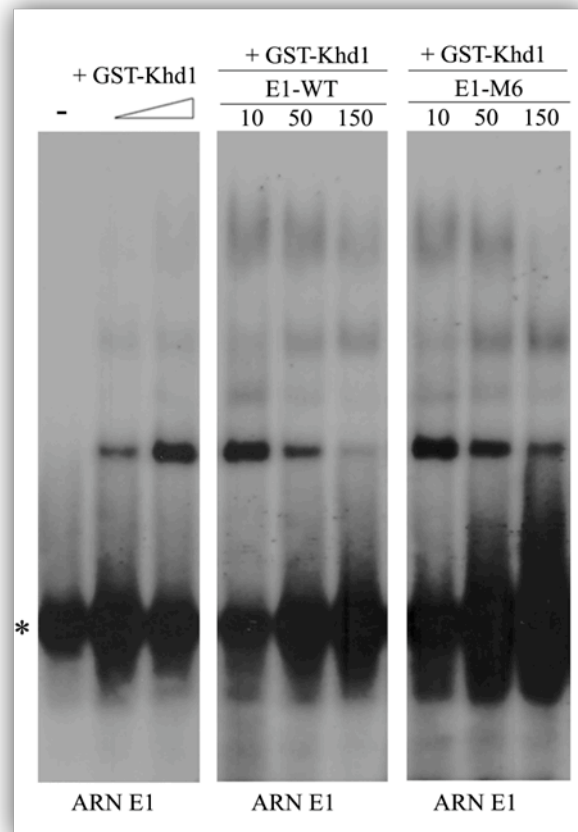


Figure 57 : Structures secondaires de l'élément E1 et du mutant E1M6.
La boucle apicale AUUUCA est mutée en GAAUUC

Figure 58 : Compétitions des complexes Khd1p-E1 par les ARN E1 et E1M6.

Des quantités croissantes de GST-Khd1p (0, 2.5, 15µg) sont ajoutées à l'élément E1 marqué. Pour les compétitions, des quantités croissantes d'E1 froid ou de E1M6 froid sont additionnés au complexe composé E1-GST-Khd1p (15µg).



Pour essayer d'identifier quelle(s) partie(s) de l'élément sont impliquées dans l'interaction avec *Khd1p*, j'ai utilisé une construction de mutant de l'élément E1. La boucle apicale AUUUCA est mutée en GAAUUC (Figure 57).

J'ai effectué des expériences de compétition du complexe *Khd1p*-E1 avec le mutant M6 (Figure 58). Sur le gel, lorsque l'ARN E1 froid est additionné à la réaction, le complexe disparaît. Lorsque la compétition est réalisée dans les mêmes conditions avec l'élément E1M6, dont la boucle apicale est mutée, la compétition est beaucoup moins efficace, ceci suggère que cette mutation affecte l'interaction *Khd1p*-E1.

- ✓ L'élément E1 (nt 598-750), situé dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1*, est l'élément de localisation lié par la protéine *Khd1*.
- ✓ *Khd1p* se lie à l'ARN E1 de façon directe.
- ✓ Cette interaction est spécifique.

**Pour découvrir l'étape de traduction ciblée par la protéine Khd1, des gradients de sucrose ont servi à isoler les différentes fractions ribosomiques pour localiser les ARNm ASH1. Dans une souche sauvage, l'ARNm ASH1 se situe majoritairement dans les monosomes. Dans une souche inactivée pour Khd1, les ARNm ASH1 se retrouvent dans la fraction de polysomes. La protéine Khd1 agirait sur l'étape de l'initiation en amont de l'assemblage des ribosomes.*

**Pour confirmer que Khd1 affecte seulement la traduction et non la localisation de l'ARNm ASH1, la distribution d'Ash1p a été observée dans une souche sauvage et dans une souche où Khd1p est inactivée. La localisation asymétrique de la protéine Ash1 passe de 80% (souche sauvage) à 40% (souche khd1). En revanche l'asymétrie de localisation de l'ARN reste inchangée.*

2. Khd1p interagit avec le domaine C-terminal du facteur canonique eIF4G1

Des études de « GST-pulldown » avec Khd1p *in vivo* ont permis d'isoler plusieurs protéines impliquées dans l'initiation de la traduction : les facteurs eIF4E, eIF4G1, eIF4G2 et Pabp1 (Gavin et al., 2006; Gavin et al., 2002).

**Des expériences de « GST-pulldown » avec une protéine recombinante GST-eIF4G et des extraits de levure qui expriment Khd1-TAP ont permis de retenir la protéine Khd1-TAP. La même expérience avec un traitement à la RNase A fait perdre l'interaction entre Khd1 et eIF4G.*

Khd1p et eIF4G interagissent *in vitro*

Pour confirmer les résultats d'interaction entre Khd1p et le facteur eIF4G *in vivo*, j'ai réalisé une expérience de « GST-pulldown » avec la protéine recombinante GST-eIF4G et la protéine Khd1 en fusion avec une étiquette de six histidines (Khd1-His). J'ajoute Khd1-His à la protéine GST-eIF4G liée sur des billes couplées à la glutathione. Après le « GST-pulldown », les protéines sont analysées par western-blot avec un anticorps anti-histidine qui

détecte la présence de Khd1-His (Figure 59). En présence de GST-eIF4G, 1/8^{ème} de la protéine se trouve en complexe avec eIF4G après 1 heure d'incubation. Khd1p n'est pas retenue avec la GST seule.

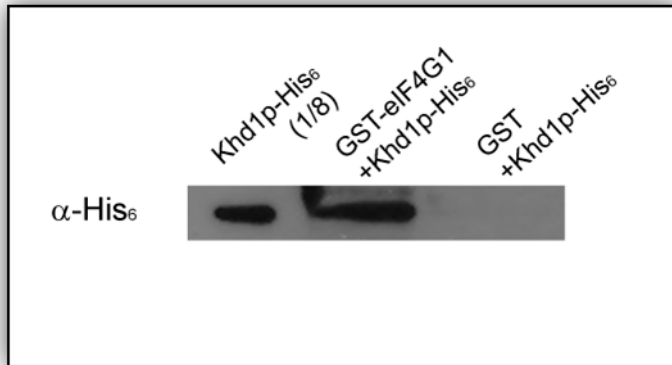


Figure 59 : Résultats des immunoprécipitations (IP) des protéines recombinantes GST-eIF4G1 et Khd1-His produites dans des bactéries.

La protéine Khd1-His est détectée par la reconnaissance d'un anti-cors anti-(His)₆. Dans le premier puits sont déposés les 1/8^{ème} de la quantité de Khd1-His de départ. Les résultats de l'IP de Khd1-His par GST-eIF4G (second puits) et la GST seule (troisième puits) sont présentés.

**Pour identifier la partie du facteur eIF4G impliquée dans l'interaction avec Khd1p, des immunoprécipitations de différentes délétions du facteur eIF4G1 ont été testées avec Khd1-Tap. Le résultat est que seules les constructions qui possèdent le domaine C-terminal du facteur eIF4G1 (acides aminés 850-952) retiennent Khd1-TAP.*

- ✓ Le facteur canonique eIF4G interagit avec Khd1p.
- ✓ Le domaine du facteur eIF4G impliqué dans l'interaction avec Khd1 est contenu dans ses 102 derniers acides aminés.

3. Le facteur eIF4G interagit avec l'élément E1 de l'ARNm *ASH1*

a. Le facteur canonique eIF4G interagit avec l'élément E1 de l'ARNm *ASH1*

Le facteur eIF4G contient dans sa partie C-terminale un domaine capable d'interagir avec l'ARN (Berset et al., 2003). Afin de déterminer si ce facteur est capable d'interagir avec l'ARNm *ASH1* par son élément E1, j'ai utilisé une construction pour exprimer le facteur eIF4G recombinant en fusion avec la GST. J'ai testé ses capacités d'interagir avec l'élément E1 transcrit *in vitro*.

Lorsque des concentrations croissantes de la protéine recombinante sont ajoutées à l'ARN E1, un complexe apparaît (Figure 60). L'interaction avec le facteur eIF4G est directe. Pour les concentrations les plus élevées, plusieurs bandes sont visibles, la protéine eIF4G qui comporte plusieurs domaines fonctionnels de liaison à l'ARN et aux protéines est certainement capable de multimériser. La même expérience est réalisée avec l'IRE et l'interaction est moins forte même si un complexe apparaît. Le facteur eIF4G semble avoir une affinité plus forte pour l'élément E1 que pour l'ARN IRE.

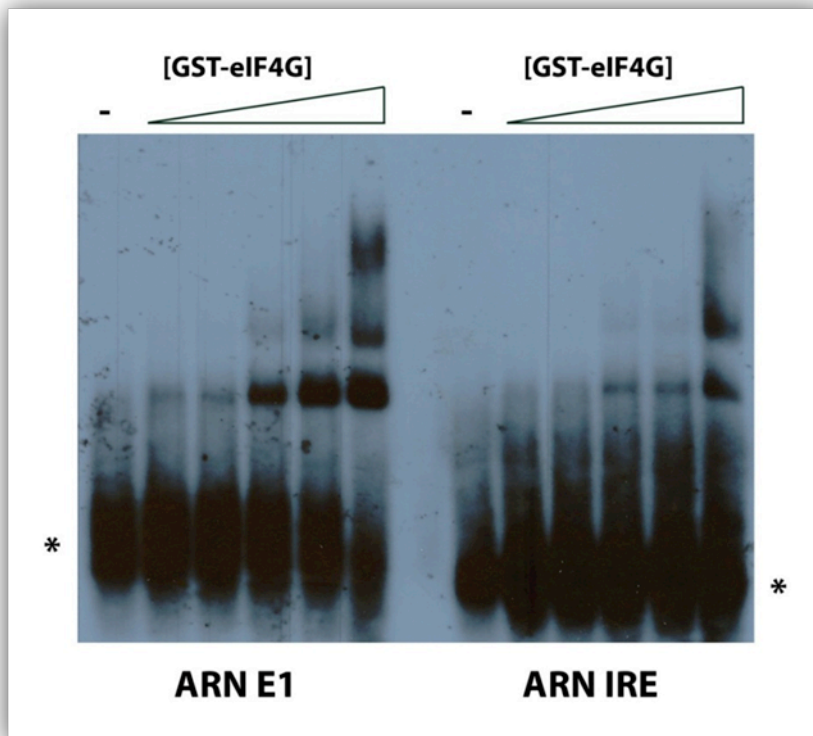


Figure 60 : Autoradiographie d'un gel natif de polyacrylamide de la protéine recombinante GSTeIF4G1 avec les ARN E1 et IRE transcrits *in vitro*.

Les ARN sont mis en présence de quantités croissantes de GSTeIF4G1 recombinante (0, 140, 280, 700, 1400, 4200 ng). L'astérisque (*) indique l'ARN non lié

b. Le domaine impliqué dans l'interaction du facteur eIF4G1 avec E1 est la partie C-terminale (acides aminés 850-952)

Le domaine C-terminal du facteur eIF4G est impliqué dans l'interaction avec *Khd1p*. Pour savoir si ce domaine (amino-acides 850-952) est aussi responsable de la liaison à l'élément E1, j'ai effectué des essais de retard sur gel de cet élément transcrit *in vitro* en présence de $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP avec le domaine C-terminal en fusion avec la GST exprimé dans les bactéries.

Après l'addition de concentrations croissantes de GST-eIF4G-Cter, le domaine C-terminal forme un complexe avec l'élément de localisation E1 (Figure 61). De la même façon que pour le facteur eIF4G1 de la pleine longueur, on observe plusieurs bandes aux plus fortes concentrations. En revanche, l'affinité semble moins bonne que pour la fusion GST-eIF4G. Dans les mêmes conditions, le domaine C-terminal semble interagir presque aussi bien avec l'ARN IRE et serait moins spécifique.

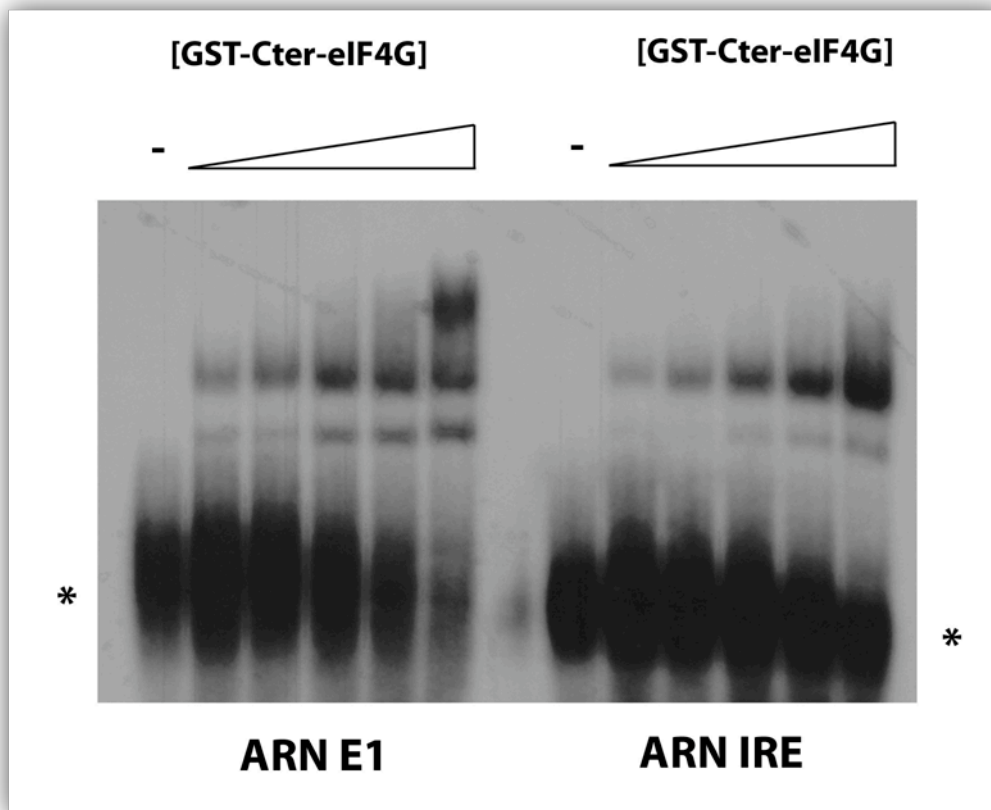


Figure 61 : Autoradiographie d'un gel natif avec la protéine recombinante eIF4G1-Cter en complexe avec l'élément E1

Les ARN sont mis en présence de concentrations croissantes de GST-eIF4G1-Cter recombinante (0, 100, 200, 500, 1000, 3000 ng). L'astérisque (*) indique l'ARN non lié.

c. Le facteur eIF4G interagit avec l'élément E1 *in vivo* et cette interaction est indépendante de *Khd1p*

Pour confirmer que l'interaction du facteur eIF4G avec l'élément E1 existe aussi *in vivo*, j'ai effectué des essais de triple hybride chez la levure *S. cerevisiae*. J'ai utilisé une construction qui contient le domaine C-terminal du facteur eIF4G1 (pGAD-eIF4G-Cter). Cette construction est utilisée comme appât. Les interactions sont testées avec des constructions de pIII-MS2-2, qui contiennent différents ARN :

- 1) L'élément E1
- 2) Le domaine 1 de l'élément E2B
- 3) Le domaine 2 de l'élément E2B
- 4) Le mutant E1M5 dont la tige liée à la boucle apicale est détruite

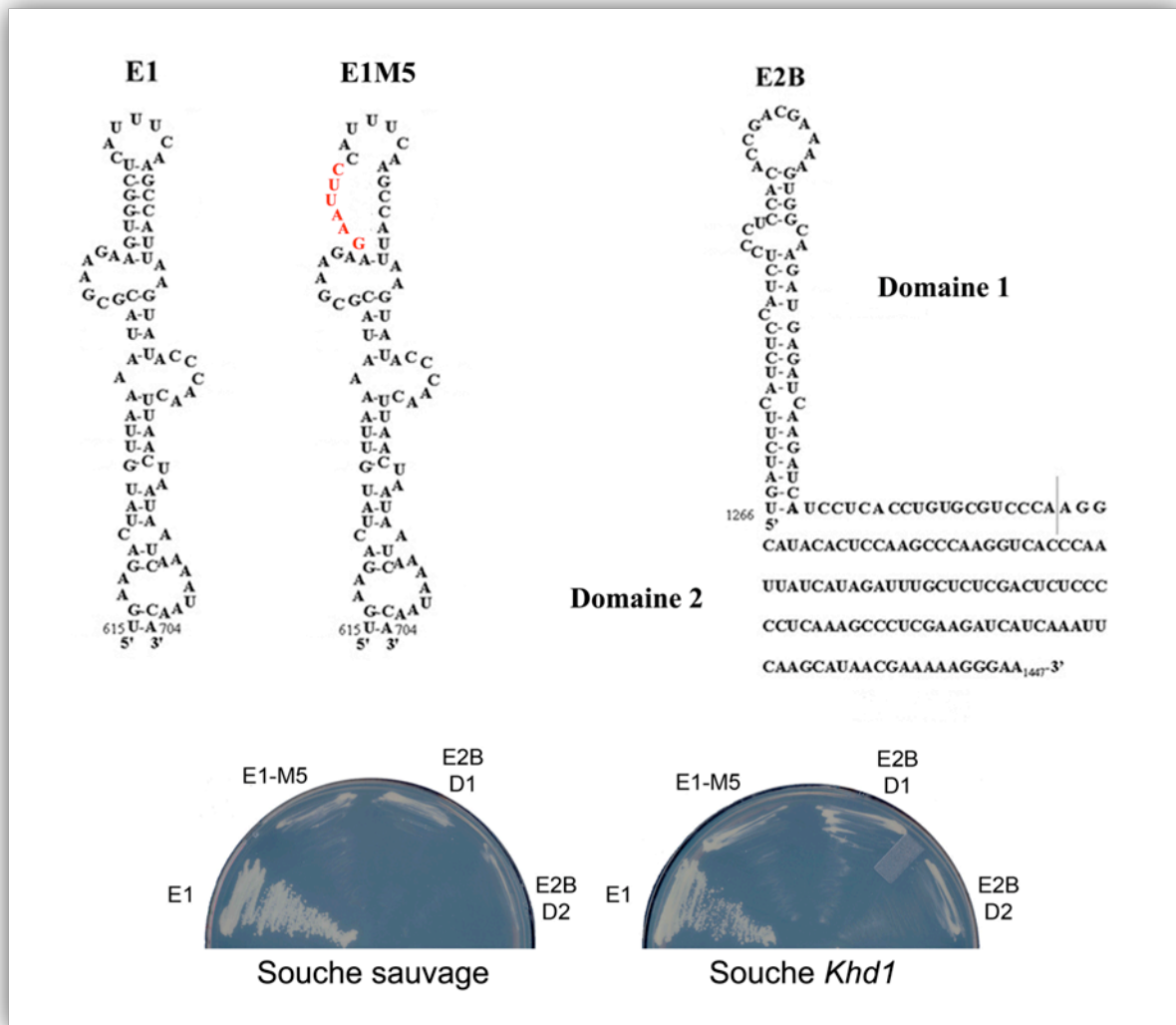


Figure 62 : Le domaine C-terminal du facteur eIF4G1 interagit *in vivo* avec l'élément E1 dans un système de triple-hybride chez la levure

Les levures YBZ1 expriment une fusion de la protéine LexA avec la protéine MS2coat. Elles sont transformées avec un plasmide exprimant une fusion du domaine C-terminal de eIF4G1 ainsi qu'un plasmide exprimant un ARN fusionné au domaine lié par la protéine MS2coat. L'interaction de la protéine et de l'ARN permettent l'activation d'un gène rapporteur (*HIS3*) et la croissance sur un milieu sans histidine.

Les essais de triple-hybride ont montré que le domaine C-terminal du facteur eIF4G1 pouvait interagir de façon spécifique avec l'élément E1 *in vivo* (Figure 62). L'expérience a aussi été réalisée avec le domaine 1 de l'élément de localisation E2B de l'ARNm *ASH1*. Comme le montre le schéma de l'élément E2B sur la Figure 62, il adopte une structure secondaire en tige-boucle analogue à celle de l'élément E1. Le résultat est négatif et l'interaction est spécifique à E1. Une autre construction avec le domaine 2 de l'élément E2B qui ne montre pas de repliement structuré a été testée. Il n'interagit pas avec le domaine C-terminal du facteur eIF4G1.

Afin d'obtenir des informations sur la partie de l'élément directement impliquée dans la liaison, un mutant de l'ARN E1, M5 (Figure 62) a été utilisé pour le comparer au sauvage. Les mutations ont pour effet de déstabiliser la tige apicale. Le résultat de cet essai montre que l'interaction avec la protéine est perdue. La mutation peut avoir comme effet d'avoir changé un (ou des) nucléotide(s) impliqué(s) dans l'interaction. Elle peut aussi avoir déstabilisé la structure secondaire en ne rendant plus accessible le site de liaison à eIF4G.

De plus, l'expérience a été répétée dans une souche inactivée pour l'expression de *Khd1*. Les résultats sont identiques à ceux observés dans une souche sauvage. Cette interaction n'est pas dépendante de *Khd1p*.

d. L'interaction entre le C-terminal du facteur eIF4G et E1 est faible

Le système de triple hybride que nous utilisons fonctionne en permettant l'expression d'un gène impliqué dans la biosynthèse de l'histidine. Les levures dans lesquelles l'interaction est produite sont sélectionnées en les cultivant sur un milieu sélectif où il manque cet acide aminé. Celles qui poussent doivent le produire en activant sa transcription.

Lorsque les interactions sont faibles, le gène *HIS3* est assez peu exprimé mais permet aux levures de pousser. En revanche si cette interaction est forte, beaucoup de gène *HIS3* est transcrit.

Il existe une substance qui inhibe l'enzyme encodée par *HIS3*, le 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole). Si les levures sont cultivées en présence de cet inhibiteur, seules celles qui expriment de grandes quantités d'histidine seront viables. Il existe une relation entre la quantité de 3-AT supportée par les levures qui peut être ajoutée et la force de l'interaction.

Pour évaluer la force de l'interaction, j'ai effectué les mêmes sélections sur des milieux contenant différentes concentrations de 3-AT (Tableau 7).

Tableau 7 : Tableau de synthèse des conditions des essais d'interactions avec le facteur eIF4G en triple-hybride

		[3-AT]=0mM	[3-AT]=0.5mM	[3-AT]=1mM	[3-AT]=5mM
Souche YBZ1 sauvage	E1	+	-	-	-
	E1M5	-	-	-	-
	E2BD1	-	-	-	-
	E2BD2	-	-	-	-
Souche YBZ1ΔKhd1	E1	+	-	-	-
	E1M5	-	-	-	-
	E2BD1	-	-	-	-
	E2BD2	-	-	-	-

Les sélections réalisées sur les milieux qui contiennent du 3-AT n'ont pas poussé, et ce également pour la concentration de 3-AT la plus faible, ce qui suggère que l'interaction est faible.

Pour évaluer de façon plus précise les intensités relatives dans différents essais de triple-hybride, la β -galactosidase exprimée est dosée. Cette enzyme est exprimée quand il existe une interaction entre l'ARN et la protéine.

Cette enzyme présente chez les bactéries catalyse la coupure de la liaison osidique présente au sein de la molécule de lactose. Elle a un autre substrat très utile pour son dosage : l'ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (o-NPG). Quand elle est clivée, cette molécule libère deux substances : le galactose et l'ortho-nitrophénol (o-NP) qui devient jaune en milieu basique (Figure 63). Il est facilement quantifié par son absorbance à 420nm.

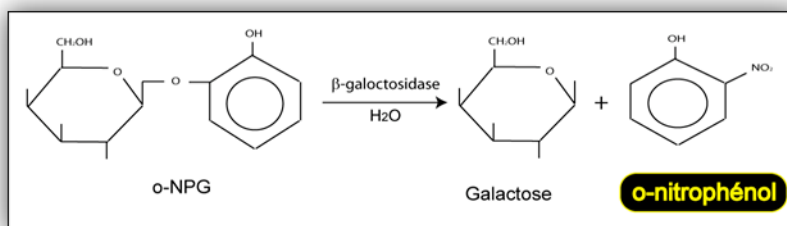


Figure 63 : Réaction catalysée par le β -galactosidase sur l'o-NPG.

La quantité d'o-NPG libérée est proportionnelle à la quantité de β -galactosidase exprimée.

La quantité d'ortho-nitrophénol libérée est proportionnelle à la β -galactosidase exprimée dans le triple-hybride, et reflète la force de l'interaction du complexe ARN-protéine.

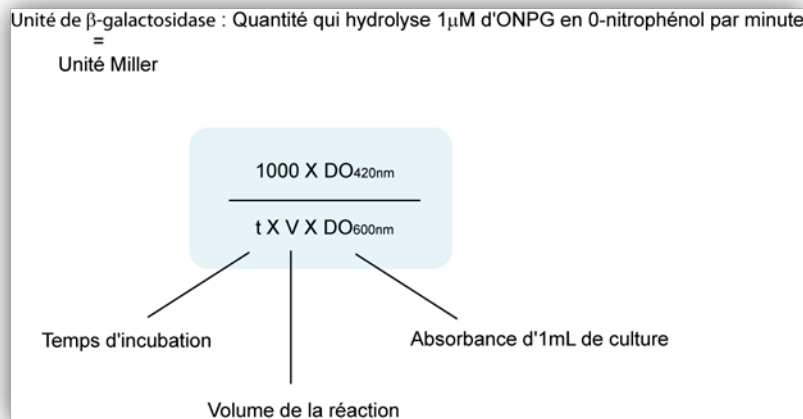


Figure 64 : L'unité Miller

Pour mesurer les forces des interactions, les levures transformées pour les études de triple hybride sont mises en culture. Lorsqu'elles ont assez poussé, les lysats sont extraits et les quantités de β -galactosidase exprimées sont dosées. Grâce à la formule de Miller (Figure 64), les unités de l'enzyme sont évaluées.

J'ai effectué ce dosage dans les souches sauvage et *khd1*. Les résultats sont concordants avec ceux des sélections sur milieu privé d'histidine (Figure 62). L'interaction du C-terminal d'eIF4G avec l'élément E1 est plus forte qu'avec les autres transcrits (Figure 65). De même, dans la souche *khd1* l'interaction avec E1 reste la plus forte.

En revanche, les valeurs absolues des unités inférieures à 0,1 unités Miller sont très faibles. Elles traduisent la présence d'une interaction faible même si celle-ci peut avoir une certaine spécificité. Pour une interaction forte, comme pour l'interaction de She2p pour l'élément E2BD1, la valeur de l'unité Miller est d'environ 250 (Olivier et al., 2005).

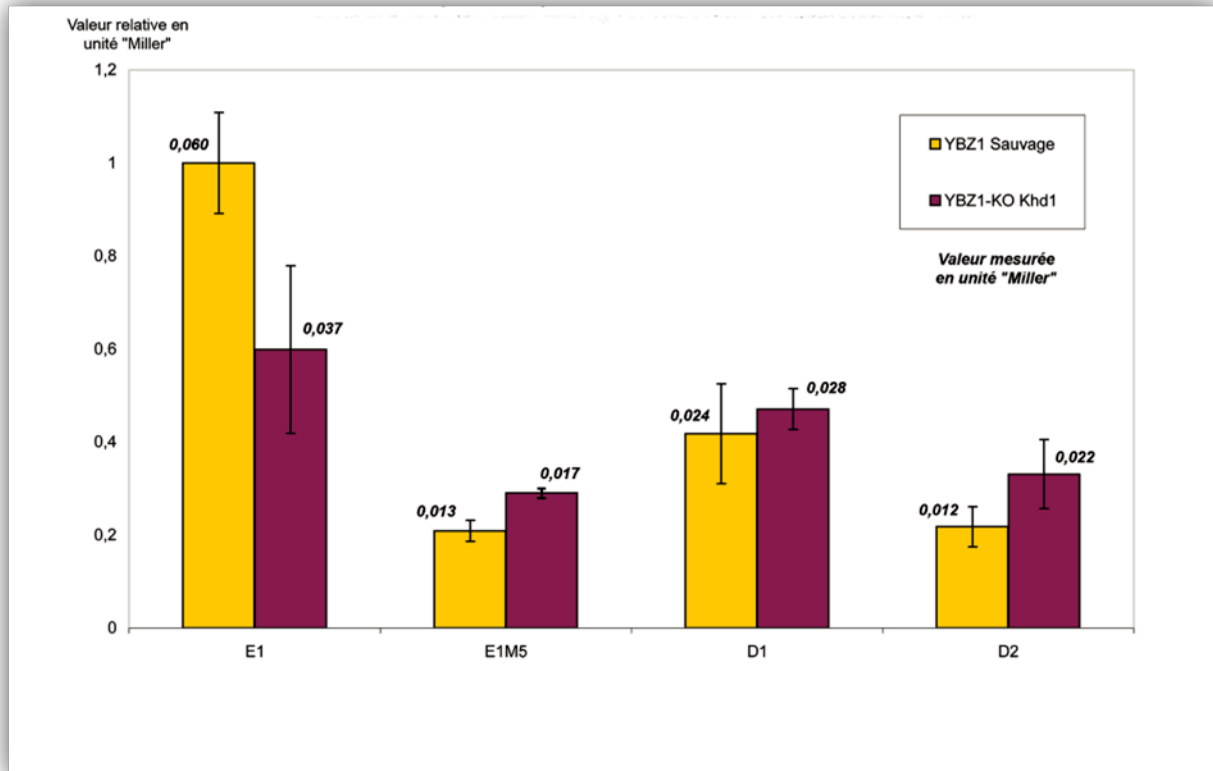


Figure 65 : Quantification de la force des interactions entre le C-terminal du facteur eIF4G1 et les ARN E1, E1M5, E2BD1 et E2BD2 en unité Miller.

L'expérience est répétée 5 fois.

- ✓ Le facteur eIF4G1 interagit avec l'élément E1
- ✓ Le domaine C-terminal (acides aminés 850-952) du facteur eIF4G est responsable de cette interaction
- ✓ La pleine longueur du facteur eIF4G semble avoir une plus forte affinité que le domaine C-terminal isolé
- ✓ Cette interaction est indépendante de *Khd1p*

4. L'interaction avec l'élément E1 est modulée par l'état de phosphorylation de Khd1p

L'hypothèse de l'activation de la traduction par des modifications post-traductionnelles a été montrée auparavant pour les protéines ZBP-1 et hnRNP K (Huttelmaier et al., 2005; Ostareck-Lederer et al., 2002). La phosphorylation de tyrosines situées à côté de leur domaine KH régule leur activité. Or la protéine Khd1, de la même façon que ces deux protéines, est pourvue de trois domaines KH (Figure 66). Son activité de répresseur pourrait être aussi modulée par phosphorylation.

**Pour savoir si Khd1p est phosphorylée dans les levures, des études de marquage métabolique ont été réalisées dans des souches qui expriment Khd1-GFP. En effet la protéine Khd1 est phosphorylée in vivo.*

Des travaux sur les kinases de levure ont identifié Khd1p comme substrat de la kinase de caséine de type 1 Yck1p (Ptacek et al., 2005).

**Khd1p est phosphorylée par Yck1p in vitro. Plusieurs sites potentiels de phosphorylation existent. Des essais de phosphorylation de différentes délétions de Khd1p ont permis de délimiter le site de phosphorylation. Ce domaine comprend les 49 derniers acides aminés et se situe en aval du dernier domaine KH.*

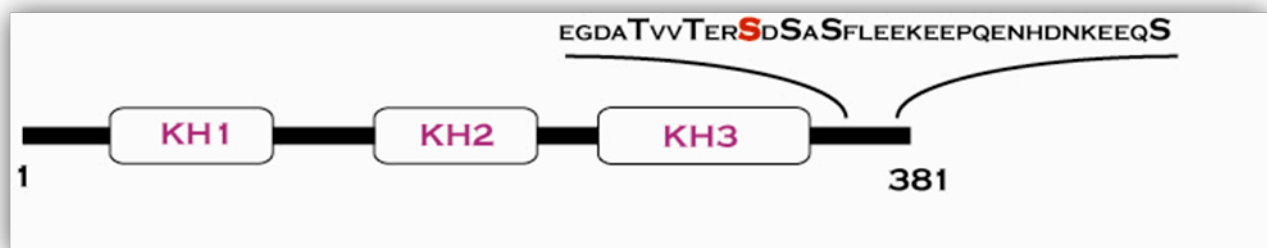


Figure 66 : Le site de phosphorylation de Khd1p se situe en aval de son troisième domaine KH

La phosphorylation de *Khd1* abolit son interaction avec l'élément E1

Dans le but de montrer l'effet de la phosphorylation de *Khd1p* sur le complexe formé avec E1, la protéine *Khd1* a été produite sous la forme recombinante GST-*Khd1* dans les bactéries. Dans cet environnement bactérien, les modifications post-traductionnelles sont inexistantes. La protéine GST-*Khd1* a été testée pour ses capacités d'interaction avec l'élément E1 avant et après sa phosphorylation (Figure 67).

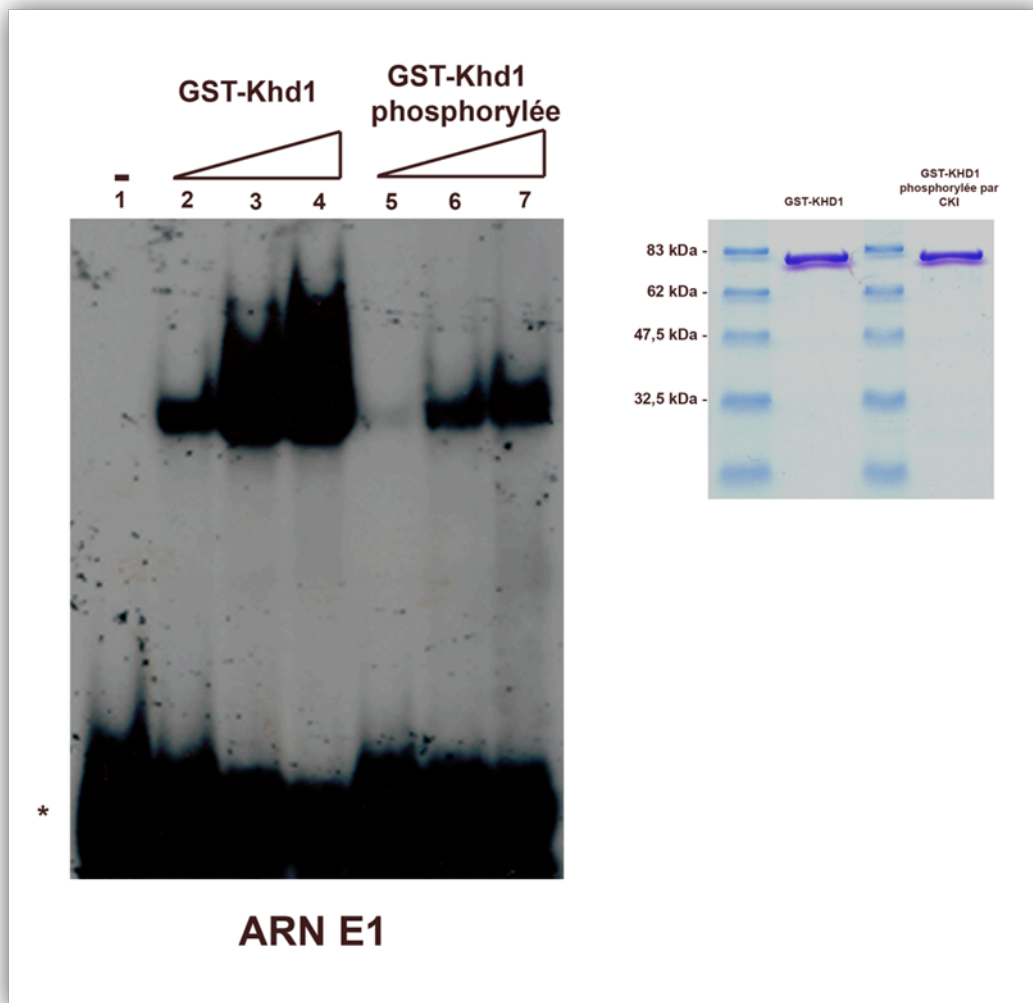


Figure 67 : Retard sur gel du complexe formé par *Khd1p* et l'élément E1 avant et après la phosphorylation de *Khd1* par la caséine Kinase de type 1 de rat.
Sur le gel SDS-PAGE, la pureté des protéines est vérifiée. Le rapport de quantité entre les protéines GST-*Khd1* et GST-*Khd1* phosphorylée est confirmé.

Lorsque des concentrations croissantes de GST-Khd1p sont ajoutées à l'élément E1, un complexe est très clairement formé. Les mêmes conditions sont utilisées avec la protéine GST-Khd1 phosphorylée : l'interaction est très diminuée.

- ✓ La phosphorylation de Khd1p par la kinase CKI diminue ses propriétés de liaison de l'ARN *in vitro*

5. Conclusion

Les travaux présentés ci-dessus entrent dans le cadre de l'étude du régulateur traductionnel Khd1p. Cette protéine est impliquée dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Cet ARNm localisé au bourgeon de la cellule fille voit son expression réprimée pendant son transport jusqu'au bourgeon.

J'ai étudié les interactions macromoléculaires impliquées dans cette régulation. J'ai tout d'abord montré que Khd1p interagit avec *ASH1* dans sa séquence codante. Elle peut lier l'élément de localisation E1 (nucléotides 595-750). Cette interaction est directe et spécifique.

Le facteur canonique eIF4G est certainement impliqué puisqu'il interagit directement avec Khd1p et avec l'élément E1. Les deux sites d'interaction sont situés dans sa séquence C-terminale.

La protéine Khd1 est impliquée dans la répression de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Mais ce mécanisme cesse lorsque Khd1p est phosphorylée par la kinase ancrée à la membrane Yck1p. J'ai montré *in vitro* que la phosphorylation de Khd1 réduit de beaucoup ses capacités d'interaction avec l'élément E1.

DISCUSSION

Au cours de ces travaux, j'ai abordé deux aspects de la traduction par l'étude de complexes ARN-protéine. Le premier concerne le facteur eIF3 et la sous-unité 40S dans l'étape d'initiation de la traduction et le second concerne la localisation de l'ARNm *ASH1* et de sa régulation traductionnelle par Khd1p pendant son transport.

La sous-unité p44 du facteur eIF3 et son interaction avec l'ARN

Dans cette première partie, je me suis concentrée sur l'étude de l'interaction entre le facteur eIF3 et la petite sous-unité ribosomique 40S. Pour cela, j'ai cloné l'ARNr 18S afin de réaliser une banque de ses fragments dans le but de la cribler avec la protéine eIF3p44 qui possède un RRM. Auparavant, cette protéine avait montré une aptitude à lier l'ARNr 18S *in vitro* (Block et al., 1998b). Son domaine RRM étant bien défini, j'ai choisi le domaine C-terminal recombinant qui contient ce RRM pour le criblage.

L'approche utilisée est SERF. Cette technique a déjà permis d'identifier les motifs d'interaction entre l'ARNr 23S de la grande sous-unité du ribosome bactérien et trois de ses protéines (Stelzl et al., 2000). Elle s'inspire du SELEX, qui consiste à cribler une banque de fragments totalement aléatoires d'ARN avec une protéine d'intérêt.

À l'issue du criblage de la banque d'ARNr 18S par le RRMp44, j'ai eu une seule séquence majoritaire. Malheureusement cette séquence est anti-sens. En effet la banque était constituée du mélange de clones sens et anti-sens. Cette séquence est liée par le RRMp44, mais n'a pas montré d'affinité préférentielle par rapport aux autres clones et au contrôle sur les gels natifs.

Les interactions ARN-RRM

Dans le tableau de la Figure 68, les RRM qui possèdent les RNP-1 et RNP-2 les plus proches de ceux de RRMp44 sont ceux des protéines sxl (RRM2) et hnRNP A1 (RRM1). La séquence d'ARN en complexe avec sxl est UGU et celle avec hnRNP A1 est une séquence d'ADN, TAGG. Aucune ne fait partie de celles qui auraient pu être parmi les fragments sélectionnés. C'est également le cas pour les autres séquences présentées dans ce tableau.

Le nombre de nucléotides impliqués dans les interactions est très variable. Pour la protéine CBP20, deux nucléotides dans l'ARN suffisent et pour la protéine U2B' huit nucléotides sont directement liés (Auweter et al., 2006).

Position on the RRM domain	N ₋₃	N ₋₂	N ₋₁	N ₀	N ₁	N ₂	N ₃		
Protein and sequence bound									
U1A (24,30)	A	U	U	G	C	A	C		
Sex-lethal RRM1 (26)	U	U	U	U	U	U	U		
Sex-lethal RRM2 (26)				U	G	U			
PABP RRM1 (25)				A	A	A	A		
PABP RRM2 (25)				A	A	A	A		
U2B' (31)	A	U	U	G	C	A	G	U	
hnRNPA1 RRM1 (36)				T	A	G	G		
hnRNPA1 RRM2 (36)			T	T	A	G	G		
Nucleolin RRM1 (27,35)					C	G	A		
Nucleolin RRM2 (27,35)				U		C	C		
HuD RRM1 (33)	U	U	A	U	U	U			
HuD RRM2 (33)				U	U	U			
HuD RRM2 (33)				U	A	U			
CBP20 RRM (28,34)					G			N	
PTB RRM1 (29)				U	C			U	
PTB RRM2 (29)					C			U	N
PTB RRM3 (29)				U	C			U	N
PTB RRM4 (29)				U	C			N	
Fox-1 RRM (23)	U	G	C	A	U	G	U		
hnRNPD RRM (37)				T	A	G	G		
Number of bases in each position									
A				3	6 (1 syn)	4	3		
C				0	7	1	2		
U/T				11	4	5	5		
G				2	2	5 (all syn)	4 (1 syn)		

N indicates that any nucleotide can be bound.

Figure 68 : Table des séquences ADN et ARN, dont la structure des complexes a été étudiée par RMN ou cristallographie (Auweter et al., 2006).

Les nucléotides N0, N1, N2 et N3 sont situés au cœur de l'interaction. Pour chaque position est indiqué le nucléotide directement impliqué dans l'interaction (observé sur la structure).

Les nucléotides les plus importants sont N0, N1 et N2 (Figure 68 ; Figure 69). Ils forment un complexe avec les acides aminés aromatiques (Position 2 de RNP-2, Positions 3 et 5 de RNP-1), à la base de cette interaction (Figure 69). Nous pouvons imaginer que le RRMp44 n'ait pas vraiment sélectionné de séquence spécifique. Mais lorsque les complexes sont analysés sur le gel natif, à d'importantes concentrations de protéine, deux nucléotides dans la séquence de l'ARN suffisent pour permettre l'interaction, même si le contexte n'est pas optimal. Il aurait moins d'affinité mais serait en mesure d'interagir avec ces ARN.

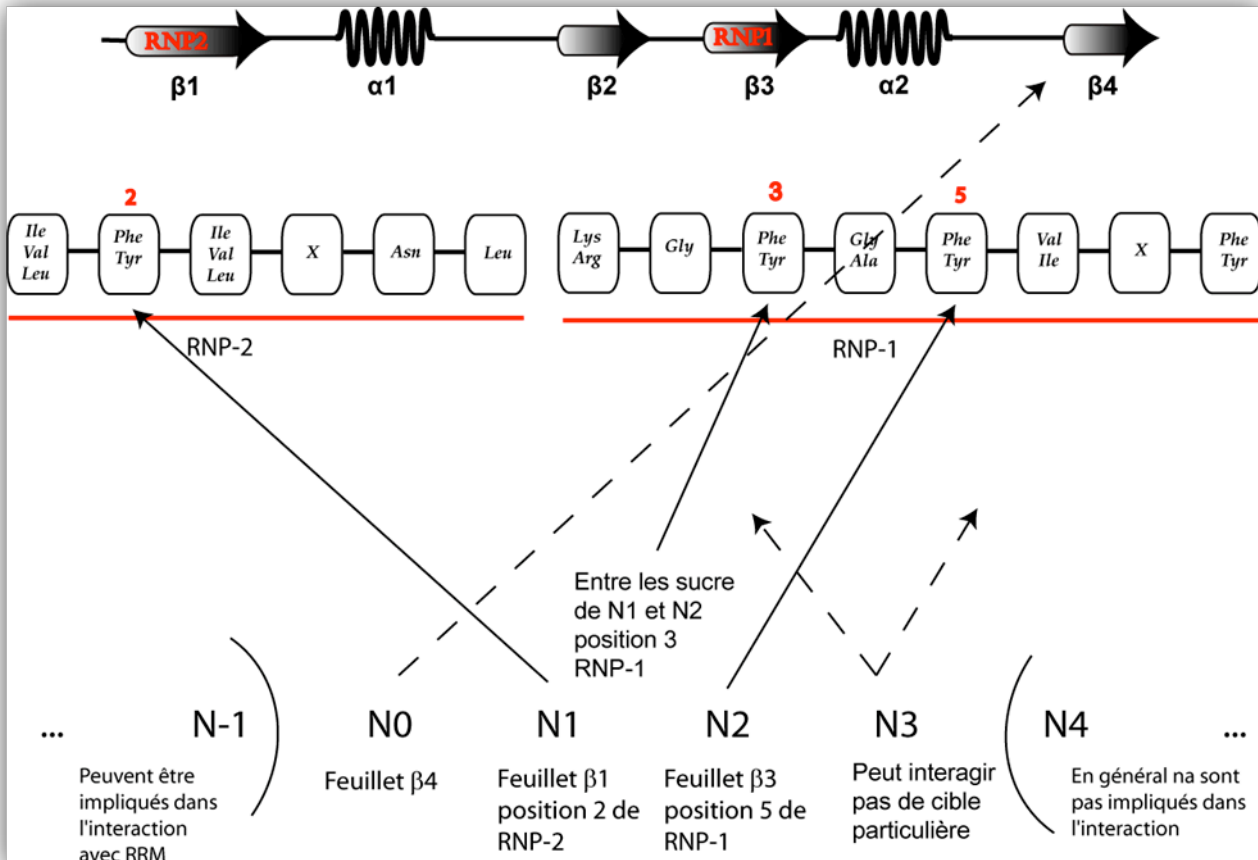


Figure 69 : Schéma récapitulatif des interactions qui participent à la formation du complexe ARN-protéine dans le cas du RRM

Les RRM reconnaissent habituellement les séquences simples brin, mais le RRM N-terminal de la protéine U1A reconnaît sa séquence spécifique uniquement si elle est dans une tige-boucle ou bien une boucle interne (Allain et al., 1996; Oubridge et al., 1994). Cette séquence, lorsque située dans un contexte qui ne peut plus former ces structures secondaires, interagit 10^4 fois moins (Oubridge et al., 1994). Elle passe d'un $K_D \approx 10^{-10} M$ pour la séquence située dans la tige-boucle ou la boucle interne à un $K_D \approx 10^{-6} M$ pour la séquence linéaire (Hall, 1994).

La structure secondaire de l'ARN est très importante pour l'interaction, elle permet à la protéine d'adopter les changements de conformation qui mènent à la formation du complexe dans un état stable (Allain et al., 1996). Dans le cas du RRM du facteur eIF3p44, il se pourrait qu'il ait une préférence pour les structures secondaires qu'adoptent les ARN. Effectivement, l'ARNr 18S est une molécule très structurée. Or dans mon étude, les fragments les plus courts sont privilégiés et dans un contexte qui ne forme pas de tige boucle.

Pour estimer l'affinité des fragments issus du criblage pour le RRMp44, j'ai utilisé comme contrôle le contexte de sélection (voir p.108 et p.113). L'ARN est transcrit avec le promoteur T7 et se termine au niveau du site *SacI*. On retrouve au niveau des sites *NotI* deux séquences riches en G et en C. Les analyses des complexes sur gel natif ont montré un complexe aussi fort qu'avec les séquences issues du criblage. Parmi les séquences sélectionnées, un certain nombre contiennent des séquences riches en GC et surtout en G (>80%). Pour le contexte, il ressort dans sa séquence deux régions riches en nucléotides G et C. Il se pourrait que ce fragment ait aussi une certaine affinité pour le RRMp44 et ne soit pas un contexte adapté pour cette étude.

Le domaine RRM de la protéine p44 montre une homologie substantielle avec un des domaines RRM de la protéine hnRNP A1 et du facteur U2AF65 (Figure 44). Ces protéines impliquées dans le repliement des ARN sont des chaperonnes. Elles déplient les ARN mal repliés ou empêchent la formation de structures secondaires qui iraient à l'encontre de leur fonction biologique. Cette caractéristique est retrouvée aussi pour le facteur U2AF65 dans l'épissage (Schroeder et al., 2004). Le facteur eIF3p44 pourrait avoir une fonction analogue à celle de certaines chaperonnes pendant la synthèse des protéines. Ceci pourrait expliquer le K_D qui ne semble pas très bon (>1 μ M faible interaction), et son aptitude à lier plusieurs ARN très différents de la même façon.

Le principe de l'utilisation d'une banque de fragments d'un ARN donné est très intéressant. Il apporte un atout supplémentaire par rapport au SELEX en permettant de diminuer la complexité de la banque d'ARN initiale et le nombre de tours de sélection requis pour identifier la ou les séquence(s) gagnantes. Un autre avantage du SERF par rapport au SELEX est de sélectionner des séquences issues de l'ARN cible présent dans la nature, alors que ce n'est pas toujours le cas pour les aptamères qui résultent du SELEX.

En revanche, le principe de sélection suivi d'une amplification possède certains inconvénients. Lors de la sélection, les artéfacts de sélection peuvent être amplifiés. Par exemple, si certaines séquences sont sélectionnées pour d'autres raisons que leur interaction directe avec la protéine, elles seront amplifiées de la même façon par la PCR. Nous pouvons imaginer que des séquences sont capables de former des dimères et multimères en raison de leurs séquences palindromiques. Ces séquences peuvent être retenues sur le filtre sans pour autant interagir avec la protéine de la sélection.

Pour aborder cette étude, une alternative aurait pu être de sélectionner les ARN liant le RRMp44 par retard sur gel natif, de découper les fragments du gel, les extraire et de les amplifier après par RT-PCR. Le temps de migration sur le gel natif amène le complexe en équilibre permanent, permettant de conserver de préférence les ARN ayant une plus grande affinité pour la protéine. Pour la construction de la banque, un contexte de tige-boucle aurait pu apporter un avantage certain pour la présentation des séquences. Ce système pourrait empêcher les séquences étudiées d'être prises dans une tige et de mieux refléter le contexte structurel d'un ARN donné.

Une autre approche pour ce type d'étude qui me paraît puissante est la combinaison de deux systèmes de sélection. Une technique de sélection *in vitro* associée à une technique de sélection *in vivo* (Konig et al., 2007). Par exemple, si on utilise le SELEX et le triple-hybride : l'approche SELEX donne une série de clones qui sont ensuite testés pour leur aptitude à lier la protéine *in vivo*. Une fois que des motifs sont sélectionnés, il est possible de faire un parallèle avec la séquence dans son contexte, par exemple l'ARNr 18S, afin de tenir compte de sa structure secondaire et de son contexte pour les études ultérieures.

De tous récents travaux sur le facteur eIF3 de mammifère viennent d'identifier les sous-unités du facteur eIF3 essentielles pour la liaison de la sous-unité 40S à l'ARNm. La reconstitution d'un facteur eIF3 capable de favoriser la liaison de la petite sous-unité du ribosome nécessite 11 sous-unités. Or p44 et p36 n'en font pas partie (Masutani et al., 2007). Ce qui suggère que ces deux protéines ne sont pas nécessaires à la fonction du facteur eIF3 dans le recrutement du ribosome. Ceci n'empêche pas une possibilité d'interaction avec l'ARNr 18S mais si elle existe, elle n'est pas cruciale pour l'initiation de la traduction.

D'autres fonctions ont été attribuées à p44. Cette protéine est exprimée de façon constitutive dans de nombreux tissus (Kim et al., 2006). Si sa fonction première n'est pas de lier l'ARNr 18S, sa fonction dans la traduction est cependant très importante. Dans des lysats de réticulocytes, lorsqu'on supprime p44, la synthèse des protéines n'est plus efficace (Hou et al., 2000). Un criblage de double-hybride a permis d'identifier un partenaire de p44 : la protéine 4.1R (« Erythroid protein 4.1 ») (Hou et al., 2000). C'est une protéine du cytosquelette, suggérant que p44 pourrait être impliquée dans la fixation de l'appareil de traduction au cytosquelette.

Une autre protéine est aussi connue pour interagir avec le facteur eIF3p44 : le facteur AIF (« Apoptosis-inducing factor ») (Kim et al., 2006). La cascade stimulée par le facteur AIF

provoque la mort cellulaire. Après la liaison du facteur AIF à p44, ce dernier est clivé par une caspase (Kim et al., 2006). Ce mécanisme qui cible la sous-unité p44 indique de nouveau que cette protéine a des fonctions importantes dans la traduction et dans sa régulation lors de l'apoptose.

Régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1* par Khd1p

Dans une seconde partie, j'ai étudié les interactions impliquées dans la régulation de l'expression d'Ash1p, répresseur transcriptionnel du gène HO (qui est impliqué dans le changement de type sexuel chez la levure). La protéine Khd1 régule la traduction de l'ARNm *ASH1* en interagissant directement avec l'élément E1 contenu dans la séquence codante de ce transcrit. Cette inhibition de la traduction de l'ARNm *ASH1* a lieu au cours de son transport, qui va du noyau où l'ARNm est synthétisé jusqu'au bourgeon de la cellule fille où ce transcrit est localisé.

L'interaction de Khd1p avec l'élément E1 d'*ASH1* a été confirmée de plusieurs façons: *in vitro* par retard sur gel et *in vivo* par immunoprécipitation suivie de RT-PCR. En revanche, les nucléotides impliqués dans cette interaction n'ont pas encore été identifiés. Une des études de compétition de retard sur gel, montre que l'interaction du mutant M6 de l'élément E1 (Figure 57) dont la boucle apicale est mutée, semble être moins forte qu'avec le sauvage (Figure 58). Nos résultats suggèrent que cette boucle apicale pourrait contenir un site de liaison à Khd1p.

Les protéines qui possèdent des domaines KH ont beaucoup été étudiées. Des éléments d'interaction ont été identifiés; certaines ont une préférence pour des séquences qui possèdent l'élément UCA (Musunuru and Darnell, 2004). Pour la protéine hnRNP K, le domaine DICE reconnu par cette protéine est une séquence riche en nucléotides CU (Ostareck-Lederer et al., 1994). L'interaction se produit avec les domaines KH1 et KH3 (Messias et al., 2006). Pour la protéine Nova, la séquence identifiée est liée par le domaine KH3. Elle contient les nucléotides UCAU (Jensen et al., 2000b). Une étude précédente a montré que Khd1p aurait une préférence pour les séquences riches en pyrimidine (Denisenko and Bomsztyk, 2002). Nous avons remarqué que la boucle terminale de l'élément E1 était riche en pyrimidines offrant ainsi un site potentiel d'interaction avec Khd1p.

Sur la structure de l'ARN E1, la séquence de la boucle apicale est la suivante :

^{5'}UCAUUUCA^{3'}

Elle contient le dinucléotide UC répété deux fois. Mais surtout, les séquences qui seraient plus probables pour l'interaction avec Khd1p sont UCAU et UCA, toutes deux exposées en raison de leur situation sur la boucle apicale du motif. Il serait très intéressant d'effectuer des analyses d'empreinte de digestion à la RNase (« foot printing ») de l'élément E1 avec Khd1p en attachant une attention particulière à cette boucle.

Pour mieux caractériser l'interaction, il faudra par la suite envisager d'identifier le domaine KH impliqué dans l'interaction. Pour la protéine hnRNP K, le domaine de liaison à l'élément DICE est situé au niveau du domaine KH3. De plus, un site de phosphorylation important est situé à ce niveau (Ptacek et al., 2005). Les acides aminés phosphorylés qui régulent l'interaction entre Khd1p et l'ARN E1, se retrouvent juste en aval du domaine KH3 situé en C-terminal de la protéine. Il serait ainsi fort probable que l'interaction entre Khd1p et l'ARN E1 se situe au niveau de ce domaine KH.

Sur les complexes des gels natifs de Khd1p avec E1 (Figure 55), il apparaît plusieurs bandes. Elles sont probablement dues à des dimérisations de la protéine. Cette dimérisation pourrait jouer un rôle dans les interactions ARN-protéine (Ramos et al., 2002). Par exemple, la protéine Nova forme un homodimère avec son domaine KH3 pour lier l'ARN et cette dimérisation est importante pour augmenter l'affinité de cette protéine pour l'ARN (Lewis et al., 2000). L'interaction spécifique entre l'ARNm *ASH1* et Khd1p est abolie lorsque ce complexe atteint la membrane du bourgeon. À ce niveau, la kinase caséine de type I Yck1p est ancrée à la membrane (Babu et al., 2002). Dans le modèle proposé, elle phosphoryle la protéine Khd1 sur des résidus sérine et thréonine situés en aval du domaine KH3, ce qui relâche l'ARNm et le laisse accessible à la machinerie traductionnelle.

Rôle de l'interaction du facteur eIF4G avec l'ARN

Nous avons montré que facteur eIF4G1 interagit avec l'élément E1 *in vitro* par retard sur gel et *in vivo* par triple hybride. Suite à l'étude des propriétés de liaison à l'ARN, l'équipe de *Berset et al.* montrèrent que ce facteur possède trois domaines de liaison à l'ARN (Berset et al., 2003). Le premier est situé dans la partie N-terminale de la protéine (acides aminés 1 à 82), le second est dans la partie médiane (acides aminés 492 à 539) et le dernier se retrouve dans la partie C-terminale (acides aminés 883 à 952). Mes résultats sur l'étude de l'interaction avec E1 localisent le site d'interaction dans la partie C-terminale du facteur eIF4G (acides

aminés 850 à 952). Cette même équipe suggérait que ces domaines de liaison à l'ARN du facteur eIF4G pourraient interagir avec l'ARNr. Or mes résultats suggèrent plutôt que ces domaines permettraient d'interagir avec l'ARNm.

Un criblage par SELEX a été réalisé avec le facteur eIF4G de mammifère. Les résultats ont permis de trouver plusieurs séquences dans lesquelles le même motif se retrouvait (Miyakawa et al., 2006). Parmi ces aptamères, certains sont capables d'inhiber la traduction et d'autres ne le sont pas même s'ils ont les mêmes séquences consensus. Après l'étude de leur structure secondaire, l'aptamère dont l'effet sur la traduction a été démontré présente une organisation en tige boucle avec une autre boucle asymétrique interne (Figure 70).

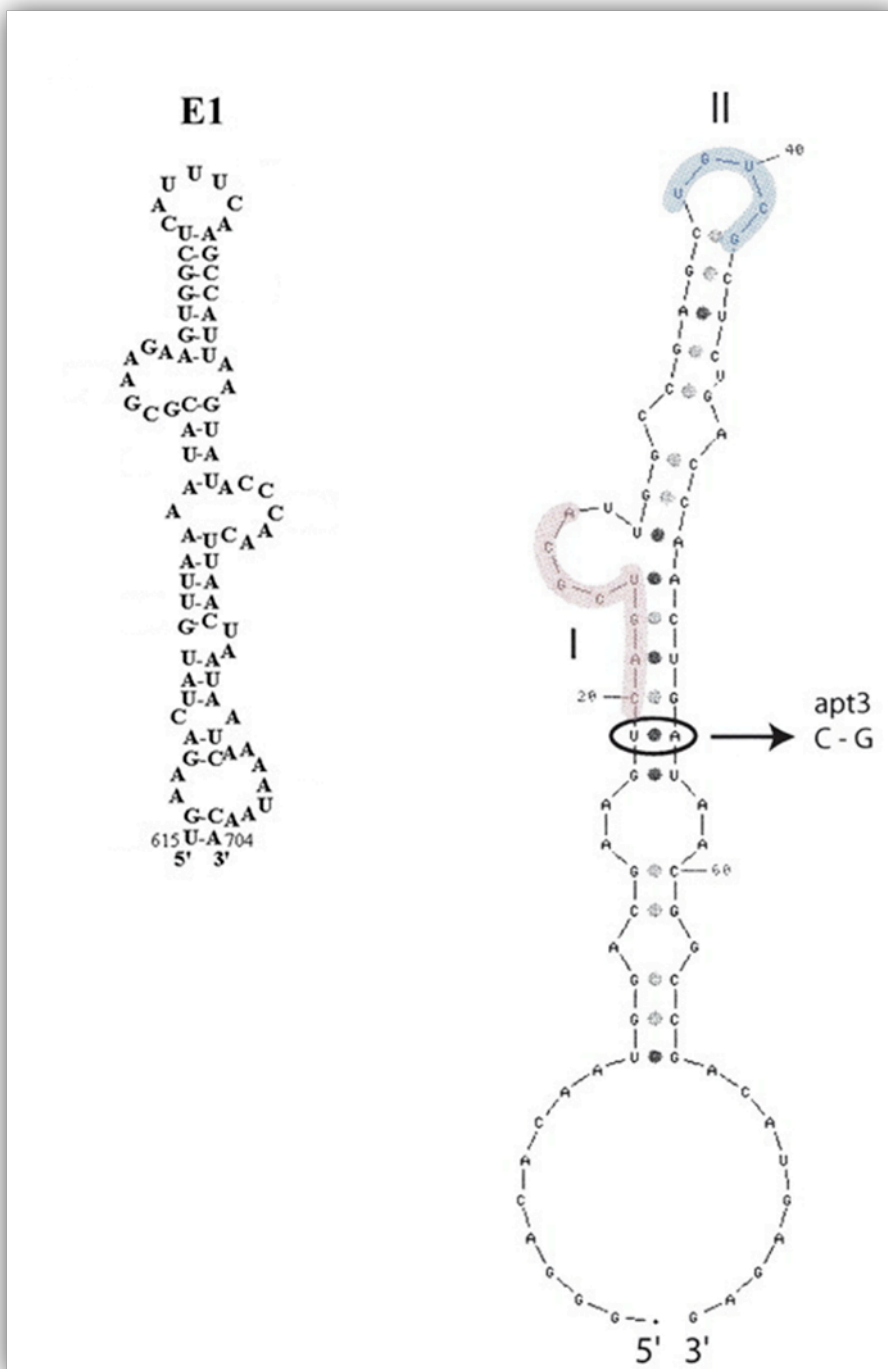


Figure 70 : Prédiction de la structure secondaire de l'aptamère sélectionné contre le facteur eIF4G de mammifère par SELEX (Miyakawa et al., 2006). Les séquences surlignées en bleu et en rouge sont les consensus ressortis du criblage SELEX contre le facteur eIF4G.

Si cet aptamère est comparé à l'élément E1 de l'ARNm *ASH1*, nous pouvons remarquer la présence des deux boucles, apicale et latérale, qui sont retrouvées de la même façon dans l'aptamère sélectionné par SELEX.

Le facteur eIF4G pourrait reconnaître la structure secondaire de l'élément E1. Ceci serait concordant avec les résultats de triple-hybride qui montrent que le domaine C-terminal du facteur eIF4G perd ses capacités d'interaction avec l'élément E1M5 dont la structure secondaire est détruite au niveau de la tige.

D'autre part, le facteur eIF4G est une protéine d'échafaudage. Elle présente un certain nombre de sites d'interaction avec des protéines dont le rôle dans la traduction est clairement établi. Ce facteur est aussi capable de lier l'IRES du virus à ARN positif EMCV (Pestova et al., 1996a). Le domaine du facteur eIF4G nécessaire pour lier l'IRES du virus EMCV a été délimité. Il se situe dans les régions 746-772 et 941-949 du facteur eIF4G (Lomakin et al., 2000). Ces régions correspondent à des domaines qui seraient capables de lier l'ARN (De Gregorio et al., 1998; Goyer et al., 1993)

Rôle des interactions eIF4G-Khd1p-E1 dans la traduction de l'ARNm *ASH1*

Nous avons montré que le facteur canonique eIF4G interagit avec Khd1p. Ce facteur est aussi capable d'interagir avec l'élément E1. Ces résultats soulèvent la question du type de complexe formé entre Khd1p, eIF4G et l'ARN E1. D'après les résultats obtenus, plusieurs modèles seraient envisageables.

Nous sommes certains de deux choses :

- 1) La protéine Khd1 interagit avec *ASH1* pendant son transport pour réprimer sa traduction
- 2) Khd1p relâche cet ARNm quand il atteint le bourgeon

L'ARNm *ASH1* est transporté au bourgeon grâce à la protéine She2, qui fait le lien entre l'ARNm et le locosome. Nous avons vu que le facteur canonique eIF4G était capable d'interagir avec l'élément E1 et avec Khd1p. Or le moment où ce facteur intervient et comment il agit n'est pas connu.

Une première possibilité serait que le facteur eIF4G interagisse directement avec Khd1p. Nous avons montré que l'interaction existe *in vitro*. Comme Khd1p se lie à l'ARNm *ASH1* par l'élément E1 tout le long du transport, ce système permettrait de recruter le facteur eIF4G, éventuellement associé à eIF4A et eIF4E, qui sera par la suite utilisé pour la traduction quand Khd1p aura été phosphorylée (Figure 71A). Ce système permettrait que la traduction soit initiée très rapidement après que la séparation des deux levures ait eu lieu.

Un autre modèle pourrait impliquer l'interaction directe du facteur eIF4G avec l'élément E1. Les expériences de « GST-pulldown » suggèrent que l'interaction Khd1p-eIF4G est dépendante de l'ARN. Dans ce second mécanisme, nous pourrions imaginer que le facteur eIF4G est tout d'abord recruté par Khd1p, puis au cours du trajet vers le bourgeon, le facteur eIF4G soit aussi utilisé pour l'inhibition de la traduction pendant le trajet jusqu'au bourgeon. Son interaction simultanée avec la coiffe de l'ARNm *ASH1* et avec l'élément E1, disposerait l'ARN de façon à ce que la traduction ne soit pas initiée pendant le trajet.

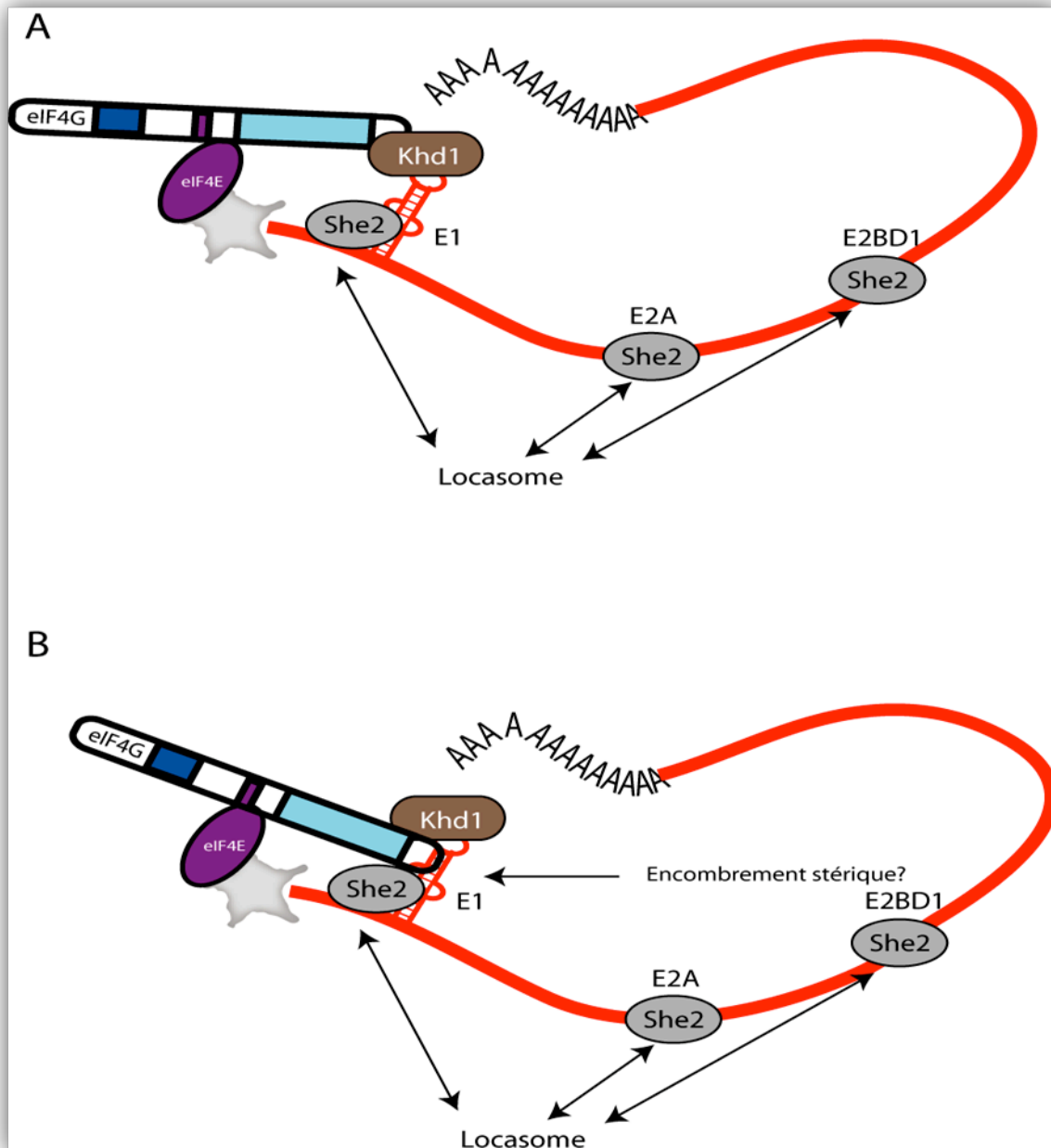


Figure 71 : Mécanismes suggérés pour la régulation de l'initiation de la traduction de l'ARNm *ASH1* pendant son transport.

A. Le facteur eIF4G interagit avec Khd1p qui interagit avec l'élément E1. B. les trois partenaires, eIF4G, E1 et Khd1p forment un complexe ternaire pendant le transport d'*ASH1*.

La protéine She2 est aussi liée à E1 (Olivier et al., 2005). Si ces trois protéines lient simultanément l'ARN E1, il y aurait fort possiblement un encombrement stérique. La protéine She2 pourrait garder ses interactions avec l'ARNm *ASH1* seulement au niveau des éléments E2A, E2B et E3, suffisantes pour le transport (Figure 71B). Cependant, si on considère que

les interactions E1-Khd1, E1-eIF4G et E1-She2 sont stériquement possibles, le complexe ternaire eIF4G-Khd1-E1 pourrait être transporté par She2p. La traduction serait réprimée par eIF4G et par Khd1p jusqu'à ce que cette dernière soit phosphorylée par la kinase Yck1p.

Un modèle qui pourrait nous aider à comprendre comment Khd1p pourrait inhiber la traduction de l'ARNm *ASH1* en ciblant le domaine C-terminal du facteur eIF4G est celui du complexe GAIT et l'ARNm de la céruloplasmine. Une étude récente sur la régulation de la traduction de l'ARNm de la céruloplasmine par le complexe GAIT implique le facteur eIF4G en tant que répresseur de la traduction spécifique de cet ARNm (Kapasi et al., 2007). Le complexe GAIT interagit avec un motif situé dans la partie 3'-UTR de cet ARNm. Lorsque la protéine ribosomale L13a est phosphorylée, elle interagit avec le domaine C-terminal du facteur eIF4G et avec le complexe GAIT lié à l'élément GAIT situé dans le 3'UTR de cet ARNm. Ceci a pour effet de circulariser l'ARNm d'une part, et d'autre part de bloquer l'accès du complexe 43S à eIF4G. Ainsi, le recrutement de la sous-unité 40S à la coiffe ne peut plus avoir lieu. Nous pouvons spéculer que la liaison de Khd1p au domaine C-terminal de eIF4G1 pourrait aussi bloquer le recrutement de la sous-unité 43S sur l'ARNm.

Conclusion

Dans le cadre de l'étude d'interactions ARN-protéine impliquées dans la régulation de l'étape d'initiation de la traduction mes projets concernaient :

- 1) L'étude de l'interaction putative entre le facteur eIF3 et la sous-unité 40S du ribosome.
- 2) L'étude d'interactions ARN-protéines impliquées dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* localisé au bourgeon chez la levure

Au cours de ces travaux, nous avons identifié le site de liaison de la protéine Khd1 sur l'ARNm *ASH1* : l'élément de localisation E1. Il adopte une structure particulière en tige-boucle. Le complexe Khd1p-E1 est crucial dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* pendant son transport. Cette interaction est régulée par une modification post-traductionnelle de Khd1p qui est phosphorylée lorsque le complexe atteint le bourgeon de la levure. L'élément est aussi un site de liaison du facteur eIF4G. Son rôle précis dans ce mécanisme n'a pas été élucidé, mais il pourrait recruter les autres facteurs du complexe eIF4F sur l'ARNm.

Les travaux sur le RRMp44 en revanche n'ont pas permis d'identifier de site de liaison à la sous-unité 40S.

Pour être recrutée à la coiffe de l'ARNm, la sous-unité 40S est associée à des facteurs canoniques pour former le complexe 43S. Les facteurs eIF3 et eIF5 en font partie. Ils interagissent directement avec eIF4G (eIF3 pour les mammifères et eIF5 pour les levures). Ceux-ci permettent de faire le lien entre la coiffe de l'ARNm et la sous-unité 40S pour assurer son recrutement.

La protéine p44 qui était tout d'abord proposée comme candidate pour établir une liaison avec la sous-unité 40S ne fait finalement pas partie du cœur de eIF3 nécessaire pour le recrutement de 40S à la coiffe. Cependant, son RRM pourrait être nécessaire pour interagir avec les ARNm. Les études initiales sur les domaines d'interaction à l'ARN du facteur eIF4G suggéraient que ceux-ci seraient impliqués dans une interaction avec l'ARNr. Nos résultats montrent plutôt une interaction avec un ARNm, dont l'élément E1.

Ainsi, mes études suggèrent que d'autres points d'interaction avec l'ARNm, autres que la coiffe, sont certainement impliqués dans la stabilisation des facteurs canoniques lors de l'initiation de la traduction.

RÉFÉRENCES

- Acker, M.G., Shin, B.S., Dever, T.E., and Lorsch, J.R. (2006). Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *The Journal of biological chemistry* *281*, 8469-8475.
- Algire, M.A., Maag, D., Savio, P., Acker, M.G., Tarun, S.Z., Jr., Sachs, A.B., Asano, K., Nielsen, K.H., Olsen, D.S., Phan, L., *et al.* (2002). Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *Rna* *8*, 382-397.
- Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *Journal of virology* *69*, 6367-6375.
- Ali, N., and Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 2249-2254.
- Allain, F.H., Gubser, C.C., Howe, P.W., Nagai, K., Neuhaus, D., and Varani, G. (1996). Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation. *Nature* *380*, 646-650.
- Altmann, M., Schmitz, N., Berset, C., and Trachsel, H. (1997). A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *The EMBO journal* *16*, 1114-1121.
- Andrade, M.A., and Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature genetics* *11*, 115-116.
- Antson, A.A. (2000). Single-stranded-RNA binding proteins. *Current opinion in structural biology* *10*, 87-94.
- Anwar, A., Ali, N., Tanveer, R., and Siddiqui, A. (2000). Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *The Journal of biological chemistry* *275*, 34231-34235.
- Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., and Hinnebusch, A.G. (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes & development* *14*, 2534-2546.
- Asano, K., Kinzy, T.G., Merrick, W.C., and Hershey, J.W. (1997a). Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *The Journal of biological chemistry* *272*, 1101-1109.
- Asano, K., Merrick, W.C., and Hershey, J.W. (1997b). The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome. *The Journal of biological chemistry* *272*, 23477-23480.
- Asano, K., Shalev, A., Phan, L., Nielsen, K., Clayton, J., Valasek, L., Donahue, T.F., and Hinnebusch, A.G. (2001). Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *The EMBO journal* *20*, 2326-2337.
- Asano, K., Vornlocher, H.P., Richter-Cook, N.J., Merrick, W.C., Hinnebusch, A.G., and Hershey, J.W. (1997c). Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly. *The Journal of biological chemistry* *272*, 27042-27052.
- Auweter, S.D., Oberstrass, F.C., and Allain, F.H. (2006). Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic acids research* *34*, 4943-4959.
- Babu, P., Bryan, J.D., Panek, H.R., Jordan, S.L., Forbrich, B.M., Kelley, S.C., Colvin, R.T., and Robinson, L.C. (2002). Plasma membrane localization of the Yck2p yeast casein kinase 1 isoform requires the C-terminal extension and secretory pathway function. *J Cell Sci* *115*, 4957-4968.

- Bacharach, E., and Goff, S.P. (1998). Binding of the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein to the viral RNA encapsidation signal in the yeast three-hybrid system. *Journal of virology* *72*, 6944-6949.
- Baird, S.D., Lewis, S.M., Turcotte, M., and Holcik, M. (2007). A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic acids research* *35*, 4664-4677.
- Baird, S.D., Turcotte, M., Korneluk, R.G., and Holcik, M. (2006). Searching for IRES. *Rna* *12*, 1755-1785.
- Bandyopadhyay, A., and Maitra, U. (1999). Cloning and characterization of the p42 subunit of mammalian translation initiation factor 3 (eIF3): demonstration that eIF3 interacts with eIF5 in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* *27*, 1331-1337.
- Barnard, D.C., Cao, Q., and Richter, J.D. (2005). Differential phosphorylation controls Maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localization on the mitotic apparatus. *Molecular and cellular biology* *25*, 7605-7615.
- Bashirullah, A., Halsell, S.R., Cooperstock, R.L., Kloc, M., Karaiskakis, A., Fisher, W.W., Fu, W., Hamilton, J.K., Etkin, L.D., and Lipshitz, H.D. (1999). Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *The EMBO journal* *18*, 2610-2620.
- Battiste, J.L., Pestova, T.V., Hellen, C.U., and Wagner, G. (2000). The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. *Molecular cell* *5*, 109-119.
- Bergsten, S.E., and Gavis, E.R. (1999). Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA. *Development (Cambridge, England)* *126*, 659-669.
- Berlanga, J.J., Baass, A., and Sonenberg, N. (2006). Regulation of poly(A) binding protein function in translation: Characterization of the Paip2 homolog, Paip2B. *Rna* *12*, 1556-1568.
- Bernstein, D.S., Buter, N., Stumpf, C., and Wickens, M. (2002). Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system. *Methods* *26*, 123-141.
- Berset, C., Zurbriggen, A., Djafarzadeh, S., Altmann, M., and Trachsel, H. (2003). RNA-binding activity of translation initiation factor eIF4G1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* *9*, 871-880.
- Birney, E., Kumar, S., and Krainer, A.R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic acids research* *21*, 5803-5816.
- Block, K.L., Vornlocher, H.-P., and Hershey, J.W.B. (1998a). Characterization of cDNAs Encoding the p44 and p35 Subunits of Human Translation Initiation Factor eIF3. *J. Biol. Chem.* *273*, 31901-31908.
- Block, K.L., Vornlocher, H.-P., and Hershey, J.W.B. (1998b). Characterization of cDNAs Encoding the p44 and p35 Subunits of Human Translation Initiation Factor eIF3. *The Journal of biological chemistry* *273*, 31901-31908.
- Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H., and Nasmyth, K. (1996). Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* *84*, 699-709.
- Boeck, R., and Kolakofsky, D. (1994). Positions +5 and +6 can be major determinants of the efficiency of non-AUG initiation codons for protein synthesis. *The EMBO journal* *13*, 3608-3617.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., and Jansen, R.-P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J.* *19*, 5514-5524.
- Bonnal, S., Pileur, F., Orsini, C., Parker, F., Pujol, F., Prats, A.C., and Vagner, S. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-

- acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *The Journal of biological chemistry* 280, 4144-4153.
- Bonnal, S., Schaeffer, C., Creancier, L., Clamens, S., Moine, H., Prats, A.C., and Vagner, S. (2003). A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *The Journal of biological chemistry* 278, 39330-39336.
- Braddock, D.T., Baber, J.L., Levens, D., and Clore, G.M. (2002). Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. *The EMBO journal* 21, 3476-3485.
- Brendza, R.P., Serbus, L.R., Duffy, J.B., and Saxton, W.M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. *Science (New York, N.Y)* 289, 2120-2122.
- Browning, K.S., Gallie, D.R., Hershey, J.W., Hinnebusch, A.G., Maitra, U., Merrick, W.C., and Norbury, C. (2001). Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. *Trends Biochem Sci* 26, 284.
- Buckanovich, R.J., Posner, J.B., and Darnell, R.B. (1993). Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 11, 657-672.
- Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Current opinion in cell biology* 17, 257-261.
- Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science (New York, N.Y)* 265, 615-621.
- Bushell, M., and Sarnow, P. (2002). Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *The Journal of cell biology* 158, 395-399.
- Cao, Q., and Richter, J.D. (2002). Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *The EMBO journal* 21, 3852-3862.
- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhauser, N., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426, 579-584.
- Chappell, S.A., Edelman, G.M., and Mauro, V.P. (2000). A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1536-1541.
- Chartrand, P., Meng, X.-H., Singer, R.H., and Long, R.M. (1999). Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Current Biology* 9, 333-336.
- Chartrand, P., Meng, X., Huttelmaier, S., Donato, D., Singer, R.H. (2002). Asymmetric sorting of Ash1p in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol. Cell* 10, 1319-1330.
- Chartrand, P., Singer, R.H., and Long, R.M. (2001). RNP localisation and transport in yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17, 297-310.
- Chaudhuri, J., Chowdhury, D., and Maitra, U. (1999). Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex. *The Journal of biological chemistry* 274, 17975-17980.
- Chaudhuri, J., Si, K., and Maitra, U. (1997). Function of eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF1A) (formerly called eIF-4C) in initiation of protein synthesis. *The Journal of biological chemistry* 272, 7883-7891.

- Chekulaeva, M., Hentze, M.W., and Ephrussi, A. (2006). Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* *124*, 521-533.
- Cheung, Y.N., Maag, D., Mitchell, S.F., Fekete, C.A., Algire, M.A., Takacs, J.E., Shirokikh, N., Pestova, T., Lorsch, J.R., and Hinnebusch, A.G. (2007). Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo. *Genes & development* *21*, 1217-1230.
- Cigan, A.M., Pabich, E.K., Feng, L., and Donahue, T.F. (1989). Yeast Translation Initiation Suppressor sui2 Encodes the alpha Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2 and Shares Sequence Identity with the Human alpha Subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 2784-2788.
- Cosma, M. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO reports* *5*, 953-957.
- Cote, C.A., Gautreau, D., Denegre, J.M., Kress, T.L., Terry, N.A., and Mowry, K.L. (1999). A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Molecular cell* *4*, 431-437.
- Craig, A.W.B., Haghghat, A., Yu, A.T.K., and Sonenberg, N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* *392*, 520-523.
- Crucs, S., Chatterjee, S., and Gavis, E.R. (2000). Overlapping but distinct RNA elements control repression and activation of nanos translation. *Molecular cell* *5*, 457-467.
- Curran, J., and Kolakofsky, D. (1988). Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. *The EMBO journal* *7*, 245-251.
- Czaplinski, K., Kocher, T., Schelder, M., Segref, A., Wilm, M., and Mattaj, I.W. (2005). Identification of 40LoVe, a *Xenopus* hnRNP D family protein involved in localizing a TGF-beta-related mRNA during oogenesis. *Developmental cell* *8*, 505-515.
- Czaplinski, K., and Mattaj, I.W. (2006). 40LoVe interacts with Vg1RBP/Vera and hnRNP I in binding the Vg1-localization element. *Rna* *12*, 213-222.
- Dahanukar, A., and Wharton, R.P. (1996). The Nanos gradient in *Drosophila* embryos is generated by translational regulation. *Genes & development* *10*, 2610-2620.
- Damoc, E., Fraser, C.S., Zhou, M., Videler, H., Mayeur, G.L., Hershey, J.W.B., Doudna, J.A., Robinson, C.V., and Leary, J.A. (2007). Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry. *Mol Cell Prot*, M600399-MCP600200.
- Darzacq, X., Powrie, E., Gu, W., Singer, R.H., and Zenklusen, D. (2003). RNA asymmetric distribution and daughter/mother differentiation in yeast. *Current opinion in microbiology* *6*, 614-620.
- Dasso, M.C., Milburn, S.C., Hershey, J.W., and Jackson, R.J. (1990). Selection of the 5'-proximal translation initiation site is influenced by mRNA and eIF-2 concentrations. *European journal of biochemistry / FEBS* *187*, 361-371.
- De Gregorio, E., Preiss, T., and Hentze, M.W. (1998). Translational activation of uncapped mRNAs by the central part of human eIF4G is 5' end-dependent. *Rna* *4*, 828-836.
- Denisenko, O., and Bomszyk, K. (2002). Yeast hnRNP K-like genes are involved in regulation of the telomeric position effect and telomere length. *Molecular and cellular biology* *22*, 286-297.
- Deshler, J.O., Highett, M.I., Abramson, T., and Schnapp, B.J. (1998). A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol* *8*, 489-496.
- Deshler, J.O., Highett, M.I., and Schnapp, B.J. (1997). Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y)* *276*, 1128-1131.

- Dominguez, D., Altmann, M., Benz, J., Baumann, U., and Trachsel, H. (1999). Interaction of Translation Initiation Factor eIF4G with eIF4A in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 274, 26720-26726.
- Dominguez, D., Kislig, E., Altmann, M., and Trachsel, H. (2001). Structural and functional similarities between the central eukaryotic initiation factor (eIF)4A-binding domain of mammalian eIF4G and the eIF4A-binding domain of yeast eIF4G. *Biochem J* 355, 223-230.
- Domitrovich, A.M., Diebel, K.W., Ali, N., Sarker, S., and Siddiqui, A. (2005). Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology* 335, 72-86.
- Donahue, T.F., Cigan, A.M., Pabich, E.K., and Valavicius, B.C. (1988). Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2 beta gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process. *Cell* 54, 621-632.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews* 3, 195-205.
- ElAntak, L., Tzakos, A.G., Locker, N., and Lukavsky, P.J. (2007). Structure of eIF3b RNA recognition motif and its interaction with eIF3j: structural insights into the recruitment of eIF3b to the 40 S ribosomal subunit. *The Journal of biological chemistry* 282, 8165-8174.
- Ephrussi, A., Dickinson, L.K., and Lehmann, R. (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66, 37-50.
- Esnouf, R.M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *Journal of molecular graphics & modelling* 15, 132-134, 112-133.
- Farina, K.L., Huttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R., and Singer, R.H. (2003). Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *The Journal of cell biology* 160, 77-87.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., and St Johnston, D. (1994). Stauf protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79, 1221-1232.
- Fletcher, C.M., Pestova, T.V., Hellen, C.U., and Wagner, G. (1999). Structure and interactions of the translation initiation factor eIF1. *The EMBO journal* 18, 2631-2637.
- Forrest, K.M., and Gavis, E.R. (2003). Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol* 13, 1159-1168.
- Fraser, C.S., Berry, K.E., Hershey, J.W., and Doudna, J.A. (2007). eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit. *Molecular cell* 26, 811-819.
- Fraser, C.S., and Doudna, J.A. (2007). Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Micro* 5, 29-38.
- Fraser, C.S., Lee, J.Y., Mayeur, G.L., Bushell, M., Doudna, J.A., and Hershey, J.W. (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. *The Journal of biological chemistry* 279, 8946-8956.
- Friebe, P., and Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of virology* 76, 5326-5338.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.
- Fu, X.D. (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *Rna* 1, 663-680.
- Gaba, A., Wang, Z., Krishnamoorthy, T., Hinnebusch, A.G., and Sachs, M.S. (2001). Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *The EMBO journal* 20, 6453-6463.

- Gautreau, D., Cote, C.A., and Mowry, K.L. (1997). Two copies of a subelement from the Vg1 RNA localization sequence are sufficient to direct vegetal localization in *Xenopus* oocytes. *Development (Cambridge, England)* *124*, 5013-5020.
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* *440*, 631-636.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* *415*, 141-147.
- Gavis, E.R., Curtis, D., and Lehmann, R. (1996). Identification of cis-acting sequences that control nanos RNA localization. *Developmental biology* *176*, 36-50.
- Gavis, E.R., and Lehmann, R. (1994). Translational regulation of nanos by RNA localization. *Nature* *369*, 315-318.
- Gebauer, F., and Hentze, M.W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *5*, 827-835.
- Gingras, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999a). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development* *13*, 1422-1437.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999b). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* *68*, 913-963.
- Git, A., and Standart, N. (2002). The KH domains of *Xenopus* Vg1RBP mediate RNA binding and self-association. *Rna* *8*, 1319-1333.
- Gonsalvez, G.B., Urbinati, C.R., and Long, R.M. (2005). RNA localization in yeast: moving towards a mechanism. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* *97*, 75-86.
- Gonzalez, I., Buonomo, S.B., Nasmyth, K., and von Ahsen, U. (1999). ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr Biol* *9*, 337-340.
- Gosert, R., Chang, K.H., Rijnbrand, R., Yi, M., Sangar, D.V., and Lemon, S.M. (2000). Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites *In vivo*. *Molecular and cellular biology* *20*, 1583-1595.
- Goyer, C., Altmann, M., Lee, H.S., Blanc, A., Deshmukh, M., Woolford, J.L., Jr., Trachsel, H., and Sonenberg, N. (1993). TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Molecular and cellular biology* *13*, 4860-4874.
- Grace, K., Gartland, M., Karayiannis, P., McGarvey, M.J., and Clarke, B. (1999). The 5' untranslated region of GB virus B shows functional similarity to the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *The Journal of general virology* *80 (Pt 9)*, 2337-2341.
- Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y.V., Rom, E., Raught, B., Morino, S., and Sonenberg, N. (1998). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Molecular and cellular biology* *18*, 334-342.
- Gray, N.K., and Wickens, M. (1998). Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *14*, 399-458.
- Grifo, J.A., Abramson, R.D., Satler, C.A., and Merrick, W.C. (1984). RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *The Journal of biological chemistry* *259*, 8648-8654.
- Grishin, N.V. (2001). KH domain: one motif, two folds. *Nucleic acids research* *29*, 638-643.

- Grunert, S., and Jackson, R.J. (1994). The immediate downstream codon strongly influences the efficiency of utilization of eukaryotic translation initiation codons. *The EMBO journal* *13*, 3618-3630.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R.H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev.* *18*, 1452-1465.
- Gu, Z., Moerschell, R.P., Sherman, F., and Goldfarb, D.S. (1992). NIP1, a gene required for nuclear transport in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 10355-10359.
- Gunkel, N., Yano, T., Markussen, F.H., Olsen, L.C., and Ephrussi, A. (1998). Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes & development* *12*, 1652-1664.
- Haccard, O., and Jessus, C. (2006). Oocyte maturation, Mos and cyclins--a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* *5*, 1152-1159.
- Hall, K.B. (1994). Interaction of RNA hairpins with the human U1A N-terminal RNA binding domain. *Biochemistry* *33*, 10076-10088.
- Hanachi, P., Hershey, J.W.B., and Vornlocher, H.-P. (1999). Characterization of the p33 Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor-3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *274*, 8546-8553.
- Harris, T.E., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Rhoads, R.E., and Lawrence, J.C., Jr. (2006). mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *The EMBO journal* *25*, 1659-1668.
- Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S.P., Standart, N., and Yisraeli, J.K. (1998). RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes & development* *12*, 1593-1598.
- He, H., von der Haar, T., Singh, C.R., Ii, M., Li, B., Hinnebusch, A.G., McCarthy, J.E., and Asano, K. (2003). The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection. *Molecular and cellular biology* *23*, 5431-5445.
- Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (1999). Translation of hepatitis C virus RNA. *Journal of viral hepatitis* *6*, 79-87.
- Hellen, C.U., and Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & development* *15*, 1593-1612.
- Henis-Korenblit, S., Strumpf, N.L., Goldstaub, D., and Kimchi, A. (2000). A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Molecular and cellular biology* *20*, 496-506.
- Hernandez, G., Vazquez-Pianzola, P., Sierra, J.M., and Rivera-Pomar, R. (2004). Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *Rna* *10*, 1783-1797.
- Hershey, J.W.B., and Merrick, W.C. (2000). The Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N et al., eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 33-88.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* *52*, 536-553.
- Hinnebusch, A.G., ed. (2000). Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosome.
- Hinnebusch, A.G. (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends in Biochemical Sciences* *31*, 553-562.

- Hinton, T.M., Coldwell, M.J., Carpenter, G.A., Morley, S.J., and Pain, V.M. (2007). Functional analysis of individual binding activities of the scaffold protein eIF4G. *The Journal of biological chemistry* 282, 1695-1708.
- Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews* 6, 318-327.
- Holcik, M., Sonenberg, N., and Korneluk, R.G. (2000). Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* 16, 469-473.
- Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123, 569-580.
- Hook, B., Bernstein, D., Zhang, B., and Wickens, M. (2005). RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: Affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *RNA* 11, 227-233.
- Hou, C.L., Tang, C., Roffler, S.R., and Tang, T.K. (2000). Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggests an interaction between the cytoskeletal network and the translation apparatus. *Blood* 96, 747-753.
- Hunt, S.L., Hsuan, J.J., Totty, N., and Jackson, R.J. (1999). unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes & development* 13, 437-448.
- Hunt, S.L., and Jackson, R.J. (1999). Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 RNA. *Rna* 5, 344-359.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., and Singer, R.H. (2005). Spatial regulation of [beta]-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438, 512-515.
- Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *The EMBO journal* 17, 7480-7489.
- Imataka, H., Olsen, H.S., and Sonenberg, N. (1997). A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *The EMBO journal* 16, 817-825.
- Imataka, H., and Sonenberg, N. (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Molecular and cellular biology* 17, 6940-6947.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K., and Herskowitz, I. (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *EMBO J.* 21, 1158-1167.
- Ito, T., Tahara, S.M., and Lai, M.M. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *Journal of virology* 72, 8789-8796.
- Izumi, R.E., Das, S., Barat, B., Raychaudhuri, S., and Dasgupta, A. (2004). A peptide from autoantigen La blocks poliovirus and hepatitis C virus cap-independent translation and reveals a single tyrosine critical for La RNA binding and translation stimulation. *Journal of virology* 78, 3763-3776.
- Jackson, R.J., Howell, M.T., and Kaminski, A. (1990). The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem Sci* 15, 477-483.
- Jackson, R.J., and Kaminski, A. (1995). Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *Rna* 1, 985-1000.
- Jan, E., and Sarnow, P. (2002). Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *Journal of molecular biology* 324, 889-902.

- Jang, G.M., Leong, L.E., Hoang, L.T., Wang, P.H., Gutman, G.A., and Semler, B.L. (2004). Structurally distinct elements mediate internal ribosome entry within the 5'-noncoding region of a voltage-gated potassium channel mRNA. *The Journal of biological chemistry* 279, 47419-47430.
- Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of virology* 62, 2636-2643.
- Jansen, R.P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., and Nasmyth, K. (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* 84, 687-697.
- Jensen, K.B., Dredge, B.K., Stefani, G., Zhong, R., Buckanovich, R.J., Okano, H.J., Yang, Y.Y., and Darnell, R.B. (2000a). Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* 25, 359-371.
- Jensen, K.B., Musunuru, K., Lewis, H.A., Burley, S.K., and Darnell, R.B. (2000b). The tetranucleotide UCAY directs the specific recognition of RNA by the Nova K-homology 3 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5740-5745.
- Ji, H., Fraser, C.S., Yu, Y., Leary, J., and Doudna, J.A. (2004). Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16990-16995.
- Jivotovskaya, A.V., Valasek, L., Hinnebusch, A.G., and Nielsen, K.H. (2006). Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and eIF2 can promote mRNA binding to 40S subunits independently of eIF4G in yeast. *Molecular and cellular biology* 26, 1355-1372.
- Johannes, G., Carter, M.S., Eisen, M.B., Brown, P.O., and Sarnow, P. (1999). Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13118-13123.
- Johannes, G., and Sarnow, P. (1998). Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. *Rna* 4, 1500-1513.
- Johnson, K.R., Merrick, W.C., Zoll, W.L., and Zhu, Y. (1997). Identification of cDNA clones for the large subunit of eukaryotic translation initiation factor 3. Comparison of homologues from human, *Nicotiana tabacum*, *Caenorhabditis elegans*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 272, 7106-7113.
- Jones, S., Daley, D.T., Luscombe, N.M., Berman, H.M., and Thornton, J.M. (2001). Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic acids research* 29, 943-954.
- Jopling, C.L., Spriggs, K.A., Mitchell, S.A., Stoneley, M., and Willis, A.E. (2004). L-Myc protein synthesis is initiated by internal ribosome entry. *Rna* 10, 287-298.
- Jung, M.Y., Lorenz, L., and Richter, J.D. (2006). Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein. *Molecular and cellular biology* 26, 4277-4287.
- Kaariainen, L., and Ranki, M. (1984). Inhibition of cell functions by RNA-virus infections. *Annual review of microbiology* 38, 91-109.
- Kahvejian, A., Roy, G., and Sonenberg, N. (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 66, 293-300.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.N., and Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & development* 19, 104-113.

- Kapasi, P., Chaudhuri, S., Vyas, K., Baus, D., Komar, A.A., Fox, P.L., Merrick, W.C., and Mazumder, B. (2007). L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control. *Molecular cell* 25, 113-126.
- Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004a). GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *Journal of molecular biology* 335, 923-936.
- Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004b). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annual review of biochemistry* 73, 657-704.
- Karim, M.M., Svitkin, Y.V., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Costa-Mattioli, M., and Sonenberg, N. (2006). A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9494-9499.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & development* 13, 1211-1233.
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I.J., Stahl, J., and Anderson, P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Molecular biology of the cell* 13, 195-210.
- Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology* 147, 1431-1442.
- Keierleber, C., Wittekind, M., Qin, S.L., and McLaughlin, C.S. (1986). Isolation and characterization of PRT1, a gene required for the initiation of protein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 6, 4419-4424.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001a). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Molecular and cellular biology* 21, 5200-5213.
- Khaleghpour, K., Svitkin, Y.V., Craig, A.W., DeMaria, C.T., Deo, R.C., Burley, S.K., and Sonenberg, N. (2001b). Translational Repression by a Novel Partner of Human Poly(A) Binding Protein, Paip2. *Molecular cell* 7, 205-216.
- Kim-Ha, J., Kerr, K., and Macdonald, P.M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81, 403-412.
- Kim-Ha, J., Webster, P.J., Smith, J.L., and Macdonald, P.M. (1993). Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of oskar mRNA. *Development (Cambridge, England)* 119, 169-178.
- Kim, J.H., and Richter, J.D. (2006). Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Molecular cell* 24, 173-183.
- Kim, J.T., Kim, K.D., Song, E.Y., Lee, H.G., Kim, J.W., Kim, J.W., Chae, S.K., Kim, E., Lee, M.S., Yang, Y., and Lim, J.S. (2006). Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g). *FEBS letters* 580, 6375-6383.
- Kislauskis, E.H., Li, Z., Singer, R.H., and Taneja, K.L. (1993). Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *The Journal of cell biology* 123, 165-172.
- Kislauskis, E.H., and Singer, R.H. (1992). Determinants of mRNA localization. *Current opinion in cell biology* 4, 975-978.
- Klein, R.J., and Eddy, S.R. (2003). RSEARCH: finding homologs of single structured RNA sequences. *BMC bioinformatics* 4, 44.
- Kloc, M., and Etkin, L.D. (2005). RNA localization mechanisms in oocytes. *J Cell Sci* 118, 269-282.

- Kolupaeva, V.G., Hellen, C.U., and Shatsky, I.N. (1996). Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *Rna* 2, 1199-1212.
- Kolupaeva, V.G., Unbehaun, A., Lomakin, I.B., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2005). Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* 11, 470-486.
- Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of virology* 70, 3363-3371.
- Komar, A.A., and Hatzoglou, M. (2005). Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *The Journal of biological chemistry* 280, 23425-23428.
- Konarska, M., Filipowicz, W., Domdey, H., and Gross, H.J. (1981). Binding of ribosomes to linear and circular forms of the 5'-terminal leader fragment of tobacco-mosaic-virus RNA. *European journal of biochemistry / FEBS* 114, 221-227.
- Konig, J., Julius, C., Baumann, S., Homann, M., Goring, H.U., and Feldbrugge, M. (2007). Combining SELEX and the yeast three-hybrid system for in vivo selection and classification of RNA aptamers. *Rna* 13, 614-622.
- Kormos, B.L., Baranger, A.M., and Beveridge, D.L. (2007). A study of collective atomic fluctuations and cooperativity in the U1A-RNA complex based on molecular dynamics simulations. *Journal of structural biology* 157, 500-513.
- Korneeva, N.L., Lamphear, B.J., Hennigan, F.L., and Rhoads, R.E. (2000). Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *The Journal of biological chemistry* 275, 41369-41376.
- Kozak, M. (1979). Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes. *Nature* 280, 82-85.
- Kozak, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of molecular biology* 196, 947-950.
- Kozak, M. (1990). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 8301-8305.
- Kozak, M. (1991). A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene expression* 1, 111-115.
- Kozak, M. (1995). Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2662-2666.
- Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *The EMBO journal* 16, 2482-2492.
- Krecic, A.M., and Swanson, M.S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Current opinion in cell biology* 11, 363-371.
- Kress, T.L., Yoon, Y.J., and Mowry, K.L. (2004). Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *The Journal of cell biology* 165, 203-211.
- Kwon, S., Abramson, T., Munro, T.P., John, C.M., Kohrmann, M., and Schnapp, B.J. (2002). UUCAC- and vera-dependent localization of VegT RNA in *Xenopus* oocytes. *Curr Biol* 12, 558-564.
- Lamphear, B.J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R.E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *The Journal of biological chemistry* 270, 21975-21983.

- Lamphear, B.J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H.D., Klump, H., Kuechler, E., Skern, T., and Rhoads, R.E. (1993). Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *The Journal of biological chemistry* *268*, 19200-19203.
- Lancaster, A.M., Jan, E., and Sarnow, P. (2006). Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Rna* *12*, 894-902.
- Lawrence, J.B., and Singer, R.H. (1986). Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* *45*, 407-415.
- Le Quesne, J.P., Stoneley, M., Fraser, G.A., and Willis, A.E. (2001). Derivation of a structural model for the c-myc IRES. *Journal of molecular biology* *310*, 111-126.
- Le, S.Y., and Maizel, J.V., Jr. (1997). A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic acids research* *25*, 362-369.
- Le, S.Y., Siddiqui, A., and Maizel, J.V., Jr. (1996). A common structural core in the internal ribosome entry sites of picornavirus, hepatitis C virus, and pestivirus. *Virus genes* *12*, 135-147.
- LeFebvre, A.K., Korneeva, N.L., Trutschl, M., Cvek, U., Duzan, R.D., Bradley, C.A., Hershey, J.W.B., and Rhoads, R.E. (2006). Translation Initiation Factor eIF4G-1 Binds to eIF3 through the eIF3e Subunit. *J. Biol. Chem.* *281*, 22917-22932.
- Leung, K.M., van Horck, F.P., Lin, A.C., Allison, R., Standart, N., and Holt, C.E. (2006). Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nature neuroscience* *9*, 1247-1256.
- Levy-Strumpf, N., Deiss, L.P., Berissi, H., and Kimchi, A. (1997). DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of gamma interferon-induced programmed cell death. *Molecular and cellular biology* *17*, 1615-1625.
- Lewis, H.A., Musunuru, K., Jensen, K.B., Edo, C., Chen, H., Darnell, R.B., and Burley, S.K. (2000). Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell* *100*, 323-332.
- Lewis, R.A., Kress, T.L., Cote, C.A., Gautreau, D., Rokop, M.E., and Mowry, K.L. (2004). Conserved and clustered RNA recognition sequences are a critical feature of signals directing RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Mechanisms of development* *121*, 101-109.
- Lewis, S.M., Veyrier, A., Hosszu Ungureanu, N., Bonnal, S., Vagner, S., and Holcik, M. (2007). Subcellular relocation of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Molecular biology of the cell* *18*, 1302-1311.
- Lie, Y.S., and Macdonald, P.M. (1999). Translational regulation of oskar mRNA occurs independent of the cap and poly(A) tail in *Drosophila* ovarian extracts. *Development (Cambridge, England)* *126*, 4989-4996.
- Lomakin, I.B., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2000). Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Molecular and cellular biology* *20*, 6019-6029.
- Lomakin, I.B., Shirokikh, N.E., Yusupov, M.M., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2006). The fidelity of translation initiation: reciprocal activities of eIF1, IF3 and YciH. *The EMBO journal* *25*, 196-210.
- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J.* *19*, 6592-6601.
- Long, R.M., Gu, W., Meng, X., Gonsalvez, G., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2001). An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *The Journal of cell biology* *153*, 307-318.

- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., and Jansen, R.-P. (1997). Mating Type Switching in Yeast Controlled by Asymmetric Localization of ASH1 mRNA. *Science (New York, N.Y)* *277*, 383-387.
- Lukasiewicz, R., Nolen, B., Adams, J.A., and Ghosh, G. (2007). The RGG domain of Npl3p recruits Sky1p through docking interactions. *Journal of molecular biology* *367*, 249-261.
- Lukavsky, P.J., Otto, G.A., Lancaster, A.M., Sarnow, P., and Puglisi, J.D. (2000). Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nature structural biology* *7*, 1105-1110.
- Macdonald, P.M., and Smibert, C.A. (1996). Translational regulation of maternal mRNAs. *Current opinion in genetics & development* *6*, 403-407.
- MacDougall, N., Clark, A., MacDougall, E., and Davis, I. (2003). *Drosophila gurken* (TGF α) mRNA localizes as particles that move within the oocyte in two dynein-dependent steps. *Developmental cell* *4*, 307-319.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Molecular and cellular biology* *15*, 4990-4997.
- Majumdar, R., Bandyopadhyay, A., and Maitra, U. (2003). Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *The Journal of biological chemistry* *278*, 6580-6587.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., and Sonenberg, N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* *25*, 6416-6422.
- Maraia, R.J. (2001). La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase iii transcripts. *The Journal of cell biology* *153*, F13-18.
- Marash, L., and Kimchi, A. (2005). DAP5 and IRES-mediated translation during programmed cell death. *Cell death and differentiation* *12*, 554-562.
- Marcotrigiano, J., Lomakin, I.B., Sonenberg, N., Pestova, T.V., Hellen, C.U., and Burley, S.K. (2001). A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. *Molecular cell* *7*, 193-203.
- Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS journal* *272*.
- Marissen, W.E., and Lloyd, R.E. (1998). Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by caspase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells. *Molecular and cellular biology* *18*, 7565-7574.
- Marissen, W.E., Triyoso, D., Younan, P., and Lloyd, R.E. (2004). Degradation of poly(A)-binding protein in apoptotic cells and linkage to translation regulation. *Apoptosis* *9*, 67-75.
- Markussen, F.H., Michon, A.M., Breitwieser, W., and Ephrussi, A. (1995). Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development (Cambridge, England)* *121*, 3723-3732.
- Marquis, J., Paillard, L., Audic, Y., Cosson, B., Danos, O., Le Bec, C., and Osborne, H.B. (2006). CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. *Biochem J* *400*, 291-301.
- Martineau, Y., Le Bec, C., Monbrun, L., Allo, V., Chiu, I.M., Danos, O., Moine, H., Prats, H., and Prats, A.C. (2004). Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Molecular and cellular biology* *24*, 7622-7635.
- Martinez-Salas, E., and Fernandez-Miragall, O. (2004). Picornavirus IRES: structure function relationship. *Current pharmaceutical design* *10*, 3757-3767.
- Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., and Imataka, H. (2007). Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *The EMBO journal*.

- Mathews, M., Sonenberg, N., and Hershey, J.W.B. (2000). Origins and principles of translational control. *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N et al., eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-32.
- Matsuo, H., Li, H., McGuire, A.M., Fletcher, C.M., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Wagner, G. (1997). Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nature structural biology* 4, 717-724.
- Mattaj, I.W. (1993). RNA recognition: A Family Matter? *Cell* 73, 837-840.
- Mayeur, G.L., Fraser, C.S., Peiretti, F., Block, K.L., and Hershey, J.W.B. (2003). Characterization of eIF3k. A newly discovered subunit of mammalian translation initiation factor eIF3. *European Journal of Biochemistry* 270, 4133-4139.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., and Bentley, D.L. (1997). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & development* 11, 3306-3318.
- Meerovitch, K., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Lejbkiewicz, F., Kenan, D.J., Chan, E.K., Agol, V.I., Keene, J.D., and Sonenberg, N. (1993). La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *Journal of virology* 67, 3798-3807.
- Meijer, H.A., Radford, H.E., Wilson, L.S., Lissenden, S., and de Moor, C.H. (2007). Translational control of maskin mRNA by its 3' untranslated region. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 99, 239-250.
- Melo, E.O., Dhalia, R., Martins de Sa, C., Standart, N., and de Melo Neto, O.P. (2003). Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. *The Journal of biological chemistry* 278, 46357-46368.
- Melton, D.A. (1987). Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. *Nature* 328, 80-82.
- Messias, A.C., Harnisch, C., Ostareck-Lederer, A., Sattler, M., and Ostareck, D.H. (2006). The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *Journal of molecular biology* 361, 470-481.
- Methot, N., Pause, A., Hershey, J.W., and Sonenberg, N. (1994). The translation initiation factor eIF-4B contains an RNA-binding region that is distinct and independent from its ribonucleoprotein consensus sequence. *Molecular and cellular biology* 14, 2307-2316.
- Méthot, N., Pickett, G., Keene, J.D., and Sonenberg, N. (1996). In vitro RNA selection identifies RNA ligands that specifically bind to eucaryotic translation initiation factor 4B: the role of the RNA recognition motif. *RNA* 2, 38-50.
- Methot, N., Rom, E., Olsen, H., and Sonenberg, N. (1997). The Human Homologue of the Yeast Prt1 Protein Is an Integral Part of the Eukaryotic Initiation Factor 3Complex and Interacts with p170. *The Journal of biological chemistry* 272, 1110-1116.
- Methot, N., Song, M.S., and Sonenberg, N. (1996). A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3. *Molecular and cellular biology* 16, 5328-5334.
- Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Bushell, M., Evans, J.R., Stoneley, M., Le Quesne, J.P., Spriggs, R.V., and Willis, A.E. (2005). Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry. *Genes & development* 19, 1556-1571.
- Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Coldwell, M.J., Jackson, R.J., and Willis, A.E. (2003). The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Molecular cell* 11, 757-771.

- Miyakawa, S., Oguro, A., Ohtsu, T., Imataka, H., Sonenberg, N., and Nakamura, Y. (2006). RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *Rna* 12, 1825-1834.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y.V., Pestova, T.V., and Sonenberg, N. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Molecular and cellular biology* 20, 468-477.
- Morley, S.J., Coldwell, M.J., and Clemens, M.J. (2005). Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell death and differentiation* 12, 571-584.
- Morris-Desbois, C., Rety, S., Ferro, M., Garin, J., and Jalinot, P. (2001). The human protein HSPC021 interacts with Int-6 and is associated with eukaryotic translation initiation factor 3. *The Journal of biological chemistry* 276, 45988-45995.
- Mowry, K.L., and Melton, D.A. (1992). Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science (New York, N.Y)* 255, 991-994.
- Muller, M., Heuck, A., and Niessing, D. (2007). Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast. *Cell Mol Life Sci* 64, 171-180.
- Munchow, S., Sauter, C., and Jansen, R.P. (1999). Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins. *J Cell Sci* 112 (*Pt 10*), 1511-1518.
- Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M.A., Nilges, M., Gibson, T.J., and Pastore, A. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell* 85, 237-245.
- Musunuru, K., and Darnell, R.B. (2004). Determination and augmentation of RNA sequence specificity of the Nova K-homology domains. *Nucleic acids research* 32, 4852-4861.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T.H., Li, J., and Evans, P.R. (1990). Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* 348, 515-520.
- Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* Cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Developmental cell* 6, 69-78.
- Naranda, T., Kainuma, M., MacMillan, S.E., and Hershey, J.W. (1997). The 39-kilodalton subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 is essential for the complex's integrity and for cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 17, 145-153.
- Naranda, T., Sirangelo, I., Fabbri, B.J., and Hershey, J.W. (1995). Mutations in the NKXD consensus element indicate that GTP binds to the gamma-subunit of translation initiation factor eIF2. *FEBS letters* 372, 249-252.
- Nasmyth, K.A. (1982). Molecular genetics of yeast mating type. *Annual review of genetics* 16, 439-500.
- Neafsey, D.E., and Galagan, J.E. (2007). Dual modes of natural selection on upstream open reading frames. *Molecular biology and evolution* 24, 1744-1751.
- Neff, C.L., and Sachs, A.B. (1999). Eukaryotic translation initiation factors 4G and 4A from *Saccharomyces cerevisiae* interact physically and functionally. *Molecular and cellular biology* 19, 5557-5564.
- Nelson, M.R., Leidal, A.M., and Smibert, C.A. (2004). *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *The EMBO journal* 23, 150-159.
- Nousch, M., Reed, V., Bryson-Richardson, R.J., Currie, P.D., and Preiss, T. (2007). The eIF4G-homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage. *Rna* 13, 374-384.

- Ohlmann, T., Rau, M., Morley, S., and Pain, V.M. (1995). Effect of cleavage of the p220 subunit of eukaryotic translation initiation factor eIF-4F on protein synthesis in vitro. *Biochemical Society transactions* 23, 315S.
- Ohlmann, T., Rau, M., Pain, V.M., and Morley, S.J. (1996). The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *The EMBO journal* 15, 1371-1382.
- Olivier, C., Poirier, G., Gendron, P., Boisgontier, A., Major, F., and Chartrand, P. (2005). Identification of a Conserved RNA Motif Essential for She2p Recognition and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4752-4766.
- Olsen, D.S., Savner, E.M., Mathew, A., Zhang, F., Krishnamoorthy, T., Phan, L., and Hinnebusch, A.G. (2003). Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *The EMBO journal* 22, 193-204.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G., and Hentze, M.W. (2002). c-Src-Mediated Phosphorylation of hnRNP K Drives Translational Activation of Specifically Silenced mRNAs. *Molecular and cellular biology* 22, 4535-4543.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Standart, N., and Thiele, B.J. (1994). Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *The EMBO journal* 13, 1476-1481.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N., and Hentze, M.W. (2001). Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104, 281-290.
- Otero, L.J., Devaux, A., and Standart, N. (2001). A 250-nucleotide UA-rich element in the 3' untranslated region of *Xenopus laevis* Vg1 mRNA represses translation both in vivo and in vitro. *Rna* 7, 1753-1767.
- Otto, G.A., Lukavsky, P.J., Lancaster, A.M., Sarnow, P., and Puglisi, J.D. (2002). Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *RNA* 8, 913-923.
- Oubridge, C., Ito, N., Evans, P.R., Teo, C.H., and Nagai, K. (1994). Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature* 372, 432-438.
- Paillard, L., Omilli, F., Legagneux, V., Bassez, T., Maniey, D., and Osborne, H.B. (1998). EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos. *The EMBO journal* 17, 278-287.
- Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., Jr., and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762-767.
- Pawlotsky, J.M. (2004). Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in microbiology* 12, 96-102.
- Pedersen, S.K., Christiansen, J., Hansen, T.O., Larsen, M.R., and Nielsen, F.C. (2002). Human insulin-like growth factor II leader 2 mediates internal initiation of translation. *Biochem J* 363, 37-44.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Perez-Canadillas, J.M., and Varani, G. (2001). Recent advances in RNA-protein recognition. *Current opinion in structural biology* 11, 53-58.
- Perez, I., Lin, C.H., McAfee, J.G., and Patton, J.G. (1997). Mutation of PTB binding sites causes misregulation of alternative 3' splice site selection in vivo. *Rna* 3, 764-778.
- Perrone-Bizzozero, N., and Bolognani, F. (2002). Role of HuD and other RNA-binding proteins in neural development and plasticity. *Journal of neuroscience research* 68, 121-126.

- Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2003). Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes & development* *17*, 181-186.
- Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2005). Reconstitution of eukaryotic translation elongation in vitro following initiation by internal ribosomal entry. *Methods* *36*, 261-269.
- Pestova, T.V., Hellen, C.U., and Shatsky, I.N. (1996a). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Molecular and cellular biology* *16*, 6859-6869.
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., and Hellen, C.U.T. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *PNAS* *98*, 7029-7036.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., and Hellen, C.U. (2004). Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep* *5*, 906-913.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., and Hellen, C.U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* *403*, 332-335.
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., and Hellen, C.U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & development* *12*, 67-83.
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., and Hellen, C.U. (1996b). 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. *Molecular and cellular biology* *16*, 6870-6878.
- Phan, L., Zhang, X., Asano, K., Anderson, J., Vornlocher, H.P., Greenberg, J.R., Qin, J., and Hinnebusch, A.G. (1998). Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Molecular and cellular biology* *18*, 4935-4946.
- Pickering, B.M., Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Stoneley, M., and Willis, A.E. (2004). Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Molecular and cellular biology* *24*, 5595-5605.
- Pisarev, A.V., Shirokikh, N.E., and Hellen, C.U.T. (2005). Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *Comptes Rendus Biologies* *328*, 589-605.
- Prats, A.C., De Billy, G., Wang, P., and Darlix, J.L. (1989). CUG initiation codon used for the synthesis of a cell surface antigen coded by the murine leukemia virus. *Journal of molecular biology* *205*, 363-372.
- Prats, A.C., Vagner, S., Prats, H., and Amalric, F. (1992). cis-acting elements involved in the alternative translation initiation process of human basic fibroblast growth factor mRNA. *Molecular and cellular biology* *12*, 4796-4805.
- Prevot, D., Darlix, J.-L., and Ohlmann, T. (2003a). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biology of the Cell* *95*, 141-156.
- Prevot, D., Decimo, D., Herbreteau, C.H., Roux, F., Garin, J., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. (2003b). Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO journal* *22*, 1909-1921.
- Price, S.R., Evans, P.R., and Nagai, K. (1998). Crystal structure of the spliceosomal U2B'-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature* *394*, 645-650.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., *et al.* (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* *438*, 679-684.

- Putz, U., Skehel, P., and Kuhl, D. (1996). A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA--protein interactions. *Nucleic acids research* *24*, 4838-4840.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *The EMBO journal* *18*, 270-279.
- Qin, X., and Sarnow, P. (2004). Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* *279*, 13721-13728.
- Ramos, A., Hollingworth, D., Major, S.A., Adinolfi, S., Kelly, G., Muskett, F.W., and Pastore, A. (2002). Role of dimerization in KH/RNA complexes: the example of Nova KH3. *Biochemistry* *41*, 4193-4201.
- Riechmann, V., and Ephrussi, A. (2001). Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Current opinion in genetics & development* *11*, 374-383.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* *17*, 1030-1032.
- Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P.A., Spaan, W.J., and Bredenbeek, P.J. (1997). Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *Journal of virology* *71*, 451-457.
- Rogers, G.W., Jr., Richter, N.J., Lima, W.F., and Merrick, W.C. (2001). Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *The Journal of biological chemistry* *276*, 30914-30922.
- Rongo, C., Gavis, E.R., and Lehmann, R. (1995). Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development (Cambridge, England)* *121*, 2737-2746.
- Rosenberg, S. (2001). Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *Journal of molecular biology* *313*, 451-464.
- Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L., and Singer, R.H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Molecular and cellular biology* *17*, 2158-2165.
- Rouault, T.A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature chemical biology* *2*, 406-414.
- Rowlands, A.G., Panniers, R., and Henshaw, E.C. (1988). The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *The Journal of biological chemistry* *263*, 5526-5533.
- Sachs, A.B. (2000). Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail. *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N et al., eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaller, M.D. (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* *20*, 6459-6472.
- Schroeder, R., Barta, A., and Semrad, K. (2004). Strategies for RNA folding and assembly. *Nature reviews* *5*, 908-919.
- Sedman, S.A., Gelembiuk, G.W., and Mertz, J.E. (1990). Translation initiation at a downstream AUG occurs with increased efficiency when the upstream AUG is located very close to the 5' cap. *Journal of virology* *64*, 453-457.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *PNAS* *93*, 8496-8501.
- Shav-Tal, Y., and Singer, R.H. (2005). RNA localization. *J Cell Sci* *118*, 4077-4081.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L., and Vale, R.D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast:

- identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 11429-11434.
- Shestakova, E.A., Singer, R.H., and Condeelis, J. (2001). The physiological significance of beta -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 7045-7050.
- Shestakova, E.A., Wyckoff, J., Jones, J., Singer, R.H., and Condeelis, J. (1999). Correlation of beta-actin messenger RNA localization with metastatic potential in rat adenocarcinoma cell lines. *Cancer research* *59*, 1202-1205.
- Sil, A., and Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* *84*, 711-722.
- Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., and Hellen, C.U. (1998a). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *Journal of virology* *72*, 4775-4782.
- Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., and Hellen, C.U.T. (1998b). Specific Interaction of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 with the 5' Nontranslated Regions of Hepatitis C Virus and Classical Swine Fever Virus RNAs. *J. Virol.* *72*, 4775-4782.
- Soler, M., Pellerin, M., Malnou, C.E., Dhumeaux, D., Kean, K.M., and Pawlotsky, J.M. (2002). Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* *298*, 160-173.
- Sonenberg, N., and Dever, T.E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Current opinion in structural biology* *13*, 56-63.
- Spriggs, K.A., Bushell, M., Mitchell, S.A., and Willis, A.E. (2005). Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell death and differentiation* *12*, 585-591.
- St Johnston, D. (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* *81*, 161-170.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature reviews* *6*, 363-375.
- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* *66*, 51-63.
- Stelzl, U., and Nierhaus, K.H. (2001). SERF: In Vitro Selection of random RNA Fragments to Identify Protein Binding Site Within Large RNAs. *METHODS* *25*, 351-357.
- Stelzl, U., Spahn, C.M.T., and Nierhaus, K.H. (2000). Selecting rRNA binding sites for the ribosomal proteins L4 and L6 from randomly fragmented rRNA: Application of a method called SERF. *PNAS* *97*, 4597-4602.
- Stohr, N., Lederer, M., Reinke, C., Meyer, S., Hatzfeld, M., Singer, R.H., and Huttelmaier, S. (2006). ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *The Journal of cell biology* *175*, 527-534.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I., and Vale, R.D. (1997). Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* *389*, 90-93.
- Takizawa, P.A., and Vale, R.D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *PNAS* *97*, 5273-5278.
- Tarun, S.Z., Jr., and Sachs, A.B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *The EMBO journal* *15*, 7168-7177.
- Tautz, D. (1988). Regulation of the Drosophila segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres. *Nature* *332*, 281-284.

- Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A.C., and Vagner, S. (2003). Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 95, 169-178.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y)* 249, 505-510.
- Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N., and Katada, T. (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *The Journal of biological chemistry* 277, 50286-50292.
- Unbehaun, A., Borukhov, S.I., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (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 & development* 18, 3078-3093.
- Vagner, S., Gensac, M.C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H., and Prats, A.C. (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Molecular and cellular biology* 15, 35-44.
- Valasek, L., Hasek, J., Trachsel, H., Imre, E.M., and Ruis, H. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* HCR1 gene encoding a homologue of the p35 subunit of human translation initiation factor 3 (eIF3) is a high copy suppressor of a temperature-sensitive mutation in the Rpg1p subunit of yeast eIF3. *The Journal of biological chemistry* 274, 27567-27572.
- Valasek, L., Nielsen, K.H., and Hinnebusch, A.G. (2002). Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo. *The EMBO journal* 21, 5886-5898.
- Valasek, L., Nielsen, K.H., Zhang, F., Fekete, C.A., and Hinnebusch, A.G. (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. *Molecular and cellular biology* 24, 9437-9455.
- Valasek, L., Phan, L., Schoenfeld, L.W., Valaskova, V., and Hinnebusch, A.G. (2001). Related eIF3 subunits TIF32 and HCR1 interact with an RNA recognition motif in PRT1 required for eIF3 integrity and ribosome binding. *The EMBO journal* 20, 891-904.
- Varani, G., and Nagai, K. (1998). RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 407-445.
- Verlhac, M.H., Chen, R.H., Hanachi, P., Hershey, J.W., and Derynck, R. (1997). Identification of partners of TIF34, a component of the yeast eIF3 complex, required for cell proliferation and translation initiation. *The EMBO journal* 16, 6812-6822.
- Vilela, C., and McCarthy, J.E. (2003). Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region. *Molecular microbiology* 49, 859-867.
- Vornlocher, H.-P., Hanachi, P., Ribeiro, S., and Hershey, J.W.B. (1999). A 110-Kilodalton Subunit of Translation Initiation Factor eIF3 and an Associated 135-kilodalton Protein Are Encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TIF32 and TIF31 Genes. *J. Biol. Chem.* 274, 16802-16812.
- Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of virology* 67, 3338-3344.
- Webster, P.J., Liang, L., Berg, C.A., Lasko, P., and Macdonald, P.M. (1997). Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes & development* 11, 2510-2521.
- Wilhelm, J.E., Vale, R.D., and Hegde, R.S. (2000). Coordinate control of translation and localization of Vg1 mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13132-13137.

- Wilson, J.E., Powell, M.J., Hoover, S.E., and Sarnow, P. (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Molecular and cellular biology* *20*, 4990-4999.
- Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A.A., Koromilas, A.E., Zhou, L., Snider, M.D., Scheuner, D., Kaufman, R.J., and Hatzoglou, M. (2003). The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* *113*, 519-531.
- Yamanaka, S., Poksay, K.S., Arnold, K.S., and Innerarity, T.L. (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes & development* *11*, 321-333.
- Yisraeli, J.K. (2005). VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* *97*, 87-96.

ANNEXE

Publication

Local Activation of Yeast *ASH1* mRNA Translation through Phosphorylation of Khd1p by the Casein Kinase Yck1p

Nicolas Paquin,¹ Marie Ménade,^{1,2} Guillaume Poirier,¹ Damiane Donato,¹ Emmanuel Drouet,² and Pascal Chartrand^{1,*}

¹Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

²Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS, Université Joseph-Fourier, 38042 Grenoble, France

*Correspondence: p.chartrand@umontreal.ca

DOI 10.1016/j.molcel.2007.05.016

SUMMARY

In *S. cerevisiae*, the *ASH1* mRNA is localized at the bud tip of late-anaphase cells, resulting in the exclusive sorting of Ash1p to the daughter cell nucleus. While the mechanism behind the localization of this transcript has been well studied, the regulation of its translation is still poorly understood. We now report that the RNA binding protein Khd1 interacts with the *ASH1* mRNA localization element E1 and with the C-terminal domain of eIF4G1 to regulate the translation of this transcript. Khd1p reduces translation initiation on the *ASH1* mRNA and diminishes Ash1p leakage into the mother cell nucleus. Furthermore, we show that the casein kinase Yck1p phosphorylates Khd1p at the plasma membrane, disrupting the Khd1p-RNA complex and releasing its translational repression on the *ASH1* mRNA. This study reveals how, by linking mRNA sorting and translational activation, Khd1p and Yck1p regulate the spatiotemporal expression of a cell fate determinant.

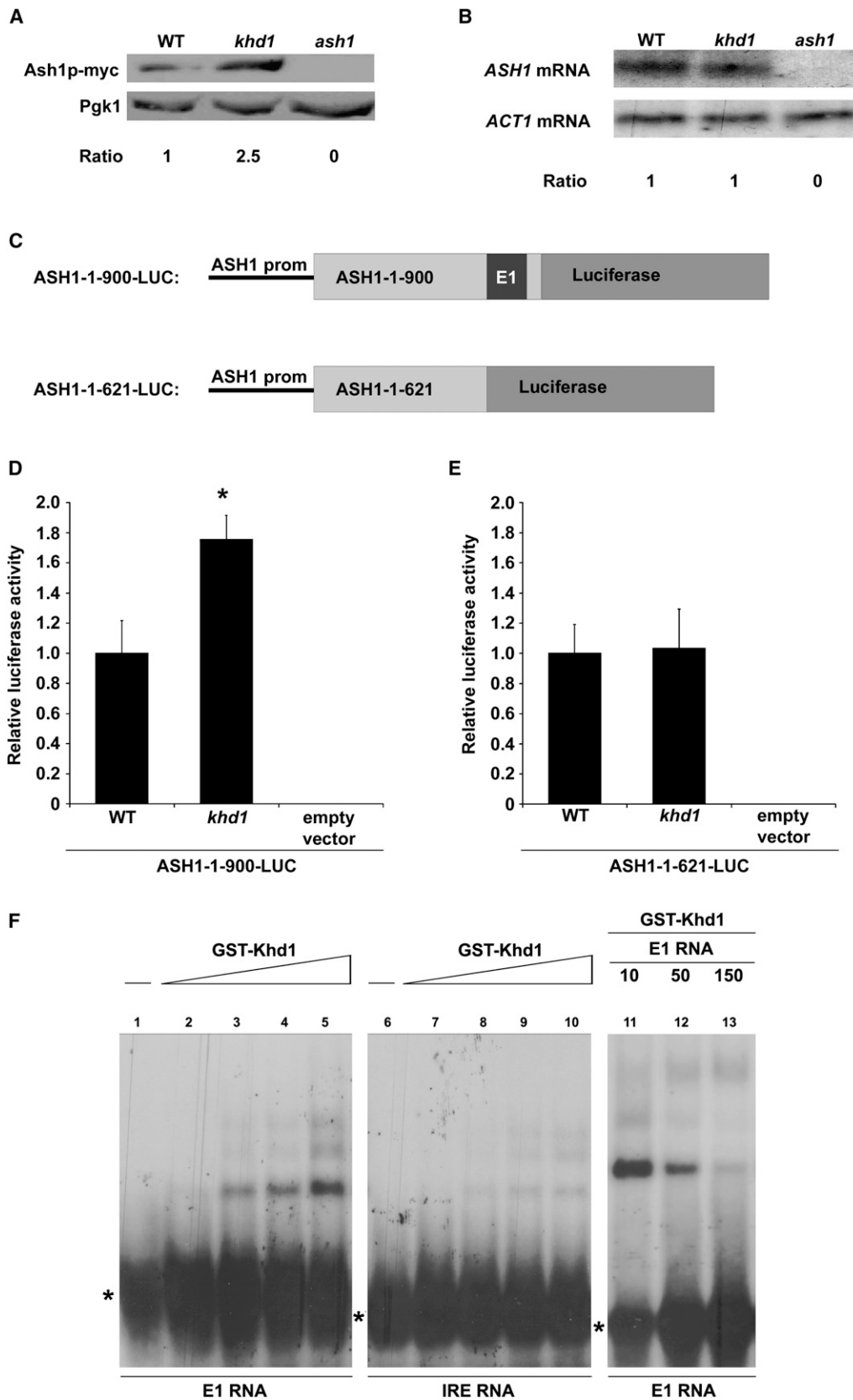
INTRODUCTION

The intracellular localization of mRNAs allows cells to properly define the site and time of expression of specific proteins. This mechanism of protein sorting is essential in biological processes like axis determination during embryonic development, asymmetric cell division, cell motility, and neuronal growth (Kindler et al., 2005; St. Johnston, 2005). In order to avoid any premature or ectopic expression of the localized proteins, the translation of these transcripts is thought to be tightly regulated. This regulation is often mediated by *trans*-acting factors that interact with *cis*-acting elements in the untranslated regions (5' and 3'UTR) of the target mRNAs (Kuersten and Goodwin, 2003). Translation initiation, the rate limiting step in translation, is frequently the target of these factors

(Gingras et al., 1999; Richter and Sonenberg, 2005). A recent study has shown that translation onset of the neurite-localized β -actin mRNA can occur through the phosphorylation of its translational repressor ZBP1 at the end site of localization, thus providing a spatial regulation of translational activation (Huttelmaier et al., 2005). It is still unclear how common is this mechanism of spatial regulation.

The budding yeast *S. cerevisiae* serves as a model system for studying the asymmetric segregation of cell fate determinants through mRNA localization (Chartrand et al., 2001; Darzacq et al., 2003). The asymmetric sorting of Ash1p to the daughter cell nucleus correlates with the localization of the *ASH1* mRNA to the distal tip of daughter cells during the anaphase of the cell cycle (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997) and results in the inhibition of mating type switching in the daughter cell (Jansen et al., 1996; Sil and Herskowitz, 1996). The core components of the *ASH1* mRNA localization machinery have been identified and were shown to form a complex, called the "locasome," which includes Myo4p, She2p, and She3p (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000; Takizawa and Vale, 2000). While the factors involved in *ASH1* mRNA sorting are well known, the translational regulation of this transcript is still poorly understood. A previous study has reported that the presence of *cis*-acting localization elements within the coding sequence of the *ASH1* mRNA plays a role in the regulation of its translation (Chartrand et al., 2002). Moreover, two *trans*-acting factors, Puf6p and Khd1p, were suggested to participate in *ASH1* mRNA translational control (Gu et al., 2004; Irie et al., 2002), but their specific roles were not determined. Furthermore, how the translation of the *ASH1* mRNA is activated at the bud tip is still unknown.

We now report that Khd1p, a protein with three RNA binding hnRNP K homology (KH) domains, is a translational regulator of the *ASH1* mRNA that interacts with the C-terminal domain of eIF4G1 and binds the localization element E1 of this mRNA. Interestingly, deletion of the C-terminal domain of eIF4G1 increases the translation of an *ASH1* reporter mRNA in vivo. Furthermore, we show that the yeast casein kinase Yck1p interacts with Khd1p at the plasma membrane and phosphorylates the C-terminal



end of Khd1p. This phosphorylation disrupts the interaction between Khd1p and RNA and relieves the Khd1p-mediated translational control on an *ASH1* reporter mRNA. Our results show that the spatiotemporal regulation of protein synthesis, by which the translational control of a localized mRNA is released only as the transcript reaches its final destination, is an important mechanism for the efficient sorting of a cell fate determinant.

RESULTS

Khd1p Regulates the Translation of the *ASH1* mRNA through the Localization Element E1

To establish the regulating effect of Khd1p on *ASH1* mRNA translation, the expression of endogenous Ash1p was compared between a wild-type (WT) *KHD1* strain and a *khd1* null strain. Deletion of *KHD1* resulted in a 2.5-fold increase in myc-tagged Ash1p expression (Figure 1A). *ASH1* mRNA levels are equal in the WT and *khd1* strains, suggesting that Khd1p acts at a posttranscriptional level to regulate the expression of Ash1p (Figure 1B). To corroborate these results, the kinetics of Ash1p synthesis were measured in WT and *khd1* strains. The *ASH1* mRNA was expressed from a galactose-inducible promoter, and the synthesis of Ash1p-myc was measured by western blot. After 1 hr of galactose stimulation, the *khd1* yeast strain showed a 2- to 3-fold increase in Ash1p synthesis compared to the WT strain (see Figure S1A in the Supplemental Data available with this article online). Northern blot analysis showed that *ASH1* mRNA levels were similar in both strains after 1 hr of galactose induction (Figure S1B).

Khd1p was previously reported to bind within the first 800 nucleotides of the *ASH1* mRNA coding sequence, a region that includes the localization element E1 (Irie et al., 2002). This localization element is bound by the RNA binding protein She2p and is sufficient to target a transcript to the bud of yeast cells (Chartrand et al., 1999). We previously reported that disruption of the four *ASH1* mRNA localization elements results in the increased synthesis of Ash1p (Chartrand et al., 2002), suggesting the possibility that one of the localization elements may be a target site for a translational regulation factor. In order to show that a possible interaction between Khd1p and the element E1 is involved in the translational regulation of the *ASH1* mRNA, luciferase fusions that contained either the first 900 nucleotides (including the element E1)

or the first 621 nucleotides of the coding sequence of *ASH1* (omitting the element E1) were generated (Figure 1C). For both constructions, the *ASH1* coding sequence was in-frame with the luciferase, generating Ash1-Luc fusion proteins. As shown in Figures 1D and 1E and Figure S1C, the fusion of the first 900 nucleotides of the *ASH1* coding sequence with luciferase resulted in a 1.8-fold increase in luciferase activity in a *khd1* strain compared to a WT strain. In contrast, the luciferase fusion that excluded the localization element E1 showed no difference in activity between WT and *khd1* strains. Moreover, the expression of luciferase alone under the *ASH1* promoter did not show any difference in the presence or absence of Khd1p (data not shown). To rule out the possibility that the mere binding of a protein within the coding sequence of the *ASH1* mRNA would explain such effect on Ash1p synthesis, the same induction of *ASH1* mRNA was performed in a yeast strain deleted of the She2 protein, which also binds within the coding sequence of *ASH1* (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000). *SHE2* deletion did not result in increased Ash1p expression, suggesting a specific effect of Khd1p on Ash1p synthesis (Figure S1A).

To test the possibility of a direct interaction between Khd1p and the localization element E1, recombinant GST-Khd1p and in vitro-transcribed localization element E1 RNA were used in an electrophoresis mobility shift assay (EMSA). As shown in Figure 1F, a complex was observed between Khd1p and the E1 RNA. This complex was specific, since only a weak shift was observed between GST-Khd1p and the iron-responsive element (IRE) RNA (Figure 1F). Multiple bands were observed at a higher protein concentration, suggesting a possible dimerization of Khd1p with RNA. In a competition assay, the main shifted band was efficiently competed by an excess of unlabeled E1 RNA (Figure 1F, lanes 11–13) but weakly competed by an excess of unlabeled IRE RNA (Figure S1D), which shows that the observed shifts were caused by the formation of a specific protein-RNA complex. Altogether, these results indicate that Khd1p interacts directly with the localization element E1.

Deletion of *KHD1* Increases the Ribosome Load on the *ASH1* mRNA and Decreases the Asymmetric Distribution of Ash1p

To determine at which level of *ASH1* mRNA translation Khd1p acts, a sucrose gradient was used to purify the

Figure 1. Khd1p Regulates the Translation of the *ASH1* mRNA through the Localization Element E1

(A) Detection of endogenous levels of Ash1p-myc and Pgc1p in a WT, *khd1* null, and *ash1* null strains by western blot.
 (B) Endogenous levels of *ASH1* mRNA and *ACT1* mRNA in a WT, *khd1* null, and *ash1* null strain, detected by northern blot.
 (C) Schematic representation of the constructions used for the luciferase assays. Constructions are on single-copy vectors and under the endogenous *ASH1* promoter. Numbers represent *ASH1* mRNA coding sequence nucleotides in-frame with luciferase.
 (D) Luciferase assay for the Ash1₁₋₉₀₀-Luc fusion protein in WT, *khd1* and control strains normalized on total protein concentration.
 (E) Luciferase assay for Ash1₁₋₆₂₁-Luc protein in WT, *khd1* and control strains normalized on total protein concentration.
 (F) EMSA for GST-Khd1 with localization element E1 and the IRE RNA. Increasing concentration of recombinant GST-Khd1p (0, 0.3, 0.64, 1.6, and 3.2 μ M in lanes 1–5 and 6–10; 9.6 μ M in lanes 11–13) was added to P³²-labeled RNA. The free RNA is indicated by an asterisk. Competition of the Khd1p-E1 RNA complex with unlabeled E1 RNA (10 times, 50 times, and 150 times excess, lanes 11–13). Paired t test, *p < 0.005. Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least four independent experiments.

various ribosome fractions from WT or *khd1* yeast cells and reveal the distribution of the *ASH1* mRNA in these fractions using dot blots. As shown in Figure 2A, the *ASH1* mRNA is mostly in the monosome and lower polysomes fractions of the gradient in a WT yeast strain, as is Khd1p (Figure S2). However, when *KHD1* was deleted, the *ASH1* mRNA was redistributed toward the higher polysome fractions of the gradient (Figure 2B). Deletion of *KHD1* had no impact on the distribution of the *ACT1* mRNA, suggesting that the effect of Khd1p is specific to the *ASH1* mRNA. Similar results were obtained when using RT-PCR for the detection of the *ASH1* mRNA in the fractions of the polysome gradient (data not shown). Altogether, these results show that Khd1p specifically reduces the ribosome load on the *ASH1* mRNA.

Since an increased translation of the *ASH1* mRNA has been shown to decrease the asymmetric distribution of Ash1p (Chartrand et al., 2002; Gu et al., 2004), the effect of a deletion of *KHD1* on the distribution of Ash1p in late-anaphase cells was explored using immunofluorescence. While 80% of late-anaphase WT yeasts showed an asymmetric localization of Ash1p in the daughter cell nucleus, only 40% of *khd1* yeasts still had Ash1p segregated to the daughter cell nucleus (Figures 3A and 3B). These results are similar to those obtained in strains in which all four *ASH1* localization elements were moved to the 3'UTR of this transcript (Chartrand et al., 2002) or to a *puf6* strain (Gu et al., 2004). To determine if this defective sorting of Ash1p was caused by a decreased localization of the *ASH1* mRNA at the bud tip in a *khd1* strain, the localization of this transcript was assessed by FISH. As shown in Figures 3C and 3D, *ASH1* mRNA localization was similar in both WT and *khd1* strains, suggesting that the defect in Ash1p asymmetric distribution observed in a *khd1* strain was not due to the mislocalization of its transcript.

Khd1p Interacts with the C-Terminal Domain of eIF4G1

Large-scale affinity precipitation assays have shown that Khd1p is associated in vivo with several proteins involved in translation initiation: eIF4E, eIF4G1, eIF4G2, and Pabp1 (Gavin et al., 2002, 2006). Among these proteins, eIF4E and eIF4G are the two that are the more frequently targeted by translation regulation factors (Gingras et al., 1999). In order to identify the mechanism by which Khd1p regulates the translation of the *ASH1* mRNA, the interaction between Khd1p and these two translation initiation factors was investigated by GST pull-down assay using a yeast extract containing TAP-tagged Khd1p. Khd1p-TAP from the yeast extract was retained by an immobilized GST-eIF4G1 recombinant protein, but not by GST alone (Figure 4A). Treatment with RNase A disrupted this complex, suggesting that the interaction is facilitated by the presence of RNA. No interaction between Khd1p-TAP and the cap binding protein eIF4E was detected by this approach (data not shown).

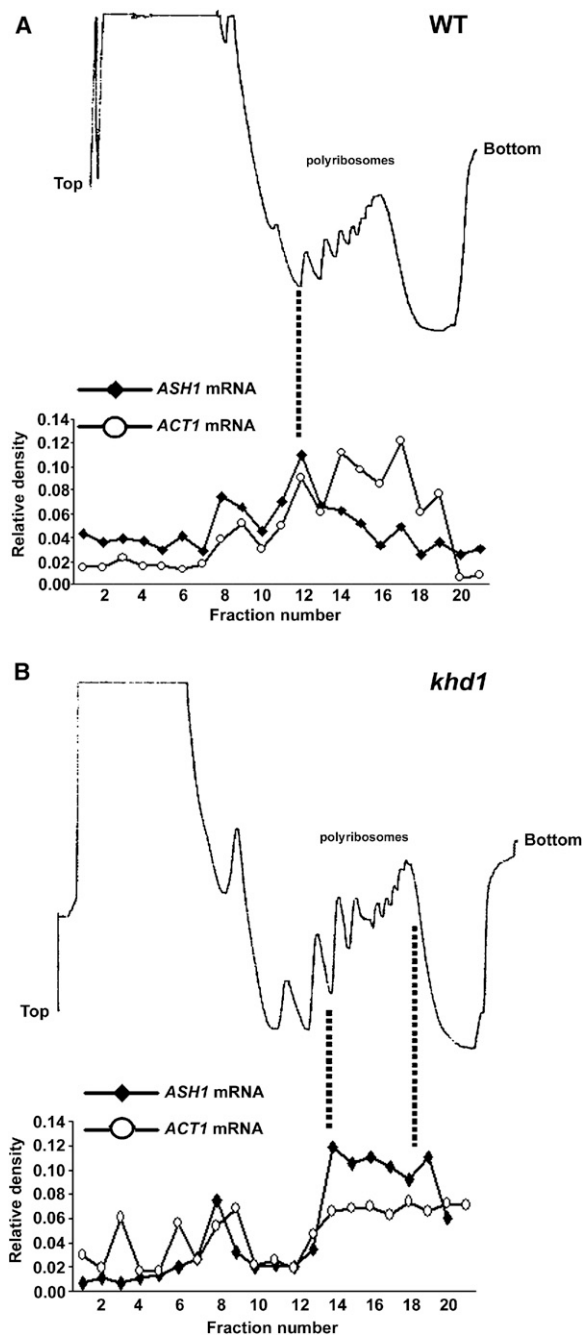


Figure 2. Deletion of *KHD1* Results in a Redistribution of *ASH1* mRNA to the Higher Polysome Fractions

(A) Sucrose gradient and relative distribution of *ASH1* mRNA and *ACT1* mRNA in a WT strain.

(B) Sucrose gradient and relative distribution of *ASH1* mRNA and *ACT1* mRNA in a *khd1* strain. These results are representative of two independent experiments using dot blots and a third using RT-PCR.

Since the interaction between Khd1p and eIF4G1 is RNA dependent, it could be the result of the two proteins being bound to the same RNA. In order to verify this possibility, the same GST pull-down assay was performed

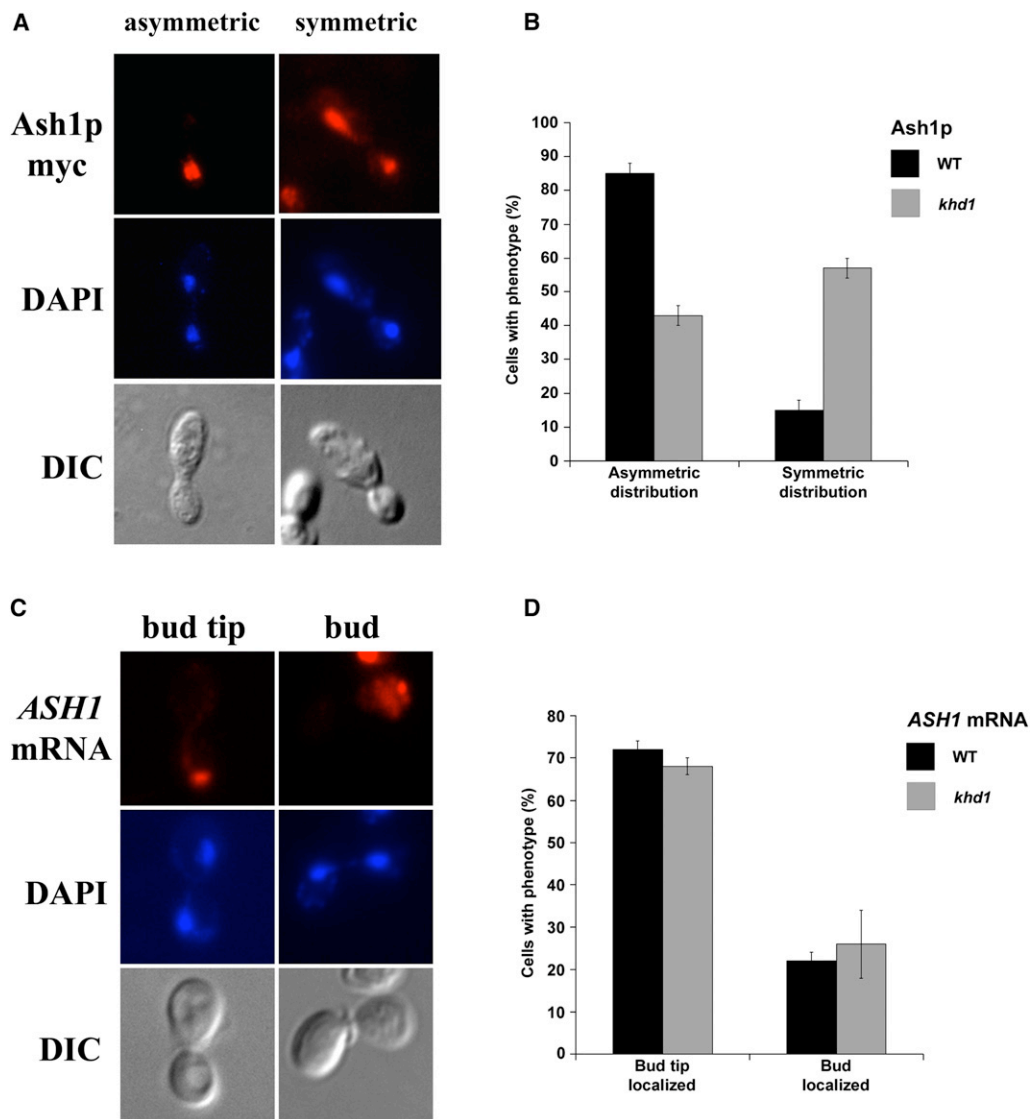


Figure 3. Deletion of *KHD1* Decreases the Asymmetric Distribution of Ash1p

(A) Phenotypes of Ash1p-myc distribution in late-anaphase yeasts. DAPI, DNA marker. DIC, Nomarski.

(B) Levels of asymmetric versus symmetric distribution of Ash1p in WT and *khd1* yeast strains.

(C) Phenotypes of *ASH1* mRNA localization scored by fluorescent in situ hybridization.

(D) Levels of bud tip versus bud-localized *ASH1* mRNA in WT and *khd1* yeast strains. More than 100 cells were counted, and both phenotypes (localized and delocalized) were scored. Error bars indicate mean \pm standard deviation.

with myc-tagged She2p. Since both Khd1p and She2p bind the E1 element of the *ASH1* mRNA, one can expect She2p to interact with eIF4G1 if the interaction is solely the result of RNA binding. Using this assay, She2p and eIF4G1 did not interact in the presence or absence of RNA (Figure 4B), suggesting that indirect protein-RNA interactions do not explain the association of eIF4G and Khd1p. Moreover, the interaction between Khd1p and eIF4G1 was confirmed in vitro by using recombinant GST-eIF4G1 and Khd1p-His₆ purified from bacteria (Figure 4C). To identify the Khd1p binding site on eIF4G1, recombinant GST fusions of deletion mutants of

eIF4G1 were generated and tested in GST pull-down assays with the TAP-tagged Khd1 protein. The results show that only the fusions that contain the C-terminal domain of eIF4G1, from amino acids 850 to 952, are capable of binding Khd1p-TAP (Figure 4D).

While these results showed that the C-terminal domain of eIF4G1 interacts with Khd1p, they did not prove that this interaction is involved in the translational control of the *ASH1* mRNA. The implication of the C-terminal domain of eIF4G1 in the translational control of the *ASH1* mRNA was assessed in vivo by using a yeast strain knocked out for both *TIF4631* (eIF4G1) and *TIF4632*

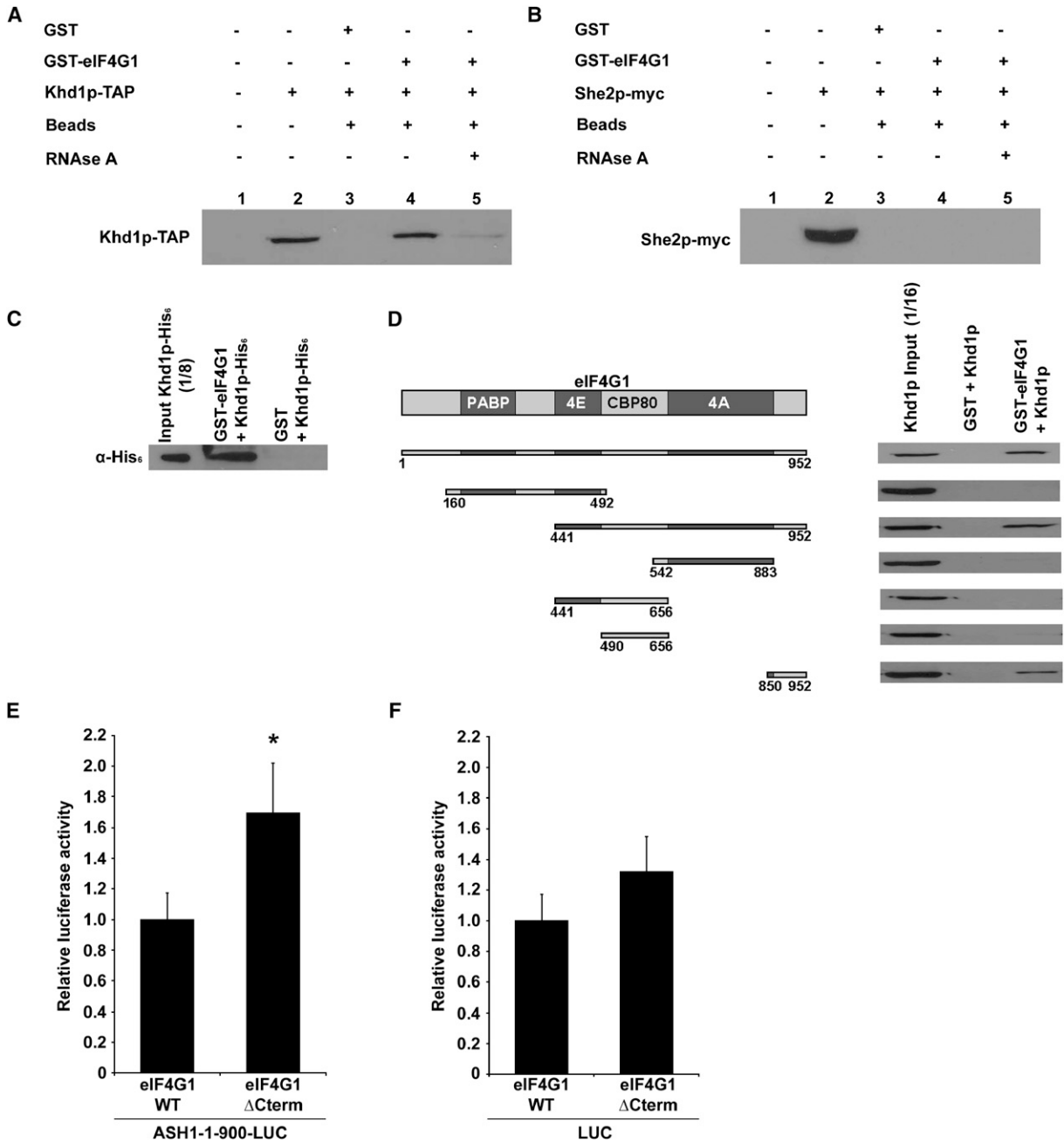


Figure 4. Khd1p Interacts with the C-Terminal Domain of eIF4G1

(A) GST pull-down assays of yeast extract containing Khd1p-TAP with recombinant GST-eIF4G1. Lane 2, 1/16 of the extract was loaded on the gel. Lane 5, the extract was treated with RNase A prior to pull-down with GST-eIF4G1.

(B) GST pull-down assays of yeast extract containing She2p-myc with recombinant GST-eIF4G1. Lane 5, the extract was treated with RNase A prior to pull-down with GST-eIF4G1.

(C) GST pull-down assay of recombinant Khd1p-His6x and GST-eIF4G1 purified from bacteria.

(D) GST pull-down assays of yeast extract containing Khd1p-TAP with various deletions of recombinant GST-eIF4G1. eIF4G1 and its interaction domains are schematically represented. Numbers represent amino acids of eIF4G1 in fusion with GST.

(E) Luciferase assay for Ash1₁₋₉₀₀-Luc fusion expressed in eIF4G1 WT and eIF4G1- Δ Cterm strains normalized on total protein concentration. Paired t test, *p < 0.001.

(F) Luciferase assay for WT firefly luciferase in eIF4G1 WT and eIF4G1- Δ Cterm strains normalized on total protein concentration. Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least five independent experiments.

(eIF4G2) genes and which only expressed full-length eIF4G1 (eIF4G1 WT) or a C-terminal deletion of eIF4G1 (eIF4G1- Δ Cterm) from a single-copy vector. Since general translation was decreased in the strain lacking the C-terminal domain of eIF4G1 (Berset et al., 2003), the luciferase activity was normalized on the total protein concentration from the extracts in order to compare the relative luciferase activity of these strains despite the deletion of the C-terminal domain of eIF4G1. As shown in Figure 4E, the expression of the Ash1₁₋₉₀₀-luciferase fusion was increased by 1.7-fold in the strain expressing eIF4G1- Δ Cterm compared to the strain expressing the full-length eIF4G1. In comparison, the expression of luciferase alone showed no significant difference between the two strains (Figure 4F). These results suggest that the C-terminal domain of eIF4G1 is involved in the translational control of the *ASH1* mRNA.

Khd1p Is Phosphorylated by the Plasma Membrane-Anchored Casein Kinase Yck1p

The identification of eIF4G1 and Khd1p as key actors in the regulation of *ASH1* mRNA translation raises the question of how the translation of this transcript is activated. As we and others have shown, translational control is important for the proper sorting of Ash1p (Chartrand et al., 2002; Gu et al., 2004). However, there must be a mechanism to activate the translation of the *ASH1* mRNA as it reaches the bud tip. One possibility is that posttranslational modification of Khd1p could remodel the translation regulation complex and trigger the release of *ASH1* mRNA from translational repression, allowing local protein synthesis at the bud tip. Indeed, previous studies have reported that the phosphorylation of tyrosine residues near the KH domain proteins hnRNP K and ZBP1 modulate their activity as translational regulators (Huttelmaier et al., 2005; Ostareck-Lederer et al., 2002).

To verify that Khd1p is a phosphoprotein, a metabolic labeling of yeasts expressing Khd1p-GFP or GFP alone was performed using P³²-labeled orthophosphate, followed by immunoprecipitation using an anti-GFP antibody. As shown in Figure 5A, P³²-labeled Khd1-GFP was detected by autoradiography, which shows that Khd1p is indeed phosphorylated in vivo. To identify a candidate kinase involved in Khd1p phosphorylation, we turned toward an in vitro large-scale phosphorylation study of yeast kinases that reported that Khd1p is a substrate for the serine/threonine kinase Yck1p, a type 1 casein kinase (CK1) (Ptacek et al., 2005). To assess the relevance of Yck1p activity on the translational regulation of the *ASH1* mRNA in vivo, the expression of the Ash1₁₋₉₀₀-luciferase reporter was measured in a WT, a *yck1* knockout, and a *khd1 yck1* double knockout strain. As shown in Figure 5B, Ash1-luciferase activity was reduced by 2.5-fold in a *yck1* strain compared to a WT strain. Northern blots indicated that the Yck1p-dependant regulation of Ash1-luciferase expression was not due to variations in mRNA levels (Figure 5C). Normal Ash1-luciferase expression was restored in a *khd1 yck1* double

knockout, suggesting that Yck1p is involved in the translational control of the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* mRNA and acts through Khd1p.

Yck1p is anchored at the plasma membrane (Babu et al., 2002), while Khd1p accumulates in the cytoplasm (Huh et al., 2003). To determine if Yck1p interacts with Khd1p in vivo, a Split-Venus protein complementation assay was used (Michnick et al., 2006). In this assay, based on a split fluorescent protein, Khd1p was fused to fragment 2 of the Venus protein (VF2), while Yck1p harbored an N-terminal Venus fragment 1 (VF1). When both proteins were coexpressed, the fluorescence of the reconstituted Venus protein was observed at the cell periphery, indicating that Khd1p and Yck1p can interact in vivo (Figure 5Da). When Khd1p-VF2 was coexpressed with VF1 alone, a diffuse cytoplasmic fluorescence signal was observed (Figure 5Dc). Coexpression of VF2 and VF1-Yck1p, or VF2 and VF1, showed no fluorescent signal (Figures 5De and 5Dg). Altogether, these results show that Yck1p can interact with Khd1p at the plasma membrane.

To determine if Khd1p is directly phosphorylated by Yck1p, recombinant GST-Khd1p was expressed and purified from *E. coli* and used in an in vitro phosphorylation assay with yeast-purified His-tagged Yck1p (Moriya and Johnston, 2004). This assay showed that full-length GST-Khd1p was readily phosphorylated in vitro by Yck1p-His-proA (Figure 6B). Yeast-purified Yck1p-His-proA was pulled down by GST-Khd1p in vitro, but not by GST alone, confirming the interaction between these two proteins (Figure S3A). Finally, recombinant CK1 from rat was also found to phosphorylate GST-Khd1p in vitro, which supports the observation that Khd1p is a substrate for CK1 (Figure S3B). To identify the Yck1p phosphorylation site(s) on Khd1p, deletions mutants of Khd1p were used in the in vitro phosphorylation assay (Figure 6A). While in silico analysis predicted two perfect CK1 sites within the first 260 amino acids of Khd1p, only a fragment that consists of the last 49 amino acids, next to the third KH domain, was found to be phosphorylated by Yck1p in vitro (Figure 6B). Within these 49 amino acids, four serines and two threonines constitute potential phosphorylation sites, and all match the CK1 consensus site: D/E₂₋₄-X₂₋₀-S/T (Kennelly and Krebs, 1991). To confirm that these six residues constitute the Yck1p phosphorylation site of Khd1p, they were all mutated to alanines, and the resulting GST-Khd1p-MUT protein was poorly phosphorylated by Yck1p (Figure 6C). Interestingly, a recent large-scale phosphoproteomic analysis in *S. cerevisiae* reported the identification of a phosphoserine residue at position 358 of Khd1p purified from yeast (Chi et al., 2007). This serine is one of the mutated residues in the GST-Khd1-MUT protein (asterisk in Figure 6A), suggesting that Yck1p might phosphorylate this residue.

Phosphorylation of Khd1p at Its C Terminus Reduces Its RNA Binding Capacity

These results raise the question of the impact of Khd1p phosphorylation on its function as an RNA binding protein

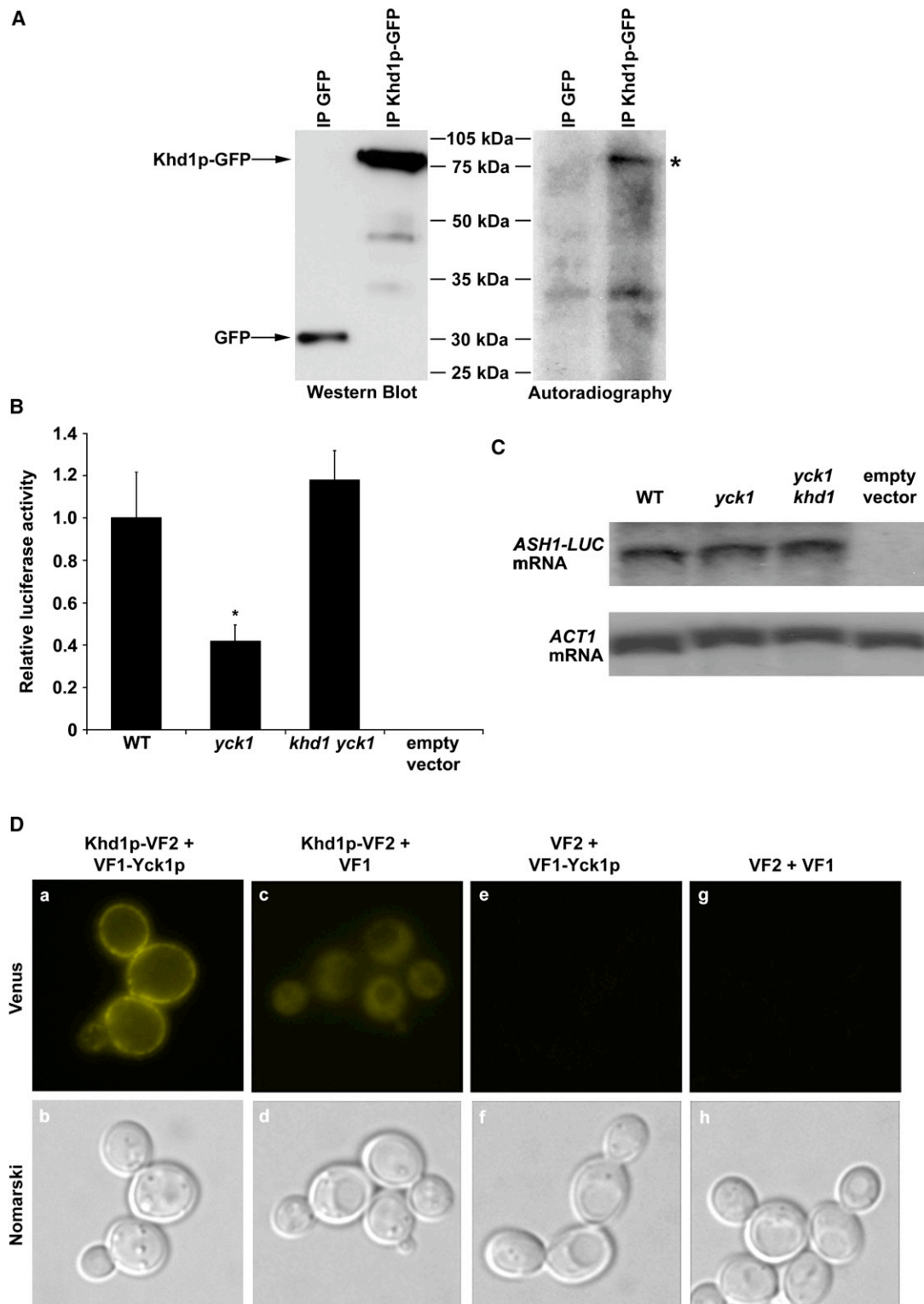


Figure 5. Khd1p Phosphorylation by Yck1p Controls Its Translational Repression Activity

(A) Khd1p is a phosphoprotein. Immunoprecipitation of GFP or Khd1p-GFP from yeasts grown on P^{32} -labeled orthophosphate. Left panel, western blot using anti-GFP antibody. Right panel, autoradiography.

(B) Luciferase assay for *Ash1*₁₋₉₀₀-Luc in WT, *yck1*, *khd1 yck1*, and *ash1* strains normalized on total protein concentration. Paired t test, * $p < 0.005$. Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least three independent experiments.

and as a translational repressor. Since the phosphorylation of RNA binding proteins has previously been shown to decrease their affinity for RNA (Ostareck-Lederer et al., 2002), the phosphorylation of Khd1p by Yck1p may affect its interaction with the E1 RNA. To test this possibility, recombinant GST-Khd1p purified from bacteria was phosphorylated in vitro by rat CK1 and used in a gel shift assay with the E1 RNA. Rat CK1 was used because of its higher enzymatic activity and the fact that it phosphorylates the same residues on Khd1p as Yck1p (as shown by the poor phosphorylation of the Khd1-MUT protein by the rat CK1; Figure S4C). CK1-phosphorylated GST-Khd1p interacted weakly with the E1 RNA compared to the unphosphorylated form of GST-Khd1p (Figure 6D), suggesting that CK1 phosphorylation decreases the RNA binding capacity of Khd1p.

Phosphorylation of Khd1p Relieves the Translational Repression on an *ASH1* Reporter mRNA

Finally, the Khd1 and Khd1-MUT proteins were expressed at near-endogenous level in yeast from a single-copy plasmid with the *KHD1* promoter (plasmids *pKHD1* and *pKHD1-MUT*). We first established that the mutations at the C-terminal end of Khd1p had no effect on its expression level compared to WT Khd1p (Figure S4A). Khd1p-MUT was as functional as the WT Khd1 protein, since a Khd1p-MUT-GFP was retained by an immobilized GST-eIF4G1 recombinant protein (Figure S4B) and recombinant GST-Khd1p-MUT had the same capacity to bind RNA than the WT Khd1p (data not shown). To determine the effect of the mutations of the six C-terminal serine and threonine residues on the phosphorylation of Khd1p in vivo, a metabolic labeling of yeasts expressing Khd1p-GFP or Khd1p-MUT-GFP was performed using P^{32} -labeled orthophosphate, followed by immunoprecipitation using an anti-GFP antibody. As shown in Figure 6E, while P^{32} -labeled Khd1p-GFP was detected, little phospho-labeled Khd1p-MUT-GFP was present after immunoprecipitation, suggesting that these mutations decrease the phosphorylation of Khd1p in vivo.

The significance of the phosphorylation of Khd1p on the translation of the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* mRNA was also assessed. A *khd1* yeast strain cotransformed with the WT *KHD1* plasmid, and the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* reporter had the same luciferase activity as a WT yeast strain (bars 1 and 2, Figure 6F). The translation of the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* mRNA was sensitive to the deletion of the *YCK1* gene when the WT *KHD1* plasmid was present, as shown by the nearly 2-fold decrease in luciferase activity in this strain (bar 3, Figure 6F). Mutations of the S/T residues of Khd1p that are phosphorylated by Yck1p had the same effect on the luciferase activity as did the deletion of *YCK1* (compare bars 2 and 3 versus 2 and 4, Figure 6F). Moreover, deletion of *YCK1* had no impact on the

luciferase activity in the yeast strain expressing Khd1p-MUT (compare bars 4 and 5, Figure 6F), suggesting that the effect of Yck1p on the translation of the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* reporter mRNA is mediated by its phosphorylation of the serine and threonine residues at the C-terminal end of Khd1p. From all these results, we conclude that phosphorylation of the C-terminal serine and threonine residues of Khd1p by Yck1p decreases the activity of Khd1p as a translational repressor by interfering with its binding to the localization element E1 of the *ASH1* mRNA.

DISCUSSION

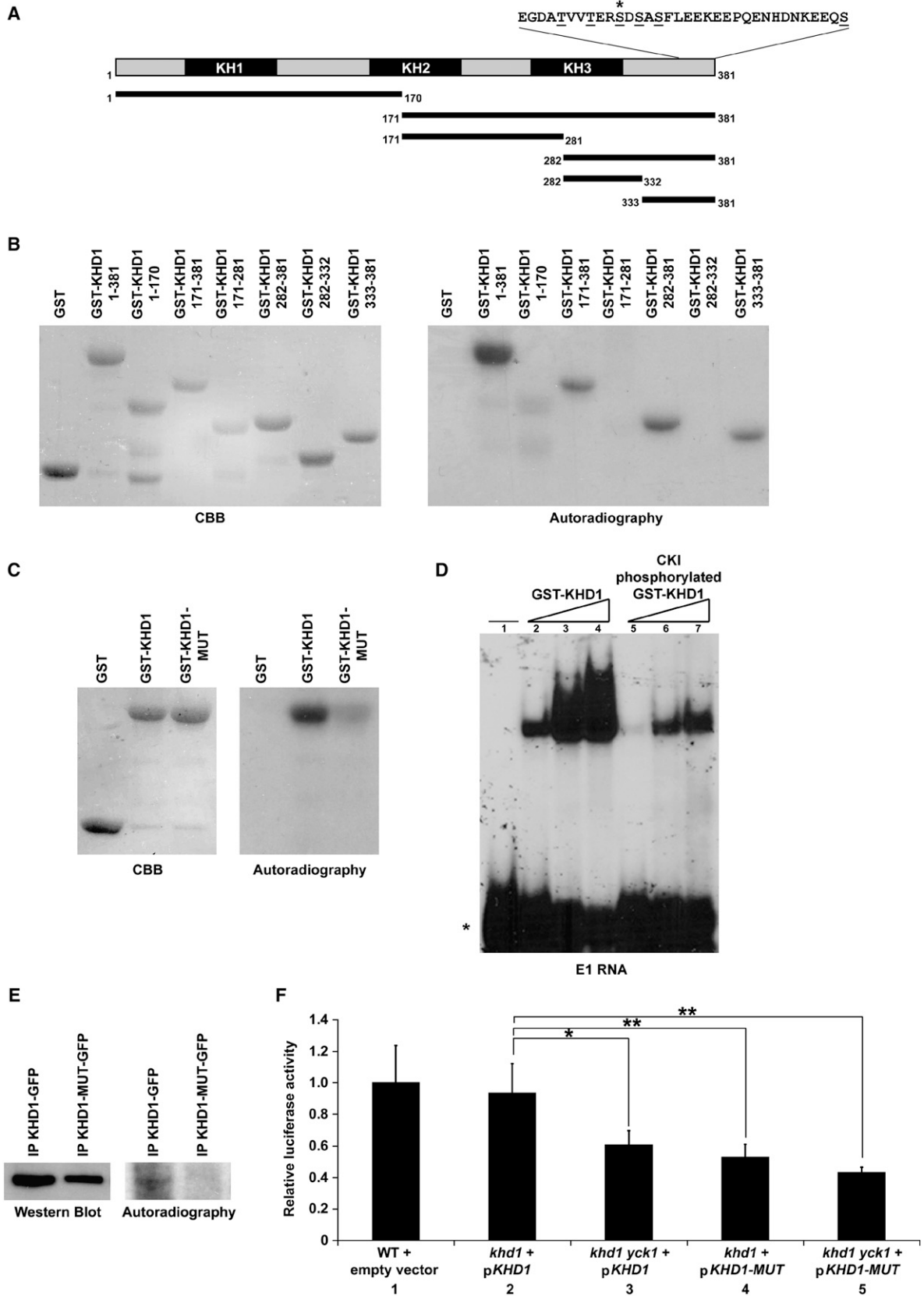
Khd1p: An Unconventional Translational Regulator

Several KH domain proteins, like hnRNP K, ZBP1, and GLD-1, are known regulators of translation (Huttelmaier et al., 2005; Jan et al., 1999; Ostareck-Lederer et al., 2002). But how these factors interact with the translation initiation machinery and repress translation is still unknown. In the current study, we have identified Khd1p as a bona fide eIF4G1-interacting protein that regulates the translation of the *ASH1* mRNA. First, deletion of *KHD1* enhances the ribosome load on the *ASH1* mRNA, resulting in increased synthesis of the Ash1 protein. Second, Khd1p interacts directly with the localization element E1 of the *ASH1* mRNA and with the C-terminal domain of eIF4G1. Third, deletion of the C-terminal domain of eIF4G1 increases the translation of an *ASH1-LUC* mRNA reporter, suggesting that this domain of eIF4G1 is involved in the translational control of this transcript. Previous evidence of a role for Khd1p in the control of *ASH1* mRNA translation came from the overexpression of this factor, which results in a reduced Ash1p level in yeast (Irie et al., 2002). There is also genetic evidence that Khd1p regulates the asymmetric activation of the *HO* promoter, which is repressed by Ash1p. Overexpression of Khd1p suppresses *myo4* and *she3* deletions in a genetic assay based on the asymmetric activation of the *HO* promoter, pointing toward a role of Khd1p in the regulation of the *ASH1/SHE* pathway (Irie et al., 2002; Tadauchi et al., 2004).

The finding that the deletion of *KHD1* results in increased accumulation of Ash1p in the mother cell nucleus, even if the *ASH1* mRNA is still properly localized at the bud tip, underlines the importance of combining translational control to mRNA transport in order to avoid any premature protein synthesis before the transcript reaches its final destination. In the absence of Khd1p, early Ash1p synthesis during the transport of the *ASH1* mRNA results in the ectopic accumulation of Ash1p in the mother cell nucleus. As Puf6p is also implicated in the translational control of the *ASH1* mRNA (Gu et al., 2004), this double control of Ash1p synthesis may reduce

(C) Levels of *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* mRNA and *ACT1* mRNA in a WT, *yck1* null strain, *yck1 khd1* double knockout strain, and *ash1* strain, as detected by northern blot.

(D) Split-Venus protein complementation assay between Khd1p and Yck1p.



any undesirable leakage of this factor to the mother cell before cytokinesis, which would be detrimental to the asymmetry in mating type switching.

This study also reveals that Khd1p is an unconventional regulator of translation. First, most known translational repressors or activators interact with mRNAs in their 5' or 3' untranslated regions (de Moor et al., 2005; Pickering and Willis, 2005). Surprisingly, Khd1p is instead recruited within the coding sequence of the mRNA it regulates. To our knowledge, this is the only known translational regulator to do so. Since Khd1p has been reported to interact with several other mRNAs beside *ASH1* (Gerber et al., 2004), it will be interesting to find if it binds these transcripts in their coding sequences and represses their translation. Second, Khd1p interacts with the C-terminal domain of eIF4G1, a domain not usually targeted by translation regulation factors. Unlike the mammalian eIF4G, the yeast eIF4G C-terminal domain does not recruit the kinase Mnk1 but binds RNA instead (Berset et al., 2003). The C-terminal end contains one of the three RNA binding domains of eIF4G1, and it is important for its function, since its deletion reduces protein synthesis in yeast. However, its specific role is not clear yet. While recombinant Khd1p and eIF4G1 were found to interact in vitro, their association may be enhanced by the interaction with the localization element E1, as suggested by the RNA dependency of their interaction in the GST pull-down assays. Our data support a model in which Khd1p bound to the localization element E1 interacts with eIF4G1 and affects its capacity to promote translation initiation on the *ASH1* mRNA (Figure 7A). The mechanism by which the Khd1p-eIF4G1 interaction inhibits translation initiation remains to be elucidated.

A Role for CK1 in Translational Control

CK1 is a ubiquitous kinase in the eukaryotic kingdom and is involved in processes as various as cell division, apoptosis, and membrane transport (Knippschild et al., 2005). It is also implicated in the regulation of the Wnt and hedgehog pathways, which play crucial roles in many aspects of development in vertebrate and invertebrate (Price, 2006). In this study, we have identified a func-

tion for this kinase in the translational control of a specific mRNA and in regulating the spatiotemporal expression of a cell fate determinant.

Our results show that the yeast casein kinase Yck1p is important for relieving the Khd1p-mediated translational control on the *ASH1* mRNA. First, Yck1p interacts with Khd1p at the plasma membrane and phosphorylates its C-terminal end. Second, this phosphorylation decreases the affinity between Khd1p and the localization element E1. Third, mutagenesis of the CK1-phosphorylated residues at the C-terminal end of Khd1p and the deletion of *YCK1* decrease the translation of an *ASH1* reporter mRNA, suggesting that Yck1p is important for the activation of *ASH1* mRNA translation. Data from epifluorescence microscopy show that, while Khd1p is present in the cytoplasm, Yck1p and Khd1p interact only at the plasma membrane. Since Khd1p colocalizes with the *ASH1* mRNA at the bud tip (Irie et al., 2002), this would restrict the location where the *ASH1* mRNA/Khd1p complex comes into proximity with Yck1p to the bud cortex. From these results, we propose that the translation of *ASH1* mRNA is controlled by the Khd1p/eIF4G1 complex during its transport (Figure 7B). As the *ASH1* mRNA/Khd1p/eIF4G1 complex reaches the bud tip, Khd1p is phosphorylated by Yck1p anchored at the plasma membrane, relieving its interaction with the *ASH1* mRNA and activating its translation locally. In this model, the localization machinery controls the location where the *ASH1* mRNA is to be translated (the bud tip), while the Khd1p/Yck1p interaction controls both the location and the time when the *ASH1* mRNA is to be translated (as it reaches the bud tip). In the absence of Yck1p, Khd1p maintains its repression on the translation of the *ASH1* mRNA, which would explain the decreased level of Ash1-luciferase protein in a *yck1* strain. But why is there a need for a rapid activation of *ASH1* mRNA translation when it reaches the bud tip? One explanation comes from the finding that insertion of a stop codon after the initiation codon of the *ASH1* mRNA reduces its tight localization at the cortex (Gonzalez et al., 1999; Irie et al., 2002), implicating translation in the process of cortical anchoring of this mRNA.

Figure 6. Ser/Thr Residues at the C-Terminal End of Khd1p Are Phosphorylated by Yck1p and Are Important for the Translational Control of an *ASH1* Reporter mRNA

(A) Description of the deletion fragments generated as GST-Khd1 fusion proteins. The last 34 amino acids of Khd1p are displayed. Underlined amino acids were mutated to alanine in the Khd1-MUT protein. Asterisk, Ser₃₅₈ was identified as a phosphoserine by Chi et al. (2007).
 (B) In vitro phosphorylation of GST-tagged fragments of Khd1p by the yeast-purified Yck1p-proA-His. Left panel, Coomassie blue staining of the GST-Khd1p fragments used in the phosphorylation assay. Right panel, autoradiography of P³²-phosphorylated GST-Khd1 fragments.
 (C) In vitro phosphorylation of GST, GST-Khd1p, and GST-Khd1-MUT proteins with yeast-purified Yck1p. Left panel, Coomassie blue-stained gel of the GST-tagged proteins. Right panel, autoradiography of the P³²-phosphorylated GST-Khd1 proteins.
 (D) EMSA for GST-Khd1 or CK1-phosphorylated GST-Khd1 with localization element E1. Increasing concentration of recombinant GST-Khd1p (100, 250, and 500 nM in lanes 2–4 and 5–7) was added to P³²-labeled RNA. The free RNA is indicated by an asterisk. Unphosphorylated GST-Khd1 was incubated with CK1 without ATP.
 (E) Immunopurification of Khd1p-GFP or Khd1p-MUT-GFP from yeasts grown on P³²-labeled orthophosphate. Left panel, western blot using anti-GFP antibody. Right panel, autoradiography.
 (F) Luciferase activity from the Ash1_{1–900}-Luc protein expressed in the following: WT strain plus control plasmid, *khd1* strain plus pKHD1, *khd1 yck1* strain plus pKHD1, *khd1* strain plus pKHD1-MUT, *khd1 yck1* strain plus pKHD1-MUT normalized on total protein concentration. Paired t test, *p < 0.05; **p < 0.001. Error bars indicate mean ± standard deviation from at least four independent experiments.

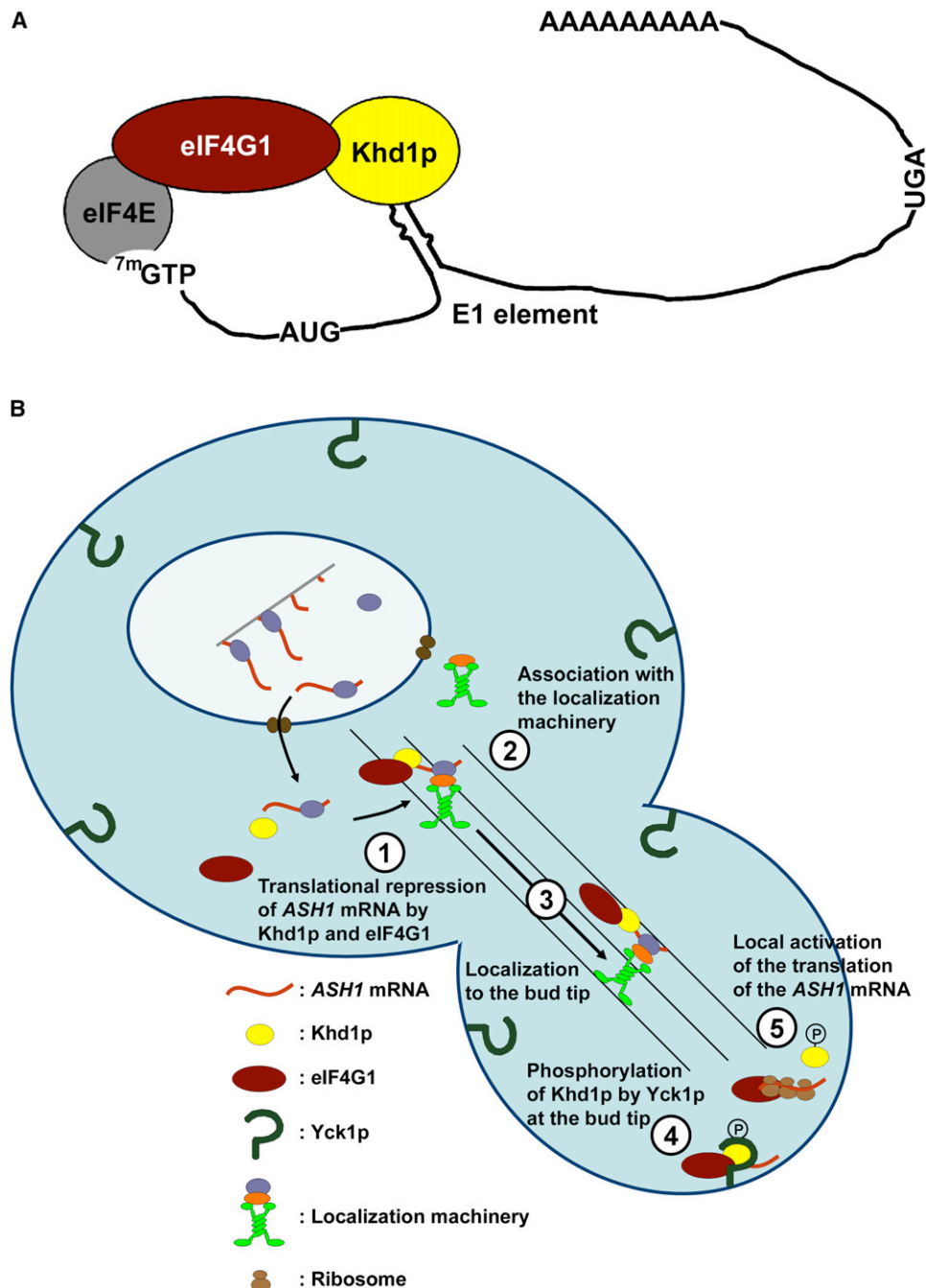


Figure 7. Model for the Regulation of Khd1p-Mediated Translational Repression of the *ASH1* mRNA

(A) Khd1p binds the localization element E1 of the *ASH1* mRNA and associates with eIF4G1 in order to repress the translation of this transcript. (B) Spatiotemporal regulation of the translation of *ASH1* mRNA. The *ASH1* mRNA is recruited by the Khd1p-eIF4G1 complex, which represses its translation (1) and associates with the localization machinery (2). The resulting RNP complex moves toward the bud through the actin cytoskeleton (3). Upon reaching the bud, Khd1p is phosphorylated by the membrane-anchored Yck1p (4), which leads to the local activation of *ASH1* mRNA translation (5).

Interestingly, another kinase known to regulate the translation of a localized transcript is Src, a membrane-anchored kinase that promotes translation of the neurite-localized β -actin mRNA (Huttelmaier et al., 2005).

Since most localized mRNAs in species studied so far are targeted close to the plasma membrane, membrane-associated kinases like Src and CK1 may be key regulators of the local translation of these transcripts or in

releasing these mRNAs from their localization machinery, through their capacity to phosphorylate the RNA binding proteins associated with these transcripts.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Growth Media and Yeast Strains

Yeast cells were grown in either synthetic growth media lacking the nutrients indicated or rich media (Rose et al., 1990). Transformation was performed according to the protocol of Gietz and Schiestl (Schiestl and Gietz, 1989). Yeast gene disruption cassette was created by PCR amplification of the *loxP*-KAN-*loxP* construct in plasmid pUG6 and primer specifics for the gene of interest (Guldener et al., 1996). Specific disruption was confirmed by PCR analysis of genomic DNA. Yeasts strains used in this study are described in Table S1.

Plasmid Constructions

Plasmid YIP128-*GAL1prom-ASH1-MYC* is described in Chartrand et al. (2002). Plasmids containing *ASH1*-luciferase fusions were made from the Firefly luciferase of the pGL3 plasmid (Promega). All luciferase fusions are in-frame with the Ash1 protein. The luciferase fusion under the endogenous *ASH1* promoter containing the *ASH1*₁₋₉₀₀ fragment was obtained by subcloning the *SacI*-*NcoI* fragment of C3319 in pGL3 Basic (Promega). The *SacI*-*Sall* fragment from the resulting vector was subcloned in YCP33. *ASH1*₁₋₆₂₁-*FLUC* and *FLUC* were cloned under *ASH1* endogenous promoter in YCP33 by recombination in yeast. All *KHD1* in fusion with GST was cloned in pGEX-4T-1 or pGEX-5X-3 (GE Healthcare) plasmids as *EcoRI*-*XhoI* PCR fragments. GST fusions of eIF4G were generated by PCR amplification. For Venus PCA fusions, *KHD1* was cloned as an *XbaI*-*BspEI* fragment in p415-linker-VF2, and *YCK1* was cloned as a *EcoRI*-*BamHI* fragment in p416-VF1 linker (kind gifts from Emily Manderson and Stephen W. Michnick). pPC3 and pPC4 were obtained by cloning a *BspEI*-*XhoI* GFP fragment in pPC1 and p415-VF2. Endogenous *KHD1* promoter was cloned as *SacI*-*PstI* fragment in pPC4 to obtain pPC5. pKHD1 and pKHD1-MUT were cloned as *XbaI*-*XhoI* fragments in pPC5. Plasmids used in this study are described in Table S2.

Luciferase Assays

Overnight cell cultures were diluted to OD₆₀₀ = 0.1 and grown to OD₆₀₀ = 0.8 in 5 mL cultures. Cells were resuspended in 150 μ L PBS 1 \times , 6 mM NaN₃, aprotinin, leupeptin, pepstatin, and PMSF and broken with glass beads. Extracts were cleared, and 20 μ L of the extract was used with 80 μ L of LAR (Promega) for the luciferase assay, and the results were normalized on the total protein concentration obtained by Bradford. All luciferase assays are the average of at least four independent experiments.

Northern Blots

RNA was purified from yeast cultures according to (Schmitt et al., 1990). Northern blots were performed according to Sambrook and Russel (2001). *ASH1*, *FLUC*, and *ACT1* probes were labeled with [α -³²P] dCTP using Ready-To-Go DNA Labeling Beads -dCTP (Amersham).

Fluorescence In Situ Hybridization and Immunofluorescence

Yeast cells were processed for fluorescent in situ hybridization and immunofluorescence according to the protocols described in Chartrand et al. (2000). For in situ hybridization, yeast spheroplasts were hybridized with a pool of Cy3-conjugated *ASH1* DNA oligonucleotide probes. For immunofluorescence, a 1:50 dilution of a mouse anti-myc 9E10 antibody (Roche) was used as primary antibody. For the secondary antibody, a 1:1000 dilution of a Donkey anti-Mouse Oregon Green-conjugated antibody (Jackson Laboratories) was used.

GST Pull-Downs

GST fusions of eIF4G1 were purified according to Tarun and Sachs (1996). Briefly, transformed BL21 cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.6 in 1 liter and induced with 0.5 mM IPTG for 4 hr. Cells washed with buffer C (150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄), resuspended in 10 mL and aliquoted in 2 mL, and frozen at -80°C. Aliquot containing recombinant GST-eIF4G1 was thawed, brought to 0.1% Triton X-100, 87.5 μ g/mL PMSF, 5 μ g/mL pepstatin, 5 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin, and sonicated 10 s, then put on ice five times. Extract was cleared, and supernatant was incubated 1.5 hr at 4°C with glutathione Sepharose-4B (Amersham) and washed three times with buffer C, 0.1% Triton X-100. Strains S288C-Khd1-TAP and K699-She2-myc were grown to an OD₆₀₀ of 1, and 100 OD₆₀₀ was broken with glass beads in 1 ml of buffer A (PBS 1 \times , 0.1% Triton X-100, 87.5 μ g/mL PMSF, 5 μ g/mL pepstatin, 5 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin). Extract was cleared, and the supernatant was applied on immobilized GST-eIF4G1 for 2 hr at 4°C. Beads were washed five times in buffer A and eluted by boiling in loading buffer for 3 min. Eluted proteins were loaded on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham). The membrane was incubated first with a goat anti-mouse-HRP (1:1000) (Amersham) and second with a rabbit anti-Goat-HRP (1:1000) (Sigma) and revealed with the ECL kit (Amersham).

Electrophoretic Mobility Shift Assays

To produce in vitro-transcribed RNA, plasmids pGEM-E1 and pGEM-IRE were linearized with *EcoRI* and transcribed with T7 RNA polymerase in the presence of [α -³²P]CTP (Jorgen et al., 1998). The transcripts were purified on 6% denaturing polyacrylamide gels, then extracted and desalted on G25 Sephadex spin columns (Roche). For unlabeled RNAs, the transcripts were purified, after treatment with DNase I, by phenol/chloroform extraction, ethanol precipitation, and desalting on G25 Sephadex spin columns. GST-Khd1p was expressed and purified according to the protocol published by Pharmacia. For EMSA, the ³²P-labeled RNA was denatured by heating at 85°C for 2 min in the binding buffer and allowed to fold at room temperature for 10 min. A total of 10,000 CPM of labeled RNA (~1 ng) was added to the binding buffer (10 mM HEPES [pH. 7.4], 150 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 4% glycerol, 15 U RNase Inhibitor [Pharmacia]) prior to the addition of various concentration of recombinant protein up to a final volume of 20 μ L. The reactions were incubated at 4°C for 30 min, then 2 μ L of 10 mg/ml heparin was added and incubated for ten more minutes at 4°C to prevent nonspecific interactions. The samples were separated on a 4% nondenaturing gel at 120V for 4 hr at 4°C, dried, and exposed overnight with Kodak films. For competition experiments, unlabeled RNAs were added prior to the addition of the protein.

Supplemental Data

Supplemental Data include Supplemental Experimental Procedures and four figures and can be found with this article online at <http://www.molecule.org/cgi/content/full/26/6/795/DC1>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Emily Manderson and Stephen W. Michnick for the Split-Venus complementation assay yeast vectors, John E.G. McCarthy for anti-eIF4G antibody, Tobias von der Haar for recombinant GST-eIF4G1, Michael Altmann and Hans Trachsel for recombinant deletions of eIF4G1 in fusion with GST, Gerardo Ferbeyre for goat anti-mouse-HRP and rabbit anti-Goat-HRP antibodies, Jon Lorsch for recombinant eIF4E, Mark Johnston for Yck1p-proA-His vector, Jon Warner for anti-Rpl3 antibody, and Yannick Sylvestre for technical support. We also thank Emmanuelle Querido, Gerardo Ferbeyre, Luc Desgrosseillers, and Léa Brakier-Gingras for their advices on the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and the Fond de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (NATEQ). M.M. was supported by

a EURODOC fellowship. P.C. was supported by fellowships from NATEQ and the Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Received: February 13, 2007

Revised: April 5, 2007

Accepted: May 14, 2007

Published: June 21, 2007

REFERENCES

- Babu, P., Bryan, J.D., Panek, H.R., Jordan, S.L., Forbrich, B.M., Kelley, S.C., Colvin, R.T., and Robinson, L.C. (2002). Plasma membrane localization of the Yck2p yeast casein kinase 1 isoform requires the C-terminal extension and secretory pathway function. *J. Cell Sci.* **115**, 4957–4968.
- Berset, C., Zurbriggen, A., Djafarzadeh, S., Altmann, M., and Trachsel, H. (2003). RNA-binding activity of translation initiation factor eIF4G1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **9**, 871–880.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., and Jansen, R.-P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers *ASH1* mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J.* **19**, 5514–5524.
- Chartrand, P., Meng, X.-H., Singer, R.H., and Long, R.M. (1999). Structural elements required for the localization of *ASH1* mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr. Biol.* **9**, 333–336.
- Chartrand, P., Singer, R.H., and Long, R.M. (2000). Sensitive and high-resolution detection of RNA in situ. *Methods Enzymol.* **318**, 493–506.
- Chartrand, P., Singer, R.H., and Long, R.M. (2001). RNP localization and transport in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 297–310.
- Chartrand, P., Meng, X., Huttelmaier, S., Donato, D., and Singer, R.H. (2002). Asymmetric sorting of *Ash1p* in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol. Cell* **10**, 1319–1330.
- Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L.Y., Coon, J.J., Syka, J.E.P., Bai, D.L., Shabanowitz, J., Burke, D.J., Troyanskaya, O.G., and Hunt, D.F. (2007). Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2193–2198.
- Darzacq, X., Powrie, E., Gu, W., Singer, R.H., and Zenklusen, D. (2003). RNA asymmetric distribution and daughter/mother differentiation in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 614–620.
- de Moor, C.H., Meijer, H., and Lissenden, S. (2005). Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 49–58.
- Gavin, A.-C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141–147.
- Gavin, A.-C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., et al. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**, 631–636.
- Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2004). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol.* **2**, 342–354.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963.
- Gonzalez, I., Buonomo, S.B.C., Nasmyth, K., and von Ahsen, U. (1999). *ASH1* mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and *Ash1* protein translation. *Curr. Biol.* **9**, 337–340.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R.H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses *ASH1* mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev.* **18**, 1452–1465.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2519–2524.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Lorenz, M., Dichtenberg, J., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., and Singer, R.H. (2005). Spatial regulation of beta-actin mRNA translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512–515.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K., and Herskowitz, I. (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of *ASH1* mRNA in yeast. *EMBO J.* **21**, 1158–1167.
- Jan, E., Motzny, C.K., Graves, L.E., and Goodwin, E.B. (1999). The STAR protein, GLD-1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **18**, 258–269.
- Jansen, R.-P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., and Nasmyth, K. (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin Myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* **84**, 687–697.
- Jorgen, K., Egebjerg, J., and Christiansen, J. (1998). Analysis of RNA-Protein Complexes In Vitro (Amsterdam: Elsevier).
- Kennelly, P.J., and Krebs, E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15555–15558.
- Kindler, S., Wang, H., Richter, D., and Tiedge, H. (2005). RNA transport and local control of translation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 223–245.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J., and Stoter, M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell. Signal.* **17**, 675–689.
- Kuersten, S., and Goodwin, E.B. (2003). The power of the 3'UTR: translational control and development. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 626–637.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., and Jansen, R.-P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science* **277**, 383–387.
- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to *ASH1* mRNA. *EMBO J.* **19**, 6592–6601.
- Michnick, S.W., MacDonald, M.L., and Westwick, J.K. (2006). Chemical genetic strategies to delineate MAP kinase signaling pathways using protein-fragment complementation assays (PCA). *Methods* **40**, 287–293.
- Moriya, H., and Johnston, M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1572–1577.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G., and Hentze, M.W. (2002). c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4535–4543.
- Pickering, B.M., and Willis, A.E. (2005). The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 39–47.
- Price, M.A. (2006). CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev.* **20**, 399–410.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., et al. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**, 679–684.
- Richter, J.D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477–480.

- Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sambrook, J., and Russel, D. (2001). *Molecular Cloning, Volume 3, Third Edition* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schiestl, R., and Gietz, R.D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* *16*, 339–346.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3091–3092.
- Sil, A., and Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* *84*, 711–722.
- St. Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 363–375.
- Tadauchi, T., Inada, T., Matsumoto, K., and Irie, K. (2004). Posttranscriptional regulation of HO expression by the Mkt1-Pbp1 complex. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 3670–3681.
- Takizawa, P.A., and Vale, R.D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 5273–5278.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I., and Vale, R.D. (1997). Actin-dependent localization of an mRNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* *389*, 90–93.
- Tarun, S.Z., and Sachs, A.B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* *15*, 7168–7177.

Supplemental Data

Local Activation of Yeast *ASH1* mRNA

Translation through Phosphorylation

of Khd1p by the Casein Kinase Yck1p

**Nicolas Paquin, Marie Ménade, Guillaume Poirier, Damiane Donato,
Emmanuel Drouet, and Pascal Chartrand**

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Ash1p kinetics and Western blots

For endogenous expression of Ash1p, cells were grown in YPD to an OD₆₀₀ of 0.8. For Ash1p kinetics, yeast cells were grown in 600 ml of non-inducible, non-repressive medium (2% lactic acid, 3% glycerol) up to an OD₆₀₀ of 0.2-0.4, induced with galactose and 50 ml samples were taken at different time points, to which NaN₃ (6 mM final concentration) was added to stop all reactions. Yeast cells were processed with 500 µl of glass beads mixed with 500 µl of sample buffer (60 mM Tris pH 6.8, 0.5mM PMSF, 0.5 mM Benzamidine, pepstatin, leupeptin, aprotinin, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol and 0.0025% Bromophenol Blue). The tubes were vortex 45 seconds and put on ice 45 seconds, repeated 4 times. After a centrifugation of 5 minutes, the supernatant was recovered. For the Western blot, yeast extracts was loaded on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Ash1p-myc was detected using a mouse anti-myc antibody (9E10; Roche) and Pgk1p was detected with a mouse anti-Pgk1 antibody (Molecular Probes), following by a HRP-labelled goat anti-mouse secondary antibody (Jackson Laboratories) and revealed with the ECL kit

(AmershamPharmacia). Western blots were quantified using the Scion Image software (NIH Image). The results are the average of at least three independent experiments.

Sucrose gradients and dot blots

Yeast cultures were grown in the selection medium and reached stationary phase (D.O.₆₀₀ 1.0 to 1.5). Polysome disassembly was inhibited by adding 100µg/ml cycloheximide (Sigma) for 15 minutes on ice. Cells were harvested by centrifugation 10 minutes at 4000 rpm, washed twice with water (10 ml) containing 100µg/ml cycloheximide and lysed with glass beads and 1X lysis buffer (25mM Tris HCl pH 7.2, 50mM KCl, 30mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoethanol, 200µg/ml cycloheximide, 2µg/ml aprotonin, 1mM PMSF, 0,5µg/ml leupeptin, 2,9 µg/ml E64, 1 µg/ml antipaine, 0.2 µg/ml chymostatine and 20mM VRC). Cells supernatant was transferred into an Eppendorf tube and centrifuged 10 minutes at 6500 rpm. at 4°C, and a second time at 14000 rpm. Finally, 300 µl to 500 µl of supernatant were loaded on a 10-50 % sucrose gradient (10 mM Tris pH 7.4, 70 mM NH₄Cl, 4mM MgOAc) and centrifuged at 36000 rpm. for 2.5 hours at 4°C with a Beckman SW41 rotor (210 000G). For each gradient, 21 fractions of 500 µl were collected in Eppendorf tubes while the gradient profile was monitored at OD₂₅₄. Each fraction was phenol extracted and the RNA was precipitated with ethanol.

Dot blot assay was performed on sucrose gradient fractions. Briefly, samples were first denatured at 65°C for 5 minutes and then applied on Hybond-N membrane (Amersham). Samples crosslinked by UV were washed 2 hours at 68°C with hybridization solution (0,5M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA). Finally, the probe was added for 12 hours at 68°C with hybridization solution.

Protein expression and purification

Recombinant protein GST-Khd1 was overproduced in *Escherichia coli* BL21 (Rosetta 2) transformed with pGEX-4T-1-Khd1 (plasmid pPC13). The cells were harvested 3 hours after induction with 1mM IPTG at 30°C, resuspended in PBS-TritonX100 0,1%, 1M NaCl, 1mg/ml lysozyme and antiproteases cocktail (PMSF + pepstatine + leupeptin + aprotinine) for 30min on ice and sonicated. The lysate was cleared by centrifugation for 15min at 15000g, 4°C, to yield the supernatant with the overexpressed soluble protein. The GST fusion protein was purified by affinity chromatography with Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare). The GST-fusion protein was eluted with 10mM reduced glutathione in PBS. The recombinant protein fractions were dialysed overnight in PBS and concentrated using a 10-kDa molecular weight cut-off filter unit (Centricon-Millipore). The Khd1-6xHis recombinant protein was produced as GST-Khd1-6xHis from the plasmid pPC18 in BL21 bacteria and purified as above. For the elution, the GST tag was cleaved with Factor Xa overnight at room temperature.

***In vitro* phosphorylation and purification of Yck1p**

GST fusions proteins were purified as for GST-pulldowns and *in vitro* phosphorylation assays were carried out as described in Moriya et al. (2004). The GST-Eluted GST-Khd1 was phosphorylated in 50mM Tris pH 7.5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT with rat Casein Kinase CKI (NEB) supplemented with 200uM ATP, 30 minutes at 30°C. The unphosphorylated GST-Khd1p was treated the same way, but without ATP.

P³² metabolic labelling

An overnight culture of yeast in selective media was diluted in 1L of low phosphate YPD and grown to an OD = 0.8. Cells were centrifuged, washed with low phosphate YPD, resuspended in 40mL of low phosphate YPD, supplemented with 333 μ Ci of P³² orthophosphate and incubated at 30°C for 1 hour. Cells were then washed with PBS 1X, resuspended in lysis buffer (PBS 1X, 0.1% triton X-100, 87.5 μ g/mL PMSF, 5 μ g/mL pepstatin, 5 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin, 50mM NaF, 20mM 2-glycerol-phosphate and 1mM Na₃VO₄) and lysed with glass beads. The lysate was cleared by centrifugation. Immunoprecipitation was carried out with polyclonal anti-GFP antibody (Rockland) overnight at 4°C. Protein A-Sepharose was added for 2 hours and beads were washed with PBS 1X, 0.1% Triton X-100. Purified proteins were eluted, resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for autoradiography and western blotting.

TABLE S1. Yeast strains used in this study

strain	genotype	source
K6278- <i>cla4</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, ash1::TRP1, cla4Δ</i>	Chartrand, 2002
K6278- <i>cla4, khd1</i>	K6278, <i>khd1::KAN</i>	this study
K699	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1</i>	Jansen, 1996
K699- <i>khd1</i>	K699, <i>khd1::KAN</i>	this study
K699- <i>yck1</i>	K699, <i>yck1::KAN</i>	this study
K699- <i>khd1, yck1</i>	K699, <i>khd1::loxP, yck1::KAN</i>	this study
K699- <i>she2</i>	K699, <i>she2::KAN</i>	this study
K699-She2-Myc	K699, <i>SHE2-myc13</i>	Takizawa, 2000
K5552	K699, <i>ASH1::ASH1-myc9</i>	Long, 1997
K5552- <i>khd1</i>	K5552, <i>khd1::KAN</i>	this study
S288C	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystem
S288C-Khd1-TAP	S288C <i>KHD1-TAP::HIS3</i>	Open Biosystem
YMK328	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, tif4631::LEU2, tif4632::ura3 p[TIF4632-URA3-CEN]</i>	Mark P. Ashe

TABLE S2. Plasmids used in this study

Plasmid	Features	Source
C3319	YEPlac181 with <i>ASH1</i> under endogenous promoter	Jansen, 1996
p415-VF2	pRS415 containing Venus Fragment 2 under <i>ADHI</i> promoter	Emily Manderson
p416-VF1	pRS416 containing Venus Fragment 1 under <i>ADHI</i> promoter	Emily Manderson
pGEM	Vectors for <i>in vitro</i> transcription	Promega
pGEX	Vectors for GST fusion proteins expression	Amersham
YCP33	Single copy yeast vector with URA3 selectable marker	Gietz, 1988
YEPlac181	Multicopy yeast vector with LEU2 selectable marker	Gietz, 1988
YIPlac128	Yeast integrative vector with LEU2 selectable marker	Gietz, 1988
pAS466	pGEX-2T containing eIF4G1 (amino acids 1 to 952)	Tarun, 1996
pBM4536	pRS426 expressing <i>YCK1</i> -7xHis-ProA (amino acids 1 to 536) under <i>ADHI</i> promoter	Moriya, 2004
pDD-01	YIP128 containing <i>ASH1</i> -myc (9x) under <i>GAL1</i> promoter	Chartrand, 2002
pKHD1	pRS415 expressing <i>KHD1</i> under endogenous promoter	This study
pKHD1-MUT	pRS415 expressing <i>KHD1</i> -MUT under endogenous promoter	This study
pPC1	p415-VF2 containing <i>KHD1</i>	This study
pPC2	p416-VF1 containing <i>YCK1</i>	This study
pPC3	pRS415 expressing GFP under <i>ADHI</i> promoter	This study
pPC4	pRS415 expressing <i>KHD1</i> -GFP under <i>ADHI</i> promoter	This study
pPC5	pRS415 expressing <i>KHD1</i> -GFP under endogenous promoter	This study
pPC6	pRS415 expressing <i>KHD1</i> -MUT-GFP under endogenous promoter	This study
pPC8	pGEM-4z containing element E1	Olivier, 2005
pPC9	pGEM-4z containing IRE	Olivier, 2005
pPC10	pGEX-1 λ T containing eIF4G1 (amino acids 160 to 492)	Dominguez, 1999
pPC11	pGEX-1 λ T containing eIF4G1 (amino acids 542 to 883)	Dominguez, 1999
pPC12	pGEX-3X containing eIF4G1 (amino acids	Dominguez, 1999

	441 to 952)	
pPC13	pGEX-4T-1 containing <i>KHDI</i>	This study
pPC14	pGEX-5X-3 containing eIF4G1 (amino acids 441 to 656)	This study
pPC15	pGEX-5X-3 containing eIF4G1 (amino acids 490 to 656)	This study
pPC16	pGEX-5X-3 containing eIF4G1 (amino acids 850 to 952)	This study
pPC17	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 1 to 381)	This study
pPC18	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> -6xHis	This study
pPC19	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> - <i>MUT</i>	This study
pPC20	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 1 to 170)	This study
pPC21	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 171 to 381)	This study
pPC22	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 171 to 281)	This study
pPC23	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 282 to 381)	This study
pPC24	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 282 to 332)	This study
pPC25	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 333 to 381)	This study
pPC30	Single copy vector with TRP1 selectable marker expressing <i>TIF4631</i> under <i>TIF4632</i> promoter	Mark P. Ashe
pPC31	Single copy vector with TRP1 selectable marker expressing <i>TIF4631(nt 1-2600)</i> under <i>TIF4632</i> promoter	This study
pPC32	YCP33 containing <i>ASH1(nt 1-621)-LUC</i> under endogenous promoter	This study
pPC33	YCP33 containing <i>ASH1(nt 1-900)-LUC</i> under endogenous promoter	This study
pPC34	YCP33 containing <i>LUC</i> under <i>ASH1</i> endogenous promoter	This study
pXR193	YIP128 containing <i>ASH1</i> -myc (9x) under endogenous promoter	Chartrand, 2002

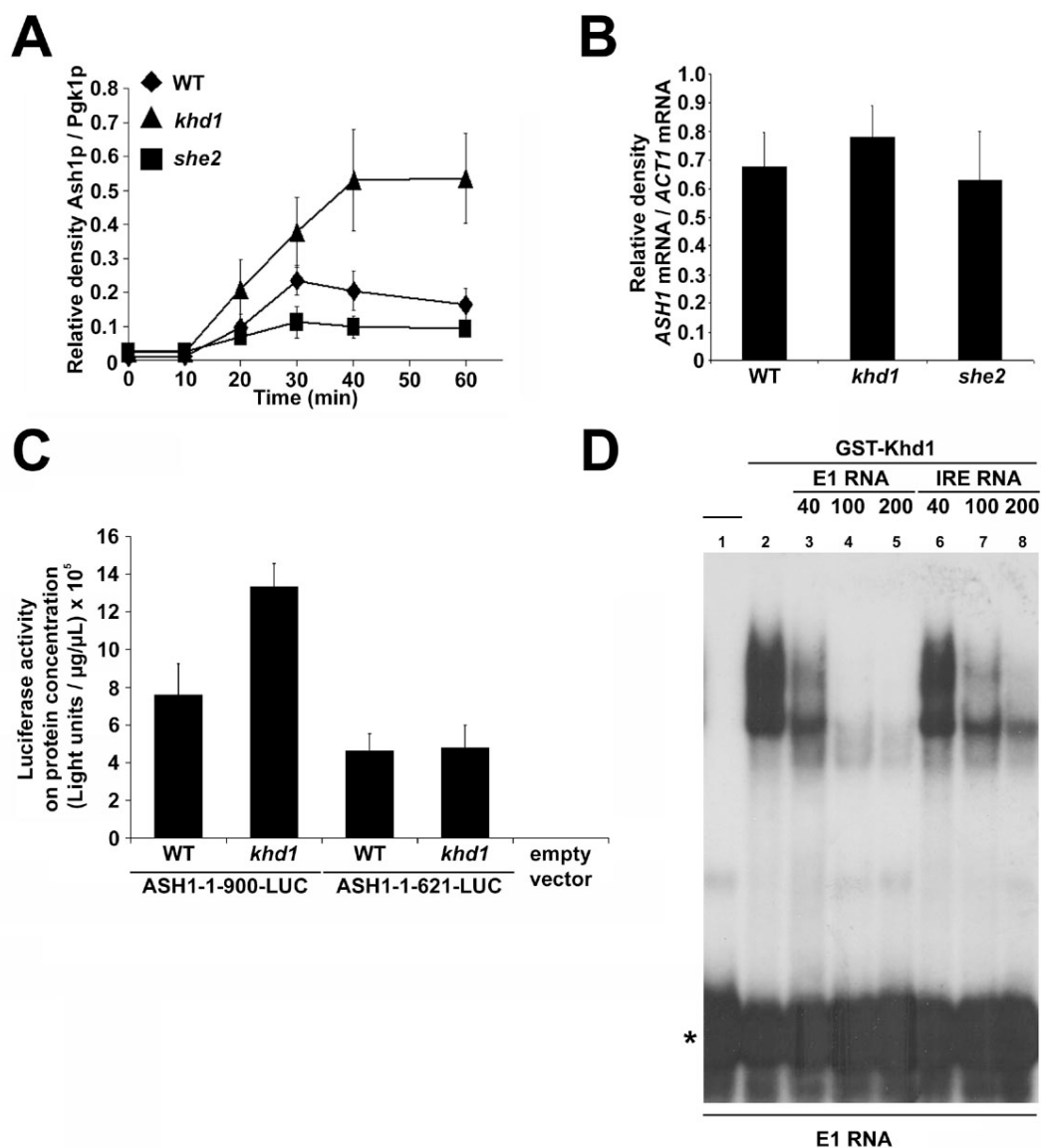


Figure S1. Kinetics of the Ash1 protein synthesized from wild-type *ASH1* mRNA

(A) Kinetics of Ash1p synthesis after galactose induction of a *GAL1prom-ASH1-MYC* gene (pDD-01) in a wild-type yeast strain (◆), in a *SHE2* knockout strain (*she2* ■), in a *KHD1* knockout strain (*khd1* ▲). Error bars indicate mean \pm standard deviation from three independent experiments. (B) *ASH1* mRNA levels in the three yeast strains normalized to *ACT1* mRNA after one hour of induction. Error bars indicate mean \pm

standard deviation from three independent experiments. (C) Absolute luciferase activity from the Ash1₁₋₉₀₀-Luc and Ash1₁₋₆₂₁-Luc fusion proteins in WT, *khdl* and control strains. Luciferase activity was normalized on total protein concentration. Since their absolute luciferase activity reflect both their expression level and the intrinsic activity of the luciferase fusion protein, they cannot be directly compared. However, the effect of a *KHDI* deletion on their relative activity can be compared. Hence, luciferase activity in the WT strain was normalized to 1 for each construct and displayed in two separate graphs (Figures 1D and 1E). Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least four independent experiments. (D) Electrophoresis mobility shift assay for GST-Khd1 with localization element E1 competed by unlabelled E1 RNA and IRE RNA. Lane 1: P³² labelled E1 RNA. Lane 2: P³² labelled E1 RNA with 0.63 μ M GST-Khd1. Competitions of the Khd1p-E1 RNA complex with 40 times, 100 times, and 200 times unlabelled E1 RNA (lanes 3 to 5) and with 40 times, 100 times, and 200 times unlabelled IRE RNA (lanes 6 to 8).

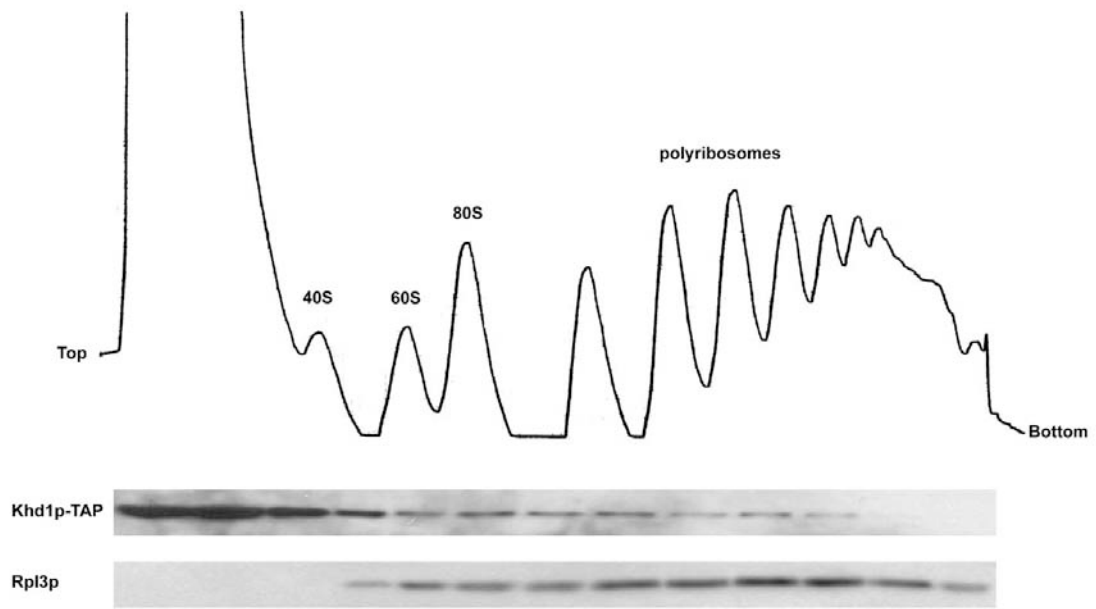


Figure S2. Cosedimentation of Khd1p with ribosomes

Sucrose gradient and distribution of Khd1p-TAP and Rpl3p, a protein of the large subunit of the ribosome, in the various fractions of the gradient.

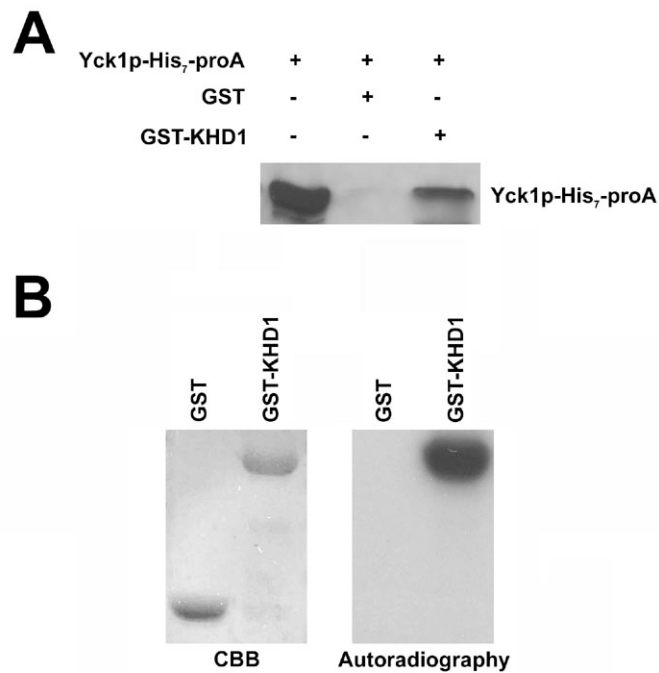


Figure S3. CK1 interacts with and phosphorylates GST-Khd1p *in vitro*

(A) GST pulldown assay of yeast purified Yck1p-His₇-proA with GST-Khd1p purified from bacteria. (B) *In vitro* phosphorylation of GST-Khd1p by the rat purified CK1. Left panel, Coomassie blue staining of the GST and GST-Khd1p proteins. Right panel, autoradiography of P³²-phosphorylated GST-Khd1p.

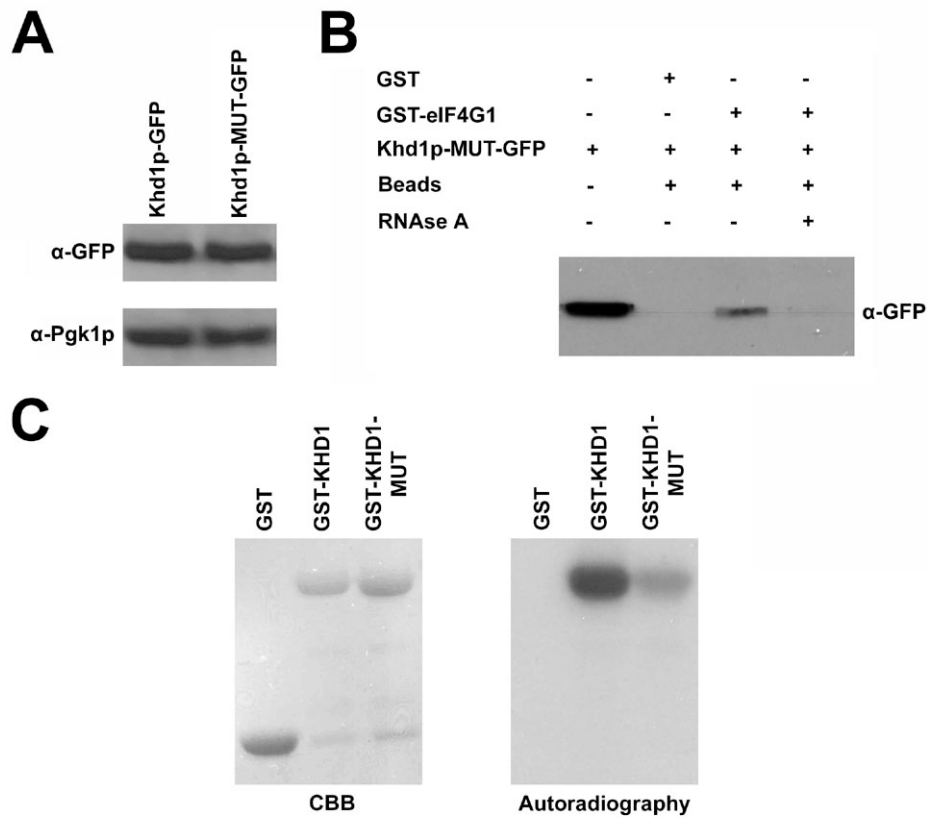


Figure S4. Characterization of the Khd1-MUT protein

(A) Detection of levels of Khd1-GFP and Khd1-MUT-GFP expressed in a *khd1* yeast strain from the plasmids pPC5 and pPC6, respectively, by Western blot. (B) GST pulldown assays of yeast extract containing Khd1-MUT-GFP with recombinant GST-eIF4G1. Lane 4: extract was treated with RNAse A prior the pulldown with GST-eIF4G1. (C) *In vitro* phosphorylation of GST, GST-Khd1p and GST-Khd1-MUT proteins with rat CK1. Left panel, Coomassie blue stained gel of the GST tagged proteins. Right panel, autoradiography of the P³²-phosphorylated GST-Khd1 proteins.