HAL
open science

Identification d'une Terminal Uridylyl Transférase impliquée dans la protection de l'extrémité 3' des ARNm déadénylés chez Arabidopsis thaliana

François Sement

▶ **To cite this version:**

François Sement. Identification d'une Terminal Uridylyl Transférase impliquée dans la protection de l'extrémité 3' des ARNm déadénylés chez Arabidopsis thaliana. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ132 . tel-00881163

HAL Id: tel-00881163

https://theses.hal.science/tel-00881163

Submitted on 7 Nov 2013

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 DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE VIE ET SANTE

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS

UPR2357

THÈSE présentée par :

François SEMENT

soutenue le : **27 Septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Identification d'une Terminal Uridylyl Transférase impliquée dans la protection de l'extrémité 3' des ARNm déadénylés chez *Arabidopsis thaliana*

THÈSE dirigée par :

M. GAGLIARDI Dominique	Directeur de recherche, CNRS

RAPPORTEURS :

M. VAUCHERET Hervé	Directeur de recherche, INRA
M. CRESPI Martin	Directeur de recherche, CNRS

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. GILMER David	Professeur, Université de Strasbourg

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Dominique Gagliardi, pour son soutien et sa patience au cours de ces trois années de thèse. J'ai énormément appris à son contact, tant au niveau de la connaissance que de l'expérience.

Je tiens aussi tout particulièrement à remercier ma collègue et amie, Heike Lange, pour sa participation au « projet TUT1 » et pour les innombrables discussions scientifiques que nous avons pu avoir.

Je voudrai également remercier les membres passés et présents de l'équipe « Dégradation des ARN » : Jean Canaday, Emilie Ferrier et Hélène Zuber ainsi que les différents stagiaires qui ont participé à ce travail.

Je tiens aussi à remercier tous les collègues de l'IBMP pour leur aide et leur disponibilité.

Je finirai en remerciant ma famille et la femme qui aura partagé ma vie pendant cette expérience. J'ai toujours pu compter sur leur soutien et je n'aurai sans doute pas pu y arriver sans eux.

Introduction 4

I. Présentation de la famille des poly(A) polymérases non canoniques ou ncPAP 6

II. La polyadénylation des ARN 7

A. Les origines de la polyadénylation 7
1) La polyadénylation chez les bactéries 7
2) La polyadénylation chez les Archaea 9

B. La polyadénylation chez les eucaryotes 10
1) Les polyadénylations nucléaires 10
a) Polyadénylation des ARNm et des autres transcrits de l'ARN polymérase II 10
b) Polyadénylation nucléaire et dégradation 12
c) Polyadénylation et ARN interférence : rôle dans la formation de l'hétérochromatine 15
2) La polyadénylation cytosolique 15
a) Activation de la traduction par la polyadenylation 15
b) Adénylation et stabilité des miRNA 16
c) Polyadénylation et dégradation dans le cytosol 17
3) La polyadénylation dans les mitochondries 17
a) Chez l'humain 17
b) Chez les trypanosomes 19
4) Dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation chez les plantes 20

III. L'uridylation des ARN 29

A. Stabilisation d'U6 snRNA par l'uridylation 29

B. Les principales étapes de la dégradation des ARNm 30

C. Les principaux acteurs de la dégradation des ARNm 31
1) Le complexe CCR4-CAF1-NOT 31
2) Le complexe LSM1-7-PAT1 32
3) Le complexe d'élimination de la coiffe 34
4) Les 5'-3' exoribonucléases cytosoliques 36

D. Sites de dégradation des ARNm 37
1) Les processing bodies ou P bodies 37
2) Les polysomes 39

E. Le rôle de l'uridylation dans la dégradation des ARN 39
1) Uridylation et dégradation des ARNm 40
2) Uridylation et dégradation des petits ARN 41
a) Biogenèse et mode d'action des petits ARN 41
b) Déstabilisation des petits ARN par l'uridylation 43
3) Uridylation des pré-miRNA 45
4) Devenir des fragments 5' des transcrits clivés par le complexe RISC 45

Objectifs de ma thèse 47

Résultats 49

I. La famille des ncPAP chez *A. thaliana* 49
A. Identification des gènes codant pour des ncPAP chez *A. thaliana* 49
B. Localisations variées des ncPAP d'*A. thaliana* dans les cellules végétales 50
II. Identification d'un nouveau rôle de l'uridylation dans la protection de l'extrémité 3' des ARNm déadénylés 51
A. Localisation de TUT1 dans le cytosol des cellules végétales 51
B. Architecture de la protéine TUT1 53
C. Activité catalytique de TUT1 54
D. La caractérisation de TUT1 a permis l'identification d'un nouveau rôle de l'uridylation des ARN 55
1) Présentation des mutants tut1 55
2) L'uridylation protège les extrémités 3' des transcrits déadénylés 57
III. Etude du rôle de TUT1 dans l'uridylation d'autres ARN et effet de la surexpression de TUT1 90
A. TUT1 n'est pas un acteur majeur de l'uridylation des petits ARN 90
B. TUT1 n'est pas nécessaire à l'uridylation du fragment 5' de l'ARNm LOM1 issu du clivage par miR171/RISC 92
C. Etude préliminaire de la surexpression de TUT1 et de son mutant d'activité TUT1** dans un système hétérologue 93
1) Stratégie expérimentale 94
2) TUT1 réprime la fluorescence due à l'expression du gène rapporteur GFP 95
3) TUT1 modifie le niveau d'expression de la GFP et d'une protéine endogène PR2. 96
4) TUT1 réprime l'accumulation de l'ARNm PR2 mais pas celui de la GFP 97
5) TUT1** provoque l'accumulation d'ARNm PR2 98
6) Caractérisation des extrémités 5' et 3' des ARNm GFP 99
a) Taux d'uridylation et taille des queues poly(A) des ARNm GFP 99
b) Statut des extrémités 5' des ARNm GFP 102
7) Caractérisation des extrémités 5' et 3' des ARNm PR2 103
8) Le domaine N terminal de la protéine TUT1 est à l'origine de l'accumulation de l'ARNm PR2 en présence de TUT1**myc 104
a) Stratégie expérimentale 104
b) Le domaine N terminal de TUT1 est requis pour la diminution de fluorescence de la GFP et la diminution des pré ARNm et des ARNm PR2 104
c) Le domaine N terminal de TUT1** est requis pour l'accumulation des ARNm PR2 105
9) Récapitulation de l'effet de l'expression de TUT1 105
10) Récapitulation de l'effet de la surexpression de TUT1** 106
11) Conclusion des résultats de l'expression ectopique de TUT1 et de son mutant d'activité TUT1** 106
Discussion 108
I. La localisation potentielle de TUT1 en lien avec son rôle biologique. 108

II. Le nouveau rôle de protection des extrémités 3' des ARNm par l'uridylation caractérisé chez *A. thaliana* 110
III. L'absence d'uridylation des ARNm a un effet mineur sur la dégradation des ARNm et le transcriptome d'*A thaliana* 112
IV. Devenir des transcrits aberrants du mutant *tut1* 112
V. L'uridylation protège les ARNm déadénylés par un mécanisme inconnu 114
VI. Enzymes potentiellement responsables de la production de transcrits aberrants dans le mutant *tut1* 115
A. Les 3'-5' exoribonucléases génériques cytosoliques 115
B. Les déadénylases impliquées dans l'hydrolyse des queues poly(A) des ARNm 116
VII. Uridylation des petits ARN 118
VIII. Uridylation des fragments 5' des ARNm clivés par RISC 119
IX. Expression ectopique de TUT1 par agroinfiltration de *N. benthamiana* 120
A. TUT1 et le stress cellulaire 120
B. Rôle du domaine N terminal de TUT1 122
Conclusion générale 124
Matériels et méthodes 125
Références 146
Annexes 165

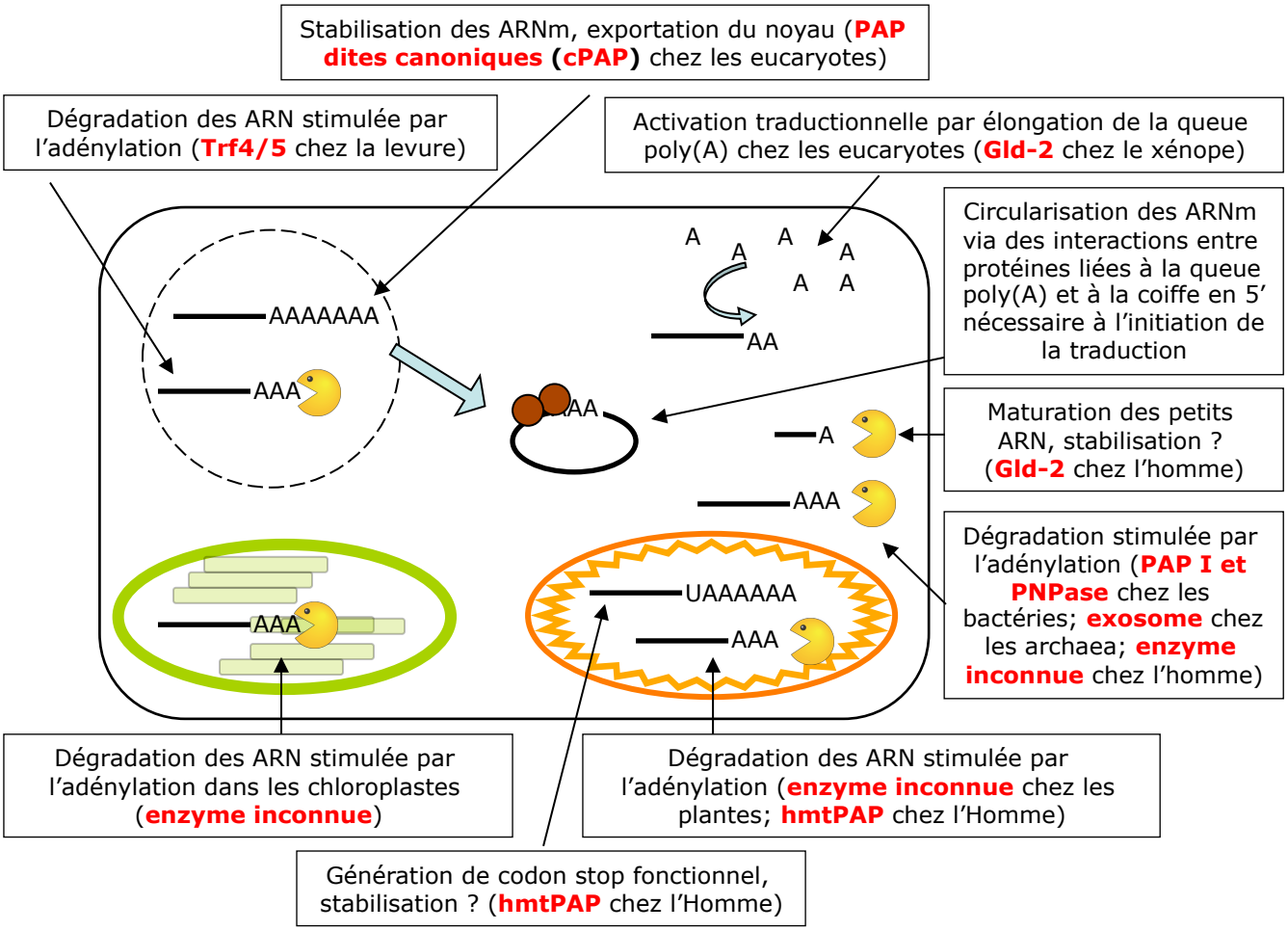


Figure 1 : Les rôles de la polyadénylation diffèrent selon l'enzyme, l'organisme et le compartiment cellulaire considéré

Les différents compartiments cellulaires au sein de la cellule sont ici représentés de manière schématique : le noyau en rond pointillé, le chloroplaste en vert et la mitochondrie en orange. Les rôles de la queue poly(A) sont notés avec l'enzyme responsable de la synthèse de la queue poly(A) en rouge entre parenthèse ainsi que l'organisme dans lequel elle a été identifiée. Cette liste d'exemples est non exhaustive. Chaque étape est détaillée dans le texte. PAP : Poly(A) polymérase ; Trf4/5 : « Topoisomérase-related function 4/5 » ; Gld-2 : « Germline determinant 2 » ; PAP I : PAP de type nucléotidyltransférase ; PNPase : PolyNucléotide Phosphorylase ; hmtPAP : « human mitochondrial PAP ».

Introduction

Les ARN nucléotidyltransférases sont des enzymes capables de catalyser l'ajout de nucléotides à l'extrémité 3' d'une molécule d'ARN. Le rôle le mieux caractérisé de ces enzymes est la polyadénylation qui consiste en l'ajout d'adénosines monophosphates à l'extrémité 3' de molécules d'ARN. La polyadénylation est présente dans presque tous les systèmes génétiques mais joue des rôles qui peuvent être diamétralement opposés selon l'organisme, le compartiment cellulaire et l'enzyme impliquée (figure 1).

Le rôle ancestral de la polyadénylation est de stimuler la dégradation des ARN (Condon, 2007). Chez les procaryotes, la présence d'une queue d'acide polyadénylique ou poly(A) va permettre le recrutement d'exoribonucléases déclenchant ainsi la dégradation des molécules d'ARN polyadénylées. Cette dégradation stimulée par la polyadénylation est retrouvée chez les eucaryotes dans différents compartiments cellulaires, notamment dans le noyau où elle participe à la voie de surveillance des ARN, dans les chloroplastes et dans les mitochondries de certains organismes comme les végétaux ou les trypanosomes (Gagliardi et al., 2004; Kao and Read, 2005; LaCava et al., 2005).

Outre son rôle dans la dégradation des ARN, la polyadénylation joue d'autres rôles importants. Le plus connu est la stabilisation des ARN messagers (ARNm) eucaryotiques. La queue poly(A) est également impliquée dans l'export de ces ARNm du noyau vers le cytosol ou encore dans l'initiation de leur traduction (Zhao et al., 1999). La polyadénylation peut également se dérouler dans le cytosol où elle a un rôle dans la dégradation des ARN (Slomovic et al., 2010), ou encore un rôle dans l'activation de la traduction, notamment dans les oocytes de xénope (Radford et al., 2008) et dans les neurones (Wells et al., 2001; Kwak et al., 2008).

Ces différents rôles de la polyadénylation sont en partie définis par les enzymes impliquées, leurs interactants et leur localisation. On peut distinguer plusieurs types de poly(A) polymérase (PAP). La plus connue et la plus étudiée est la PAP dite canonique (cPAP pour « canonical PAP »), responsable de la formation de la queue poly(A) à l'extrémité 3' des ARNm eucaryotiques. Les autres PAP sont par opposition appelées PAP non canoniques ou ncPAP (« non canonical poly(A)

polymerase »). Elles sont retrouvées chez tous les eucaryotes étudiés jusqu'à présent et sont impliquées dans d'autres rôles de la polyadénylation comme la surveillance des ARN par exemple. Les membres de la famille des ncPAP ne catalysent pas toutes une réaction de polyadénylation. Certaines sont capables d'ajouter d'autres nucléotides, tel que des uridines à l'extrémité 3' d'une molécule d'ARN. L'uridylation des ARN émerge comme un processus important dans le contrôle de la stabilité des ARN. Comme dans le cas de la polyadénylation, l'uridylation des ARN est impliquée dans la stabilisation et la déstabilisation d'ARN selon la nature de ces ARN.

L'étendue des rôles des membres de la famille des ncPAP illustre la complexité et la diversité des rôles de l'ajout d'une queue poly(A) ou poly(U) à l'extrémité 3' des ARN.

Dans la première partie de cette introduction, je présenterai les rôles de la polyadénylation avec un intérêt particulier par la dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation chez les plantes. Dans une seconde partie, je ferai le point des connaissances du processus d'uridylation des ARN et de son impact sur la stabilité de ces derniers.

I. Présentation de la famille des poly(A) polymérases non canoniques ou ncPAP

L'addition de nucléotides à l'extrémité 3' d'une molécule d'ARN est réalisée par les ribonucléotidyltransférases, une classe d'enzymes appartenant à la superfamille des ADN polymérases β (Aravind and Koonin, 1999), qui est conservée chez tous les eucaryotes. Le membre le plus connu de cette classe est sans doute la poly(A) polymérase dite canonique (cPAP). La cPAP ajoute une queue poly(A) à tous les transcrits de l'ARN polymérase II à l'exception des ARNm d'histones chez les mammifères. Cette queue poly(A) ajoutée à la fin de la transcription est requise pour la stabilisation des ARNm, leur export du noyau vers le cytosol et l'efficacité de leur traduction (Colgan and Manley, 1997). D'autres enzymes, appartenant aussi à la superfamille ADN polymérases β, permettent également la synthèse de queue poly(A) ou poly(U) à l'extrémité 3' des ARN ou encore l'ajout du motif CCA nécessaire à la maturation de l'extrémité 3' des ARN de transfert (ARNt). Ces enzymes appartiennent à la sous famille des poly(A) polymérases non canoniques. Elles montrent une diversité remarquable de spécificité de substrats, de nucléotides ajoutés ainsi que de fonctions métaboliques qu'elles remplissent. Le nombre de ces ncPAP varie d'un organisme à l'autre, de deux chez *Saccharomyces cerevisiae* à quatorze chez *Arabidopsis thaliana* en passant par sept chez l'humain (Martin and Keller, 2007; Lange et al., 2009).

Malgré la diversité des rôles qu'elles jouent dans la cellule, toutes les PAP partagent des caractéristiques communes et notamment la présence de deux domaines. Le premier est le domaine catalytique qui contient le motif tour-hélice de la superfamille des β polymérases. Une caractéristique de ce motif est la présence de deux aspartates importantes pour la coordination de l'ion métallique et du nucléotide dans le site actif. Ce domaine catalytique est accompagné d'un domaine dit associé aux PAP, qui est également très conservé parmi les ncPAP (Martin and Keller, 2007). Ce domaine associé aux PAP contient un domaine de reconnaissance des nucléotides.

Contrairement à la PAP canonique, les PAP non canoniques (ncPAP) ne contiennent pas de motifs classiques de liaison à l'ARN, à l'exception de la Terminale Uridylyl Transferase spécifique de U6 snRNA, appelée RBM21 chez l'humain (Trippe

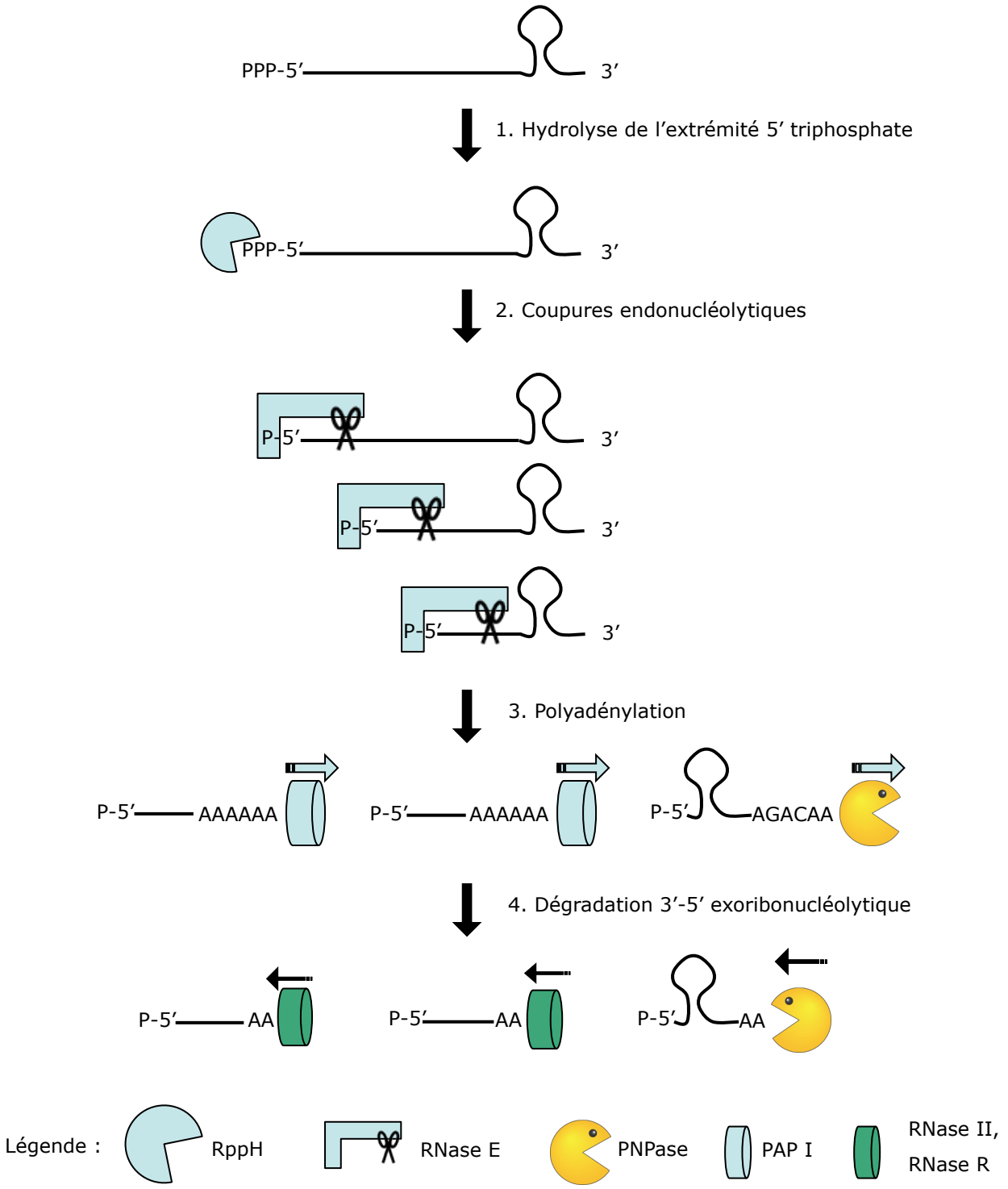


Figure 2 : Schéma des étapes de la dégradation des ARN dépendante de l'extrémité 5' chez *E. coli*

La dégradation se déroule en 4 étapes : 1. Le groupement 5' triphosphate présent en 5' du transcrit primaire est hydrolysé par la pyrophosphatase RppH générant une extrémité 5' monophosphate. 2. L'extrémité 5' monophosphate recrute l'endonucléase RNase E qui initie une série de coupures endonucléolytiques. 3. Les produits de ces coupures sont polyadénylés à leur extrémité 3' par la PAP I (poly(A) polymérase de type nucléotidyltransférase) ou la PNPase (PolyNucléotides Phosphorylase). La PAP I produit des queues uniquement composées de A alors que la PNPase produit des queues majoritairement composées de A. 4. Les fragments d'ARN polyadénylés sont dégradés par des 3'-5' exoribonucléases telles que la RNaseII, la RNase R ou la PNPase.

et al., 2006). A la place, les ncPAP agissent généralement en complexe avec d'autres protéines possédant des domaines de liaison à l'ARN pour reconnaître leur substrat (LaCava et al., 2005).

Les ncPAP comme les cPAP catalysent l'incorporation de ribonucléosides monophosphates à l'extrémité 3'OH d'un ARN d'une manière matrice-indépendante, via un mécanisme catalytique dépendant d'ion métallique. En général, les PAPs montrent une grande sélectivité au niveau des nucléotides ajoutés *in vivo*. Cependant, *in vitro*, cette sélectivité devient plus flexible, acceptant ainsi des nucléotides alternatifs (Rissland et al., 2007). Comprendre les mécanismes de la sélectivité nucléotidique au niveau moléculaire requiert des informations structurales qui commencent à être publiées pour les ncPAP (Stagno et al., 2007; Hamill et al., 2010; Munoz-Tello et al., 2012; Yates et al., 2012) mais plus d'information seront nécessaires pour bien caractériser ces mécanismes. La comparaison des structures des ncPAP, associées en complexe ou non et en fonction de leur activité *in vitro,* permettra de caractériser les acides aminés ou motifs conférant la sélectivité au niveau des nucléotides ajoutés.

II. La polyadénylation des ARN

A. Les origines de la polyadénylation

1) La polyadénylation chez les bactéries

Chez les bactéries, le seul rôle connu de la polyadénylation est dans la dégradation des ARN (figure 2). Il existe plusieurs voies de dégradation des ARN chez les bactéries avec notamment une voie dépendante de l'extrémité 5' et une voie indépendante. Dans le cadre de la voie de dégradation des ARNm dépendante de l'extrémité 5', la première étape de la dégradation consiste en l'hydrolyse du groupement triphosphate à l'extrémité 5' des ARNm par l'enzyme RppH (Celesnik et al., 2007; Deana et al., 2008; Richards et al., 2011). L'extrémité 5' monophosphate ainsi produite favorise le recrutement de RNases qui vont dans un deuxième temps réaliser des coupures endonucléolytiques effectuées majoritairement par la RNase E ou la RNase J chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* respectivement (Condon, 2007; Silva et al., 2011; Lehnik-Habrink et al., 2012). Chez *B. subtilis*, la RNase J possède également une activité 5'-3' exoribonucléase en plus de son activité

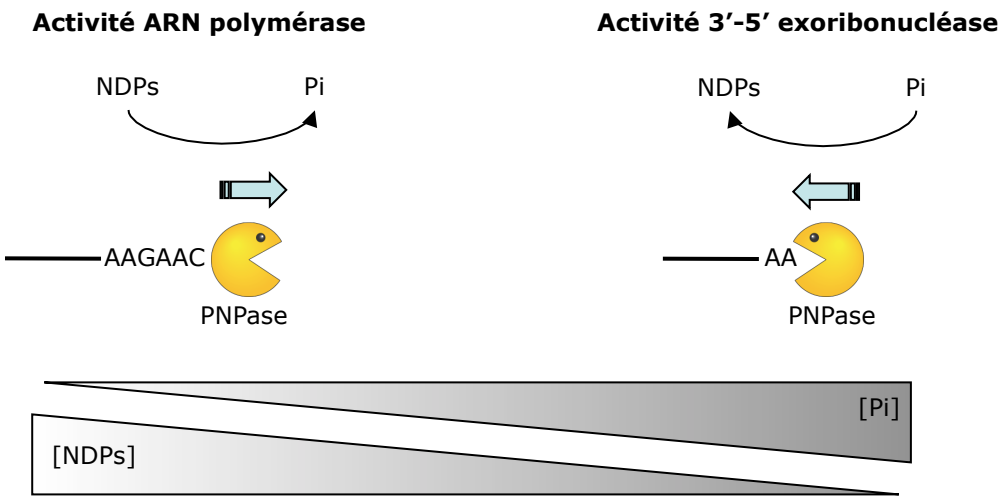


Figure 3 : La PNPase (PolyNucléotide Phosphorylase) catalyse deux types de réactions
La PNPase utilise du phosphate inorganique (Pi) pour cliver les liaisons phosphodiesters des ARN. Les produits de cette réaction sont des nucléosides diphosphates (NDPs). Cette réaction est réversible, c'est à dire que la PNPase peut synthétiser des ARN à partir de nucléosides diphosphates. L'activité exoribonucléase ou polymérase dépend des concentrations relatives en phosphate inorganique et en nucléoside diphosphate. L'activité ARN polymérase de la PNPase va aboutir à la formation d'extensions nucléotidiques hétéropolymériques, majoritairement composées d'adénosines monophosphates mais contenant également les trois autres nucléotides.

endonucléolytique (Mathy et al., 2007, 2010). De manière intéressante, les activités pyrophosphatase de RppH et 5'-3' exoribonucléase des RNases J rappellent respectivement les activités de decapping des ARNm par DCP2 et l'activité 5'-3' exoribonucléase des protéines XRN dans les cellules eucaryotes.

Lors de la troisième étape de la dégradation des ARNm bactériens par la voie dépendante des extrémités 5', les fragments d'ARN produits par les coupures endonucléolytiques peuvent être polyadénylés ce qui favorise leur dégradation par des exoribonucléases telles que la PolyNucléotide Phosphorylase (PNPase), la RNase II et la RNase R chez *E. coli* (Andrade et al., 2009) (figure 2). La présence d'une queue poly(A) facilite l'action de ces 3'-5' exoribonucléases en fournissant une extrémité 3' non structurée qui permet une meilleure interaction entre l'enzyme et son substrat. Cette polyadénylation est effectuée principalement par la poly(A) polymérase de type nucléotidyltransférase PAP I (encodée par le gène *pcnb* chez *E. coli*). PAP I produit des queues poly(A) homopolymériques, c'est à dire uniquement composées d'adénosines monophosphates. En absence de PAP I, les ARN bactériens destinés à la dégradation peuvent néanmoins être polyadénylés par une deuxième enzyme qui n'est autre que la PNPase (Mohanty and Kushner, 2000) (figure 2).

En effet, la PNPase peut catalyser soit la dégradation soit la synthèse des ARN (figure 3). La dégradation des ARN est due à son activité 3' 5' exoribonucléolytique de type phosphorolytique. La PNPase utilise du phosphate inorganique pour cliver les liaisons phosphodiesters des ARN. Les produits de cette réaction sont des nucléosides diphosphates. Cette réaction est réversible, c'est à dire que la PNPase peut synthétiser des ARN à partir de nucléosides diphosphates. L'activité exoribonucléase ou polymérase dépend des concentrations relatives en phosphate inorganique et en nucléoside diphosphate. L'activité ARN polymérase de la PNPase va aboutir à la formation d'extensions nucléotidiques hétéropolymériques, majoritairement composées d'adénosines monophosphates mais contenant également les trois autres nucléotides (Mohanty and Kushner, 2000).

La déstabilisation des ARN bactériens par la polyadénylation a plusieurs conséquences sur l'expression du génome. La fonction principale de la polyadénylation est de faciliter la dégradation de petites molécules d'ARN structurées issues du clivage endonucléolytique de molécules plus longues telles que les ARNm, ou des ARN non codant tels que les ARN régulateurs, les ARNr et les ARNt non

fonctionnels (Deutscher, 2003). Ce dernier exemple suggère que la dégradation des ARN dépendante de la polyadénylation jouerait un rôle dans le contrôle de la qualité des ARN bactériens.

Le contrôle du niveau d'expression d'un gène par la polyadénylation chez *E. coli* a également été décrit. L'inactivation de la PAP I entraîne la surexpression de la glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS) en raison de l'accumulation et de la stabilisation du transcrit GlmS (Joanny et al., 2007). Cette accumulation n'est pas due à un effet direct de l'absence de polyadénylation de l'ARNm GlmS. L'absence de polyadénylation va stabiliser le petit ARN GlmY. Cette stabilisation de GlmY entraîne la stabilisation du petit ARN GlmZ qui va activer la transcription du gène *GlmS* (Reichenbach et al., 2008). L'expression de *GlmS* est donc soumise à une cascade de régulation par des petits ARN bactériens (les petits ARN bactériens ont une taille de 50 a 400 nt, revue dans Waters and Storz, 2009), dont la déstabilisation est dépendante de la polyadénylation par PAP I.

Une autre conséquence de la dégradation des ARN médiée par la polyadénylation est le contrôle du nombre de copie de plasmides ColEI chez *E. coli*. Ce contrôle intervient via la dégradation par la voie PAP I/PNPase de l'ARN régulateur ARN I, qui est un ARN antisens régulant la réplication des plasmides ColEI (He et al., 1993).

La dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation permet donc la dégradation d'ARN structurés mais également, de manière indirecte, de contrôler l'abondance de plasmides ou de protéines.

2) La polyadénylation chez les Archaea

Chez les *Archaea* halophiles et chez certaines *Archaea* méthanogènes, aucune protéine homologue aux enzymes effectuant la polyadénylation chez les bactéries n'a pu être identifiée par l'analyse des séquences génomiques. De plus, aucun ARN polyadénylé n'a été mis en évidence chez *Haloferax volcanii* ainsi que dans d'autres *Archaea* halophiles et méthanogènes. Contrairement aux bactéries et aux eucaryotes où jusqu'ici, une absence de polyadénylation reste exceptionnelle (Portnoy and Schuster, 2008), l'étude des *Archaea* a donc montré de nombreux cas d'absence de polyadénylation.

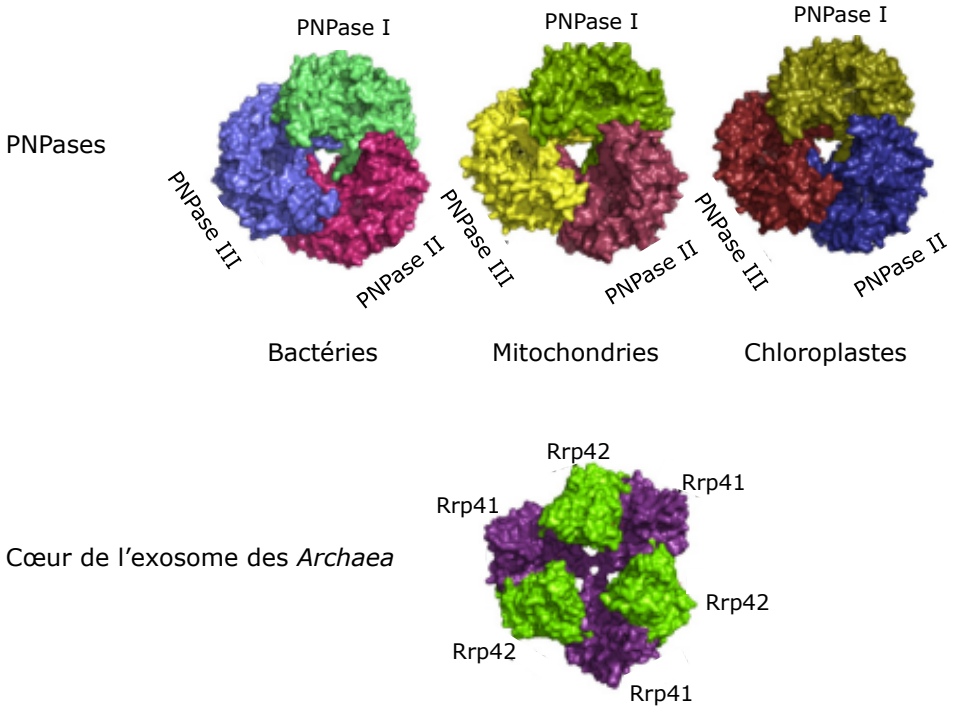


Figure 4 : Comparaison des structures tridimensionnelles des PNPases (PolyNucleotide Phosphorylase) de bactéries, de mitochondries et de chloroplastes et du cœur de l'exosome des *Archaea*

Les PNPases forment un complexe homotrimérique ayant une forme d'anneau. Chaque monomère possède deux domaines phosphorolytiques, dont un seul est actif. Ces trois sites actifs entourent le canal formé par l'assemblage des trois sous unités et qui permet l'interaction avec une molécule d'ARN simple brin. Le cœur de l'exosome des *Archaea* est formé de trois hétérodimères Rrp41/Rrp42 (« Ribosomal RNA Processing 41/42 ») lui donnant une forme d'anneau. Rrp41 possède un domaine phosphorolytique qui permet la dégradation ou la synthèse d'une molécule d'ARN simple brin. D'après Slomovic *et al.* 2008.

En revanche, des queues poly(A) hétéropolymériques ont été trouvées chez des *Archaea* hyperthermophiles ainsi que chez certaines *Archaea* méthanogènes. Chez ces organismes, la polyadénylation est effectuée par l'exosome (Portnoy et al., 2005). Initialement, l'exosome a été défini comme un complexe protéique dégradant les ARN de 3' en 5' chez les eucaryotes (Mitchell et al., 1997). La structure et la fonction de l'exosome eucaryotique seront détaillées plus loin dans l'introduction (paragraphe II B 1 b). L'exosome des *Archaea* ressemble de manière structurale et fonctionnelle à la PNPase (figure 4) (Slomovic et al., 2008). Le cœur de l'exosome des *Archaea* est formé de trois hétérodimères Rrp41/Rrp42 (« Ribosomal RNA Processing 41/42 ») lui donnant une forme d'anneau. La sous unité Rrp41 possède le domaine phosphorolytique nécessaire à la dégradation d'une molécule d'ARN simple brin et ce domaine est également responsable de la formation des extensions nucléotidiques hétéropolymériques.

Chez les *Archaea*, la polyadénylation, lorsqu'elle existe, a la même fonction que chez les bactéries et promeut la dégradation 3'-5' exoribonucléolytique des ARN par l'exosome.

B. La polyadénylation chez les eucaryotes

1) Les polyadénylations nucléaires

a) Polyadénylation des ARNm et des autres transcrits de l'ARN polymérase II

La polyadénylation est une étape essentielle de maturation pour tous les ARNm eucaryotiques à l'exception des ARNm histone chez les mammifères. Elle requiert le complexe protéique de polyadénylation contenant notamment CPSF ("Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor"), CstF ("Cleavage stimulation Factor"), la protéine de structure simplekine et la poly(A) polymérase canonique (cPAP) ainsi que deux motifs présents sur le brin d'ARN en cours de synthèse (figure 5). Ces deux séquences se trouvent de part et d'autre du site de clivage et dirige l'addition de la queue poly(A). La séquence hexanucléotidique AAUAAA (ou parfois des variantes de cette séquence), est située de 10 à 30 nucléotides en amont du site de clivage/polyadénylation (Proudfoot and Brownlee, 1976). Une séquence plus variable (DSE pour "Downstream Sequence Element"), riche en GU, est située 20 à 40 nucléotides en aval du site de clivage (McLauchlan et al., 1985). La variabilité de ces

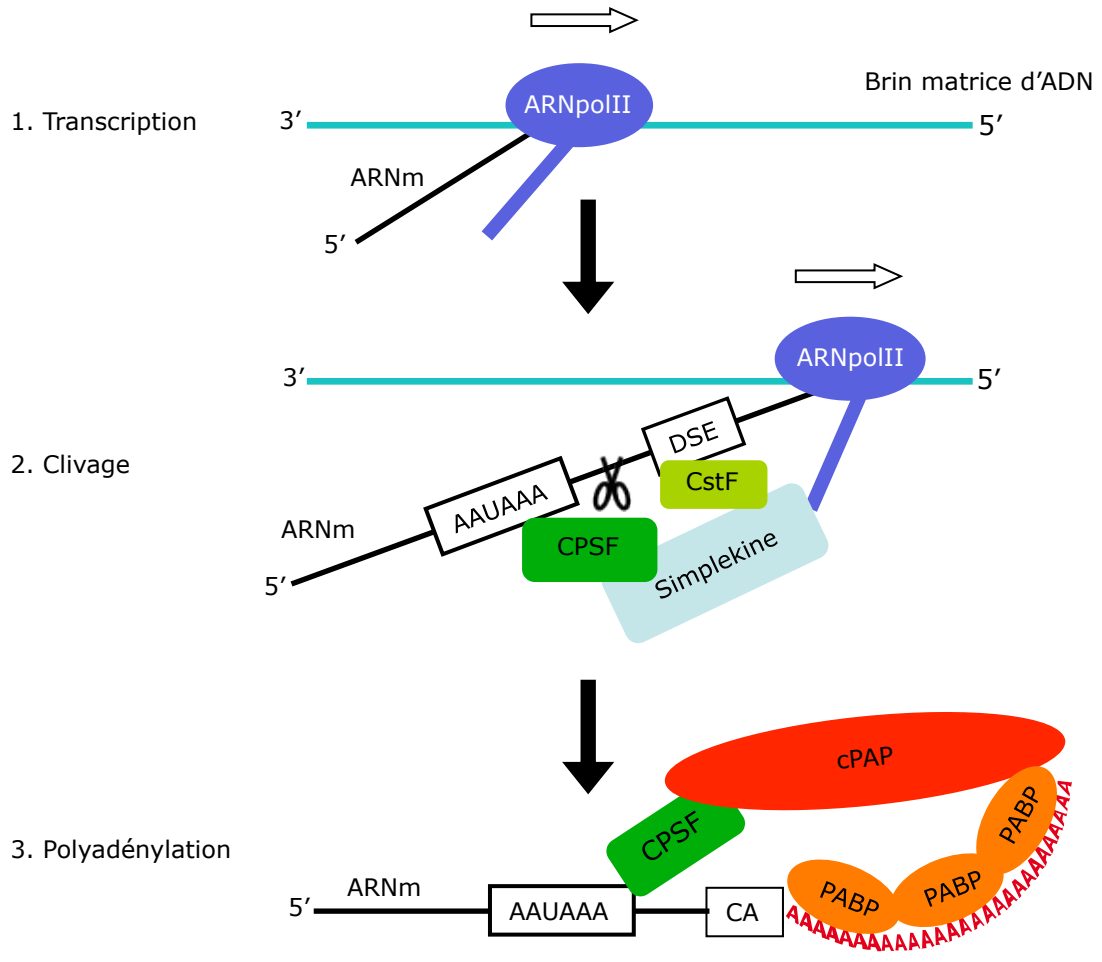


Figure 5 : La polyadénylation nucléaire des ARNm eucaryotiques chez les mammifères.
Cette réaction se déroule en trois étapes :
1. Le gène est transcrit à partir du brin matrice d'ADN par l'ARN polymérase II (ARNpolII). 2. Après transcription de la séquence hexanucléotidique et de la séquence DSE (« Downstream Sequence Element »), celles ci sont respectivement reconnues par les facteurs de polyadénylation CPSF (« Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor ») et CstF (« Cleavage Stimulating Factor »). Ces deux facteurs vont catalyser la coupure de l'ARNm entre ces deux séquences, généralement après un dinucléotide CA. 3. CPSF recrute alors la cPAP (poly(A) polymérase canonique) qui va synthétiser une queue poly(A) d'environ 250 résidus à l'extrémité 3′ de l'ARNm. La synthèse de la queue poly(A) s'arrête lorsque l'encombrement stérique due aux PABP (« Poly(A) Binding Protein ») empêche le contact entre la cPAP (PAP canonique) et CPSF.

deux séquences et leur distance l'une par rapport à l'autre détermine la force du signal poly(A) et le site de clivage qui se trouve généralement après un dinucléotide CA (Chen et al., 1995). La séquence hexanucléotidique est reconnue par le facteur protéique CPSF et la séquence DSE par CstF. CPSF joue un rôle dans les réactions de clivage et de polyadénylation, en aidant au recrutement de la cPAP. L'assemblage de la machinerie de polyadénylation requiert aussi le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II et la protéine de structure symplekine (Hirose and Manley, 1998; Takagaki and Manley, 2000).

Chez *A. thaliana*, une étude récente sur les sites de polyadénylation des ARNm par séquençage direct a révélé que les sites de clivage et de polyadénylation des ARNm sont moins conservés que chez les mammifères. Des séquences hexanucléotidiques différentes du consensus AAUAAA sont retrouvées, telles que les séquences UUGUUU ou des variantes de cette séquence. De manière générale, les sites de polyadénylation des ARNm d'*A. thaliana* sont beaucoup plus hétérogènes que chez d'autres organismes (Sherstnev et al., 2012).

La longueur de la queue poly(A) est déterminée par les protéines PABP ("Poly(A) Binding Protein"). Lors du début de la synthèse de la queue poly(A) par la cPAP, une protéine PABP va se fixer sur la queue poly(A) naissante. Cette fixation va stimuler la processivité de la cPAP et les monomères de PABP vont continuer à se fixer sur cette queue poly(A) naissante. Son élongation s'arrête lorsque la cPAP n'est plus en contact avec CPSF, en raison de l'encombrement stérique provoqué par la liaison des PABP sur la queue poly(A) (Keller et al., 2000). Ce processus permet le contrôle de la taille des queues poly(A) et aboutit à à la formation d'une queue poly(A) d'environ 250 nucléotides chez les mammifères et d'environ 110 nucléotides chez la levure.

Le rôle le plus connu de la polyadénylation des ARNm eucaryotiques est la stabilisation de ces derniers. Les protéines PABP se liant à la queue poly(A) vont protéger l'ARN de l'action des 3'-5' exoribonucléases (Bernstein et al., 1989). La maturation de l'extrémité 3' des pré ARNm est également liée à l'export de ces ARN du noyau vers le cytosol. En effet, l'étude de mutants chez *S. cerevisiae* a permis de mettre en évidence l'importance des facteurs de maturation de l'extrémité 3' dans l'exportation nucléaire des ARN (Brodsky and Silver, 2000). La longueur de la queue poly(A) des ARNm est également un élément de régulation décisif de l'export de ces

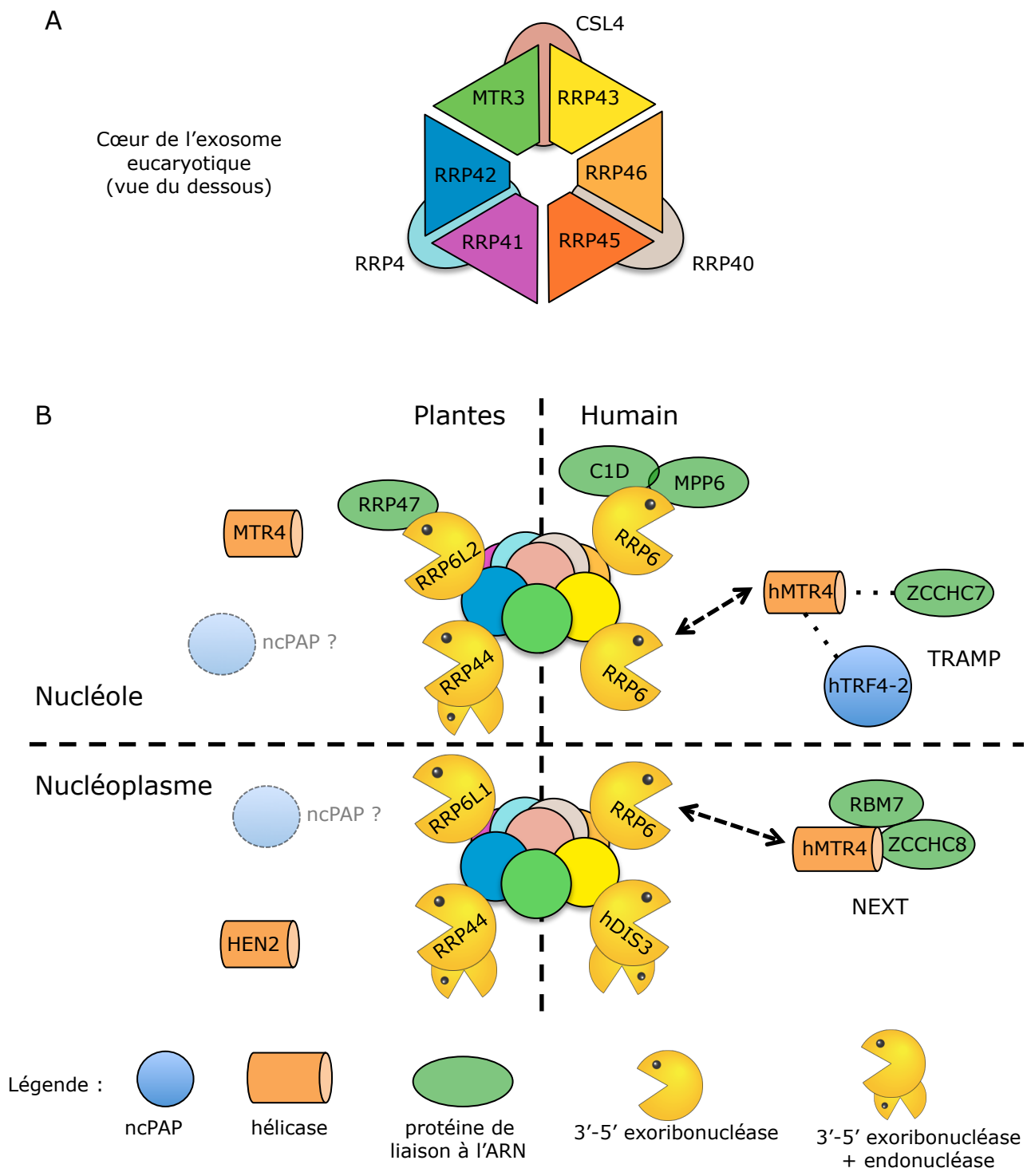


Figure 6 : Les exosomes nucléaires chez les plantes et l'humain
A. Le cœur de l'exosome est formé de 9 sous-unités, conservées chez tous les eucaryotes.
B. Les exosomes nucléaires humains et végétaux ont le même cœur mais des cofacteurs différents. Dans le nucléole des cellules végétales, MTR4, RRP6L2 et RRP47 participent à la maturation des ARNr. HEN2 et RRP6L1 sont sans doute impliquées dans la dégradation des ARN dans le nucléoplasme. Aucune ncPAP nucléaire n'a encore été caractérisée chez les plantes. Dans le noyau des cellules humaines, hMTR4 intéragit avec RRP6 et hMTR4 forme un complexe TRAMP potentiel avec hTRF4-2 et ZCCHC7. hMTR4 est commun au nucléole et au nucléoplasme. Dans le nucléoplasme, hMTR4 est en complexe avec RBM7 et ZCCHC8 et forment le complexe NEXT (Lubas et al. 2011). En plus de ces complexes, le complexe RRP6-C1D-MPP6 dans le nucléole participe à la maturation des ARNr. Les protéines RRP44/hDIS3 sont des 3'-5' exoribonucléases possédant également une activité endonucléolytique, associées avec le cœur de l'exosome dans le noyau des cellules humaines et végétales.

ARNm chez les vertébrés, indépendamment du site de transcription ou de la longueur de l'ARNm (Fuke and Ohno, 2008).

Une fois l'ARNm exporté dans le cytosol, sa traduction efficace est favorisée par sa circularisation due au rapprochement de la coiffe à l'extrémité 5' et de la queue poly(A) en 3'. Ce rapprochement est effectué par l'intermédiaire d'un complexe protéique comprenant entre autres eIF4E, qui va interagir avec la coiffe 7mGpppN, les protéines PABP liées à la queue poly(A) et eIF4G qui interagit avec eIF4E et les PABP (Wells et al., 1998; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002).

La queue poly(A) des ARNm eucaryotiques joue donc plusieurs rôles : dans la stabilisation de ces ARN, leur exportation vers le cytosol et l'efficacité de leur traduction.

b) Polyadénylation nucléaire et dégradation

La polyadénylation nucléaire par d'autres enzymes que les cPAP est un processus ubiquitaire chez les eucaryotes. La polyadénylation nucléaire par les ncPAP participe à la maturation de nombreux ARN non codant tels que les ARN ribosomiques, les snoARN ("small nucleolar RNA") et les snARN ("small nuclear RNA") (LaCava et al., 2005). Elle est également impliquée de la dégradation des introns épissés, des transcrits cryptiques intergéniques (Wyers et al., 2005) et des ARNm codants pour les histones chez la levure (Reis and Campbell, 2007). Le rôle de la queue poly(A) ajoutée est de permettre le recrutement et l'activation d'enzymes de la dégradation des ARN tel que l'exosome nucléaire et ainsi déclencher la dégradation et/ou la maturation des ARN ciblés.

L'exosome est un complexe hétéropolymerique servant chez les eucaryotes de plateforme de dégradation des ARN (Sloan et al., 2012). Le cœur de l'exosome, de composition identique chez tous les eucaryotes, est formé de 9 sous unités. Ce cœur (figure 6 A) peut être divisé en deux parties : la première est formée de 6 protéines, Rrp41, Rrp42, Mtr3, Rrp43, Rrp46 et Rrp45. L'association de ces 6 protéines donne une forme d'anneau au cœur de l'exosome. Cet anneau est coiffé de 3 autres protéines, Rrp40, Csl4, et Rrp4 (Liu et al., 2006). Ces 3 protéines possèdent des domaines S1 ou KH, domaines de liaison à l'ARN. Il est important de noter que, en dépit d'une similarité avec la RNase PH d'*E. coli*, aucune de ces 9 sous-unités ne participe à l'activité exoribonucléolytique de l'exosome chez l'homme ou la levure.

Cependant la sous unité de l'exosome RRP41 chez les plantes a conservé les résidus nécessaires à son activité phosphorolytique (Chekanova et al., 2000). Des expériences sont en cours au laboratoire afin de déterminer l'importance de la conservation de ces résidus pour l'activité de l'exosome chez *A. thaliana*.

Chez tous les eucaryotes, différents cofacteurs protéiques interagissant avec le cœur de l'exosome lui confèrent et modulent son activité exoribonucléase (figure 6 B). Dans le noyau de *S. cerevisiae*, cette activité est conférée par les RNases Rrp44 (Schneider et al., 2007) et Rrp6 (Briggs et al., 1998). La mutation de Rrp6 entraîne l'accumulation d'ARN polyadénylés, indiquant que ces ARN sont bien des substrats de Rrp6 (Carneiro et al., 2007). Des protéines orthologues de Rrp6 et Rrp44 sont retrouvées chez l'humain et *A. thaliana* (figure 6A). Mtr4, une hélicase, est également un cofacteur essentiel de l'exosome nucléaire chez l'homme et la levure (Bernstein et al., 2008; Jia et al., 2011; Lubas et al., 2011).

De manière générale, les cofacteurs de l'exosome diffèrent en fonction du compartiment cellulaire. Un des thèmes de recherche du laboratoire de D. Gagliardi est la caractérisation de l'exosome et de ses cofacteurs chez *A. thaliana*. La diversité des cofacteurs de l'exosome est plus importante chez les plantes que chez la levure et l'homme. Par exemple, *A. thaliana* possède trois gènes codant pour des homologues de Rrp6 de la levure. Ces protéines, baptisées RRP6L1, 2 et 3 ont des localisations différentes dans les cellules végétales (Lange et al., 2008). RRP6L1 est principalement nucléoplasmique, RRP6L2 est accumulé dans le nucléole et RRP6L3 est cytosolique. En plus de l'exemple des protéines RRP6L, deux protéines homologues de l'hélicase Mtr4, cofacteur de l'exosome chez la levure, sont présentes dans le noyau de *A. thaliana*. Ces hélicases sont AtMTR4 et HEN2. Nous avons pu montrer que les protéines d'*A. thaliana* RRP6L2 et AtMTR4, s'accumulant dans le nucléole, sont impliquées dans la maturation des ARNr (Lange et al., 2008, 2011). L'absence de ces protéines entraine l'accumulation de sous produits de maturation des ARNr polyadénylés. L'autre hélicase homologue à Mtr4 de la levure, HEN2 localisée principalement dans le nucléoplasme d'*A. thaliana* est en cours de caractérisation au laboratoire. Son absence entraine également l'accumulation d'ARN polyadénylés mais la nature de ceux ci est différente de ceux accumulés en absence de RRP6L2 ou AtMTR4 (résultats non publiés).

Il est important de noter que l'exosome n'est pas le seul responsable de la dégradation d'ARN polyadénylés dans le noyau des cellules eucaryotes. Chez les mammifères, la polyadénylation de snoRNA H/ACA par la ncPAP PAPD5 va permettre le recrutement, non pas de l'exosome, mais de PARN, une déadénylase, qui va dégrader la queue poly(A) ajoutée et les 5 à 8 nucléotides de l'extrémité 3' du snoRNA pour le rendre fonctionnel (Berndt et al., 2012).

Enfin, les ncPAP responsables de l'ajout d'une queue poly(A) déstabilisatrice dans le noyau et cofacteurs de l'exosome ont été identifiées chez la levure *S. cerevisiae*. Ces enzymes sont les ncPAP Trf4 et Trf5. La ncPAP Trf4 a notamment été caractérisée comme faisant partie de la voie de contrôle qualité des ARN, nécessaire à la dégradation de l'ARNt(met) hypomethylé, d'ARNr 5S aberrant ou de U6snRNA mutant (Kadaba et al., 2004, 2006; Vaňáčová et al., 2005). Trf4 s'associe aux protéines Air1/2 et à l'hélicase Mtr4 pour former le complexe TRAMP (« Trf4p/Air2p/ Mtr4p polyadenylation (TRAMP) complex ») (LaCava et al., 2005). La protéine Trf5 peut également être incorporée à la place de Trf4. Ces complexes, associés à l'exosome nucléaire, sont impliqués dans la voie métabolique de surveillance des ARN qui permet la dégradation d'ARN non codant et/ou non fonctionnels et la maturation des ARN ribosomiques. *In vitro*, la présence du complexe TRAMP stimule l'activité exonucléases des protéines Rrp44 et Rrp6, cofacteurs de l'exosome (Schneider et al., 2007; Callahan and Butler, 2010). Il a été montré que l'activité poly(A) polymérase de Trf4 n'est pas indispensable à la dégradation et à la maturation de ses cibles (San Paolo et al., 2009) suggérant ainsi que Trf4 jouerai également un rôle structural permettant l'activité du complexe TRAMP dans la surveillance des ARN nucléaires.

Un complexe TRAMP potentiel a été identifié dans le nucléole des cellules humaines lors de l'immunoprécipitation de l'hélicase hMTR4 (figure 6 B) (Lubas et al., 2011). Ce complexe est potentiellement constitué de l'hélicase hMTR4, de la protéine de liaison à l'ARN ZCCHC7 et de la ncPAP hTRF4-2 (présente dans le nucléole et le nucléoplasme). Un autre complexe de ciblage des ARN à dégrader par l'exosome a été identifié dans le nucléoplasme des cellules humaines et est appelé complexe NEXT (« Nuclear Exosome Targeting (NEXT) complex »). L'hélicase hMTR4 fait également partie de ce complexe. A la différence du complexe TRAMP potentiel, ce complexe NEXT comprend des protéines restreinte au nucléoplasme : la protéine en doigt de zinc ZCCHC8 et la protéine de liaison à l'ARN potentielle RBM7 (Lubas et

al., 2011). Aucune ncPAP n'a été identifiée comme faisant parti de ce complexe. L'existence de deux complexes destinés à l'activation de la dégradation des ARN par l'exosome nucléaire humain suggère une spécialisation de ces complexes et de certains facteurs qui les composent. Aucune des 14 ncPAPs présentes chez *A. thaliana* n'a été identifiée à ce jour comme la (les) ncPAP favorisant la dégradation des ARN nucléaires.

c) Polyadénylation et ARN interférence : rôle dans la formation de l'hétérochromatine

Cid12 et Cid14, deux autres protéines de la famille des poly(A) polymérases non canoniques, ont été identifiées chez *S pombe* et caractérisées pour leur rôle dans la formation de l'hétérochromatine. Cid 12 est un composant du complexe RDRC ("RNA-directed RNA polymerase complex") chez *Schizosaccharomyces pombe* (Motamedi et al., 2004). La formation de l'hétérochromatine dépendante de l'ARN interférence (ARNi) chez *S. pombe* requiert les complexes d'extinction transcriptionnelle induite par l'ARN (RITS) et RDRC. Les complexes RDRC et RITS dirigent la méthylation des histones menant à la formation de l'hétérochromatine au niveau des centromères. L'absence de Cid12 provoque la disparition des siRNA du complexe RITS générés à partir de séquences centromériques répétées (Motamedi et al., 2004; Halic and Moazed, 2010).

La poly(A) polymérase non canonique Cid14 est essentielle à la formation de l'hétérochromatine mais cette fois au niveau des télomères. En plus de son rôle dans la maturation des ARNr (Win et al., 2006) Cid 14 a aussi été montré comme impliquée dans la maturation de siRNA avec Cid12. Ces siRNA sont générés à partir de transcrits télomériques répétés et permettent la formation de l'héterochromatine au niveau des télomères (Bah et al., 2012).

2) La polyadénylation cytosolique

a) Activation de la traduction par la polyadenylation

La polyadénylation n'est pas un processus limité au noyau, elle se déroule également dans le cytosol. La polyadénylation cytosolique a été caractérisée principalement dans les oocytes animaux et les cellules neuronales. Cette réaction

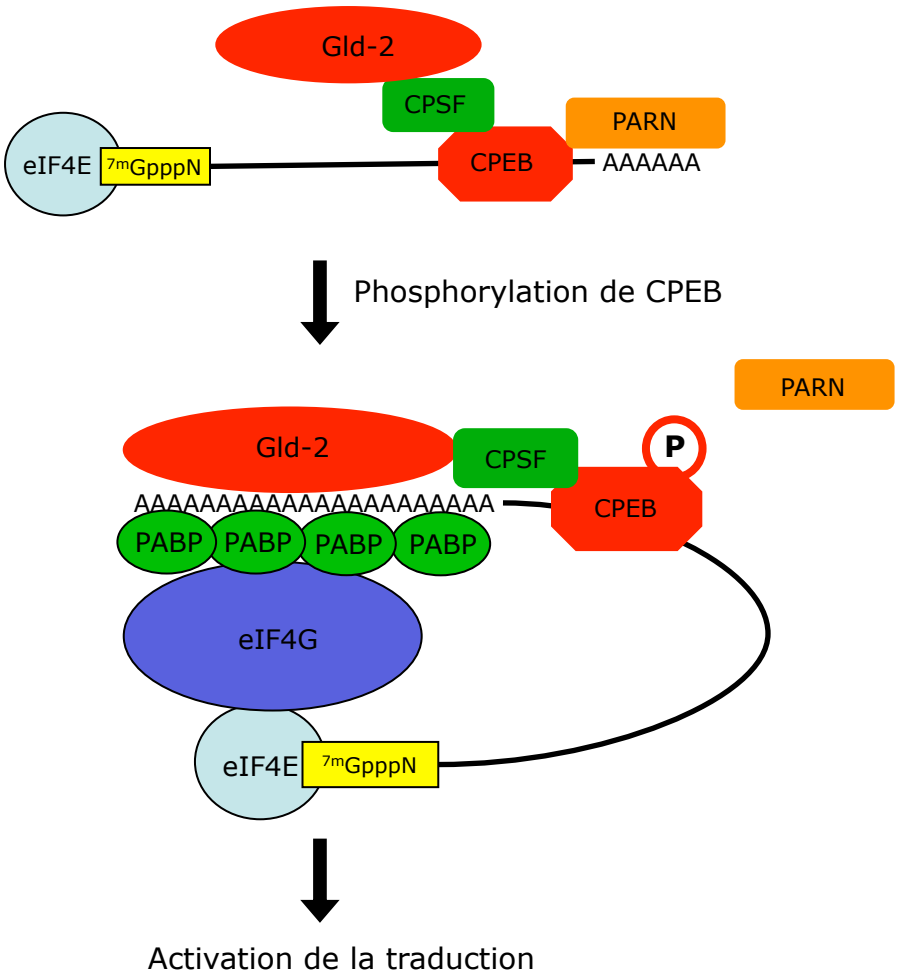


Figure 7 : Activation traductionnelle par la polyadénylation dans le cytosol des oocytes de xénope

Dans les oocytes immatures de xénope, les ARNm portant des protéines CPEB (« Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein ») sont maintenus inactifs par la présence de la déadénylase PARN (poly(A) ribonucléase). Ces ARNm inactifs sont associés avec le facteur de polyadénylation nucléaire CPSF (« Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor »), avec la poly(A) polymérase Gld-2 (« GermLine Determinant 2 ») et avec eIF4E (« eucaryotic Initiation Factor ») qui interagit avec la coiffe ^{7m}GpppN. La phosphorylation de CPEB va induire un réarrangement du complexe et la dissociation de PARN. Ceci va activer la poly(A) polymérase Gld-2 et ainsi déclencher l'élongation de la queue poly(A) qui va permettre le recrutement des protéines PABP sur la queue poly(A) et du facteur de traduction eIF4G, tous deux nécessaires à l'activation traductionnelle de l'ARNm.

requiert certains facteurs de la polyadénylation nucléaire mais également des facteurs spécifiques tel que les protéines de liaison d'élément cytosolique de polyadénylation (CPEB). En général, l'extension de la queue poly(A) mène à une activation traductionnelle (figure 7) (Igea and Méndez, 2010; Villalba et al., 2011).

L'expression génique dans les oocytes de vertébrés est principalement régulée au niveau traductionnelle. Dans ces oocytes, les ARNm maternels sont maintenus inactifs jusqu'à des étapes ultérieures du développement. La traduction de ces ARNm est activée par différentes vagues de polyadénylation cytosolique successives effectuées par la ncPAP Gld-2. Cette polyadénylation cytosolique a d'abord été considérée comme un régulateur de la traduction uniquement dans le développement précoce. Cependant, elle joue également un rôle dans les cellules somatiques telles que les neurones (Udagawa et al., 2012). Ainsi chez la drosophile, la polyadénylation CPEB- dépendante est requise pour l'activation d'ARNm dendritiques dans les neurones pour la formation de la mémoire à long terme (Kwak et al., 2008).

b) Adénylation et stabilité des miRNA

La protéine Gld-2 ne joue pas seulement un rôle dans l'activation traductionnelle d'ARNm maintenus inactifs dans le cytosol. Elle est également impliquée dans la stabilisation des miRNA. Dans des cellules de foie d'homme ou de souris, miR122 qui joue un rôle dans le métabolisme du cholestérol et des acides gras, est présent sous forme adénylée. Cette adénylation est réalisée par Gld-2 après séparation du duplex miR/miR*, ce qui va permettre la stabilisation sélective du miR122 dans le foie (Katoh et al., 2009). De manière surprenante, lors de la dérégulation de PAPD4/GLD2 de la souris ou dans des cellules humaines, aucun changement drastique du niveau des miRNA n'a été mis en évidence, suggérant que l'adénylation des miRNA n'influence pas leur stabilité d'une manière générale (Burroughs et al., 2010). Etant donné l'absence de changement drastique des niveaux de miRNA lors de la dérégulation de GLD2, il est possible que l'adénylation des miRNA soit un processus strictement régulé en fonction du miRNA et du tissu dans lequel il est exprimé. Il a été proposé que cette modification influencerait l'efficacité du complexe RISC (« RNA Induced Silencing Complex ») dans lequel les miRNA joue le rôle de guide (traité plus en détail dans le paragraphe III E 2 a). Des études récentes au niveau « genome-wide » semblent montrer que l'adénylation est un processus

commun touchant de nombreux miRNA dans des espèces très différentes allant de *Caenorhabditis elegans* à l'humain (Wyman et al., 2011).

c) Polyadénylation et dégradation dans le cytosol

La dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation pourrait également exister dans le cytosol des cellules eucaryotes. Le premier organisme où ce processus a été illustré est *Chlamydomonas reinhardtii* lors de l'étude de MUT68, un membre de la famille des ncPAP (Ibrahim et al., 2006). Dans cet article, l'absence de MUT68 entraine la disparition de la polyadénylation des fragments 5' d'ARNm après clivage par le complexe RISC. Cette même protéine a été identifiée 4 ans plus tard comme responsable de l'uridylation des miRNA et siRNA (Ibrahim et al., 2010). Il est donc possible que MUT68 possède deux activités différentes en fonction du type de substrat ou alors, la disparition de la polyadénylation des fragments 5' d'ARNm clivés par RISC soit un effet indirect de l'absence de MUT68.

Un autre article donne des indices de ce phénomène de dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation dans le cytosol (Slomovic et al., 2010). La dérégulation de XRN1, une 5'-3' exoribonucléase, de RRP6 une exoribonucléases 3'-5' ou encore de RRP41, un des composants du cœur de l'exosome aboutit à l'accumulation de fragments d'ARNm et d'ARNr polyadénylés dans le cytosol de cellules humaines.

3) La polyadénylation dans les mitochondries

Malgré leur origine phylogénétique commune, la polyadénylation dans les mitochondries joue des rôles différents selon l'organisme considéré. Elle peut avoir un rôle de stabilisation, être une marque de dégradation ou être tout simplement absente comme dans les mitochondries de levures (Gagliardi et al., 2004).

a) Chez l'humain

Au cours de l'évolution, le génome mitochondrial humain qui consiste en une molécule d'ADN double brin circulaire, s'est compacté jusqu'à atteindre la taille de 16 kb contenant 13 gènes codant pour des protéines et des gènes codants pour les ARNr et les ARNt. Les deux brins d'ADN sont transcrits en ARN précurseurs polycistroniques qui sont clivés et dont les produits sont polyadénylés de manière

constitutive. La taille de ces queues poly(A) sont d'environ 50 résidus pour les ARNm et peuvent atteindre 10 résidus pour les ARNr. Le fait qu'au moins 10 de ces gènes mitochondriaux humains soient transcrits en tant que transcrit polycistronique implique que le nombre de copie produite de chaque ARN est la même. Cependant, le niveau des ARNm est différent pour chaque gène mitochondrial (Duborjal et al., 2002) en raison de demi-vies différentes pour chaque transcrit (Nagao et al., 2008). La régulation post-transcriptionnelle de l'expression du génome mitochondrial humain fait probablement intervenir la polyadénylation qui pourrait avoir un effet stabilisateur et déstabilisateur sur les transcrits.

L'effet de la polyadénylation sur la stabilité des transcrits mitochondriaux n'est cependant pas bien caractérisé pour le moment. La déplétion par des siRNA de la PAP mitochondriale humaine hmtPAP, provoque à la fois l'accumulation de certains transcrits, la déplétion d'autres alors que les derniers ne sont pas affectés (Tomecki et al., 2004; Nagaike et al., 2005). De plus, la surexpression d'une déadenylase dans les mitochondries humaines a eu le même type de conséquence : un effet positif , négatif ou neutre sur le niveau d'accumulation des transcrits mitochondriaux (Wydro et al., 2010; Rorbach et al., 2011). Un nouvel acteur de la régulation de la polyadénylation mitochondriale humaine a également été identifié. Il s'agit du complexe protéique formé par les protéines LRPPRC (« leucine-rich pentatricopeptide repeat (PPR) motif-containing protein ») et SLIRP (« stem-loop-interacting RNA-binding protein »). Ce complexe se lie aux séquences codantes des ARNm mitochondriaux et une étude récente propose que ce complexe favoriserait la polyadénylation des transcrits par la hmtPAP et inhiberait leur dégradation (Chujo et al., 2012).

En plus de la présence de queue poly(A) stable à l'extrémité 3' des ARN mitochondriaux humain, la polyadénylation semble être impliquée dans la dégradation des ARN par une voie semblable à celle des procaryotes dont les mitochondries sont originaires. En effet, de nombreuses molécules d'ARN mitochondriaux montrent des sites internes de polyadénylation et une très faible accumulation des transcrits correspondants, suggérant l'existence d'une voie de dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation dans les mitochondries humaines (Slomovic et al., 2005). Des acteurs de cette dégradation pourraient être la PNPase et l'hélicase SUV3. En absence de SUV3, des transcrits courts et polyadénylés s'accumulent (Khidr et al., 2008). Il a été montré que la PNPase associée à l'hélicase

SUV3 *in vitro* était responsable de la dégradation d'ARN mitochondriaux structuré (Wang et al., 2009). Cependant, les données sur le sujet sont contradictoires : La localisation de la PNPase au niveau de l'espace intermembranaire (Chen et al., 2006) dont les ARNm encodés par le génome mitochondrial sont absents illustre bien ces contradictions. De plus, la PNPase a été montré comme participant à l'import d'ARN dans la mitochondrie, reliant ainsi sa localisation avec une fonction (Wang et al., 2010). La RNase dégradant les ARN mitochondriaux humain n'a pas encore été identifiée (Bruni et al., 2012).

Un rôle incontestable de la polyadénylation mitochondriale chez l'humain est la création de codon stop. La condensation du génome mitochondrial humain est telle que pour plusieurs gènes, elle a abouti à l'apparition de codons stop incomplets formés par des nucléotides U ou UA au lieu de UAA. L'ajout d'une queue poly(A) à l'extrémité 3' d'un ARNm mitochondrial permet donc de générer des codons stop fonctionnels (Anderson et al., 1981).

b) Chez les trypanosomes

La maturation des ARN mitochondriaux chez les trypanosomes requiert plusieurs étapes post-transcriptionnelles incluant la coupure d'ARN précurseurs polycistroniques, l'édition, la polyadénylation et l'uridylation. L'édition des ARN dans les mitochondries des trypanosomes consiste à des insertions ou délétions multiples d'uridines. L'étape de polyadénylation est un processus complexe, dont les mécanismes ne sont pas encore bien caractérisés.

La longueur des queues poly(A) des ARN mitochondriaux des trypanosomes est partiellement corrélée avec leur statut d'édition (Kao and Read, 2005). Les ARN non-édités contiennent soit des queues poly(A) courtes (environ 20 nucléotides) soit pas de queue poly(A). Les ARN partiellement ou totalement édités présentent des queues poly(A) courtes ou des queues longues (de 120 à 200 nucléotides) composées de nucléotides A et U. La protéine KPAP1 est responsable de la formation de la queue poly(A) courte à l'extrémité 3' des molécules d'ARN non éditées (Etheridge et al., 2008). Il a également été montré que l'interaction de ces queues poly(A) courtes avec les protéines PPR KPAFS allait permettre la synthèse de la longue queue poly(A/U) par KPAP1 et la terminale uridyltransférase RET1 et que la présence de ces queues poly(A/U) joue un rôle très important dans la traduction (Aphasizheva et al., 2011).

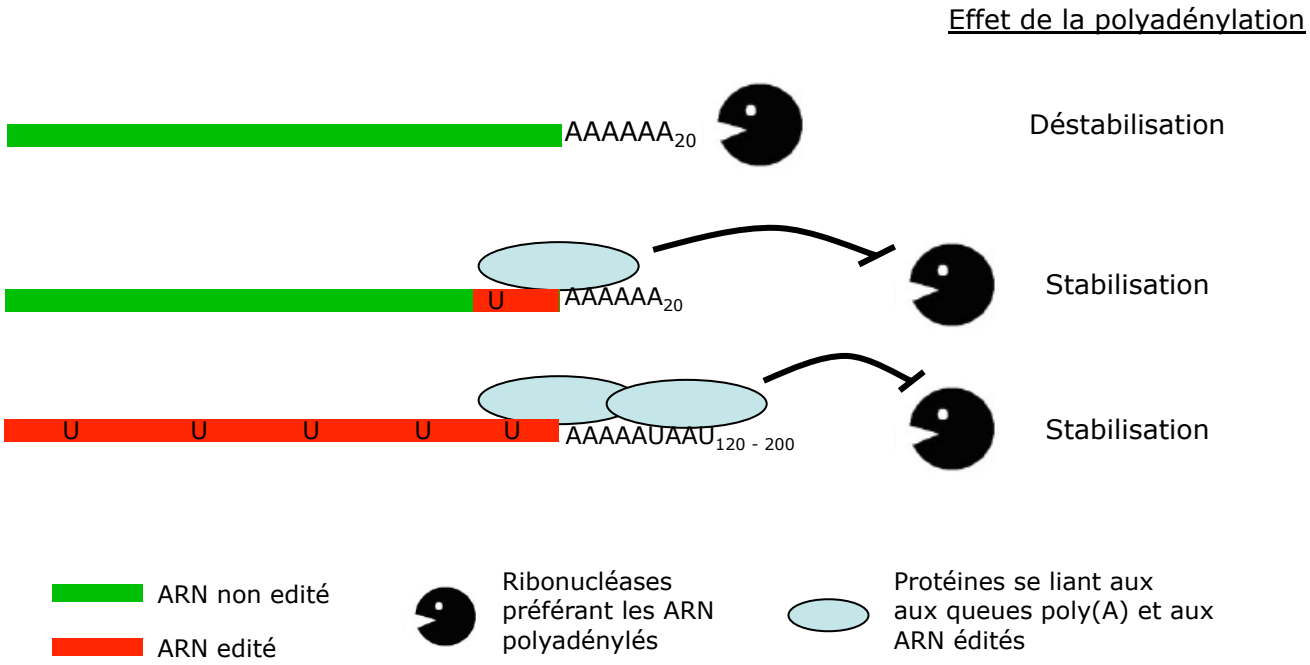


Figure 8 : Modèle proposé pour l'effet *in vitro* de la polyadénylation en fonction du statut d'édition des ARN dans les mitochondries de trypanosome

La présence d'une courte région éditée dans la molécule d'ARN semble suffisante pour transformer une queue poly(A) destabilisatrice en un élément stabilisateur. L'édition dans les mitochondries de *T. brucei* consiste en l'ajout de résidus uridine. La stabilisation des ARN édités s'expliquerait par la présence de protéines se liant à la queue poly(A) et aux régions éditées qui inhiberait la dégradation des ARN par les ribonucléases. D'après Kao and Read, 2005.

De façon intéressante, des différences de longueur de la queue poly(A) spécifiques des étapes de la vie des trypanosomes suggèrent un rôle de la polyadénylation dans la régulation de l'expression du génome mitochondrial pendant les cycles de la vie des trypanosomes.

La polyadénylation semble jouer un double rôle dans la stabilité des transcrits mitochondriaux des trypanosomes (figure 8). Des expériences *in vitro* ont montré que des ARNm non-édités avec une queue poly(A) courte sont dégradés plus rapidement que leur homologues sans queue poly(A) (Kao and Read, 2005). Inversement, en l'absence de queue poly(A), les ARNm édités sont dégradés plus rapidement que leur homologues non-édités (Kao and Read, 2005). Il est surprenant que, alors qu'une queue poly(A) courte stimule la dégradation d'un transcrit mitochondrial non-édité, elle limite la dégradation d'un ARNm édité. Une courte région éditée semble suffisante pour transformer une queue poly(A) déstabilisatrice en un élément de stabilisation. L'effet opposé de la polyadénylation sur la stabilisation des ARN édités et non-édités suggère un nouveau mécanisme de régulation de la stabilité des ARN, spécifique aux trypanosomes (Kao and Read, 2005).

4) Dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation chez les plantes

Les processus de dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation chez les plantes sont un des sujets d'étude de l'équipe de Dominique Gagliardi que j'ai intégrée pour ma thèse. Ces processus ont fait l'objet d'une revue publiée dans le journal « Trends In Plant Science ». Ma contribution à cet article a été la caractérisation préliminaire des ncPAP chez *Arabidopsis*. Certains de ces processus ont été partiellement décrits dans la première partie de cette introduction pour des besoins de comparaisons avec d'autres organismes. La dégradation des ARN stimulée par la polyadénylation est présente dans tous les compartiments génétiques de la cellule végétale et peut nécessiter de facteurs protéiques spécifiques des plantes comme décrit précédemment pour l'exosome nucléaire végétal par exemple. Cette revue fait le point sur les connaissances accumulées sur ces processus chez les végétaux au début de ma thèse.

III. L'uridylation des ARN

L'uridylation des ARN, i.e. l'ajout d'uridines à l'extrémité 3' d'une molécule d'ARN, est un phénomène beaucoup moins bien caractérisé que la polyadénylation. Tout comme la polyadénylation, l'uridylation va influencer la stabilité des ARN, de manière positive ou négative selon la cible et l'enzyme impliquée. Cette partie de mon introduction a pour but de faire le point sur les connaissances de cette modification des ARN ainsi que sur les mécanismes généraux de dégradation des ARNm eucaryotiques.

A. Stabilisation d'U6 snRNA par l'uridylation

Les ARNm eucaryotes subissent de nombreuses modifications après leur transcription par l'ARN polymérase II dans le noyau. Parmi ces modifications, l'épissage des introns est un des processus les plus étudiés. Cet épissage est catalysé par un complexe ribonucléoprotéique appelé spliceosome et formé par différents « small nuclear RNA » (snRNA) et leurs protéines associées (Konarska and Sharp, 1986). Parmi les différents snRNA, U6 snRNA est le plus conservé, de la levure à l'homme, et joue donc un rôle fondamental dans le processus d'épissage. Dans différents aspects, U6 snRNA diffèrent des autres snRNA. Alors que la majorité des snRNA est transcrit par l'ARN pol II, U6 snRNA est transcrit par l'ARN pol III (Moenne et al., 1990). L'extrémité 3' de U6 snRNA est composée de 4 uridines codées par le génome. Ces 4 résidus servent de signal de fin de transcription pour l'ARN pol III (Paule and White, 2000). En plus de cela, ces uridines vont permettre la stabilisation du pré-U6 snRNA en se liant à une protéine La, également liée à l'extrémité 5' de U6. La liaison de la protéine La aux deux extrémités protège l'ARN de l'action d'exoribonucléases. Au cours de la maturation de cet snRNA, celui-ci peut subir un allongement et une réduction de sa queue oligo(U) par l'action de la U6 TUTase (Trippe et al., 1998) et d'une nucléase spécifique de U6 (Booth and Pugh, 1997). Enfin, une cyclisation 2'-3' phosphate de la dernière uridine va provoque la dissociation de la protéine La et le recrutement du complexe Lsm2-8. Il a été montré que l'association avec le complexe Lsm2-8 permet la rétention nucléaire du U6 snRNP (Spiller et al., 2007). La cyclisation de la dernière uridine et le recrutement de Lsm2-8

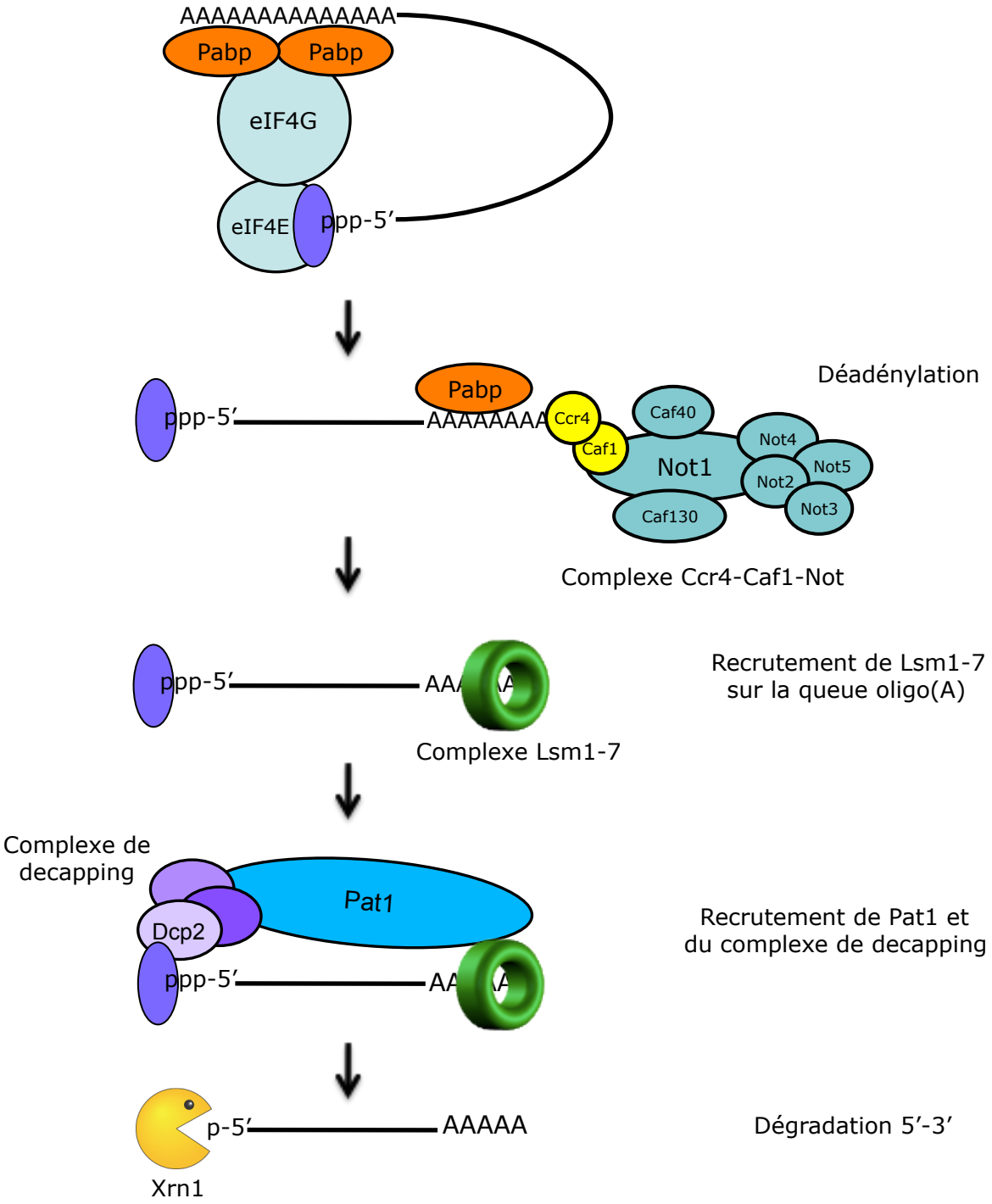


Figure 9 : La voie de dégradation des ARNm chez *S. cerevisiae*
Les extrémités 5′ et 3′ de l'ARNm sont protégées tant qu'il est circularisé. La première étape de la dégradation d'un ARNm est sa déadénylation par le complexe Ccr4-Caf1-Not. Une queue oligo(A) favorise le recrutement du complexe Lsm1-7 à l'extrémité 3′ de l'ARN qui va à son tour recruter l'inhibiteur de traduction et protéine plateforme Pat1. Pat1 va à son tour recruter le complexe de decapping qui va ensuite hydrolyser la coiffe ^{7m}GpppN de l'ARNm, créant ainsi une extrémité 5′ phosphate. Cette extrémité permet l'hydrolyse de l'ARNm par Xrn1, la 5′-3′ exoribonucléase cytosolique chez *S. cerevisiae*.

vont permettre la stabilisation du snRNA U6 et la formation du complexe U4:U6 snRNP impliqué dans l'épissage des introns.

B. Les principales étapes de la dégradation des ARNm

Pour comprendre l'importance de l'uridylation des ARNm, il est nécessaire de présenter d'abord les principales étapes de la dégradation des ARNm dans le cytosol. La plupart de ces étapes ont été élucidées chez l'organisme modèle *S. cerevisiae*. Je traiterai donc tout d'abord des mécanismes généraux de dégradation des ARNm avec pour exemple principal cet organisme, bien que l'uridylation des ARNm en soit absent.

S. cerevisiae est un modèle incomparable pour l'étude des mécanismes de dégradation des ARNm. Malgré l'absence d'uridylation des ARN, de petits ARN (si/miRNA) et la présence d'uniquement deux ncPAP chez cet organisme (i.e. Trf4 et Trf5, voir II B 1 b), les principales étapes de la dégradation des ARNm eucaryotiques sont retrouvées (figure 9). Les ARNm en cours de traduction sont protégés de la dégradation grâce à leur circularisation qui permet la protection des extrémités 5' et 3'. En général, la première étape de la dégradation d'un ARNm est sa déadénylation (Decker and Parker, 1993), effectuée de manière exoribonucléolytique par le complexe Ccr4-Caf1-Not principalement (Tucker et al., 2001). Ce complexe n'est certainement pas seul responsable de la déadénylation. Il existe d'autres déadénylases tel que Ngl3p chez la levure (Feddersen et al., 2012) ou PARN chez les plantes (Chiba et al., 2004) pouvant remplir la même fonction. Après déadénylation, la longueur des queues poly(A) est réduite à 10-15 A ce qui ne permet plus une interaction stable entre la queue poly(A) et les protéines de liaisons à la queue poly(A) (Pabp). La circularisation de l'ARNm est alors rompue et la queue poly(A) courte et libre va permettre le recrutement du complexe inhibiteur de traduction Lsm1-7-Pat1. L'association de l'ARNm déadénylé avec ce complexe favorise le recrutement du complexe d'hydrolyse de la coiffe (ou complexe de decapping) formé entre autres par une enzyme responsable de l'hydrolyse de la coiffe et son cofacteur, Dcp2 et Dcp1 respectivement. L'élimination de la coiffe (ou decapping) de l'ARNm va empêcher toute traduction et rendre l'ARNm sensible aux attaques exoribonucléolytiques 5'-3' par la protéine Xrn1.

C. Les principaux acteurs de la dégradation des ARNm

1) Le complexe CCR4-CAF1-NOT

La déadénylation est la première étape de la dégradation de la plupart des ARNm. Chez les cellules de mammifère et chez la levure, la longueur initiale de la queue poly(A) des ARNm est d'environ 200A et 110A respectivement. La déadénylation des ARNm se déroule en deux phases. La première phase est réalisée par les exonucléases PAN2-PAN3 jusqu'à ce que la queue poly(A) atteigne une taille d'environ 110A et 70A chez les mammifères et la levure respectivement. Le reste de la déadénylation est réalisée par le complexe CCR4-CAF1-NOT ou par PARN (« Poly(A)-specific ribonucléase », absente chez *S. cerevisiae*) (Körner and Wahle, 1997; Yamashita et al., 2005).

Le complexe CCR4-CAF1-NOT est un complexe hétéropolymérique impliqué dans de nombreuses fonctions du métabolisme des ARNm telles que la transcription, la répression traductionnelle, l'export et la surveillance des ARNm dans le noyau et la déadénylation (revue dans Collart and Panasenko, 2012). Le complexe CCR4-CAF1-NOT est composé de 9 sous unités chez *S. cerevisiae*, Ccr4, Caf1, Caf40, Caf130 et Not1-5 et il existe sous au moins deux formes d'environ 1 et 2 mégaDa (Liu et al., 1998; Bai et al., 1999). Des complexes orthologues sont retrouvés chez les différents eucaryotes supérieurs tels que l'humain et la drosophile par exemple (Albert et al., 2000; Temme et al., 2004). L'activité de déadénylation des ARNm par le complexe CCR4-CAF1-NOT est due aux deux déadénylases CCR4 et CAF1, à l'exception notable de Caf1 de *S. cerevisiae* dont l'activité catalytique n'est pas nécessaire à la déadénylation *in vivo* (Tucker et al., 2002). Une implication de ce complexe dans la dégradation des ARNm a été fournie par l'identification de CCR4 et CAF1 comme les principales déadénylases requises *in vivo* chez la levure (Ccr4 uniquement), la souris, la mouche et l'humain (Albert et al., 2000; Tucker et al., 2001; Temme et al., 2004; Yamashita et al., 2005). L'activité déadénylase du complexe CCR4-CAF1-NOT aboutit à une réduction de la taille de la queue poly(A) à 10-15A. Lorsque cette longueur est atteinte, PABP n'est plus capable d'interagir avec la queue poly(A) et de protéger l'ARNm de la reconnaissance par le complexe LSM1-7.

La déadénylation peut également être contôlée de manière spécifique par des éléments *cis* des ARNm. Ces éléments sont situés dans la 3'UTR (« Untranslated

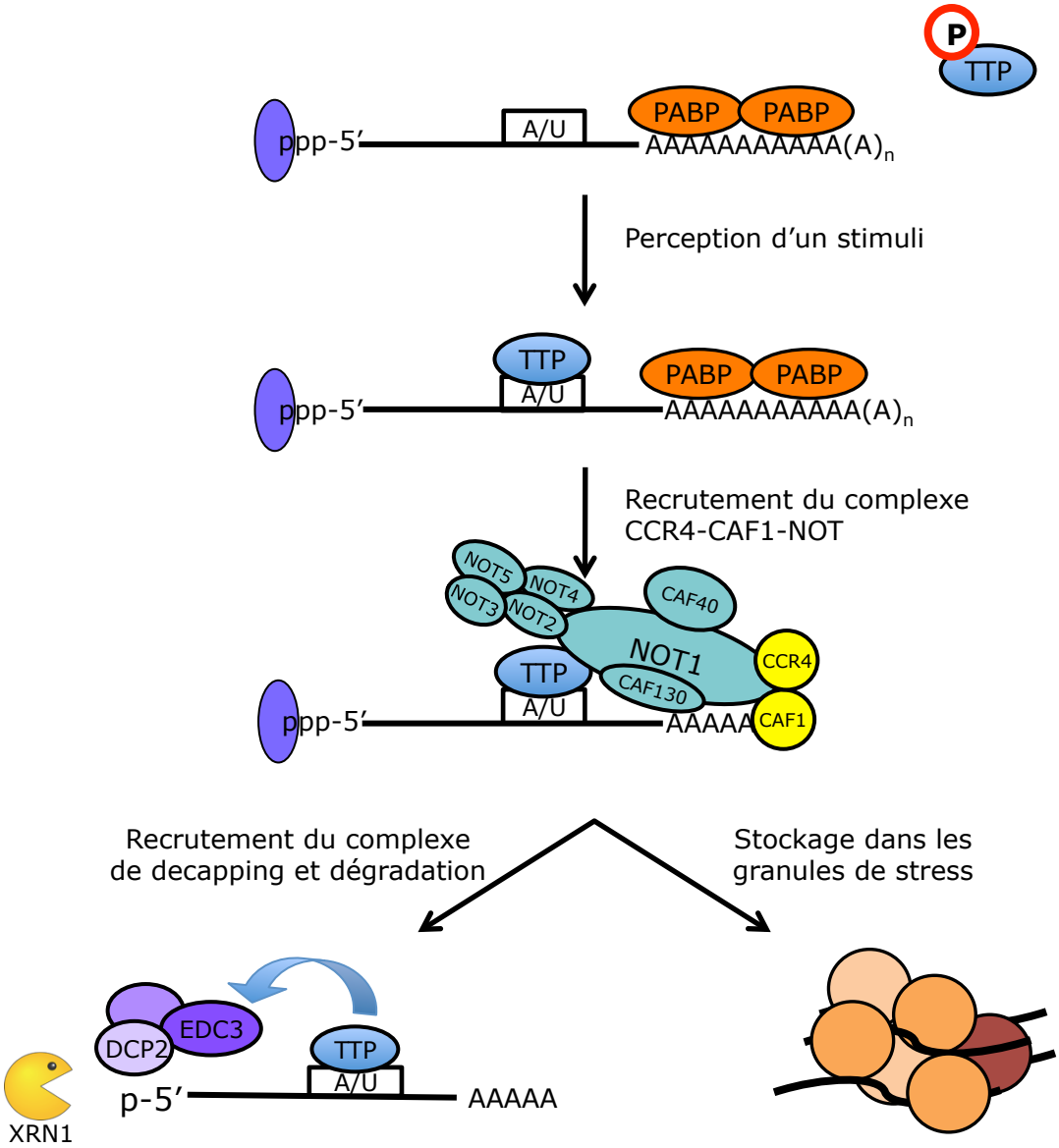


Figure 10 : Le devenir des transcrits possédants une séquence ARE (« A/U rich element ») après perception d'un stimuli

La protéine tristetraproline (TTP) est maintenue sous une forme phosphorylée en absence de stress. La perception d'un stress par la cellule va provoquer la déphosphorylation de TTP et son appariement avec les transcrits possédant une séquence ARE (A/U). Grâce à son interaction avec la protéine plateforme NOT1, la protéine TTP recrute le complexe de déadénylation et la déadénylase CAF1 hydrolyse la queue poly(A). La coiffe du transcrit est alors hydrolysée par recrutement du complexe de decapping par l'interaction de TTP avec EDC3. l'extrémité 5' phosphate rend l'ARNm sensible par les 5'-3' exoribonuléase (XRN1). Ces transcrits peuvent également être stockés dans les granules de stress qui sont des structures dynamiques formées par l'agrégation de transcrits dont la traduction est inhibée.

Region ») des ARNm en général et peuvent mener à une forte accélération de leur dégradation. Ces éléments sont des séquences riches en A/U (ARE pour « AU Rich Element ») qui, par l'interaction avec des protéines reconnaissant ces ARE, provoquent une dégradation rapide des ARNm (Barreau et al., 2005). La famille des protéines Tis11 chez les mammifères sont des protéines de liaison aux ARE. Cette famille comprend les protéines TTP (Carballo et al., 1998), BRF1 (Stoecklin et al., 2002) et BRF2 (Lai et al., 2000). La protéine TTP (tristetraproline) est le membre le mieux caractérisé de cette famille et agit comme un suppresseur de l'inflammation chez la souris en contrôlant l'expression du facteur de necrose de tumeur α (TNFα pour « tumor necrosis factor-α ») (Carballo et al., 1998). Des étude ultérieures ont montré que TTP provoque la dégradation de nombreux ARNm impliqués dans la réponse immunitaire (revue dans Schott and Stoecklin, 2010). En cas de perception d'un stimuli dans les cellules humaines, la protéine TTP peut être déphosphorylée et recrutée au niveau des ARE (figure 10). La protéine va alors interagir avec NOT1, protéine plateforme du complexe CCR4-CAF1-NOT pour permettre une déadénylation rapide par la déadénylase CAF1 et la dégradation de ces ARNm (Sandler et al., 2011). Ce système permet à la cellule une réponse rapide à la perception d'un changement de l'environnement et d'ajuster son transcriptome.

2) Le complexe LSM1-7-PAT1

Les protéines Lsm (pour « Sm-like ») 1 à 8 sont conservées chez tous les eucaryotes. Ces protéines de petite taille (10-25 kDa) possèdent toutes le domaine Sm caractérisé par la présence de deux motifs conservés, Sm I et Sm II séparés par une région plus variable (Hermann et al., 1995). Les protéines Lsm forment des complexes de 6 ou 7 protéines en forme d'anneau impliqués dans l'interaction avec l'ARN.

Le complexe Lsm2-8 est strictement nucléaire et est impliqué dans l'épissage des introns des ARNm avec les snRNA U4 et U6 (voir III A). Le complexe LSM1-7 joue un rôle important dans la dégradation des ARNm en interagissant avec l'extrémité 3' des ARNm déadénylés (Tharun et al., 2000) ou uridinylés dans le cytosol. Ce complexe possède une affinité plus grande pour les ARNm oligoadénylés comparé à ceux polyadénylés ou sans queue poly(A) et cette affinité est encore plus forte pour les ARNm oligadénylés où une série d'uridines a été ajoutées (Chowdhury et al., 2007;

Song and Kiledjian, 2007). Cette affinité du complexe est apporté par la protéine Lsm1 (Chowdhury and Tharun, 2008). Le complexe LSM1-7-PAT1 qui interagit avec l'extrémité 3' des ARNm est un stimulateur d'élimination de la coiffe (Tharun, 2009). L'interaction entre les deux extrémités de l'ARNm est rendue possible par la protéine de structure PAT1 qui fait la liaison entre le complexe LSM1-7 et le complexe d'élimination de la coiffe comprenant entre autres DCP1 et DCP2 (Haas et al., 2010; Ozgur et al., 2010) (voir paragraphe suivant). Lors de l'immunoprécipitation de ce complexe chez la levure, seuls des ARNm déadénylés ont été trouvés comme interagissant avec ce complexe. De plus, aucun facteur essentiel de traduction, tel que le complexe d'initiation de la traduction associé à la coiffe ou les protéines PABP, n'a été trouvé comme associé avec le complexe LSM1-7 (Tharun and Parker, 2001). Au niveau cellulaire, le complexe LSM1-7-Pat est cytosolique et s'accumule au niveau de structures dynamiques appelées « processing bodies » (P bodies). Ces P bodies sont formés par l'accumulation d'ARNm destinés à être dégradés (Sheth & Roy Parker 2003) (la fonction des P bodies est détaillée dans le paragraphe III D 1).

Un deuxième rôle de Lsm1 chez la levure, et par extension du complexe Lsm1-7-Pat, est de protéger l'extrémité 3' des ARNm d'un « rognage » (« trimming ») en se liant à l'extrémité 3' de l'ARNm oligoadénylé (Boeck et al., 1998; He and Parker, 2001; Tharun et al., 2005). Dans des mutants *lsm1* de la levure, une partie des ARNm s'accumule sous forme non-adénylés, rognés d'environ 10 nucléotides en 5' du site de polyadénylation. L'exonucléase responsable de cette dégradation n'a pas encore été identifiée mais parmi les candidats possibles se trouvent le complexe CCR4-CAF1-NOT (He and Parker, 2001). L'intégrité de l'extrémité 3' des ARNm semble importante *in vivo*. Des études génétiques montrent que la sensibilité à la voie de dégradation 3'-5' de certains ARNm essentiels à haute température est la raison de la thermosensibilité des mutants *lsm1* et *pat1*. En effet la combinaison de mutation des gènes *Lsm* ou *Pat1* avec des mutations des gènes *Ski* (hélicases partenaires de l'exosome dans le cytosol), bloquant la dégradation 3'-5' de l'exosome dans le cytosol, abolit la sensibilité aux hautes température causée par les mutations *lsm* et *pat1* (Tharun et al., 2000; He and Parker, 2001). Pour certains ARNm de levure au moins, le complexe Lsm1-7-Pat peut donc avoir un effet protecteur en bloquant leur dégradation par l'exosome.

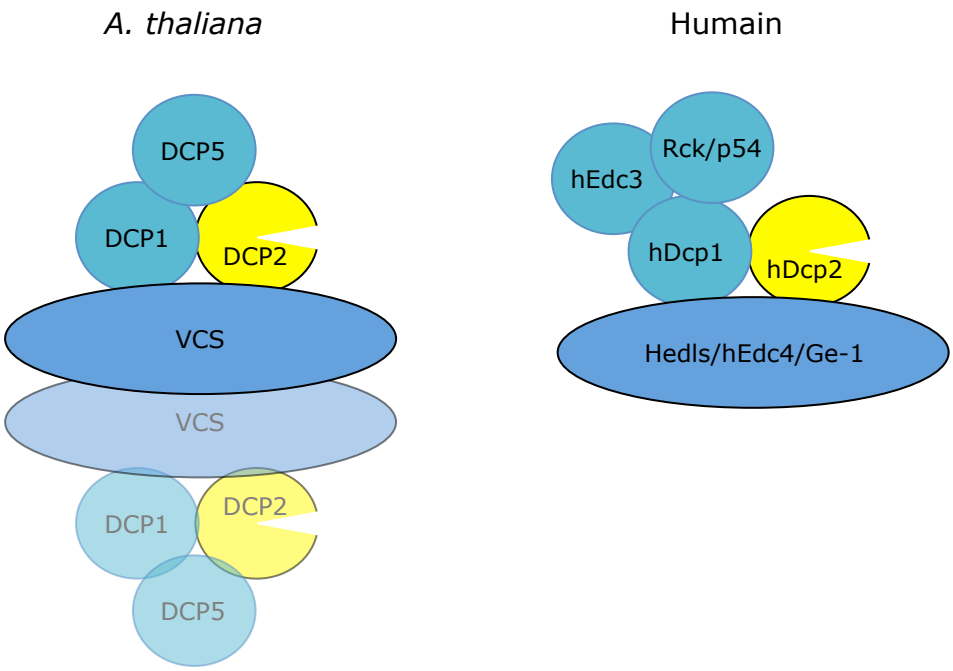


Figure 11 : Comparaison des complexes de decapping chez *A. thaliana* et chez l'humain

Chez *A. thaliana* et chez l'humain, le cœur du complexe de decapping est formé des mêmes protéines DCP1 et DCP2, le cofacteur et l'enzyme possédant l'activité de decapping respectivement. Les protéines DCP1 et DCP2 n'interagissent qu'en présence de la protéine plateforme VCS/Hedls/Edc4/Ge-1. Chez *A. thaliana*, la protéine VCS peut potentiellement former des homodimères par interaction avec une région non impliquée dans d'autres interactions. La protéine DCP5 interagit avec DCP1 et DCP2. Chez l'humain, hDCP2 n'interagit qu'avec hEDC4 (orthologue de VCS) et hDCP1. hDCP1 interagit avec hEDC3 et Rck.

3) Le complexe d'élimination de la coiffe

L'élimination de la coiffe est une étape importante et très régulée dans la dégradation des ARNm eucaryotiques. Plusieurs enzymes peuvent être responsables de l'hydrolyse de la coiffe des ARNm, comme la protéine DCP2 ou la protéine hNudt16 chez l'humain (Song et al., 2010; Lu et al., 2011). Cette diversité des enzymes d'hydrolyse de la coiffe (ou decapping) n'a été montrée que chez les mammifères pour le moment. Chez les autres eucaryotes, la principale enzyme connue pour être impliquée dans l'hydrolyse de la coiffe 7mGpppN est DCP2 (Dunckley and Parker, 1999). Cette enzyme est la plus étudiée des enzymes de decapping et est conservée chez tous les eucaryotes étudiés jusqu'à présent. Elle semble être le facteur limitant de l'étape de decapping (mis à part chez les mammifères). Cette enzyme possède un motif Nudix/MutT à son extrémité N-terminale, indispensable à son activité. Son action est soumise à une régulation complexe par des cofacteurs protéiques activateurs de decapping et inhibiteurs de traduction.

Le principal cofacteur de DCP2 et le mieux caractérisé est DCP1. DCP2 et DCP1 forment le cœur du complexe de decapping chez les eucaryotes. Même si originellement DCP1 avait été caractérisé comme l'enzyme responsable de l'hydrolyse de la coiffe (LaGrandeur and Parker, 1998), cette protéine ne possède pas d'activité.

Chez la levure et l'humain, le complexe de decapping est mieux caractérisé et le nombre de cofacteurs est plus important que chez *A. thaliana* (figure 11). Certaines de ces protéines ont été caractérisées comme des activateurs de decapping comme les protéine EDC (« Enhancer of Decapping ») et d'autres comme des inhibiteurs de traduction ayant un effet stimulateur de decapping au moins en partie en promouvant l'inhibition de la traduction.

Chez la levure, Dcp1 interagit de manière directe avec Dcp2 grâce à des acides aminés non conservés chez d'autres organismes. Edc1 et 2 semblent être spécifiques de la levure (Dunckley et al., 2001) et stimulent l'activité et la liaison de Dcp2 sur la coiffe *in vitro* (Schwartz et al., 2003). Des études de cinétiques réactionnelles de Dcp2 ont montré que Dcp1 stimule l'activité de Dcp2 de manière indirecte en liant les activateurs de decapping Edc1 et Edc2. Cette liaison se fait par l'intermédiaire du domaine EVH1 de Dcp1 et du domaine riche en proline situé à l'extrémité C terminale

d'Edc1 et Edc2 (Borja et al., 2011). Cette liaison stimule la réaction de decapping d'un facteur 1000. Une troisième protéine Edc a été identifiée chez la levure. Edc3 est conservé chez les eucaryotes en général et est considéré comme étant également un activateur de decapping. Même si aucune donnée *in vitro* n'a été obtenue pour l'instant, l'absence d'Edc3 chez la levure affecte le decapping d'un groupe d'ARNm ce qui tend à prouver son rôle dans la stimulation de Dcp2 (Kshirsagar and Parker, 2004). De manière intéressante, des recherches récentes ont montré un rôle du complexe EDC3, DCP1 et DCP2, et de la 5'-3' exoribonucléase nucléaire XRN2, dans la terminaison de la transcription par l'ARN pol II dans le noyau des cellules humaines (Brannan et al., 2012).

Chez l'humain, DCP1 seule ne s'associe pas de manière stable avec DCP2 *in vitro* et DCP1 chez l'humain, *C elegans* et *D. melanogaster* ne stimule pas l'activité de DCP2 de manière directe (Cohen et al., 2005; Fenger-Grøn et al., 2005; Lin et al., 2008). A la place, l'activité de DCP2 chez les organismes multicellulaires est stimulée par l'interaction d'une protéine appelée Hedls/Ge-1/EDC4/VCS.

D'autres activateurs, telles que Pat1 (voir paragraphe précédent) et Dhh1 semblent activer le decapping au moins en partie par leur effet sur l'inhibition de la traduction. Dhh1, qui appartient à la famille des DexD/H box ATPases, a été caractérisé comme un répresseur de la traduction (Coller and Parker, 2005). Dans des levures en cours de division, l'adressage de Dhh1 à un messager provoque l'inhibition de sa traduction ainsi que sa dégradation. Cependant, dans des levures mutées pour des composants de la dégradation 5'-3', l'association de Dhh1 à un ARNm provoque sa relocalisation au niveau des P bodies. Son activité ATPase n'est pas requise pour son rôle dans l'inhibition de traduction ni dans la stimulation de la dégradation mais est nécessaire pour sa dissociation des P bodies (Carroll et al., 2011).

Chez *A. thaliana*, les protéines caractérisées comme des membres du complexe de decapping sont DCP2, DCP1, VCS/EDC4 et DCP5 (Xu et al., 2006; Xu and Chua, 2009) (figure 11). Chacune de ces protéines est indispensable au développement post-embryonnaire chez *A. thaliana* et l'inactivation d'un des gènes codant pour ces protéines aboutit à la mort de la plante au stade cotylédons. Très récemment, DCP5 a été liée à la résistance au stress (Xu and Chua, 2012). En présence d'un stress hydrique, DCP1 est phosphorylée par la MAPK6 (Mitogen-Activated Protein Kinase 6). Cette phosphorylation s'accompagne d'une association préférentielle de DCP1

avec DCP5 pour promouvoir le decapping *in vivo*. Ce processus est essentiel pour l'adaptation au stress étant donné que les mutants *dcp5-1* (mutant hypomorphe de DCP5) et DCP1-S237A (insensible à la phosphorylation) sont hypersensibles au stress comparés à une plante sauvage.

L'hydrolyse de la coiffe des ARNm a longtemps été considérée comme une étape irréversible menant à la destruction de l'ARNm. Cependant, des études relativement récentes montrent qu'il existe une activité de restauration de la coiffe dans le cytosol des cellules de mammifères (Otsuka et al., 2009). Cette activité est nécessaire pour un rétablissement complet des cellules après un stress oxydatif. Ce résultat suggère que les cellules sont capables de stocker des ARNm sous forme décappés et donc de remobiliser des messages traductionnellement silencieux. Le site le plus probable de ce stockage se situe au niveau des « processing bodies » (P bodies).

4) Les 5'-3' exoribonucléases cytosoliques

Les principales enzymes responsables de la dégradation des ARNm après élimination de leur coiffe sont les 5'-3' exoribonucléases XRN. Ces enzymes sont présentes chez tous les eucaryotes dans le noyau et le cytosol et leur activité nécessite la présence d'une extrémité 5' phosphate. Chez *S. cerevisiae*, Xrn1 est la seule 5'-3' exoribonucléase cytosolique et participe avec l'exosome à la dégradation des ARNm (Larimer et al., 1992). L'homologue de Xrn1 de la levure a été identifié chez *A. thaliana* et a été baptisé XRN4 (Kastenmayer and Green, 2000). Deux autres protéines XRN ont été identifiées : XRN2 et XRN3, toutes les deux nucléaires et suppresseurs du PTGS (Gy et al., 2007). Les mutants *xrn4* ont été identifiés initialement par génétique inverse. Contrairement aux phénotypes sévères des mutants du complexe de decapping d'*A. thaliana*, les phénotypes *xrn4* sont subtils (Souret et al., 2004). Cette différence de phénotype est surprenante étant donné que XRN4 et le complexe de decapping sont censés intervenir sur le même groupe d'ARNm. Au final, seule la dégradation d'un petit groupe d'ARNm ne peut être compensée par l'absence de XRN4. En effet, des analyses transcriptomiques montrent que très peu de transcrits sont accumulés en absence de XRN4 (Gregory et al., 2008; Rymarquis et al., 2011). Cet effet peut être expliqué par une étude récente montrant

Tableau 1 : Composants protéiques des processing bodies chez *A. thaliana* et leurs homologues chez l'humain et la levure.

Extrait de : Jun Xu, Nam-Hai Chua. Processing bodies and plant development. Curr Opin Plant Biol. 2011 Feb;14(1):88-93.

Table 1

Known homologs of human P-bodies components in *Arabidopsis*.

Gene	AGI(AT)	Genetic alleles	Description of alleles	Yeast	Human
DECAPPING 1	1G08370	*dcp1-1*; *dcp1-2*	Postembryonic lethal [8**,9*]	DCP1	DCP1a; DCP1b
DECAPPING 2	5G13570	*dcp2-1*; *dcp2-2*; *dcp2-3*	Postembryonic lethal [8**,9*]	DCP2	DCP2
		tdt1-1; *tdt1-2(dcp2-1)*	Vascular defects, postembryonic lethal [12*]		
VARICOSE	3G13300	*vcs-1*; *vcs-2*; *vcs-3*; *vcs-4*; *vcs-5*	Leaf blade and shoot apical meristem defects, temperature sensitive [19]		Hedls Ge-1
		vcs-6; *vcs-7*	Postembryonic lethal [8**]		
DECAPPING 5	1G26110	*dcp5-1*	Germination slow, abnormal vein development, defect in mRNA decapping, P-body formation and translational repression [11**]	SCD6	RAP55
EXORIBONUCLEASE 4	1G54490	*xrn4-1*	Elevated transgene silencing [20*]	XRN1	XRN1
		xrn4-4; *xrn4-5*	Overaccumulation of specific mRNAs including 3′ products of miRNA-mediated cleavage [21]		
		ein5	Ethylene insensitive, overaccumulation of EBF1 and EBF2 mRNAs [22,23] elevated small RNA processing [24]		
DExD/H-BOX HELICASE 1	3G61240	*dhh1-1*[a]		DHH1	Rck/p54
SUPERSENSITIVE TO ABA AND DROUGHT 1	5G48870	*sad1*	Dwarf and small, hypersensitive to ABA and drought [25]	LSM5	hLSM5
LIKE Sm 4	5g27720	*emb1644-1*; *emb1644-2*	Embryo defective from globular stage (http://www.seedgenes.org)	LSM4	hLSM4
ARGONAUTE 1	1G48410	*ago1-3*	Infertile, defect in gene silencing [26], including translation inhibition [27]		hAGO1
SILENCING DEFECTIVE 3	1G05460	*sde3-1*; *sde3-2*	Defect in transgene silencing [28]		MOV10
UP-FRAMESHIFT 1	5G47010	*upf1-3*; *lba1*	Seedling lethality [29,30*]	NAM7	UPF1
		upf1-4; *upf1-5*	Leaf and flower abnormality, defect in RNA interference [30*]		
UP-FRAMESHIFT 2	2G39260	*VIGS*	Defect in degradation of aberrant spliced RNA [31,32**]	NMD2	UPF2
UP-FRAMESHIFT 3	1G33980	*upf3-1*; *upf3-2*	Leaf and flower abnormality [30], defect in degradation of aberrant spliced RNA [33]	UPF3	UPF3
SUPPRESSOR WITH MORPHOGENETIC EFFECT ON GENITALIA 7	5G19400	*VIGS*	Defect in degradation of aberrant spliced RNA [31,32**]		SMG-7
CCR4-ASSOCIATED FACTOR1a	3G44260	*caf1a-1*; *caf1a-2*	Sensitive to abiotic and biotic stresses [34,35]	POP2	CAF1
CCR4-ASSOCIATED FACTOR1b	5G22250	*caf1b-1*; *caf1b-2*; *caf1a/caf1b*			
EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E	4G18040	*cum1-1*; *cum1-2*	Loss-of-susceptibility to potyviruses [36]	CDC33	eIF4E
ISO-EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E	5G35620	*lsp1*; *atelF(iso)4E-1*	Loss-of-susceptibility to potyviruses [37,38]		

[a] Xu and Chua (unpublished).

que XRN4 dégrade préférentiellement des ARN possédant certains motifs ou faisant partie de certaines catégories fonctionnelles (Rymarquis et al., 2011).

L'effet subtil de l'absence de XRN4 sur le développement d'*A. thaliana* n'en fait pas moins un acteur majeur de la dégradation des ARN. Des mutants *xrn4* ont été isolés dans des criblage de mutants de divers voies métaboliques telles que la voie de la réponse à l'éthylène (Olmedo et al., 2006; Potuschak et al., 2006) ou encore dans la voie du silencing (Gazzani et al., 2004; Gregory et al., 2008). De manière intéressante, la dégradation rapide de messagers aberrants par XRN4 empêche la formation de siRNA dirigés contre ces transcrits (Herr et al., 2006).

D. Sites de dégradation des ARNm

1) Les processing bodies ou P bodies

Les lieux intracellulaires de la dégradation des ARNm ont été l'objet de beaucoup de débats. Les processing bodies (P bodies) sont des structures dynamiques formées par l'agrégation de transcrits non traduits et destinés à la dégradation. Ces complexes ribonucléoprotéiques contiennent de nombreuses protéines liées à la dégradation des ARNm et à l'inhibition traductionnelle (tableau 1). On y retrouve le complexe LSM1-7-Pat1 (Ozgur et al., 2010), des 5'-3' exoribonucléases telles que XRN1 chez l'homme et la levure ou XRN4 chez les plantes (Weber et al., 2008), ainsi que le complexe de decapping DCP1/DCP2 et ses activateurs, les protéines EDC (Xu et al., 2006). Le complexe d'initiation de la traduction en est absent à l'exception de eIF4E, protéine de liaison à la coiffe des ARNm. Lors de l'étude des P bodies dans les cellules de mammifères, eIF4E a été trouvé comme associé à ces structures avec des facteurs de dégradation des ARNm suggérant que l'élimination de la coiffe est le dernier évènement menant à la dégradation 5'-3' des ARNm (Andrei et al., 2005).

Les mécanismes permettant la formation des P bodies ne sont pas encore connus. Cependant, certains domaines de protéines présentes dans les P bodies ont été caractérisés comme permettant l'agrégation de RNP sous forme de P bodies. Chez la levure, la codélétion des domaines Yjef-N d'Edc3 et du domaine C terminal riche en glutamine/asparagine (Q/N) de Lsm4 (domaine ressemblant à ceux des prions) abolit la formation des P bodies (Decker et al., 2007; Reijns et al., 2008). Le rôle d'EDC3 est

sans doute conservé chez les eucaryotes étant donné la conservation du domaine Yjef-N. Chez la drosophile, la délétion de ce domaine d'EDC3 aboutit également à la disparition des P bodies (Tritschler et al., 2007). En revanche, le domaine de Lsm4 riche en Q/N de la levure n'est pas conservé chez les autres eucaryotes. Ce domaine est remplacé par un domaine RGG qui a été montré pour la protéine humaine G3BP comme participant à l'agrégation de RNP sous la forme de granules de stress (Tourrière et al., 2003). Le domaine riche en Q/N de Lsm4 de la levure est retrouvée chez d'autres protéines présentes dans les P bodies. GW182 dans les cellules humaines et dans les cellules de drosophile, et EDC4 chez les métazoaires possèdent aussi ce domaine riche en Q/N suggérant la conservation du rôle de ce domaine dans l'agrégation de RNP chez tous les eucaryotes. Dans ces cellules, la déplétion d'EDC4 ou GW182 mène à la perte de P bodies visibles au microscope (Jakymiw et al., 2005; Yu et al., 2005b; Eulalio et al., 2007).

Les P bodies semblent être un lieu préférentiel de regroupement des ARNm destinés à être dégradés. L'hypothèse a été émise que la formation de ces agrégats serait directement proportionnelle à la concentration en ARNm destinés à être dégradés dans le cytosol. Cette hypothèse est soutenue par un certain nombre d'observations. La première est qu'en cas de blocage des ARNm au niveau des polysomes grâce à différentes drogues telle que la cycloheximide, les P bodies disparaissent (Weber et al., 2008). De plus, la formation des P bodies peut être restaurée dans ces conditions en exprimant à de haut niveau un transcrit ne pouvant être piégé au niveau des polysomes (Franks and Lykke-Andersen, 2007). La deuxième observation est que les manipulations visant à augmenter le nombre d'ARNm dissociés des polysomes chez les cellules humaines, de levure ou de drosophile aboutissent à une augmentation de la formation des P bodies (Cougot et al., 2004; Brengues et al., 2005; Teixeira et al., 2005; Eulalio et al., 2007). La troisième observation est que le ralentissement des étapes enzymatiques de la dégradation 5'-3' des ARNm (comme la déplétion de DCP2 ou des XRN cytosoliques) provoque une accumulation des P bodies (Sheth and Parker, 2003; Cougot et al., 2004; Weber et al., 2008). Cependant, la présence des P bodies n'est pas nécessaire à la dégradation des ARNm. En effet, une souche de *S. cerevisiae* qui ne forme plus de P bodies n'est pas affectée dans la vitesse de dégradation de deux transcrits rapporteurs (Decker et al., 2007).

L'importance des P bodies est donc relative étant donné que leur présence ne semble pas être nécessaire à la dégradation des ARNm. La fonction des P bodies ainsi que les mécanismes gouvernant leur formation sont des sujets d'étude de nombreuses équipes. Les prochaines années devraient permettre de mieux caractériser l'importance de ces structures dynamiques dans la dégradation des ARNm. Les P bodies ne sont pas le seul type de granules cytosoliques. Les granules de stress sont également des structures dynamiques formés par l'agrégation de RNP dont la traduction est inhibée mais qui ne contiennent pas de facteurs protéiques liés à la dégradation des ARN (Thomas et al., 2010). Un nouveau type de granule vient également d'être identifié, les siRNA bodies, qui pourrait être à la base de la formation des granules de stress (Jouannet et al., 2012).

2) Les polysomes

Jusque récemment, il était considéré qu'un ARNm devait être dissocié des polysomes avant d'être dégradé. Cette idée provient du fait que les facteurs protéiques liés à la traduction des ARNm sont dissociés et remplacés par des facteurs protéiques liés à la dégradation des ARNm lorsque ces ARNm doivent être dégradés (Tharun and Parker, 2001). Cependant, des études récentes tendent à montrer qu'une partie des transcrits pourraient être dégradée de manière co-traductionnelle au niveau des polysomes, en tout cas chez la levure (Hu et al., 2009). Dans ce cas, le decapping et la dégradation 5'-3' se déroulent alors que l'ARNm n'est pas encore libre de ribosomes comme le montre l'analyse des ARNm associés aux ribosomes dans différents mutants de la voie de dégradation 5'-3'. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse que la voie de dégradation 5'-3' des ARNm aurait évolué pour permettre la translocation du dernier ribosome. Ces résultats semblent être confirmés chez *A. thaliana* par des expériences menées dans l'équipe de Jean-Marc Deragon à Perpignan. En effet, cette equipe à pu montré que certains facteurs protéiques liés à la dégradation des ARNm, tel que XRN4, sont présents au niveau des polysomes d'*A. thaliana* (communication personnelle).

E. Le rôle de l'uridylation dans la dégradation des ARN

La voie principale de dégradation des ARNm chez les eucaryotes suit celle de l'organisme modèle *S. cerevisiae* avec cependant une plus grande complexité. La

déadénylation joue également un rôle important dans la dégradation des ARNm chez tous les eucaryotes. Mais il existe d'autres mécanismes liés permettant de déclencher la dégradation des ARNm. Un de ces mécanismes a été identifié chez *S. pombe* et consiste en l'uridylation des ARNm.

1) Uridylation et dégradation des ARNm

Il existe chez *S. pombe* et sans doute chez quasiment tous les autres eucaryotes supérieurs une complexité plus importante dans le processus de dégradation des ARNm par rapport à *S. cerevisiae*. La protéine Cid1 caractérisée chez *S. pombe* a été identifiée comme une terminale uridylyl transférase (TUTase) et peut déclencher la dégradation d'un ARNm en uridylant son extrémité 3' (Rissland and Norbury, 2009). Malgré une certaine activité poly(A) polymérase *in vitro* en plus de son activité TUTase, cette enzyme est responsable de l'ajout de 1 à 3 uridines *in vivo* à l'extrémité 3'OH des ARNm. L'absence de Cid1 va aboutir à une augmentation de la demi-vie de certains ARNm dont urg1. Une telle augmentation est également constatée dans des mutants *ccr4*, la principale déadénylase, suggérant une redondance des deux voies métaboliques. La voie de dégradation dépendante de l'uridylation, tout comme celle dépendante de la déadénylation, permet le recrutement du complexe LSM1-7 sur l'ARNm et de déclencher le decapping. Cependant, il est difficile d'apprécier si cette voie est une voie générale de dégradation des ARNm car elle n'a pour l'instant été montré chez *S. pombe* que sur un seul ARNm.

Chez le champignon filamenteux *Aspergillus nidulans*, en plus de la voie métabolique de dégradation stimulée par la déadénylation, une autre modification des ARNm a été mise en évidence et joue un rôle dans la dégradation des transcrits. Il s'agit de l'ajout de quatre nucléotides CUCU (ou des variants contenant C et U) par l'enzyme CutA sur les transcrits avec une queue poly(A) courte (environ 15A) dans un contexte type sauvage (Morozov et al., 2010). Cette modification marque principalement les transcrits décappés et l'absence de CutA provoque une augmentation de la demi-vie de certains transcrits. Ces derniers arguments tendent à montrer un rôle de cette modification dans la voie de dégradation 5'-3' des ARNm.

Un cas particulier de la voie de dégradation des ARNm stimulée par l'uridylation est le cas des ARNm codant pour les histones chez l'humain. Chez les animaux, ces ARNm ne sont pas polyadénylés à leur extrémité 3' mais finissent par

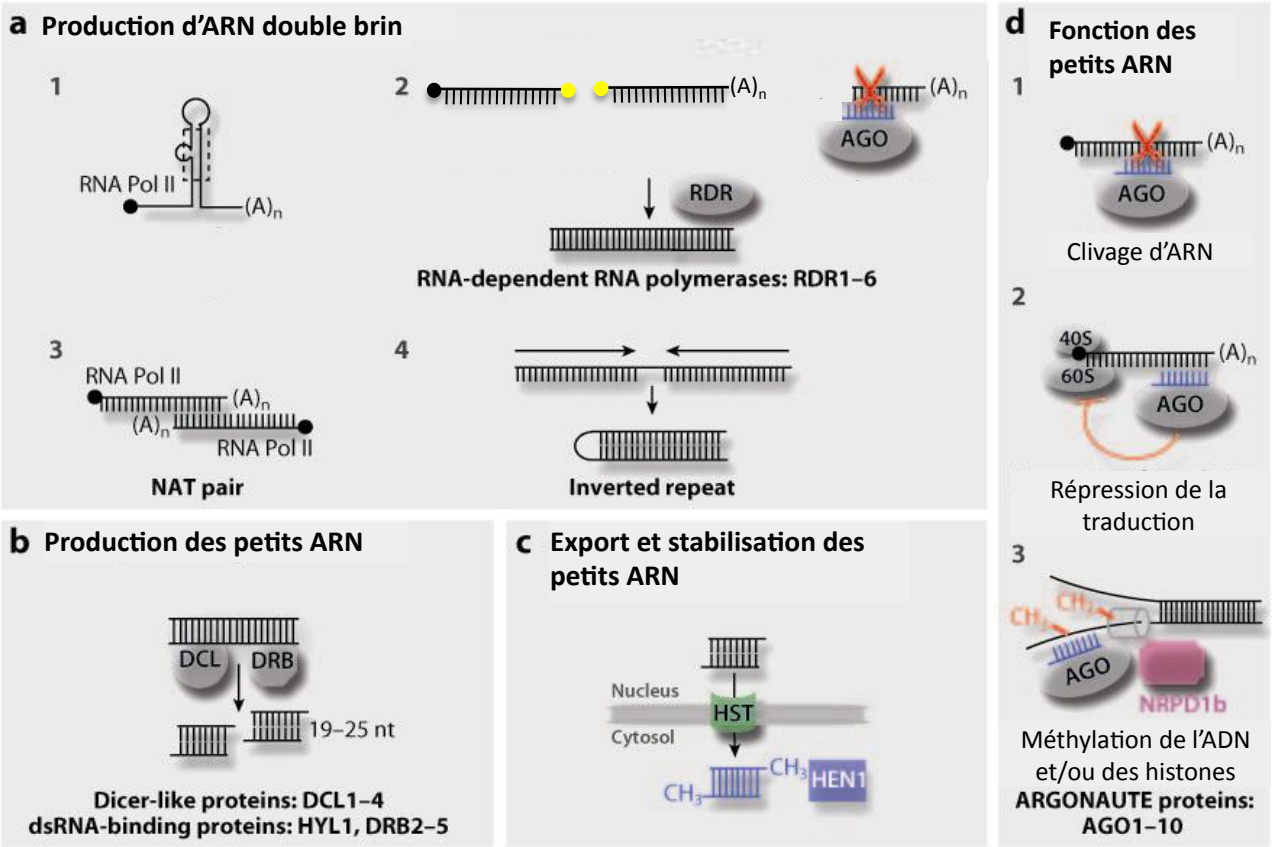


Figure 12 : Étapes consensus des voies métaboliques du RNA silencing chez *A. thaliana*
a.Tous les petits ARN ont pour origine un ARN double brin. (1) Les miRNA proviennent de transcrits issus des gènes *MIRNA* qui vont former des structures tige-boucle. Les siRNA sont générés à partir de d'ARN double brin formé (2) soit par l'action de polymérases RDR (« RNA dependant RNA polymerase ») sur des ARN viraux ou considérés comme aberrants (sans coiffe ou sans queue poly (A)) ou cibles de miRNA de 22 nt (détaillé dans le texte). Les siRNAs peuvent également avoir pour origine (3) l'appariement de deux ARNm avec des séquences complémentaires ou (4) par l'appariement sur lui-même de transcrit répété inversé.
b. Les ARN double brin sont clivés par une des quatre protéines DCL (« Dicer-Like ») assistée de protéine de liaison aux ARN double brin (DRB).
c. Les duplex de petits ARN peuvent être exportés du noyau vers le cytoplasme grâce à la protéine HASTY (HST) et sont stabilisés par la méthylation de leur extrémité 3' par HUA ENHANCER 1 (HEN1).
d. Le petit ARN guide associé à une protéine ARGONAUTE (AGO) va dirigé le complexe RISC (« RNA-Induced Silencing Complex ») sur sa cible et provoquer soit (1) son clivage, soit (2) sa répression traductionnelle. Lors de l'association de la protéine AGO et du petit ARN avec le complexe RITS (« RNA-Induced Transcriptionnal Silencing »), ce dernier va provoquer la méthylation de l'ADN génomique et des histones de la région ciblée. D'après Ruiz-Ferrer V. & Voinnet O. 2009.

une structure tige-boucle conservée interagissant avec la protéine SLBP. Les ARNm histones sont rapidement dégradés à la fin de la phase S ou en cas d'inhibition de la réplication de l'ADN. La première étape de la dégradation des ARNm histones est l'uridylation (Mullen and Marzluff, 2008) par la protéine humaine ZCCHC11 (Schmidt et al., 2010). Cette uridylation va déclencher l'élimination de la coiffe de l'ARNm par l'intermédiaire d'un complexe protéique contenant SLBP et LSM1. La dégradation du transcrit sera réalisée simultanément par la voie 5'-3' et 3'-5'.

2) Uridylation et dégradation des petits ARN

a) Biogenèse et mode d'action des petits ARN

Les petits ARN (entre 20 et 32 nucléotides) jouent des rôles importants sur la régulation du transcriptome au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Ces petits ARN interviennent dans l'extinction transcriptionnelle (« Transcriptionnal Gene Silencing », TGS) et post-transcriptionnelle de l'expression de gènes (« Post transcriptionnal Gene Silencing », PTGS). De nombreuses revues sont disponibles sur ce sujet (Guleria et al., 2011; Juliano et al., 2011; Khraiwesh et al., 2012; Okamura, 2012) et je n'illustrerai ici que les points principaux concernant les petits ARN.

Les petits ARN peuvent être classés en 3 grands groupes selon leur précurseurs, leur biogenèse et leurs partenaires protéiques : les microARN (miRNA), les « small interfering RNA » (siRNA) et les Piwi-interacting RNA (piRNA) (Ambros and Chen, 2007; Kim et al., 2009). Le groupe de piRNA n'est retrouvé que chez les animaux. La biogenèse et le mode d'action des mi/siRNA chez *A. thaliana* sont illustrés en figure 12.

Les miRNA sont produits à partir des gènes *MIR* dont les ARN forment des structures en tige-boucle. Les miRNAs matures sont en général de 21 à 24 nucléotides et sont générés par la coupure des précurseurs tige-boucle par des enzymes de type RNaseIII (Drosha et Dicer chez les animaux et DCL1 chez les plantes). Les miRNA ciblent des gènes endogène en induisant la coupure et la dégradation de l'ARNm ciblé et/ou sa répression traductionnelle (Voinnet, 2009; Huntzinger and Izaurralde, 2011).

Les siRNAs sont générés à partir d'ARN double brin issus d'une transcription antisens, de la transcription d'éléments répétés inversés, de la réplication virale ou de

l'activité de la « RNA dépendent RNA polymérase » (RDR) qui convertis un ARN simple brin en ARN double brin. Les siRNAs font entre 21 et 24 nucléotides et leur biogenèse requiert également l'activité endonucléase de Dicer chez les animaux ou DCL2, DCL3 et DCL4 chez les plantes qui produisent respectivement des siRNAs de 22, 24 et 21 nucléotides (Bouché et al., 2006). Les siRNA répriment l'expression d'éléments transposables, de transgènes, participent au clivage des ARN viraux et également à la régulation négative de l'expression génique par l'intermédiaire de miRNA qui vont déclencher la production de « trans-acting siRNAs » (tasiRNAs) (Marin et al., 2010).

Le dernier grand groupe est le groupe des piRNA. Les piRNAs ont une taille entre 24 et 32 nucléotides en général et sont retrouvés exclusivement chez les animaux. Les piRNAs sont générés a priori à partir d'ARN précurseurs simple brin d'une manière indépendante de Dicer (Siomi et al., 2011). Leur biogenèse est composée d'une voie métabolique primaire puis d'une amplification (Brennecke et al., 2007). Les piRNAs sont dérivés d'éléments transposables, de régions intergéniques et de certains gènes. Les piRNAs générés à partir d'éléments transposables répriment l'expression de ces éléments par le clivage de ces transcrits et la méthylation des loci génomiques (Aravin et al., 2008; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008).

L'action de ces petits ARN est dépendante de leur interaction avec les protéines Argonautes (AGO). Le TGS va aboutir à la formation d'hétérochromatine en méthylant des régions d'ADN génomique et/ou des histones dans le but de réprimer la transcription de ces régions du génome. Le PTGS va inhiber l'expression d'ARNm en se fixant à l'ARNm grâce à la complémentarité de séquence entre la cible et le miRNA. Le transcrit est alors maintenu traductionnellement silencieux ou dégradé grâce au clivage du transcrit au niveau du site du miRNA par la protéine AGO. La famille des protéines AGO peut être divisée en deux sous-classe : la sous classe des PIWI (animaux uniquement) et celle des AGO. Chez *A. thaliana*, il existe 10 protéines AGO dont les fonctions sont plus ou moins spécialisées (Mallory and Vaucheret, 2010). Par exemple, les protéines AGO4/6/9 et leurs petits ARN de 24 nucléotides sont impliqués dans le TGS (Zilberman et al., 2003; Zheng et al., 2007; Havecker et al., 2010). Les protéines AGO1/7, complexées avec des petits ARN de 21-22 nucléotides et capables de cliver leur cibles, sont impliquées dans le PTGS (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi et al., 2005; Montgomery et al., 2008).

Chez les plantes et la drosophile, les siRNAs sont impliqués dans la défense antivirale et d'une manière générale permettent la dégradation de molécules d'ARN aberrantes. Chez les plantes, la reconnaissance d'intermédiaires de réplication ARN viraux double brin ou d'ARNm viraux peut déclencher la réponse antivirale. Les ARN viraux simples brins peuvent être transformés en ARN double brin par l'action de RDR6. Ces ARN double brin sont ensuite clivés par DCL4 ou DCL2, ce qui va générer des duplex de siRNAs. Un brin de ce duplex sera chargé par une protéine AGO et ce complexe ribonucléoprotéique sera chargé de reconnaître les ARN viraux dans la cellule (Pantaleo, 2011). Les ARN exogènes ne sont pas les seuls à être reconnus par RDR6. L'accumulation de certains ARN considérés comme aberrants peut également provoquer la synthèse de siRNAs comme il été montré pour des pseudogènes, des transgènes, ou des ARNm sans queue poly(A) (Luo and Chen, 2007).

Les mécanismes de biogenèse et d'action des petits ARN font l'objet d'intenses études mais leurs processus de dégradation commencent seulement à émerger.

b) Déstabilisation des petits ARN par l'uridylation

Une étude récente a permis de mettre en évidence que l'ajout de nucléotide à l'extrémité 3' d'un petit ARN est un évènement post-transcriptionnel commun à tous les organismes et qui montre une sélectivité en fonction du petit ARN et du tissu, dans des espèces allant de *C. elegans* à l'humain (Wyman et al., 2011). Parmi les différents nucléotides pouvant être ajoutés, la mono-adénylation (traitée dans le paragraphe II B 2 b) et la mono-uridylation sont les modifications de petits ARN les plus rencontrées. Les enzymes catalysant l'uridylation n'ont pas toutes été identifiées chez les différents organismes modèles, cependant certaines sont connues.

Il a été montré que la totalité des petits ARN chez les plantes et certains petits ARN chez les animaux étaient soumis à une méthylation du ribose à leur extrémité 3'. L'enzyme responsable de cette méthylation est HEN1 qui a d'abord été identifiée chez *A. thaliana* comme une méthylase des petits ARN ayant pour substrat les duplex de miRNA et siRNA (Yu et al., 2005a; Yang et al., 2006). Des homologues de HEN1 méthylent les petits ARN chez d'autres plantes, les piRNAs chez les animaux et les petits ARN associés à Ago2 chez la drosophile (Yu et al., 2005a; Horwich et al., 2007; Kamminga et al., 2010). En général, la méthylation sert à protéger les petits ARN de la dégradation 3'-5' et de l'uridylation (Li et al., 2005). En effet, dans le mutant nul *hen1*

d'*A thaliana*, le niveau général des miRNAs est diminué et des formes de mi/siRNA uridylés à leur extrémité 3' apparaissent. Cette hétérogénéité de taille due à l'uridylation des petits ARN donne un profil en northern blot sous forme d'échelle, typique de *hen1*.

Chez *A. thaliana*, une ARN nucléotidyltransferase de la famille des ncPAP uridylant les petits ARN non méthylés vient d'être identifiée. Il s'agit de la protéine HESO1 (« HEN1 Suppressor 1 ») (Ren et al., 2012; Zhao et al., 2012). La mutation du gène *HESO1* entraîne une atténuation du phénotype développemental de la mutation *hen1* mais pas la restauration complète du phénotype sauvage. De plus, le phénotype moléculaire dû à l'absence d'HEN1, à savoir une diminution du niveau des miRNA et l'apparition de miRNA uridylés, n'est pas complètement aboli en l'absence d'HESO1, ce qui suggère qu'une autre enzyme serait capable de compenser, au moins partiellement, l'absence d'HESO1.

Il a également été montré que les mi et les siRNAs sont en compétition pour être substrat de HEN1. Chez *A. thaliana*, l'ARN pol IV est essentielle à la biogenèse des siRNA endogènes. Dans un mutant où l'activité de HEN1 est réduite (*hen1-2*), une mutation dans une sous unité de l'ARN pol IV permet de restaurer la fertilité. Ceci est dû à une diminution des niveaux de siRNA endogènes, rendant HEN1 plus disponible pour la méthylation des miRNAs ce qui les protègera de l'uridylation par HESO1 (Yu et al., 2010).

Chez *C. reinhardtii*, les petits ARN sont méthylés comme chez les angiospermes. MUT68, une nucléotidyltransférase de la famille des ncPAP, est l'enzyme responsable de l'uridylation des petits ARN non méthylés chez cette algue unicellulaire (Ibrahim et al., 2010), en plus de son rôle potentiel dans l'adénylation des fragments 5' issus du clivage par le complexe RISC. L'uridylation des petits ARN par MUT68 stimule leur dégradation par la protéine RRP6 humaine *in vitro*. Dans ces conditions très particulières, MUT68 et RRP6 ne sont pas capables d'utiliser un miR912 méthylé comme substrat, indiquant ainsi que MUT68 n'agirait que sur les petits ARN non méthylés.

Chez les humains, la protéine ZCCHC11 a également été montrée comme responsable de l'uridylation des miRNA en plus de son rôle dans l'uridylation des ARNm histones. ZCCHC11 a été montré comme responsable de l'uridylation (1 à 3 uridines) des miRNAs de la famille miR26 qui répriment les ARNm codant pour des

cytokines, et notamment le messager codant pour l'interleukine 6 impliquée dans la réponse immunitaire (Jones et al., 2009). L'uridylation de miR26 permet une régulation précise de la réponse immunitaire en abrogeant la répression des messagers codant pour des cytokines.

Chez *C. elegans*, l'uridylation des siRNAs naturellement non méthylés de la voie CSR-1 permet de restreindre l'activité de ces siRNAs au messager CSR-1 codant pour une protéine Argonaute impliquée dans la ségrégation des chromosomes (van Wolfswinkel et al., 2009). L'absence de CDE-1, la nucléotidyltransférase responsable de l'uridylation de ces siRNAs, va entrainer une augmentation des siRNAs contre CSR-1, une ségrégation des chromosomes déficiente pendant la mitose et la méiose et un silencing de gène erroné. L'uridylation régule l'accumulation des siRNAs contre CSR-1 en les déstabilisant.

3) Uridylation des pré-miRNA

L'uridylation des petits ARN n'est pas le seul moyen de réguler leur niveau d'accumulation. ZCCHC11 chez les mammifères et PUP-2 chez *C. elegans* peuvent être recrutés par la protéine de liaison à l'ARN LIN28 au niveau de précurseurs de miRNA (pré-miRNA) de la famille let-7 dans le cytosol (Heo et al., 2008; Hagan et al., 2009; Piskounova et al., 2011). Cette uridylation des précurseurs de miRNA empêche leur prise en charge par Dicer et entraine leur dégradation, inhibant ainsi la biogenèse de miRNA actifs de la famille Let-7.

4) Devenir des fragments 5' des transcrits clivés par le complexe RISC

Le clivage d'ARNm par les miRNAs et le complexe RISC est un moyen puissant de régulation de l'expression génique. Le clivage par le complexe RISC produit deux fragments d'ARNm, le fragment 5' possédant la coiffe et le fragment 3' avec la queue poly(A). Le fragment 3' possède une extrémité 5' phosphate, ce qui en fait un substrat des 5'-3' exoribonucléases et notamment XRN4 chez *A. thaliana* (Souret et al., 2004). Le fragment 5' quant à lui, a été montré comme uridylé chez des espèces très différentes, d'*A. thaliana* à la souris en passant par des cellules infectées par le virus Epstein-Barr (Shen and Goodman, 2004). Cette uridylation a pu être corrélée à un statut décappé du fragment 5' et à un raccourcissement du coté 5' du fragment. Les protéines impliquées dans cette uridylation et ce raccourcissement de l'extrémité 5'

n'ont pas été caractérisées. Cependant, des candidats évidents de ce raccourcissement sont le complexe de decapping et les protéines XRN impliquées dans la dégradation 5'-3' des ARNm.

Comme il a été illustrée dans cette introduction, les ncPAP sont capables de catalyser l'ajout d'adénosines et d'uridines. La liste non exhaustive des rôles de la polyadénylation et de l'uridylation des ARN illustre bien la variété des effets que les ncPAP peuvent déclencher selon leur activité, leur substrat ARN et leur localisation intracellulaire. C'est dans ce contexte qu'a debuté mon projet de thèse.

Objectifs de ma thèse

Mon projet de thèse a découlé de mon stage de Master 2 en 2009. L'objectif de mon stage était de déterminer la localisation des protéines de la famille des ncPAP d'*A. thaliana*. Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation d'une de ces protéines, codée par le gène At2g45620 et que nous avons appelé TUT1. L'activité poly(U) polymérase de TUT1 avait été suggérée en 2007 par Kwak et Wickens (Kwak and Wickens, 2007). Dans cette étude, TUT1 avait été exprimée dans un système hétérologue, c'est à dire des oocytes de xénope, afin de caractériser son activité en favorisant son recrutement sur un ARN témoin grâce à un système d'ancrage artificiel sur l'ARN (« tethering assay »). Lors de mon stage de Master 2, j'ai montré une localisation potentielle de TUT1 au niveau des P bodies et des granules de stress lors d'expériences d'expression transitoire de protéines de fusion fluorescentes dans des cellules de tabac. Au début de ma thèse, aucune protéine de la famille des ncPAP n'avait été caractérisée chez *A. thaliana* et la présence potentielle d'une ARN nucléotidyltransférase au niveau des P bodies ou des granules de stress n'avait également jamais été montrée. De plus, son activité poly(U) polymérase potentielle et le manque d'information à ce moment là sur les mécanismes de l'uridylation et son impact sur le transcriptome en faisait un sujet de thèse difficile et ambitieux d'un point de vue personnel et extrêmement intéressant d'un point de vue scientifique. Mon travail de thèse a donc consisté en la caractérisation de la protéine TUT1, et plus particulièrement de ses substrats ARN, dans le but de déterminer l'impact de cette protéine sur le transcriptome d'*A. thaliana*.

Après avoir fait un bref rappel des résultats obtenus lors de mon stage de Master 2, je présenterai les deux grandes parties de mon travail de thèse. La première consistera en une caractérisation de TUT1 *in vivo* par une approche de génétique inverse. Cette étude nous a permis de montrer que les ARNm sont des substrats de TUT1 et de déterminer le rôle de l'uridylation des ARNm chez *A. thaliana*. Dans une deuxième partie, je présenterai des données préliminaires concernant l'analyse fonctionnelle de domaines de TUT1. Ces expériences nous ont permis d'observer l'effet de l'expression ectopique de TUT1 sur l'expression d'un gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente GFP et de mettre en évidence une fonction

potentielle du domaine N terminal de TUT1. Ces travaux ouvrent des pistes pour la caractérisation future des mécanismes d'action de TUT1 et des mécanismes de reconnaissance des substrats ARN par TUT1.

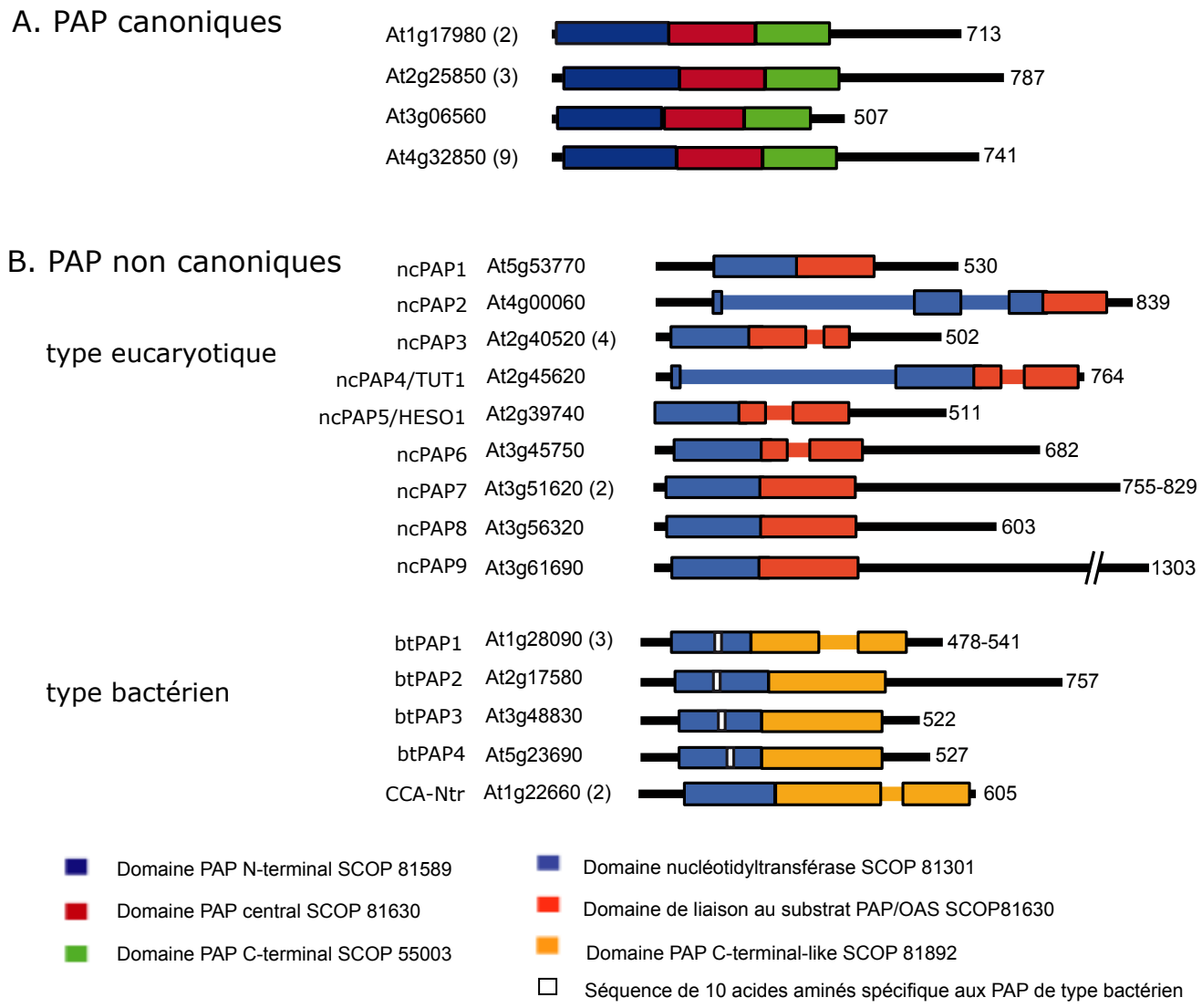


Figure 13 : Présentation de la famille des PAP d'*A. thaliana*
A. Dans le génome d'*A. thaliana*, 4 gènes codent pour des poly(A) polymérases (PAP) canoniques (cPAP), responsables de la synthèse des queues poly(A) des ARNm et de tous les transcrits de l'ARN polymérase II.
B. 9 gènes codent pour des PAP non canoniques (ncPAP) de type eucaryotique (référence à Trf4 de *S. cerevisiae*) parmi lesquelles se trouvent TUT1 et HESO1 (voir introduction). 5 gènes codent pour des PAP non canoniques de type bactérien, parmi lesquelles se trouve aussi une enzyme de maturation des ARNt, la CCA nucléotidyltransférase. Pour chaque gène, le numéro AGI est indiqué, suivi entre parenthèses du nombre d'épissages alternatifs prédits. La taille (en acides aminés) des protéines correspondantes est affichée à droite du modèle de gène. Pour les gènes des différentes ncPAP, leur identifiant selon la nomenclature du laboratoire est également donnée à gauche du numéro AGI.

Résultats

I. La famille des ncPAP chez *A. thaliana*

A. Identification des gènes codant pour des ncPAP chez *A. thaliana*

La première étape de mon projet a été d'identifier dans le génome d'*A. thaliana* les gènes codant pour des ncPAP potentielles. Ces gènes candidats doivent posséder une séquence codant pour un domaine nucléotidyltransférase (SCOP 81301 (Structural Classification of Proteins)) (Andreeva et al., 2008) associé soit à un domaine de liaison au substrat défini initialement pour la protéine humaine 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1) (SCOP 81630) soit à un domaine propre aux PAP d'origine bactérienne (SCOP 81892). La base de données SCOP permet une classification des protéines prenant en compte d'une part la similarité au niveau de la structure primaire des protéines (séquence en acides aminés) et d'autre part la similarité des structures secondaires des domaines des protéines. Cette analyse a permis l'identification de dix huit gènes. Parmi ces dix huit gènes, quatre codent pour des cPAP (« canonical Poly(A) Polymerase »), responsables de la polyadénylation nucléaire des ARNm et d'autres transcrits de l'ARN polymérase II (figure 13A). Les quatorze gènes restant peuvent être divisés en deux sous-familles en fonction de l'origine du domaine PAP/OAS1 (figure 13B).

La sous-famille des ncPAP de type eucaryotique compte neuf gènes chez *A. thaliana* (*ncPAP1* à *9*). Au début de mon projet de thèse, aucune protéine issue d'un gène de la famille des ncPAP de type eucaryotique n'avait été caractérisée chez *A. thaliana*. Quelques semaines avant le début de l'écriture de ce manuscrit, la première caractérisation d'un de ces gènes a été publiée. Deux articles de recherche, publiés simultanément, présentent le rôle de ncPAP5/HESO1 dans l'uridylation des petits ARN chez *A. thaliana* (Ren et al., 2012; Zhao et al., 2012).

La deuxième sous-famille de gènes code pour des PAP non canoniques de type bactérien (btPAP pour « bacterial type PAP »). Cette famille contient cinq membres dont un seul gène (At1g22660) a été caractérisé. Ce gène code pour une ARNt nucléotidyltransférase, une enzyme responsable de l'ajout des nucléotides CCA en 3'

Tableau 2 : Tableau des résultats de prédiction de localisation des btPAP.
Les logiciels de prédiction d'adressage aux organelles utilisés sont Targetp (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/), mitop2 (www.mitop.de:8080/mitop2/), iPSORT (http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT) et predotar (http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html). Le gène btPAP1 possède 3 modèles de transcrits aboutissant à la production de 3 protéines avec des extrémités N terminale différentes (btPAP1-1/2/3). btPAP1-1 semble le meilleur candidat pour une importation dans la mitochondrie puisque tous les programmes utilisés prédisent un adressage mitochondrial. btPAP1-2 est prédite par 2 des programmes comme étant importée dans les chloroplastes et btPAP1-3 n'est pas prédite comme étant importée dans les organelles. btPAP2 est prédite par 3 des 4 programmes comme mitochondriale alors qu'aucune localisation majoritaire ressort des prédictions concernant btPAP3. Les 4 programmes s'accordent sur un adressage aux organelles de btPAP4 qui est majoritairement prédite mitochondriale et possiblement chloroplastique.

	locus chromosomique	targetp	mitop	subloc	ipsort	predotar1	WoLFPSORT
btPAP1-1	At1g28090.1	mitochondrie	mitochondrie	noyau	mitochondrie	poss. mitochondrie	plaste
btPAP1-2	At1g28090.2	autre	autre	noyau	chloroplaste	chloroplaste	plaste
btPAP1-3	At1g28090.3	autre	autre	noyau	autre	aucune	noyau
btPAP2	At2g17580	mitochondrie	autre	noyau	mitochondrie	mitochondrie	noyau
btPAP3	At3g48830	voie secrétrice	mitochondrie	cytosol	peptide signal	aucune	plaste
btPAP4	At5g23690	mitochondrie	mitochondrie	noyau	mitochondrie	poss. chloroplaste	plaste

Tableau 3 : Localisation des différentes protéines fluorescentes exprimées dans des cellules de tabac BY2.
Chaque protéine d'intérêt fusionnée en C-terminale à la GFP a été exprimée dans des cellules de tabac BY2. En première colonne se trouve le nom de la protéine selon la nomenclature du laboratoire ou différentes publications. Dans la deuxième colonne se trouve le locus chromosomique ainsi que la version de l'epissage alternatif utilisée. L'ensemble des ADNc correspondant aux ARNm a été cloné. La troisième colonne indique le type de localisation observée au microscope confocal dans des cellules de tabac BY2 après transformation biolistique. Une cas vide signifie que la localisation de la protéine correspondante n'a pas pu être déterminée.

Nom	AGI	Localisation
ncPAP1	At5g53770	nucléaire
ncPAP2	At4g00060	nucléo-cytosolique, exclue du nucléole
ncPAP3-1	At2g40520.1	nucléo-cytosolique
ncPAP3-2	At2g40520.2	nucléo-cytosolique
ncPAP3-3	At2g40520.3	nucléo-cytosolique
ncPAP3-4	At2g40520.4	nucléo-cytosolique
ncPAP4/TUT1	At2g45620	cytosolique et foci cytosoliques, colocalisant avec des marqueurs des Processing bodies et des granules de stress
ncPAP5/HESO1	At2g39740	cytosolique et foci cytosoliques, colocalisant avec des marqueurs des Processing bodies
ncPAP6	At3g45750	nucléaire, granules dans le nucléoplasme et accumulation à l'interface nucléole/nucléoplasme
ncPAP7	At3g51620	
ncPAP8	At3g56320	
ncPAP9	At3g61690	
btPAP1-1	At1g28090.1	mitochondrie
btPAP1-3	At1g28090.3	nucléo-cytosolique
btPAP2	At2g17580	nucléaire
btPAP3	At3g48830	
btPAP4	At5g23690	mitochondrie/Chloroplaste

des ARNt dans les mitochondries et les chloroplastes (Zimmer et al., 2009). Bien que les organisations structurales des ARNt nucléotidyltransférases et des btPAP véritables soient pratiquement identiques, ces deux types d'enzyme peuvent être différenciés par un motif de 10 acides aminés présent chez les btPAP et absent des ARNt nucléotidyltransférases (Martin and Keller, 2007). En raison de l'origine bactérienne des mitochondries et des chloroplastes selon la théorie endosymbiotique, les protéines issues des quatre autres gènes de la famille btPAP (*btPAP1* à *4*) sont les candidats les plus probables pour remplir des fonctions dans les organelles. Ces protéines sont prédites à des degrés divers comme étant importées dans les mitochondries et les chloroplastes (Tableau 2). Toutefois, les prédictions de localisation ne sont par définition qu'indicatives et ces localisations doivent être vérifiées expérimentalement.

B. Localisations variées des ncPAP d'*A. thaliana* dans les cellules végétales

La détermination de la localisation des ncPAP est une première étape de la caractérisation de ces protéines. Leur localisation intracellulaire peut nous orienter pour la recherche de leurs substrats ARN potentiels et donc leur(s) fonction(s) biologique(s). Pour débuter cette étude, nous avons décidé d'observer la localisation des ncPAP par expression transitoire des protéines fusionnées à des protéines fluorescentes dans des cellules de tabac.

Les différentes constructions ont été réalisées à partir d'amplification d'ADN complémentaire (ADNc) généré par rétro-transcription (RT-PCR) ou à partir de clones RIKEN disponibles (www.brc.riken.jp/lab/epd/catalog/cdnaclone.html). Pour ces expériences, la stratégie aura été de conserver un maximum de la 5' UTR et d'exprimer des protéines de fusion où la GFP se situe à l'extrémité C terminale des protéines d'intérêt. Une fois les constructions obtenues, celles ci sont transformées dans des cellules de tabac BY2 par transfert biolistique, ce qui permet une expression transitoire des protéines fluorescentes. De manière générale, les résultats obtenus (tableau 3) montrent des localisations variées des ncPAP fusionnées à la GFP. Parmi les constructions réalisées, trois d'entre elles n'ont pas pu être testées (ncPAP7 à 9). Pour deux gènes (*ncPAP3* et *btPAP1*), plusieurs modèles de transcrit générés par épissage alternatif ont été clonés. Le gène *btPAP1* est prédit pour encoder trois modèles de transcrit produits par épissage alternatif. Sur ces trois modèles, seuls

deux ont pu être confirmés par amplification à partir d'ADNc (btPAP1-1 et btPAP1-3). L'unique différence entre ces deux modèles se situe au niveau de l'extrémité 5' des transcrits qui codent des protéines avec des extrémités N terminales différentes. La protéine la plus longue, btPAP1-1, a montré une localisation mitochondriale alors que sa version courte, btPAP1-3, a montré une localisation cytosolique. Bien que l'étude de ce gène n'ait pas constitué une priorité de ma thèse, il serait intéressant de confirmer ces résultats et de comprendre les fonctions biologiques d'une même ncPAP dirigée dans deux compartiments cellulaires différents. En ce qui concerne le gène *ncPAP3*, des constructions ont pu être produites à partir des quatre modèles de transcrit prédits. Ces modèles ne diffèrent que par leur 5'UTR et ont la même séquence codante. De manière attendue, les protéines fluorescentes issues de ces quatre constructions ont toutes montré la même localisation (nucléocytosolique).

Il est important de noter que ces localisations de protéines fluorescentes dans les cellules d'un organisme hétérologue ne sont en aucun cas des preuves de la localisation intracellulaire réelle de ces protéines, mais uniquement des indices. Cependant, ces expériences suggèrent fortement que les ncPAP sont localisées dans des compartiments cellulaires variés dans toute la cellule végétale. La présence de plusieurs ncPAP dans un même compartiment cellulaire illustre une spécialisation et/ou une redondance fonctionnelle de ces protéines.

II. Identification d'un nouveau rôle de l'uridylation dans la protection de l'extrémité 3' des ARNm déadénylés

A. Localisation de TUT1 dans le cytosol des cellules végétales

Parmi les différentes localisations obtenues, la localisation de ncPAP4/TUT1 (At2g45620, appelée TUT1 dans le reste du manuscrit) a retenu notre attention. La protéine TUT1GFP montre une localisation cytosolique avec une accumulation au niveau de foci. La protéine GFPTUT1 montre le même profil de localisation intracellulaire. Ces ponctuations cytosoliques ne correspondent pas à des mitochondries, puisqu'elles ne colocalisent pas avec le marqueur Mitotracker Orange CM-H2TMRos (Invitrogen) (résultats non montrés).

Les substrats de TUT1 étant vraisemblablement des ARN, les granules formés par l'assemblage de particules ribonucléoprotéiques que sont les P bodies et/ou les

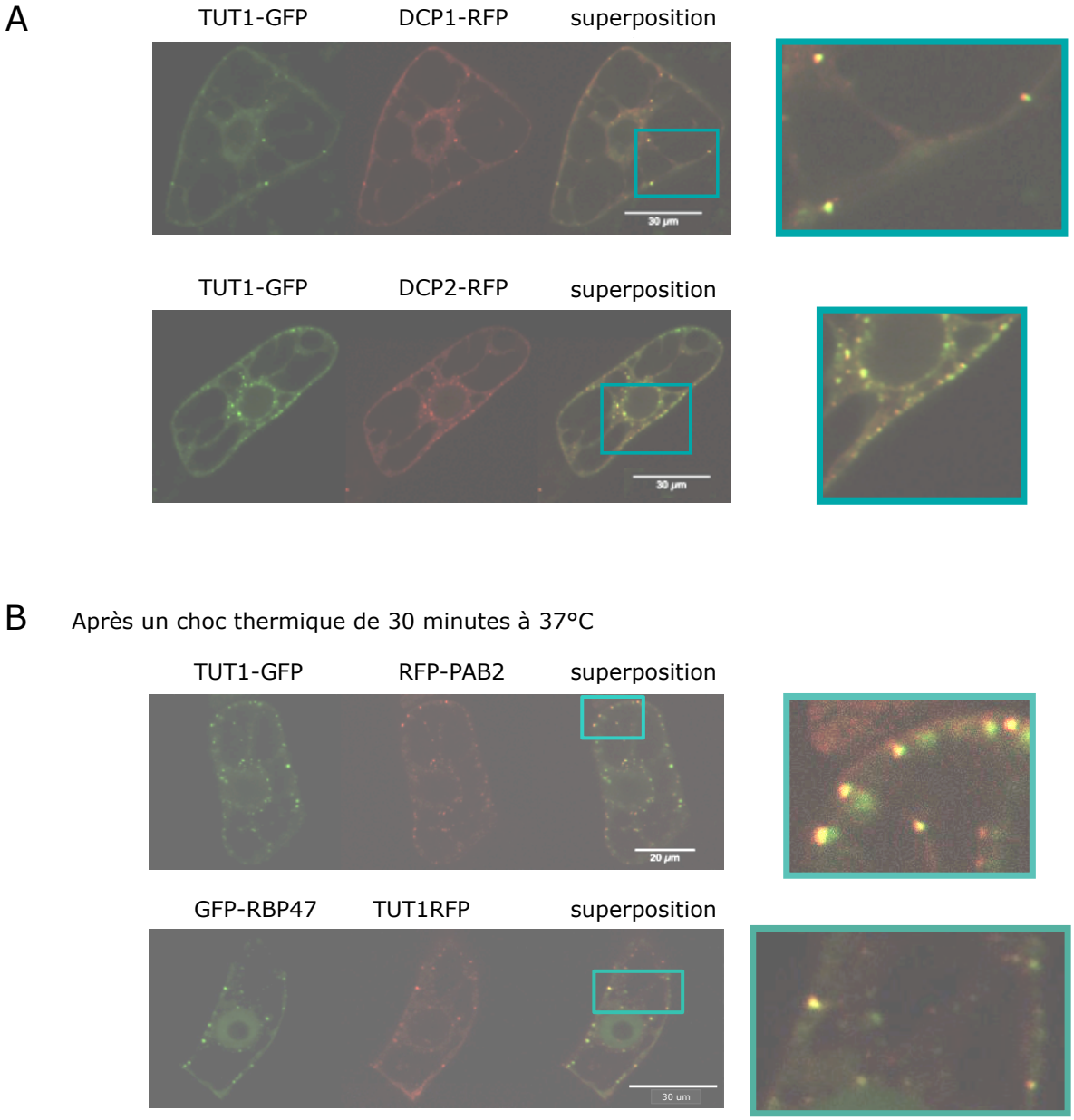


Figure 14 : TUT1 colocalise avec des marqueurs des P bodies et des granules de stress
Les protéines fluorescentes TUT1-GFP et TUT1-RFP ainsi que les différents marqueurs ont été exprimés de manière transitoire dans des cellules de tabac BY2. Ces cellules ont ensuite été observées au microscope confocal. Les protéines TUT1-GFP et TUT1-RFP sont cytosoliques et s'accumulent au niveau de foci dans le cytosol.
A. Ces foci marqués par TUT1-GFP colocalisent avec les foci marqués par DCP1-RFP et DCP2-RFP, connus pour être des marqueurs des P bodies.
B. Dans d'autres cellules BY2 ayant subi au préalable un choc thermique à 37°C pendant 30 minutes, les protéines TUT1-GFP et TUT1-RFP colocalisent avec les marqueurs des granules de stress RFP-PAB2 et GFP-RBP47. Pour chaque expérience de colocalisation, un agrandissement de la superposition des signaux GFP et RFP est présenté à droite. Les ponctuations jaunes sur ces agrandissements montrent la colocalisation partielle des signaux GFP et RFP au niveau des foci. L'échelle est donnée par en bas à droite de la superposition.

granules de stress constituaient des candidats potentiels pour ces foci cytosoliques où TUT1GFP s'accumule. Les P bodies et les granules de stress sont deux types de foci cytosoliques formés par l'agrégation de RNP dont la traduction est inhibée. Afin de déterminer la nature des foci marqués par TUT1GFP, des expériences de colocalisation ont été réalisées avec des protéines marqueurs des P bodies et des granules de stress. Des constructions codant pour TUT1 fusionnée à une protéine fluorescente ont été coexprimées avec des constructions codant pour des protéines marqueurs de foci cytosoliques tels que DCP1RFP et DCP2RFP (P bodies) (Xu et al., 2006) ainsi que PAB2RFP et RBP47GFP (granules de stress) (Weber et al., 2008). DCP1 et DCP2 sont deux membres du complexe de decapping connus pour être associés aux P bodies (Xu et al., 2006). PAB2 (« poly(A) binding protein 2) est une protéine cytosolique associée aux queues poly(A) des ARNm. En cas de stress, certains ARNm en cours de traduction sont dissociés des polysomes et stockés avec leurs protéines PAB2 sous forme d'agrégats appelés granules de stress. La formation des granules de stress provoque une accumulation de la protéine PAB2RFP au niveau de ces foci. RBP47 est un composant de la machinerie nucléaire d'epissage, homologue à TIA-1 des mammifères. RBP47 a été montrée comme étant une protéine relocalisée au niveau des granules de stress cytosoliques après un stress comme un choc thermique (Weber et al., 2008). TUT1 fusionnée à une protéine fluorescente colocalise partiellement avec DCP1RFP et DCP2RFP dans les cellules de tabac BY2 (figure 14A), ainsi qu'avec PAB2RFP et RBP47GFP après un choc thermique de 30 minutes à 37°C (figure 14B). Ces résultats indiquent une localisation potentielle de TUT1GFP au niveau des P bodies et des granules de stress.

Afin de confirmer que les foci marqués par l'accumulation de TUT1GFP sont des P bodies et des granules de stress, un contrôle classique est un traitement cycloheximide. La cycloheximide bloque l'initiation et l'élongation de la traduction en se fixant sur les ribosomes. En cas de traitement cycloheximide, les ARNm ne peuvent plus quitter les polysomes et les P bodies et les granules de stress disparaissent. Lors de différentes expériences de colocalisation de TUT1GFP avec des marqueurs des P bodies et des granules de stress, le traitement cycloheximide n'a pas entraîné la disparition des foci cytosoliques marqués par TUT1GFP. Cependant, l'utilisation de cycloheximide sur des cellules végétales BY2 exprimant uniquement les marqueurs des P bodies ou des granules de stress n'a pas non plus abouti à la disparition des foci

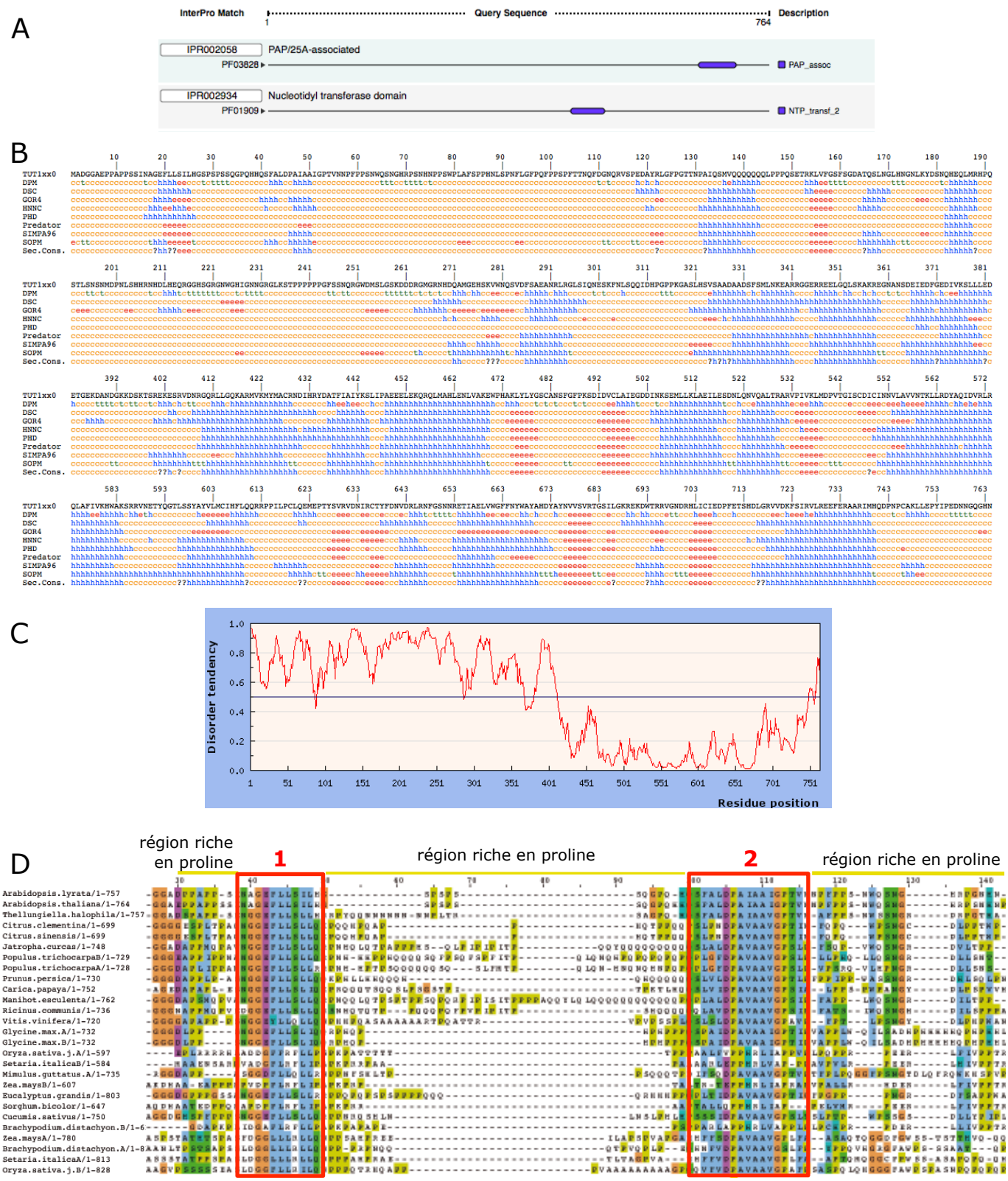


Figure 15 : La partie N terminale de TUT1 est non structurée et contient des motifs conservés chez les angiospermes

la protéine TUT1 peut être divisée en deux grandes parties, la partie C terminale étant homologue à Cid1 (31% d'identité, 53% de similarité), une TUT de *S. pombe*.

A. Le logiciel de recherche de domaine IntreproScan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/) n'identifie de domaine que dans la partie C terminale de TUT1.

B. La partie N terminale de TUT1 n'a que très peu de structure secondaire prédite selon le logiciel NPS@ (« Network Protein Sequence @nalysis » http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html). La partie N terminale est majoritairement composée de régions prédites de repliement aléatoire (orange) avec très peu d'hélice alpha (bleu) et de brin étendu (« extended strand » rouge). C. La séquence de TUT1 a été analysée avec le logiciel IUPred (http://anchor.enzim.hu/) dont la fonction est de déterminer la tendance de désordonnement. La partie N terminale de TUT1 a une nette tendance a être désorganisée. D. Un alignement des séquences de TUT1 et de ses homologues du monde végétal par Emilie Ferrier a permis de mettre en évidence que la partie N terminale contient des motifs conservés (1 et 2 illustrés ici) séparés par des régions riches en proline.

cytosoliques, indiquant donc une inefficacité du traitement dans nos conditions expérimentales. D'après mes informations, le traitement cycloheximide n'a jamais été réalisé sur des cellules végétales en culture mais uniquement sur des pointes de racines, de l'épiderme d'oignon ou des protoplastes. Afin de confirmer cette localisation au niveau de foci cytosoliques, il est nécessaire d'obtenir soit une lignée exprimant TUT1 fusionnée à une étiquette soit des anticorps dirigés contre la protéine TUT1. Ces lignées et/ou anticorps pourront être utilisés avec des lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant des marqueurs des P bodies et des granules de stress, fusionnés à des protéines fluorescentes. Ces lignées sont générées dans le cadre du projet ANR « RNP bodies ».

Même si l'association de TUT1 avec les P bodies et les granules de stress est uniquement potentielle à ce stade de notre étude, nos résultats suggèrent fortement une localisation cytosolique pour TUT1. Cette localisation indique que les substrats ARN de TUT1 sont probablement cytosoliques.

B. Architecture de la protéine TUT1

La protéine TUT1 est une protéine de 86 kDa qui comprend deux parties de taille semblable. La moitié N terminale ne contient aucun motif connu. La moitié C terminale de la protéine contient le domaine nucléotidyltransférase et le domaine associé aux PAP/OAS.

La partie C terminal de la protéine possède 31% d'identité et 53% de similarité avec Cid1 qui est responsable de l'uridylation des ARNm chez *S. pombe* (Rissland and Norbury, 2009). Le logiciel de prédiction de domaine InterProscan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/) identifie la présence du domaine nucléotidyltransférase et du domaine associé aux PAP dans cette partie de la protéine TUT1 (figure 15A). Cette partie est suffisante pour conférer une activité nucléotidyltransférase à TUT1 comme détaillé plus loin dans les résultats.

La partie N terminale ne contient aucun domaine protéique connu et l'analyse de la séquence protéique par le logiciel de prédiction de structure secondaire NPS@ (« Network Protein Sequence @nalysis » http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/ NPSA/npsa_seccons.html) montre une prédiction forte de repliement aléatoire dans la partie N terminale (figure 15B). Le logiciel NPS@ utilise plusieurs logiciels de prédiction de structure secondaire pour déterminer la

structure secondaire consensus. Une analyse supplémentaire par le logiciel IUPred confirme que la partie N terminale de TUT1 est prédite comme étant désorganisée (figure 15C). Elle possède notamment un pourcentage élevé de proline (14,8%) dans ses 250 premiers acides aminés. De manière intéressante, les homologues de TUT1 chez les autres espèces d'angiosperme possèdent également un domaine N terminal prédit comme intrinsèquement désorganisé et de taille similaire à celui de TUT1. De plus, l'organisation de la partie N terminale est très conservée. Des alignements effectués par Emilie Ferrier au laboratoire ont mis en évidence que des parties riches en proline séparent des régions très conservées ou motifs (figure 15D). Un rôle fonctionnel est fort probable pour ces motifs étant donné leur conservation. Ils pourraient notamment être impliqués soit dans la reconnaissance des substrats ARN de TUT1, soit dans l'interaction avec des protéines partenaires, deux fonctions potentielles en cours d'investigation au laboratoire.

C. Activité catalytique de TUT1

TUT1 a été incluse en 2007 dans une étude des homologues de Cid1 de *S. pombe* chez d'autres organismes (Kwak and Wickens, 2007). Ces expériences ont été réalisées par micro-injection d'ARNm codant pour les protéines candidates fusionnées à la séquence codant pour la protéine de coque du phage MS2. La fusion avec cette protéine virale permet de diriger l'action de cette protéine sur un ARN contenant la structure tige-boucle reconnue par la protéine virale (Bernardi and Spahr, 1972). Ces expériences ont permis de montrer que TUT1 possède une activité poly(U) polymérase dans les oocytes de xénope.

L'activité Terminale Uridylyl Transférase (TUTase) a été caractérisée en détail par Emilie Ferrier au laboratoire. Elle a pu montrer que la protéine recombinante TUT1 possède effectivement une activité poly(U) polymérase *in vitro* sur différent substrats ARN. TUT1 est capable d'uridyler n'importe quel ARN possédant une extrémité 3' libre. Lorsque les conditions optimales d'activité sont réunies, TUT1 est capable d'ajouter environ 200 uridines à l'extrémité 3' d'un ARN (voir figure 1 de l'article au paragraphe II D 2 des résultats). TUT1 possède une forte spécificité pour l'UTP *in vitro*, contrairement à Cid1 qui est aussi capable de catalyser efficacement l'ajout d'adénines. Une étude cinétique de l'activité de TUT1 *in vitro* a permis de

montrer que cette activité est distributive pour les premiers nucléotides ajoutés (voir figure 1 de l'article au paragraphe II D 2 des résultats).

In vitro, TUT1 est capable de catalyser l'ajout de nucléotides à une extrémité 3'OH d'ARN et reconnaît tous les types d'ARN testés. Cette absence de spécificité de reconnaissance d'un type de substrat ARN *in vitro* ne nous donne pas d'information sur ses cibles potentielles *in vivo*. Cependant, son activité distributive pour les premiers nucléotides ajoutés est spécifique à l'égard des uridines. Si la distributivité de TUT1 n'est pas modifiée par des facteurs *in vivo*, TUT1 n'ajoute vraisemblablement que quelques uridines à ses substrats *in planta*. Cette information a été cruciale dans ma recherche de substrats ARN de TUT1 *in planta.*

D. La caractérisation de TUT1 a permis l'identification d'un nouveau rôle de l'uridylation des ARN

Etant donnée la localisation cytosolique probable de la protéine TUT1GFP, nous avons tout d'abord cherché un rôle potentiel de TUT1 dans l'uridylation de cibles ARN cytosoliques. Les substrats potentiels de TUT1 comprennent les petits ARN (mi/siRNA) (Li et al., 2005), les fragments 5' des ARNm clivés par le complexe RISC (Shen and Goodman, 2004) et les ARNm. Ces derniers n'avaient jamais été montrés comme uridylés chez les plantes mais le sont chez la levure *S. pombe* (Rissland and Norbury, 2009). Pour identifier les substrats de TUT1, nous avons utilisé une approche de génétique inverse et étudié des mutants d'insertion de *TUT1*.

1) Présentation des mutants tut1

Afin d'étudier le rôle de TUT1 chez *A. thaliana* par une approche de génétique inverse, des lignées mutantes *tut1* ont été sélectionnées. Plusieurs lignées d'insertion T-DNA dans le gène At2g45620 sont disponibles. Parmi ces mutants, deux ont particulièrement retenu notre attention (figure 16A). Le premier mutant *tut1-1* correspond à la lignée SALK_087647c. Son insertion se trouve au milieu du premier exon dans la partie codante du gène. Le site d'insertion du T-DNA a pu être partiellement confirmé par séquençage du produit PCR obtenu après amplification de la région génomique située au niveau de la bordure gauche du T-DNA. La bordure droite du T-DNA n'a pas pu être amplifiée (figure 16A).

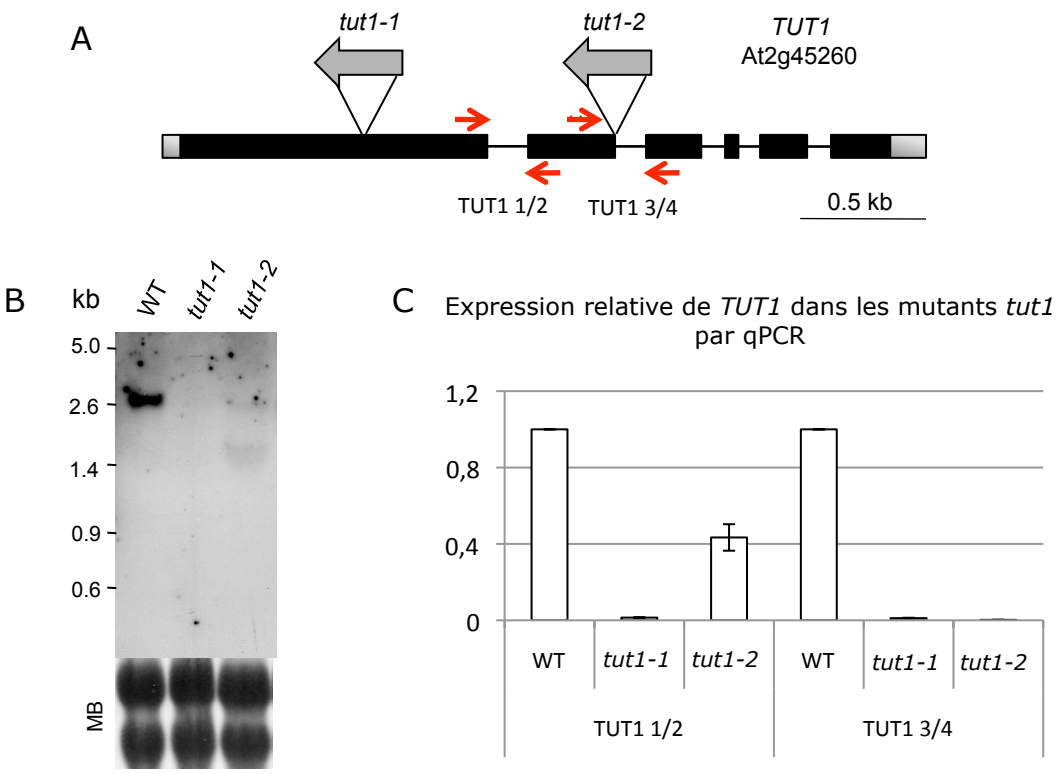


Figure 16 : Caractérisation des mutants *tut1*

A. Le modèle du gène *TUT1* est présenté, les exons du gène étant représentés par des blocs et les introns par des lignes reliant les blocs. La partie codante du gène est en noir et les régions non traduites (UTR) en gris. Les sites d'insertions des T-DNA des lignées *tut1-1* et *tut1-2* ainsi que l'orientation de ces insertions sont indiquées par des flèches grises au dessus du modèle de gène. Les positions des insertions ont été confirmées par séquençage de la bordure gauche du T-DNA pour *tut1-1* et des bordures gauche et droite pour *tut1-2*. La position des couples d'amorces oligonucléotidiques TUT1 1/2 et TUT1 3/4, utilisés en qPCR, est indiquée sur le modèle du gène par des flèches rouges.

B. Une analyse par northern blot de l'expression de *TUT1* dans les lignées *tut1-1* et *tut1-2* sur 30 µg d'ARN total de fleurs a été réalisée. Aucune expression de *TUT1* n'a pu être mise en évidence dans la lignée *tut1-1*. Deux bandes correspondant à des tailles inférieures (2,6 et 1,5 kb environ) à la taille du transcrit TUT1 (2,7 kb) apparaît dans la piste *tut1-2*. L'intensité de ces bandes est très largement inférieure à celle de la bande dans les plantes sauvage (WT). La coloration de la membrane au bleu de méthylène (MB) est montrée pour contrôle de charge.

C. L'expression relative de *TUT1* dans les deux lignées mutantes, mesurée par qPCR, est présentée. Les résultats confirment que la lignée *tut1-1* n'exprime plus l'ARNm TUT1. Une expression de *TUT1* est constatée dans la lignée *tut1-2* à hauteur de 0,4 environ par rapport aux plantes sauvages avec le couple d'amorce TUT1 1/2. Aucune expression n'est constatée avec le couple d'amorces TUT1 3/4.

Le deuxième mutant *tut1-2* correspond à la lignée WiscDSLoxHS208_08D dont l'insertion est prédite à la fin de l'exon 2. Le site d'insertion exact du T-DNA a pu être déterminé par séquençage des produits PCR issus de l'amplification des bordures droite et gauche du T-DNA. Ces expériences ont montré que le T-DNA est inséré au niveau du site d'épissage 5' de l'intron 2, à la limite exacte entre exon2 et intron 2 (figure 16A). Cette insertion se trouve dans la partie du gène codant pour le domaine nucléotidyltransférase, moins d'une centaine de base en aval de la région codant pour les résidus aspartates impliqués dans la coordination de l'ion magnésium, indispensables pour l'activité de la protéine.

Ces mutants ont été analysés pour étudier une altération potentielle de l'expression du gène *TUT1* par leur insertion respective. L'expression du gène *TUT1* a été vérifiée par northern blot et par qPCR dans ces deux lignées après obtention de plantes homozygotes pour l'insertion des T-DNA. La lignée *tut1-1* ne montre aucune expression du gène *TUT1* par northern blot (figure 16B). Pour la lignée *tut1-2*, un signal très faible d'expression de *TUT1* est observé. Cependant, ce signal obtenu pour la lignée *tut1-2* montre la présence de deux ARN plus petits que l'ARNm TUT1 dans les plantes sauvages (figure 16B).

En qPCR, l'expression relative du gène *TUT1* a été determinée dans les lignées *tut1-1* et *tut1-2* par rapport au type sauvage à l'aide de deux couples d'amorces (figure 16C). Le premier couple d'amorces, TUT1 1/2, encadre le premier intron et le deuxième couple d'amorces, TUT1 3/4, encadre le deuxième intron. Le deuxième couple d'amorces a été choisi afin de vérifier que la lignée *tut1-2* ne produisait pas d'ARNm TUT1 fonctionnel après épissage. La lignée *tut1-1* possède une expression relative de *TUT1* négligeable pour les deux couples d'amorces par rapport aux plantes sauvages. Pour la lignée *tut1-2*, l'expression relative de TUT1 est 0,43 et 0,002 pour les couples d'amorces TUT1 1/2 et 3/4 respectivement. Le résultat obtenu avec le couple d'amorce TUT1 3/4 pour la lignée *tut1-2* montre que l'insertion du T-DNA prévient la production d'un ARNm mature.

L'ensemble de ces analyses a permis l'identification de deux mutants *tut1*. La lignée *tut1-1* a constitué notre principal outil pour la recherche de phénotypes moléculaires et l'identification des substrats de TUT1. La lignée *tut1-2* a été utilisée pour confirmer les résultats obtenus avec la première lignée. A l'instar de *tut1-1*, la

lignée *tut1-2* correspond à un mutant nul de TUT1 étant donné que le phénotype moléculaire lié à l'absence de TUT1 est observé dans ces deux lignées.

Au niveau du phénotype développemental, aucun de ces deux mutants n'a montré de particularité, tant au niveau de l'architecture des plantes que du temps nécessaire au développement. Les tests de germination *in vitro* en présence de différents stress abiotiques (stress osmotique, stress salin) n'ont montré aucune différence entre les graines de type sauvage et les graines *tut1-1*.

2) L'uridylation protège les extrémités 3' des transcrits déadénylés

Les résultats que je vais présenter maintenant ont constitué la partie la plus importante de ma thèse. Au moment de l'écriture de ce manuscrit, les fruits de ce travail ont fait l'objet de l'écriture d'un article inclus dans cette partie des résultats. A l'opposé du rôle déstabilisateur de l'uridylation des ARNm décrit jusqu'à maintenant, l'étude réalisée sur le mutant *tut1* a mis en lumière un nouveau rôle de protection des extrémités 3' des ARNm par l'uridylation.

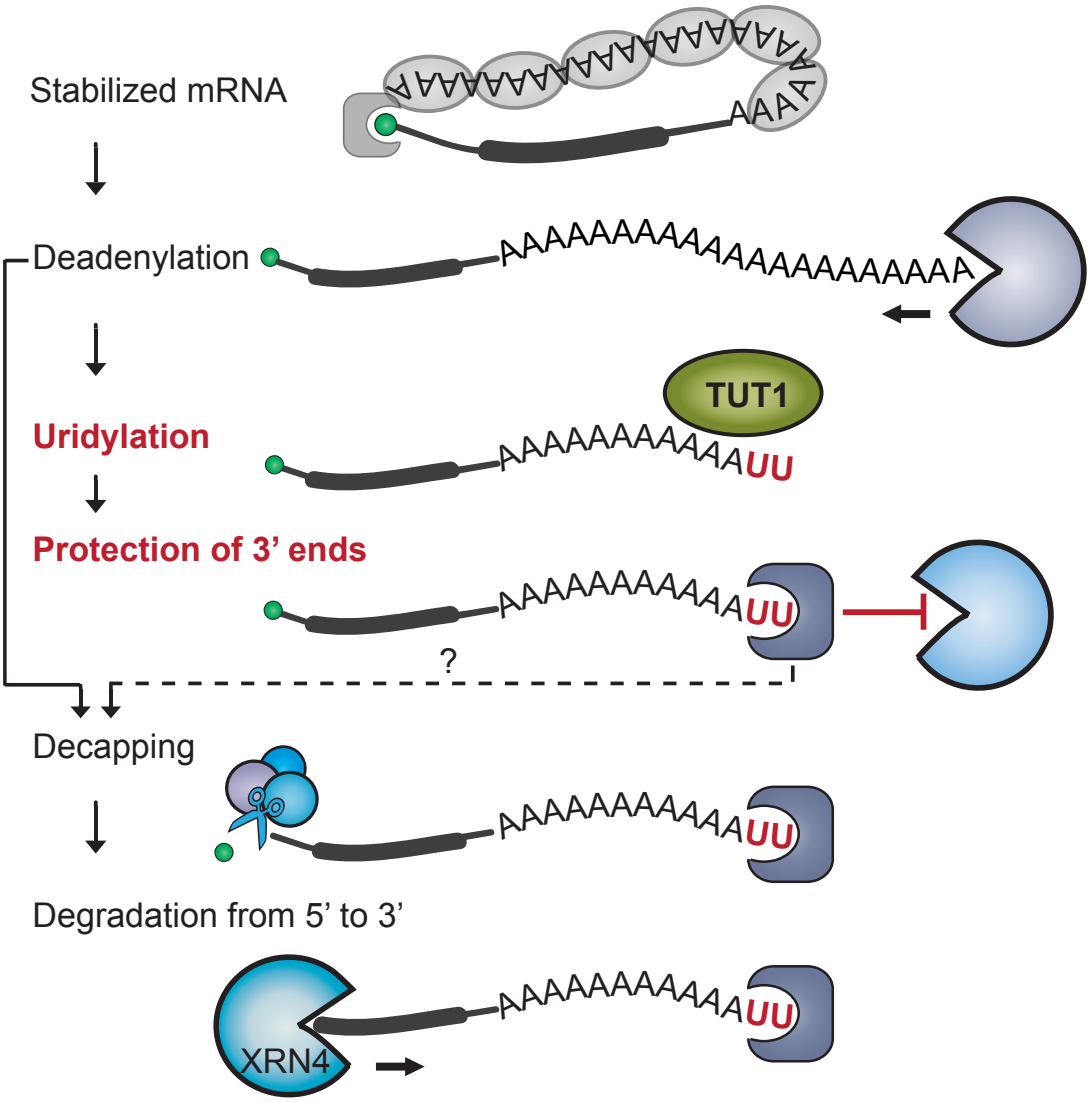
L'uridylation des ARNm a été montrée comme étant le processus déclencheur d'une voie de dégradation des ARNm parallèle à celle de la déadénylation chez *S. pombe* (Rissland and Norbury, 2009). Nos expériences ont montré que les ARNm peuvent également être uridylés chez *A. thaliana*.. Mais contrairement à *S. pombe*, l'uridylation intervient après déadénylation. Ce résultat suggère que ce processus d'uridylation des ARNm est intégré à la voie de dégradation des ARNm déclenchée par la déadénylation. Une observation similaire vient d'être rapportée pour l'ARNm CCR2 d'*A. thaliana* (Morozov et al., 2012). Toutefois, nos résultats montrent que l'uridylation ne semble pas avoir d'impact majeur sur la vitesse de dégradation des ARNm mais est essentielle pour prévenir la formation de transcrits tronqués en 3'. Chez *A. thaliana*, l'uridylation protège l'extrémité 3' des ARNm déadénylés d'une activité 3'-5' exoribonucléase qui peut compromettre l'intégrité de l'ARNm. En absence de TUT1 et d'uridylation des messagers, des ARNm avec des extrémités 3' non ou déadénylés s'accumulent, rognés parfois jusque dans leur séquence codante.

Il a été montré en 2009 que des ARNm pouvaient être soumis à une dégradation co-traductionnelle chez *S. cerevisiae* (Hu et al., 2009). Ce phénomène montre que l'ARNm associé aux polysomes, traduit de 5' en 3' par les ribosomes, peut être la cible d'une activité 5'-3' exoribonucléase dégradant le transcrit dans le sens de

la lecture. Cette dégradation co-traductionnelle de certains transcrits implique que la polarité 5'-3' de dégradation des ARNm est un système mis en place pour assurer l'achèvement correct de la traduction par le dernier ribosome associé à l'ARNm. Nous avons pu détecté la présence de transcrits tronqués au niveau des polysomes dans le mutant *tut1*, montrant l'impact potentiellement délétère de la non-protection des extrémités 3' des ARNm déadénylés. Chez *A. thaliana,* l'uridylation des ARNm fait donc partie intégrante des processus responsables de l'établissement de la polarité de dégradation des ARNm au niveau des polysomes en empêchant toute attaque de l'extrémité 3'.

Jusqu'à présent, l'étude de l'uridylation des ARN cytosoliques a toujours montré le rôle déstabilisateur de cette modification des ARN (Norbury, 2010). Le travail présenté ici constitue la première démonstration d'un rôle de protection des extrémités 3' des ARNm par l'uridylation.

Graphical abstract



Uridylation prevents the formation of aberrant mRNAs

François Michael Sement[1], Emilie Ferrier[1], Hélène Zuber[1], Rémy Merret[2], Abdelmalek Alioua[1], Jean-Marc Deragon[2], Cécile Bousquet-Antonelli[2], Heike Lange[1] and Dominique Gagliardi[1,*]

[1]Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Strasbourg, 12 rue du général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France. [2]Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Perpignan Via Domitia, 66860 Perpignan Cedex, France.

[*]Corresponding author. Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue du général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France. Email: dominique.gagliardi@ibmp-cnrs.unistra.fr Tel: +33 3 67 15 53 66 FAX: + 33 3 88 61 44 42

Running title: Uridylation protects mRNAs from 3' trimming

ABSTRACT

RNA quality control mechanisms are key processes of gene expression in charge of detecting and eliminating defective transcripts. These defective, potentially deleterious, RNAs are accidentally generated during transcription and throughout the many steps of RNA maturation. Degradation processes must also efficiently prevent the leakage of degradation intermediates akin to aberrant RNAs. Here we report that uridylation protects deadenylated mRNAs from further deadenylation and 3' to 5' attacks in the body of the mRNA in Arabidopsis. We propose that uridylation acts upstream of RNA quality control by preventing the formation of aberrant, 3' truncated transcripts during the process of RNA degradation and that uridylation

favors 5' to 3' directionality of mRNA degradation. Importantly, uridylation prevents 3' shortening of mRNAs associated with polysomes suggesting that a key biological function of uridylation is to prevent the translation of truncated mRNAs.

HIGHLIGTHS

- Deadenylation of mRNAs is followed by uridylation in Arabidopsis
- Uridylation protects deadenylated mRNAs from 3' attacks
- Uridylation favors 5' to 3' directionality of mRNA degradation
- Lack of uridylation results in the presence of 3' shortened, aberrant mRNAs in polysomal fractions

INTRODUCTION

Ensuring the accurate expression of genetic information is of vital importance for every organism. RNA Quality Control (RQC) pathways are in charge of detecting and destroying aberrant transcripts (Doma and Parker, 2007; Houseley and Tollervey, 2009; Reznik and Lykke-Andersen, 2010). In plants, *Caenorhabditis elegans* and certain fungi, aberrant RNAs are also silenced by small RNA pathways. In this case, aberrant RNAs are recognized by RNA-dependent RNA polymerases (RdRPs) (Voinnet, 2008). RdRPs, via the synthesis of double-stranded RNA, initiate the production of siRNAs that mediate the silencing of homologous sequences (Voinnet, 2008). Not surprisingly, siRNAs pathways and RQC processes are intertwined. For example, slowing down the degradation of aberrant transcripts such as uncapped mRNAs in Arabidopsis promotes their recognition by the siRNA pathway (Gazzani et al., 2004; Gregory et al., 2008; Gy et al., 2007).

In addition to its fundamental role in clearing the cell of aberrant transcripts, the main function of RNA degradation remains the turn-over of all coding and non-coding RNAs, a potent mean of regulating gene expression. Degradation of mRNAs is usually initiated by a deadenylation step (Chen and Shyu, 2011). Deadenylation leads to decapping and subsequent 5’ to 3’ degradation by XRN proteins, or alternatively to 3' to 5' degradation by the exosome. Decapping can also be induced by uridylation as

shown for the non-polyadenylated histone mRNAs in humans, several mRNAs in *Schizosaccharomyces pombe* and the *gdhA* mRNAs in *Aspergillus nidulans* (Morozov et al., 2010; Mullen and Marzluff, 2008; Rissland and Norbury, 2009). Uridylation also enhances 5' to 3' degradation of RISC-cleaved transcripts in Arabidopsis (Shen and Goodman, 2004) and influences the stability or function of small RNAs or their precursor (Hagan et al., 2009; Heo et al., 2009; Ibrahim et al., 2010; Lehrbach et al., 2009; Ren et al., 2012; Wyman et al., 2011; Zhao et al., 2012). Collectively, these data reveal an emerging role of uridylation in controlling transcript stability in eukaryotes (Norbury, 2010).

In *S. pombe*, mRNAs are uridylated by the terminal uridylyltransferase Cid1 (Rissland et al., 2007). The Arabidopsis Cid1 homologue, encoded by At2g45620, catalyses the addition of uridines when artificially tethered to a non-adenylated reporter RNA ectopically expressed in Xenope oocytes (Kwak and Wickens, 2007). Here, we describe the function of the At2g45620 gene product that we named *TERMINAL URIDYLYLTRANSFERASE 1* (*TUT1*). We show that TUT1 targets mRNAs *in vivo* and that uridylation is preceded by shortening of the poly(A) tail. More importantly, uridylation is necessary to avoid complete deadenylation and 3' attacks to the body of mRNAs. Our data indicate that uridylation prevents the formation of 3' truncated, aberrant transcripts during the process of mRNA degradation. Interestingly, uridylated mRNAs are detected in polysomal fractions. We propose that one biological benefit of protecting mRNA 3' end by uridylation is to prevent the translation of 3' truncated mRNAs.

RESULTS

The Arabidopsis gene *At2g45620* encodes a cytosolic terminal uridylyltransferase

The intracellular localization of TUT1 was determined by expressing fluorescent fusion proteins. Expression of TUT1-GFP or TUT1-RFP resulted in a diffuse fluorescence signal throughout the cytosol (Figure 1A). In addition, discrete foci were observed in all cells examined. To identify the nature of these foci, TUT1-GFP or TUT1-RFP was co-expressed with DCP1-RFP or RBP47-GFP, markers of processing bodies (P-Bodies) and stress granules, respectively (Weber et al., 2008; Xu et al.,

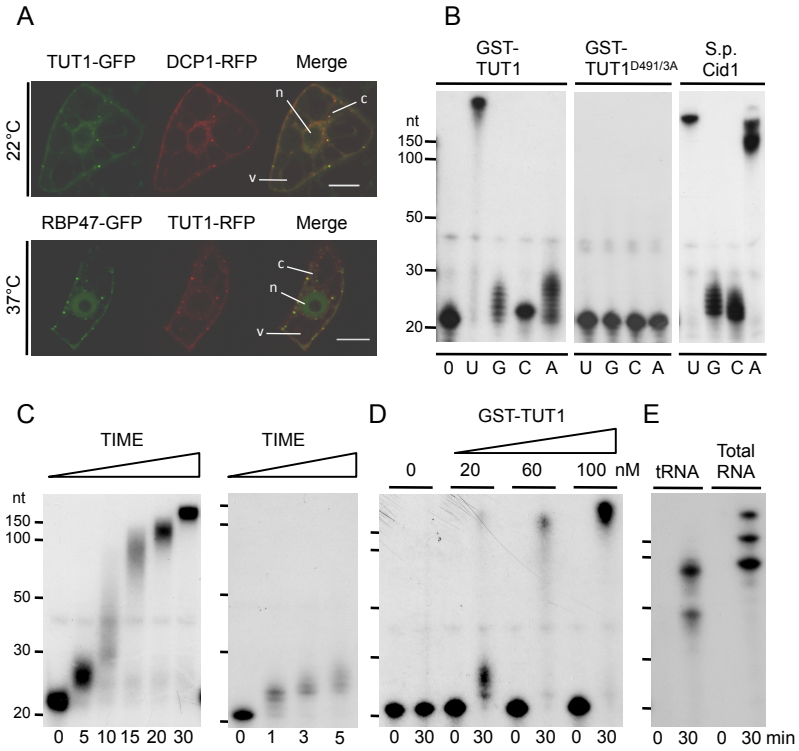


Figure 1. TUT1 is a cytosolic terminal uridylyltransferase.

(A) TUT1 is a cytosolic protein. Transient expression of TUT1 fused to GFP (upper panel) or RFP (lower panel) in tobacco BY-2 cells. Markers of P-bodies and stress granules were DCP1-RFP and RBP47-GFP, respectively. Cells shown in the lower panel were incubated 30 min at 37°C prior to observation. n, nucleus; v, vacuole; c, cytosol. Scale bars are 30 µm (top) and 15 µm (bottom).

(B to E) Catalytic properties of TUT1. Reaction products were separated on 17% denaturing polyacrylamide gels prior to autoradiography. The migration of size standards (150, 100, 50, 30 and 20 nt) is indicated on the left. Incubation time is indicated in minutes at the bottom of panels C to E.

(B) TUT1 is a terminal uridylyltransferase. GST-TUT1 or the catalytically inactive mutant GST-TUT1$^{D491/3A}$ were incubated for 30 min with a 21 nucleotide 5' [^{32}P]-labeled synthetic RNA without (0) or in the presence of 1 mM of each ribonucleotide as indicated. For comparison, the catalytic activity of *S. pombe* Cid1 is shown.

(C) and (D) TUT1's activity is distributive for the first added nucleotides as shown by time-course analysis or dilution experiments, respectively.

(E) TUT1 uridylates different types of RNA substrates *in vitro*. Total plant RNA and yeast tRNAs were incubated with GST-TUT1 and [α ^{32}P]-UTP as described in experimental procedures.

2006). DCP1 is a subunit of the decapping complex (Xu et al., 2006) and RBP47 together with UBP1 are nuclear components of the pre-mRNA splicing machinery, homologous to mammalian TIA1. RBP47 was shown to relocalize to cytoplasmic stress granules upon heat shock or hypoxia (Weber et al., 2008). The partial co-localization of TUT1 with DCP1 and with RBP47 following heat stress suggests that TUT1 can associate with cytosolic RNP granules (Figure 1A). These results also provide a first hint that TUT1 targets cytosolic RNAs. To characterize the nucleotidyltransferase activity of TUT1, we produced recombinant proteins corresponding either to the wild-type protein or to a mutated version in which two conserved aspartate residues (D491 and D493) essential for catalysis of nucleotidyltransferases were mutated to alanines. The nucleotidyltransferase activity of both proteins was tested using a synthetic oligoribonucleotide substrate and conditions previously used to describe Cid1's activity (Rissland et al., 2007). No activity was observed for the mutant protein $TUT1^{D491/3A}$ whereas TUT1 showed a robust uridylation activity (Figure 1B). Under these assay conditions characterized by a high Mg^{2+} concentration (5 mM), TUT1 synthesizes tails of more than 200 Us while only between 1 to 9 of the three other ribonucleotides are appended to the RNA substrate in 30 min. Interestingly and unlike recombinant Cid1 (Rissland et al., 2007), TUT1 appears intrinsically able to discriminate between UTP and ATP *in vitro* (Figure 1B).

Testing the stringency of TUT1's nucleotide specificity *in vitro* entailed the use of high concentrations of recombinant TUT1 and Mg^{2+} ions (100 nM and 5 mM, respectively) to maximize activity. Under these conditions, large U-tails are polymerized (Figures 1B) which very unlikely reflect the *in vivo* situation. In fact, a time course analysis reveals that up to 10 Us are added within 5 minutes to each RNA substrate molecule before tails are elongated (Figure 1C, left panel). Remarkably, TUT1 adds from 1 to 3 Us to almost all RNA substrate molecules within a single minute (Figure 1C, right panel). Therefore, the activity of TUT1 is distributive for the first added nucleotides. Also, decreasing TUT1 concentration resulted in the appearance of a population of RNA substrates modified by the addition of up to 10 Us which confirms the distributivity of TUT1 for the first added nucleotides (Figure 1D). Unless the distributive action of TUT1 is modified by *in vivo* factors, these data indicate that

TUT1's RNA substrates could be modified by the addition of a limited number of uridines *in vivo*. The *in vitro* experiments also revealed that TUT1 has no intrinsic specificity towards particular RNA substrates since total RNA and structured RNAs such as tRNAs can be uridylated by TUT1 (Figure 1E). Taken together, these data show that Arabidopsis TUT1 is a cytosolic terminal uridylyltransferase with a marked preference for uridine polymerization and a distributive activity for the first added nucleotides.

TUT1 preferentially uridylates deadenylated mRNAs

To identify *in vivo* targets of TUT1, we investigated mRNA uridylation by nested 3' RACE PCR experiments using gene-specific forward primers and reverse primers complementary to a 3' ligated anchor sequence. An initial screen based on mRNAs chosen for distinctive features including rapid or long half-lives, presence or absence of introns or miRNA target sites revealed that any mRNA that we investigated is a substrate of TUT1. Detailed features of mRNA uridylation are presented for five mRNAs: *LOM1* (At2g45160)*, DREB2C* (At2g40340), *BAM3* (At4g20270), At2g21560 and At5g48250. *LOM1* (*LOST OF MERISTEM1*) encodes a SCARECROW-like transcription factor, *DREB2C* (*DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2C*) a member of the DREB subfamily A-2 of ERF/AP2 transcription factor family, *BAM3* (*BARELY ANY MERISTEM 3*) a CLAVATA1-related leucine-rich receptor-like protein kinase. At2g21560 and At5g48250 encode a protein of unknown function and a B-box Zinc finger transcription factor, respectively, and were identified among genes misregulated in *tut1* (see Figure S1 for the description of *tut1* mutants used in this study and Figure S3 for microarray data). The uridylation status of *LOM1, DREB2C, BAM3,* At2g21560 and At5g48250 mRNAs was compared between WT, *tut1* and *xrn4* mutants (Figure 2, the 3' RACE PCR profiles are presented in Figure 4A for *LOM1, DREB2C, BAM3* and in Figure 5D for At2g21560 and At5g48250). A *xrn4* mutant was included in the analysis since XRN4 is the Arabidopsis 5' to 3' cytosolic exoribonuclease (Kastenmayer and Green, 2000), a reasonable candidate for degrading uridylated mRNAs by analogy with the data reported for humans and *S. pombe* (Mullen and Marzluff, 2008; Rissland and Norbury, 2009). Four key observations were made. First, 14% (6/43) of *LOM1*, 43% (26/60) of *DREB2C,* 36% (23/64) of *BAM3*, 57% (33/58) of At2g21560 and 18% (19/105) of At5g48250

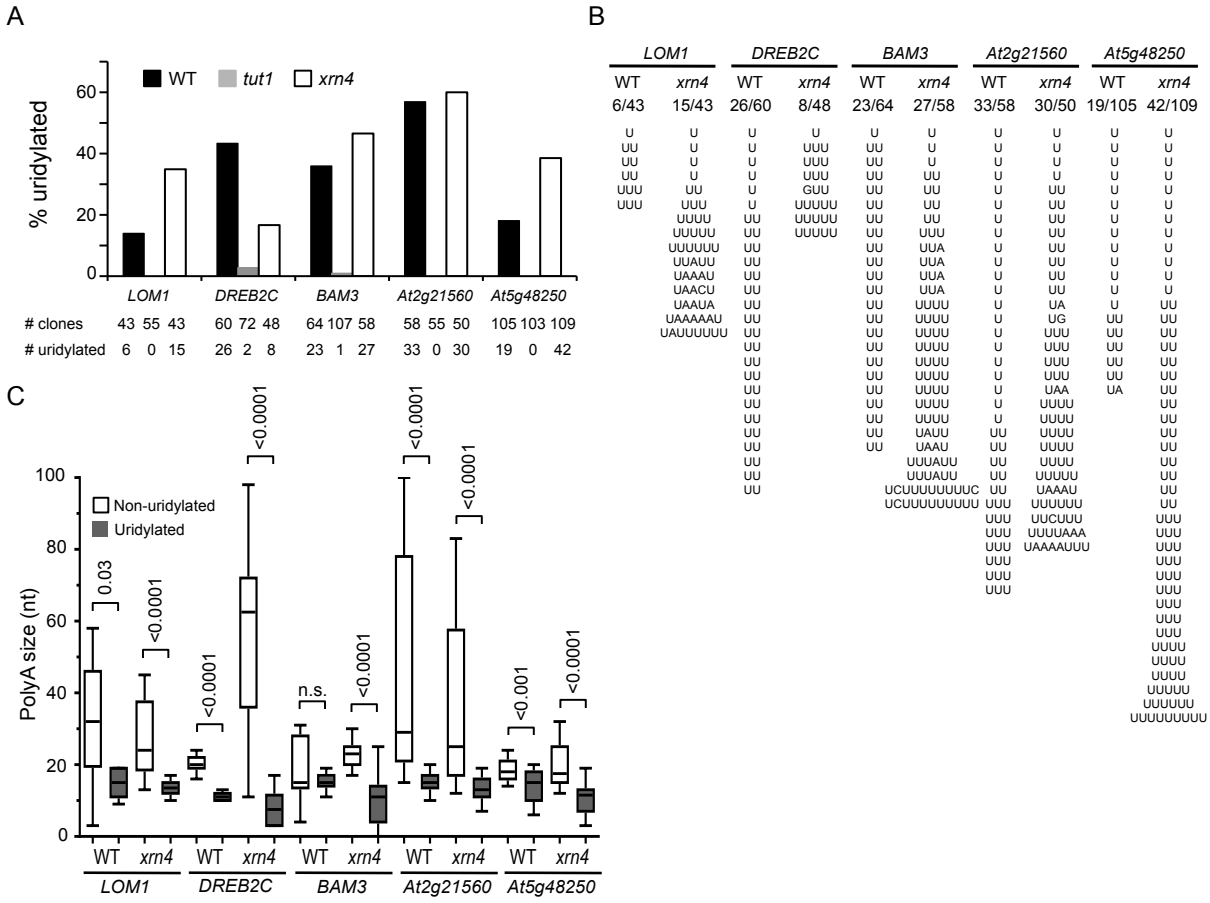


Figure 2. Deadenylation precedes uridylation.

(A) TUT1 uridylates mRNAs. Percentage of uridylated mRNAs determined by 3' RACE PCR in WT, *tut1* and *xrn4* for *LOM1* (At2g45160), *DREB2C* (At2g40340), *BAM3* (At4g20270), At2g21560 and At5g48250 (n=2). The characterization of *tut1* mutants is shown in Figure S1 and representative 3' RACE PCR profiles are shown in Figures 4A and 6. Number of clones (# clones) and number of clones corresponding to uridylated mRNAs (# uridylated) are indicated for each genotype.

(B) Composition and length of U-tails detected at the 3' ends of *LOM1*, *DREB2C*, *BAM3*, At2g21560 and At5g48250 mRNAs in WT and *xrn4*. The number of clones corresponding to uridylated mRNAs on the total number of clones is indicated.

(C) Deadenylation precedes uridylation. Box plot analysis of poly(A) tail length distribution for non-uridylated (white) and uridylated (grey) *LOM1*, *DREB2C*, *BAM3*, At2g21560 and At5g48250 mRNAs in WT and *xrn4* as indicated. The second and third quartiles are shown by the box edges, the median is indicated by a horizontal bar, whiskers show the range of data except far-outliers. p-values (Mann-Whitney test) are indicated for each pair, except when non-significant (n.s.).

Sement_Figure 2

mRNAs were uridylated in WT (Figure 2A). This shows that mRNAs can be uridylated in Arabidopsis and that mRNA uridylation is likely a common process since we detected the uridylation of all mRNAs we tested in the course of this study. Second, composition and length of the tails differ in WT and *xrn4* backgrounds. Whereas 92% (98/107) of uridylated clones had either 1 or 2 uridines in WT, the majority of the oligo(U) tails (68/122) were at least 3 nucleotide long in *xrn4* and could reach up to 11 nucleotides (Figure 2B). In addition, the short tails in WT were almost exclusively composed of Us (180/181 nucleotides) whereas the oligo(U)-rich tails in *xrn4* included up to 10% As (37/381). The fact that both length and composition of U-tails are modified in absence of XRN4 suggests that uridylated mRNAs are substrates of XRN4. Third, no uridylated transcript for LOM1 (0/55), At2g21560 (0/55) and At5g48250 (0/103) was detected in *tut1* and only 2/72 *DREB2C* clones and 1/107 *BAM3* clones corresponded to uridylated transcripts in *tut1* (Figure 2A). These results show that TUT1 is the main nucleotidyltransferase responsible for uridylating mRNAs in Arabidopsis. Fourth, uridylated transcripts had shorter poly(A) tails than non-uridylated ones (Figure 2C). A large range of poly(A) tail lengths was observed for the different transcripts analyzed and larger poly(A) tails were detected occasionally in *xrn4*. However, the significance of this latter observation remains to be determined as the increase in *xrn4* was not systematically observed. It is important to point out that the 3' RACE PCR strategy used here has the advantages of being gene-specific, extremely sensitive and allows the detection of a single uridine present at the 3' end of a poly(A) tail. This method is therefore well suited for detecting uridylated RNAs and comparing their occurrence between genotypes. However, it entails the preferential detection of shorter versus longer tails and therefore the actual length of long poly(A) tails could be underestimated. In spite of this technical limitation, a reduction in size of poly(A) tails was systematically observed for uridylated mRNAs as compared to non-uridylated ones (Figure 2C). Overall, the average sizes of poly(A) tails for nonuridylated and uridylated mRNAs were 37 and 13, respectively (Mann Whitney test $p<0.0001$, $n=299$ and 229, respectively) indicating that TUT1 preferentially uridylates deadenylated mRNAs.

Uridylation marks uncapped, 5' shortened transcripts

Uridylation was reported to enhance decapping of mRNAs in *S. pombe* and *Aspergillus*

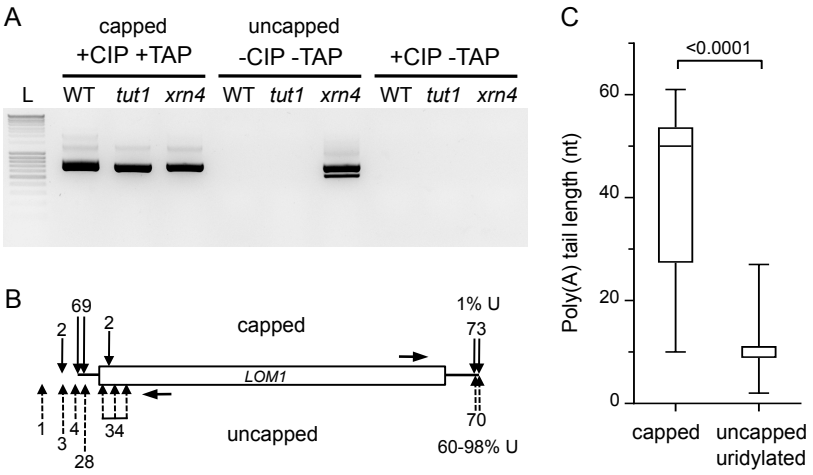


Figure 3. Uridylation marks 5' shortened, uncapped *LOM1* mRNAs.
(A) Detection of capped and uncapped *LOM1* mRNAs by circular RT-PCR analysis following combinations of CIP and TAP treatments as indicated. The negative image of an ethidium bromide stained agarose gel is shown.
(B) Most uncapped *LOM1* mRNAs are uridylated. Positions of 5' and 3' ends of capped (black arrows above diagram) and uncapped (dashed arrows below diagram) *LOM1* mRNAs in *xrn4*. 73 and 70 clones were analyzed for capped and uncapped mRNAs, respectively. The numbers of clones is indicated for each position. The position of primers used for cRT-PCR is indicated by horizontal arrows. The percentage of clones corresponding to uridylated mRNAs is shown at the 3' ends.
(C) Uncapped, uridylated *LOM1* mRNAs have shorter poly(A) tails in *xrn4* as compared to capped transcripts. Box plot analysis as in Figure 2.

nidulans and of non-polyadenylated histone mRNAs in humans (Morozov et al., 2010; Mullen and Marzluff, 2008; Rissland and Norbury, 2009). We therefore compared the proportion of uridylated transcripts between capped and uncapped *LOM1* transcripts by circular RT-PCR (cRT-PCR). Capped *LOM1* transcripts were detected in WT, *tut1* and *xrn4* whereas uncapped *LOM1* mRNAs accumulated to detectable levels only in *xrn4* (Figure 3A). This is in line with the idea that uncapped transcripts are degraded by XRN4. The 3' extremities of both capped and uncapped transcripts in *xrn4* mapped between positions +2074 to +2102 (Figure 3B). For the uncapped samples, 42 out of 70 clones were uridylated and only 2 out of 70 were not. For the rest of the clones (26/70), sequence analysis of cRT-PCR products cannot discriminate between uridines that could be either genomically-encoded at the 5' or added at the 3' extremities. We favor the latter possibility since more than 90% of the uridylated *LOM1* mRNAs had shortened poly(A) tails and half of them correspond to 5' truncated transcripts (see below). Therefore up to 98% of the clones in the uncapped sample correspond to uridylated transcripts. By contrast, only 1 out of 73 clones for capped transcripts was uridylated. In addition, 95% (69/73) of 5' extremities of capped transcripts map at or within 27-nt downstream of the known *LOM1* 5' ends. By contrast, the 5' extremities of 49% (34/70) of uncapped transcripts map within the coding sequence, indicating that a 5' shortening occurs even in absence of the known cytosolic 5' to 3' exoribonuclease XRN4 (Figure 3B). Whether these 5' shortened transcripts in *xrn4* are generated by an endoribonuclease activity or by a cytosolic 5' to 3' exoribonuclease distinct from XRN4 is presently unknown. The cRT-PCR experiments also confirmed that uridylated *LOM1* transcripts have a decreased poly(A) size as compared to non-uridylated, capped transcripts (Figure 3C). In *xrn4*, the *LOM1* poly(A) tail distribution had a median of 50 for capped transcripts and 11 for uridylated, uncapped transcripts ($p<0.0001$, Mann-Whitney test). The prevalence of uridylated transcripts in the uncapped fraction, the 5' shortening of uridylated transcripts and the fact that uridylated transcripts have short poly(A) tails strongly suggest that in Arabidopsis, mRNA uridylation is linked to decapping and 5' to 3' degradation. However, none of the phenotypes linked with compromised decapping or 5' to 3' RNA degradation in Arabidopsis were observed in *tut1* mutants. For instance, *tut1* mutants do not show the ethylene-insensitive phenotype of *xrn4* seedlings (Olmedo et al., 2006; Potuschak et al., 2006) (Figure S2) and we did not

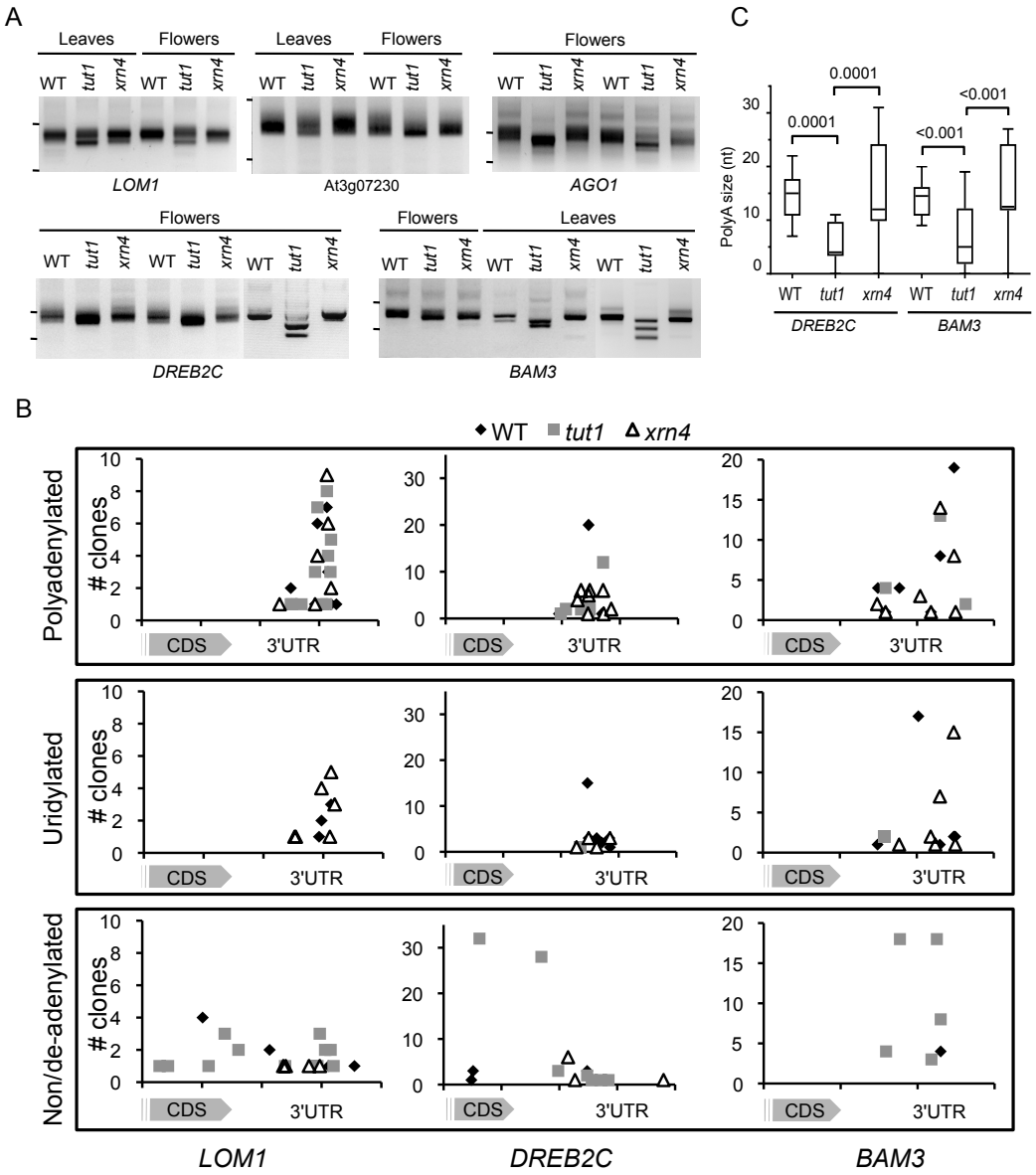


Figure 4. Uridylation protects from 3' shortening.
(A) mRNA 3' shortening in *tut1* detected by 3' RACE PCR. Genotypes, tissues and gene identities are indicated for all panels corresponding to negative images of ethidium bromide stained 2% agarose gels. The migration of 0.5 and 0.2 kbp size standards are shown on the left.
(B) 3' truncated transcripts accumulate in *tut1*. Number of clones (n=141 for *LOM1*, n=180 for *DREB2C*, n=229 for *BAM3*) from at least two independent experiments and corresponding to polyadenylated, uridylated, non/ deadenylated (from 0 to 10 As) mRNAs plotted against position alongside the 3' region of each respective mRNA as indicated. One interval on abscissas is 100 nt.
(C) Increased deadenylation of *DREB2C* and *BAM3* mRNAs in *tut1*. Box plot analysis as in Figure 2.

observe abnormalities in embryo-to-seedling transition, a developmental step strongly affected by the loss of decapping activity (Goeres et al., 2007; Xu et al., 2006). Taken together, these data show that uridylation preferentially marks decapped, 5' shortened transcripts but suggest that decapping is not adversely compromised in *tut1* mutants.

Uridylation protects deadenylated mRNAs from 3' trimming

Interestingly, distinctive 3' RACE PCR patterns were observed in *tut1* for *LOM1*, *DREB2C*, *BAM3* as well as for two other tested transcripts At3g07230 and *AGO1* (At1g48410) (Figure 4A). Identical observations were subsequently made for 18 other tested mRNAs (Figures 5D and S4). Two types of differences were observed in *tut1*: a slight but systematic reduction in the size of the main amplification products and the occasional presence of additional bands with reduced size (Figure 4A). As shown for several experiments for *BAM3* and *DREB2C*, heterogeneous patterns are observed in *tut1.* This suggests the occasional amplification of low abundant degradation intermediates. Both the systematic size reduction of PCR products in *tut1* and the occasional amplification of even shorter products were explained by sequence analysis for *LOM1*, *DREB2C* and *BAM3*. Cloned 3' RACE PCR products fell into three categories corresponding to (i) polyadenylated transcripts, (ii) uridylated transcripts and (iii) non-polyadenylated or deadenylated transcripts. Transcripts were considered deadenylated when the poly(A) tail length was less than 10, a size inferior to the minimal required poly(A) tail length for the binding of a poly(A) binding protein (PABP) (Sachs et al., 1987). Plotting the clone numbers against the position of 3' ends on the respective mRNAs shows that polyadenylation sites are within 150-200 nt from the stop codon for the three genes (Figure 4B). For each gene, multiple polyadenylation sites were determined and their overall distribution appeared unchanged in WT, *tut1* and *xrn4* (Figure 4B). The distribution of uridylated ends coincides perfectly with the positions of polyadenylation sites, indicating that TUT1 uridylates preferentially poly(A) tails (Figure 4B). More importantly, the number and diversity of clones corresponding to deadenylated or non-polyadenylated transcripts were markedly increased in *tut1* (Figure 4B). Especially in the case of *LOM1* and *DREB2C*, the 3' extremities of deadenylated or non-polyadenylated transcripts covered the whole range of the sequence investigated by

3' RACE PCR with some 3' ends mapping even within the CDS. This first analysis explains the occasional detection of shorter PCR products in *tut1* as opposed to WT or *xrn4*. To understand whether the size shift observed for the main 3' RACE PCR products is due to alternative polyadenylation sites or a reduced poly(A) length, size-selected amplification products corresponding to the main band for *DREB2C* and *BAM3* were cloned. No difference was observed in the distribution of poly(A) sites between WT, *tut1* and *xrn4*. However, poly(A) tails are markedly shorter in *tut1* (Figure 4C). These data indicate that uridylation by TUT1 protects mRNAs from further deadenylation once the poly(A) tail has been shortened to a critical size favoring its uridylation.

Both the occurrence of truncated transcripts and the shortening of poly(A) tails in *tut1* strongly suggest that TUT1 protects deadenylated transcripts from further 3' degradation. Alternatively, TUT1 could be required for the degradation of 3' shortened transcripts detected in *tut1*. However, we do not favor the latter hypothesis since the only uridylated RNA species that we detect *in vivo* correspond to oligoadenylated mRNAs, and not to truncated mRNAs. In addition, no truncated uridylated transcripts accumulate in *xrn4* although our results indicate that uridylated mRNAs are substrates of XRN4 (Figures 2 and 3). We therefore propose that uridylation prevents the complete deadenylation of transcripts and protects them from additional 3' exoribonucleolytic attacks in the mRNA body.

Impact of TUT1 on the Arabidopsis transcriptome

To determine the genome-wide impact of TUT1 on mRNA steady-state levels, we performed a microarray analysis using the CATMAv6.1 array based on Roche-NimbleGen technology and rosette leaf RNA. Overall, 164 genes showed significant different expression levels between *tut1* and WT in three biological replicates. Among them, 134 genes displayed a ≥ twofold differential transcript accumulation: 76 were decreased in *tut1*, 58 increased (see Figure 5A for the validation of three misregulated genes in *tut1* and Figure S3 for a complete list of misregulated genes and gene ontology analysis). The number of differentially expressed genes is comparable to those observed for *xrn4* when mRNA steady-state levels were analyzed with Affymetrix arrays: 67 differentially regulated genes detected by Affymetrix ATH1 arrays (34 down, 33 up) and 82 detected by Affymetrix tiling arrays (30 down,

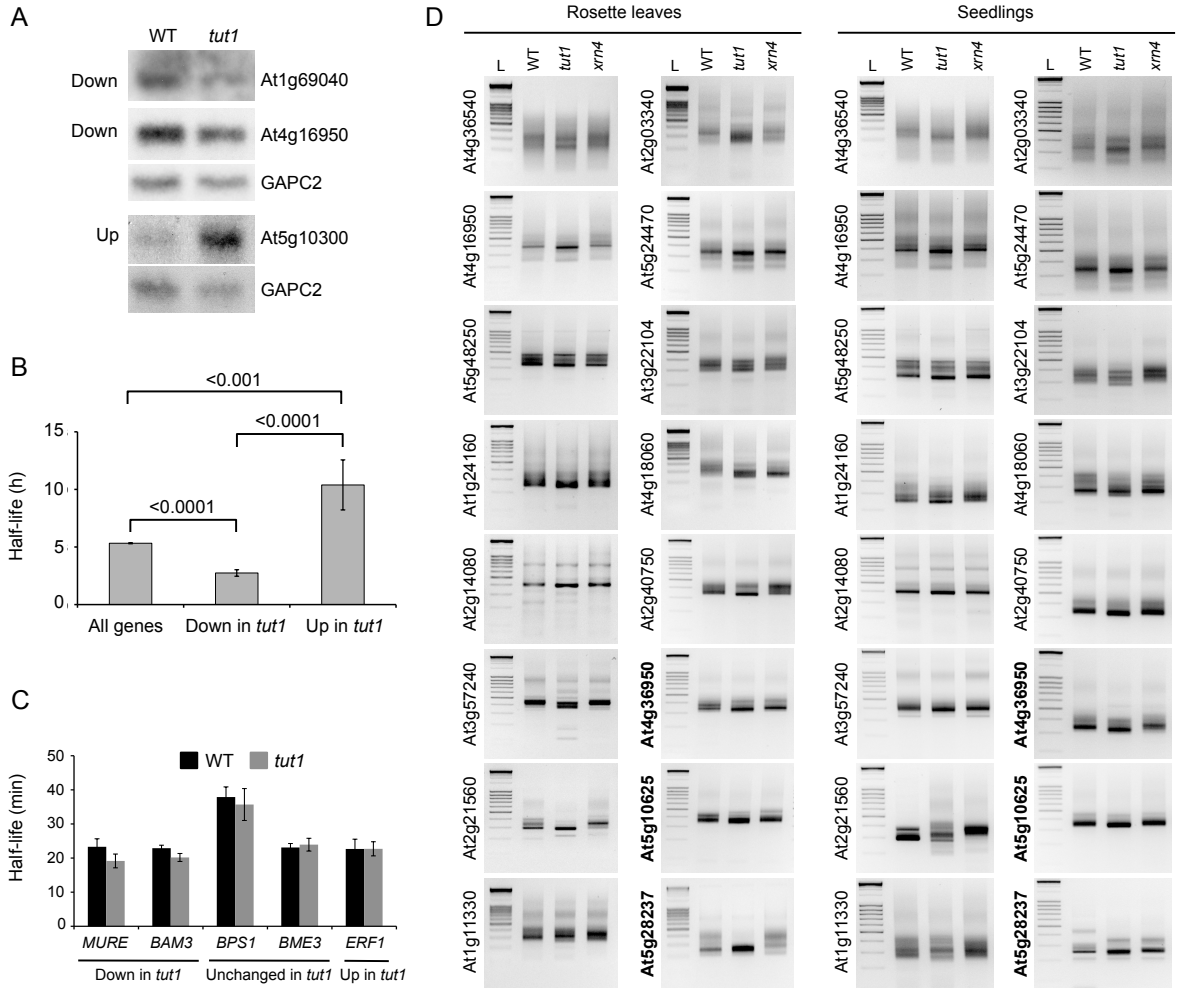


Figure 5. TUT1 has a limited impact on steady-state level and degradation rates of mRNAs but is required for preventing 3' shortening of all 16 tested mRNAs.

(A) Validation of microarray data for selected mRNAs. Northern blot analysis is shown for three mRNAs that have been selected amongst the most misregulated genes in *tut1* (see Figure S3 for microarray results) that are detectable in rosette leaves. *GAPC2* transcripts were used as a loading control.

(B) mRNAs down- and up-regulated in *tut1* have a significant shorter and longer average half-lives, respectively, when compared with the whole mRNA population. Known mRNA half-lives in Arabidopsis (n=13013) (Narsai et al., 2007) was compared with known half-lives for mRNAs down-regulated (n=46) and up-regulated (n=22) in *tut1*. Data are presented as means ∓ SEM. Indicated p-values were calculated with a Mann-Whitney test.

(C) TUT1 has no significant impact on mRNA half-lives regardless of respective misregulation of steady-state levels in *tut1*. *MURE* (At1g63680) and *BAM3* mRNAs are down-regulated, BPS1 (At1g01550) and BME3 (At3g54810) mRNA levels are unchanged and ERF1 (At4g17500) is upregulated in *tut1*. Half-lives (min) were determined in rosette leaves following cordycepin inhibition of transcription and qRT-PCR analysis. Data are presented as means ∓ SEM (n=4).

(D) Uridylation protects the 3' ends of all 16 tested mRNAs in leaves and seedlings. Thirteen down- and 3 up-regulated transcripts (regular and bold AGI numbers, respectively) in *tut1* were analyzed by 3' RACE analysis in WT, *tut1* and *xrn4* at two developmental stages, rosette leaves and seedlings. All panels correspond to negative images of ethidium bromide stained 2% agarose gels. 3' RACE PCR products were run alongside a DNA ladder (L) with 100 bp size increments. Complex patterns reflect multiple polyadenylation sites frequently observed for Arabidopsis mRNAs. 3' shortening is detected in *tut1* for all transcripts regardless of their respective mis-expression in *tut1*.

Sement_Figure 5

52 up) (Gregory et al., 2008; Rymarquis et al., 2011). However, there is no significant overlap between *tut1* and *xrn4* datasets with only one gene (At5g49280) upregulated both in *tut1* CATMA and *xrn4* ATH1 arrays. Although these analyzes were performed on different tissues, the almost complete lack of common targets indicate that inactivation of either TUT1 or XRN4 has not only a limited but a distinct impact on the transcriptome in spite of both proteins being likely components of the same degradation pathway. Another discrepancy between *tut1* and *xrn4* datasets was observed when comparing differentially expressed genes and known half-lives of Arabidopsis mRNAs (Narsai et al., 2007). In *tut1*, down-expressed mRNAs have a significant shorter than average half-life (p-value <0.0001) (Figure 5B), whereas this relationship was not observed in the *xrn4* dataset. As TUT1 acts on deadenylated mRNAs, shorter-lived mRNAs are potentially more susceptible to the protective effect conferred by TUT1 since these mRNAs are more frequently deadenylated than stable mRNAs. However, not all mRNAs with known short half-lives are down-regulated in *tut1*. Similarly, genes up-regulated in *tut1* have a longer average half-life (p-value <0.001) but not all stable mRNAs are upregulated in *tut1*. To test for a potential direct impact of TUT1 on mRNA degradation rates, halflives of five short-lived transcripts (i.e. half-lives ranging between 20 and 40 min) were determined in rosette leaves following inhibition of transcription by cordycepin. The degradation rates of the five mRNAs were not significantly affected regardless of their respective upregulated (ERF1), downregulated (*MURE* and *BAM3*) or unchanged (*BPS1* and *BME3*) expression level in *tut1* (Figure 5C). Variations in mRNA steady-state levels in *tut1* are therefore likely due to indirect effects or to multifactorial causes that remain to be identified. A limited impact of TUT1 on mRNA degradation rates is in line with the fact that *tut1* mutants lack any of the phenotypes previously observed in Arabidopsis mutants affected in the 5' to 3' degradation pathway.

By contrast, and more importantly, the role of uridylation on protecting deadenylated mRNAs is consistently observed. We determined the 3' RACE profiles for 16 mRNAs amongst the most deregulated genes in *tut1* (13 down and 3 up, listed in Figure S3). All tested mRNAs are shortened at their 3' extremities in *tut1*, both in leaves and in seedlings (Figure 5D). Cloning and sequence analysis of 3' RACE products for *At2g21560* and *At5g48250* revealed similar features as observed for *LOM1*, *DREB2C* and *BAM3* in terms of the nature and length of U tails, the loss of uridylation in *tut1*

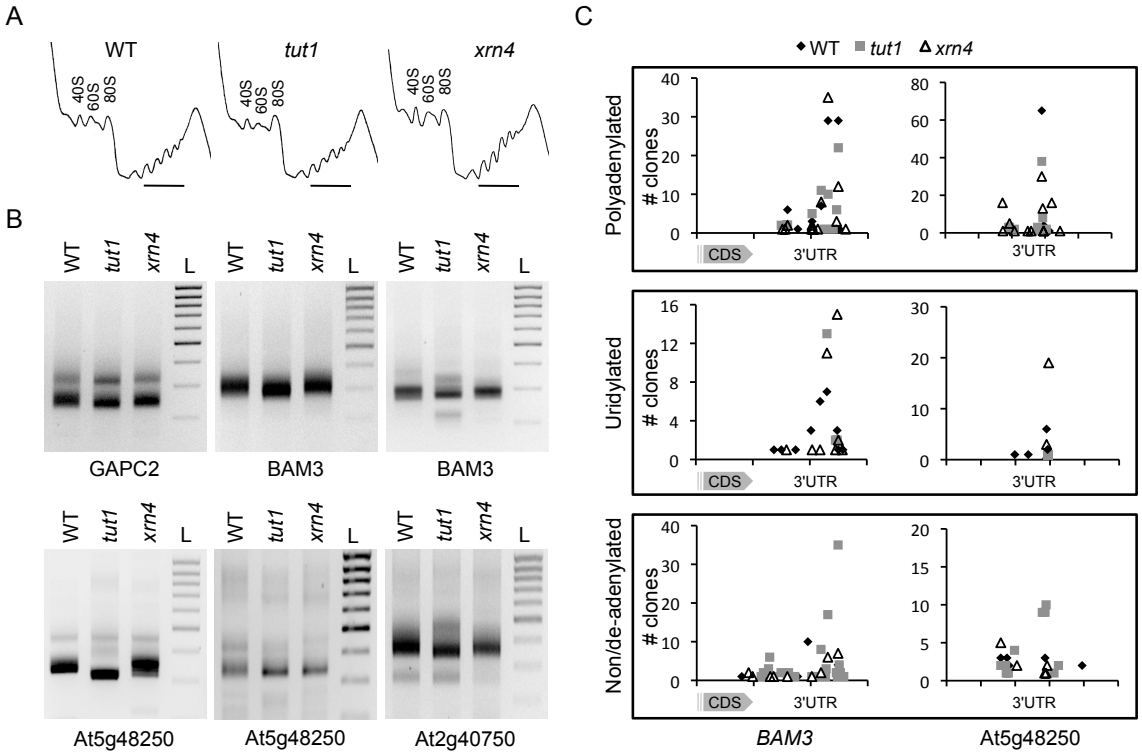


Figure 6. Uridylated mRNAs are present in polysomal fractions.
(A) Polysome profiles in WT, *tut1* and *xrn4*. The position of the 40S, 60S and 80S peaks is indicated on each panel. Polysomal fractions analyzed by 3' RACE PCR are marked by a horizontal line.
(B) 3' shortening of mRNAs in *tut1* is detected in polysomal fractions by 3' RACE PCR. Genotypes, tissues and identity of mRNAs are indicated on all panels corresponding to negative images of ethidium bromide stained agarose gels. The occasional detection of shorter transcripts is shown for BAM3. The migration of a DNA ladder (L) (1 to 0.2 kbp, 0.1 kbp size increment) is shown on the right of each panel.
(C) 3' truncated transcripts accumulate in *tut1* polysomal fractions. Legend as in Figure 4B.

and the poly(A) size reduction of uridylated transcripts (presented alongside *LOM1*, *DREB2C* and *BAM3* data in Figure 2). Similarly, the occurrence of 3' shortened transcripts was enhanced in *tut1* for *At2g21560* and *At5g48250*, albeit to a lesser extent for the latter (Figure S4A). We also analyzed the 3' shortening of two mRNAs in *tut1* by northern analysis. To maximize mRNA detection we used RNA extracted from young flowers and first confirmed the typical size shift in *tut1* by 3' RACE PCR (Figure S4B). The At5g08040 mRNAs encode a mitochondrial import receptor subunit and are well resolved on denaturing 6% acrylamide gel due to their short size of 371 nt. The *GAPC2* (At1g13440) mRNAs are longer (1439 nt) and their analysis on acrylamide gels required a prior reduction in size through targeted RNase H cleavage about 200 nt upstream of the polyadenylation sites. For both mRNAs, the slight size shift is observed on northern blots albeit not as clearly as by 3' RACE PCR which favors the detection of shorter poly(A) tails as discussed previously (Figure S4C and D).

Taken together, the results presented in Figures 4, S4 and 5 indicate that the lack of uridylation results in an identical molecular phenotype for all 23 tested mRNAs, irrespective of the tissue or the modulation of mRNA steady-state levels in *tut1*. Although 3' shortening of deadenylated mRNAs cannot be investigated at a genome-wide level, its systematic occurrence on any mRNA investigated strongly suggests that the protection of mRNA 3' end by uridylation is widespread in Arabidopsis.

Uridylation protects 3' ends of mRNAs associated with polysomes

The impact of TUT1 on the steady-state level of mRNAs is limited. By contrast, protection of deadenylated mRNA 3' extremities by uridylation is systematically observed. To address the biological relevance of this protection, we tested whether uridylation could protect 3' ends of mRNAs associated with polysomes, a reasonable hypothesis since mRNA deadenylation and subsequent 5' to 3' decay can be co-translational in *S. cerevisiae* (Hu et al., 2009). Polysomes were isolated from seedlings and typical polysome UV profiles were observed for WT, *tut1* and *xrn4* samples indicating no major effects of the *tut1* mutation on polysome assembly (Figure 6A). 3' RACE PCR profiles were determined for four transcripts: *GAPC2* and *BAM3* mRNAs are stable and short-lived transcripts respectively whereas half-lives of At2g40750 and At5g48250 range from 1.2 to 1.8 hours (Figure S3) (Narsai et al., 2007). For the

four transcripts, the characteristic 3' shortening was observed in *tut1* polysomal fractions (Figure 6B). In addition, shorter amplicons corresponding to 3' truncated transcripts were also occasionally detected for *BAM3* and At5g48250 in *tut1* polysomal fractions. This strongly suggests that the protective effect conferred by TUT1 on deadenylated mRNAs operates on mRNAs engaged in polysomes. The presence of uridylated mRNAs in polysomal fractions in WT and *xrn4*, and of 3' shortened transcripts in *tut1* was confirmed by cloning and sequence analysis of *BAM3* and At5g48250 samples (Figure 6C). Based on these results, we propose that one of the biological roles of mRNA uridylation is to protect the 3' end of mRNAs associated with polysomes.

DISCUSSION

Uridylation of mRNAs was recently reported to promote 5' to 3' degradation through decapping (Mullen and Marzluff, 2008; Rissland and Norbury, 2009). Here we show that in addition, uridylation is crucial to protect deadenylated mRNAs from 3' ribonucleolytic attacks. We propose that uridylation is a key process to prevent the production of 3' truncated, aberrant transcripts during the process of degradation and that uridylation favors the 5' to 3' directionality of mRNA decay, at least by protecting 3' end of deadenylated mRNAs and possibly by promoting decapping as discussed below. Interestingly, uridylation protects the 3' end of mRNAs engaged in polysomes, possibly to prevent translation of 3' truncated transcripts.

Deadenylation precedes uridylation

Overall, poly(A) tails of non-uridylated mRNAs are significantly longer than for uridylated mRNAs (Figures 2C, 3C, 4C). The poly(A) tails of more than 200 clones corresponding to uridylated transcripts analyzed in the course of this study have both an average and median size of 13 As. This size is comparable with the known oligo(A) size of deadenylated mRNAs in eukaryotes. This observation strongly suggests that mRNA uridylation by TUT1 is preceded by a deadenylation step. Interestingly, mRNA uridylation in *S. pombe* occurs independently of deadenylation, and although the two pathways are partially redundant, both uridylation and deadenylation alone can induce decapping and the subsequent degradation from the 5' end (Rissland and

Norbury, 2009). Uridylation-induced decapping was also observed in human cells. However, at the time of writing, uridylation-induced decapping was reported only for the non-polyadenylated histone mRNAs (Mullen and Marzluff, 2008) and therefore, the link between uridylation and deadenylation remains unknown in humans. By contrast, shortening of the poly(A) tail precedes the uridylation-related CUCU modification of the *gdhA* mRNA in *A. nidulans* (Morozov et al., 2010). mRNA uridylation appears conserved among eukaryotes (with the notable exception of *S. cerevisiae*) and in the few cases investigated so far, mRNA uridylation is part of a degradative process (Morozov et al., 2010; Mullen and Marzluff, 2008; Rissland and Norbury, 2009). Since mRNA degradation is commonly initiated by deadenylation, the link between deadenylation and uridylation could constitute the rule rather than the exception.

A novel role for uridylation in preventing the formation of 3' truncated mRNAs

Our results indicate that uridylation marks decapped mRNAs. However, it is difficult to estimate at present the impact of uridylation in promoting decapping in Arabidopsis. This connection between uridylation and decapping is difficult to assess because deadenylation alone can trigger decapping. Deadenylation is still underinvestigated in Arabidopsis, mostly because of the functional redundancy and the complexity of the components of the deadenylation machinery (Chiba and Green, 2009). Clearly, uridylation is not required for decapping in Arabidopsis since *tut1* mutants have none of the phenotypes associated with compromised decapping (Goeres et al., 2007; Xu et al., 2006). By contrast, we show that uridylation is necessary to prevent the 3' trimming of deadenylated mRNAs. In absence of TUT1, the deadenylated transcripts of all tested mRNAs were trimmed at their 3' ends. Such 3' truncated mRNAs have also been detected in *S. cerevisiae lsm1-lsm7* mutants (He and Parker, 2001). Binding of the Lsm1-7 complex to oligo(A) tails recruits the decapping complex via Pat1 but also protects the 3' ends from ribonucleolytic attacks (Coller and Parker, 2005; Haas et al., 2010; He and Parker, 2001; Ozgur et al., 2010; Tharun, 2009). Both functions of the yeast Lsm1-7 complex are likely conserved in Arabidopsis but we observed two important discrepancies. First, the presence of the Lsm1-7 complex is not sufficient to ensure protection of the 3' ends of deadenylated mRNAs in Arabidopsis *tut1* mutants and the uridylation activity of TUT1 is therefore

mandatory. In line with this, uridylation is known to enhance the recruitment of the Lsm1-7 complex to oligo(A) tails (Song and Kiledjian, 2007). Second and surprisingly, inactivating both genes encoding the Lsm1 orthologues in Arabidopsis (At1g19120 and At3g14080) did not phenocopy the *tut1* phenotype (data not shown, double *lsm1* mutant kindly provided by Joanna Kufel, Warsaw). Obviously, an additional factor(s) than the Lsm1-7 complex is involved in protecting uridylated mRNAs in Arabidopsis and further work is required for its identification. Nonetheless, our results imply that in Arabidopsis, protection of deadenylated mRNA 3' ends requires an active process, uridylation, highlighting its biological significance.

Uridylation acts upstream of RNA quality control

But why protect 3' ends of mRNAs following deadenylation? We think that the main function of mRNA uridylation in Arabidopsis is to prevent the formation of aberrant RNAs once mRNAs have been deadenylated. Aberrant defective transcripts are mostly produced by mistakes of the processing machinery during the multiple steps required for the production of mature functional transcripts. In addition, the leakage of degradation intermediates must also be prevented during RNA degradation processes since mRNAs that have lost their cap or poly(A) tail are also considered as aberrant RNAs. (Gregory et al., 2008; Luo and Chen, 2007). Our data suggest that preventing the formation of 3' truncated transcripts by uridylation could be crucial to avoid the translation of truncated transcripts. Although mRNAs commonly exit translation prior to degradation (reviewed in Coller and Parker, 2005; Tharun, 2009), in budding yeast mRNA degradation can also occur on polysomes (Hu et al., 2009). This finding led to the hypothesis that the 5' to 3' directionality of RNA decay evolved to allow the last translocating ribosome to complete translation. Our data indicate that uridylation definitely participates in the establishment of 5' to 3' polarity of RNA degradation in Arabidopsis by protecting 3' ends of decapped transcripts. In addition and as discussed above, we cannot rule out a stimulation of decapping by uridylation as reported in *S. pombe* and humans (Mullen and Marzluff, 2008; Rissland and Norbury, 2009) which would also contribute to the 5' to 3' polarity of mRNA degradation. Detecting uridylated mRNAs in polysomal fractions strongly suggests that protection by uridylation operates in polysomes. More importantly, since deadenylated mRNAs unlikely associate *de novo* in polysomes, deadenylation possibly

targets mRNAs being translated in Arabidopsis. In that case, protection of mRNA 3' end by uridylation would prevent the translation of truncated transcripts. Further work is required to identify the ribonuclease(s) involved in nibbling the unprotected deadenylated mRNAs in *tut1*. In yeast *lsm* mutants, the nibbling enzyme is also unknown but the exosome was shown to degrade 3' trimmed mRNAs (He and Parker, 2001). The 3' truncated transcripts in *tut1* mutants could also become substrate of the 3' to 5' degradation pathway, either of the exosome or other cytosolic 3' to 5' exoribonucleolytic activities such as SUPPRESSOR OF VARICOSE (SOV), a member of the RNase II family associated with RNP granules or RRP6L3, a cytosolic RRP6-like exoribonuclease (Lange et al., 2008; Zhang et al., 2010). However, determining the exact fate of 3' truncated mRNAs in *tut1* mutants likely constitutes a red herring: the most important consequence of our data is that the preventive action of TUT1 ensures that such aberrant transcripts are not, or to a much lesser extent, produced in WT plants. Whereas mechanisms of RNA quality control have evolved to detect and eliminate defective transcripts, uridylation is rather part of a preventive process that acts upstream of RNA quality control to ensure that 3' truncated aberrant transcripts are not produced from deadenylated mRNAs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Material

The plant material and oligonucleotides used in this study are detailed in Supplemental Experimental Procedures and Table S1.

Transient expression of TUT1 fused to fluorescent proteins

The coding sequence of *TUT1* (At2g45620), *DCP1* (At1g08370) and *RBP47* (At1g19130) was fused 5' of GFP or RFP sequences using the Gateway® destination vectors pB7FWG2 and pH7RWG2, respectively. Biolistic transformation of tobacco BY2 cells and analysis by confocal microscopy were performed by standard methods.

Activity assays

The production and purification of recombinant proteins is detailed in Supplemental Experimental Procedures. TUT1 and Cid1 activities were compared by using identical amounts of arbitrary units defined by measuring TCA-precipitable incorporation of

[α-^{32}P]-UTP into tRNAs and reaction conditions based on (Rissland et al., 2007). In vitro assays shown in Figure 1B contained 100nM of GST-TUT1 or GST-TUT1$^{D491/3A}$ or 0.1unit/µL of poly(U) polymerase (Cid1) (NEB), 25 mM potassium phosphate pH 7, 5 mM MgCl2, 5 mM DTT, 10%(v/v) glycerol, 0,1µg/µl BSA, 0.1 mM UTP, GTP, CTP or ATP and 5 nM of a 21 nucleotide synthetic RNA 5' end labelled using T4 Polynucleotide Kinase and [γ-^{32}P]-ATP. In Figures 1C to D, the reaction buffer was 20 mM MOPS pH 7.5, 100 mM NaCl, 15%(v/v) glycerol, 0.1%(v/v) Tween 20, 1 mM MgCl2, 0.5 µg/µl BSA, 1 mM UTP. Unless otherwise specified, 100 nM TUT1 were used. Similar conditions were used to test the uridylation of total RNA and tRNA except that 500 ng of plant total RNA or yeast tRNA were incubated with 5 µCi (170 nM) of [α-^{32}P]UTP. Reaction products were separated by denaturing 17% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis before autoradiography.

3' RACE, cRT-PCR, qRT-PCR, northern and CATMA microarray experiments

The 3' RACE PCR to detect uridylated mRNAs were performed using 5µg of total RNA purified with Nucleospin® RNA plant columns (Macherey Nagel) dephosphorylated with Calf Intestinal alkaline Phosphatase (CIP, Promega) before ligation to the RNA primer (5'PCUAGAUGAGACCGUCGACAUGAAUUC-3'NH2) with T4 RNA ligase (Fermentas). This sequence was used as an anchor to initiate cDNA synthesis by SuperScript® III reverse transcriptase (Invitrogen) and in subsequent PCR amplification in combination with gene-specific sense primers. 3' RACE experiments were used to compare the lengths of short poly(A) tails between samples but cannot be used to estimate the size of longer, primary poly(A) tails. Circular RT-PCR analysis was used to characterize the 5' and 3' extremities of capped and uncapped *LOM1* transcripts. Capped transcripts were analyzed by treating 5 µg of total RNA with CIP and Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) (Epicentre) prior to circularization with T4 RNA ligase at 18°C for 16h in 200µl final volume reaction. CIP and TAP treatments were omitted to detect uncapped transcripts. Negative controls were treated only with CIP. 3' RACE and cRT PCR products were cloned in pGEM®-T Easy (Promega) prior to sequence analysis. qRT-PCR, northern and CATMA microarray experiments are detailed in Supplemental Experimental Procedures.

mRNA half-life measurements

Half-lives of mRNAs were measured following inhibition of transcription by cordycepin as described in (Zhang et al., 2010) except that diced rosette leaves were used as plant material. *BAM3*, *MURE*, *BPS1*, *BME3* and *ERF1* mRNA levels were quantified at 0, 15, 30, 45 and 60 min by qPCR as detailed in Supplemental Experimental Procedures.

Polysome purification

Polysome purification was performed according to (Mustroph et al., 2009) except that 400mg of tissue powder were loaded on 11 ml 15-60% (W/v) sucrose gradients.

Statistical Analysis

All p-values were calculated using Mann-Whitney tests except for CATMA microarray analysis (See Supplemental Experimental Procedures).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), grant ANR2010-BLAN-1707 from Agence Nationale de la Recherche (ANR) to DG and JMD, and grant ANR2010-LABX-36 to DG. The authors are grateful to Joanna Kufel for providing the *lsm1a lsm1b* mutant and to Benjamin Stupfler and Barbara Class for technical help.

REFERENCES

Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. Wiley Interdiscip Rev RNA *2*, 167-183. Chiba, Y., and Green, P.J. (2009). mRNA degradation machinery in plants. J. Plant Biol. *52*, 114-124.

Coller, J., and Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. Cell *122*, 875-886.

Doma, M.K., and Parker, R. (2007). RNA quality control in eukaryotes. Cell *131*, 660-668.

Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., and Sablowski, R. (2004). A link

between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. Science *306*, 1046-1048.

Goeres, D.C., Van Norman, J.M., Zhang, W., Fauver, N.A., Spencer, M.L., and Sieburth, L.E. (2007). Components of the Arabidopsis mRNA decapping complex are required for early seedling development. Plant Cell *19*, 1549-1564.

Gregory, B.D., O'Malley, R.C., Lister, R., Urich, M.A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A.H., and Ecker, J.R. (2008). A link between RNA metabolism and silencing affecting Arabidopsis development. Dev Cell *14*, 854-866.

Gy, I., Gasciolli, V., Lauressergues, D., Morel, J.B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H., and Mallory, A.C. (2007). Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. Plant Cell *19*, 3451-3461.

Haas, G., Braun, J.E., Igreja, C., Tritschler, F., Nishihara, T., and Izaurralde, E. (2010). HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa. J Cell Biol *189*, 289-302.

Hagan, J.P., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. Nat Struct Mol Biol *16*, 1021-1025.

He, W., and Parker, R. (2001). The yeast cytoplasmic LsmI/Pat1p complex protects mRNA 3' termini from partial degradation. Genetics *158*, 1445-1455.

Heo, I., Joo, C., Kim, Y.K., Ha, M., Yoon, M.J., Cho, J., Yeom, K.H., Han, J., and Kim, V.N. (2009). TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. Cell *138*, 696-708.

Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. Cell *136*, 763-776.

Hu, W., Sweet, T.J., Chamnongpol, S., Baker, K.E., and Coller, J. (2009). Co-translational mRNA decay in Saccharomyces cerevisiae. Nature *461*, 225-229.

Ibrahim, F., Rymarquis, L.A., Kim, E.J., Becker, J., Balassa, E., Green, P.J., and Cerutti, H. (2010). Uridylation of mature miRNAs and siRNAs by the MUT68 nucleotidyltransferase promotes their degradation in Chlamydomonas. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 3906-3911.

Kastenmayer, J.P., and Green, P.J. (2000). Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 13985-

13990.

Kwak, J.E., and Wickens, M. (2007). A family of poly(U) polymerases. RNA 13, 860-867.

Lange, H., Holec, S., Cognat, V., Pieuchot, L., Le Ret, M., Canaday, J., and Gagliardi, D. (2008). Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by-product involves one of the three RRP6-like proteins in Arabidopsis thaliana. Mol Cell Biol *28*, 3038-3044.

Lehrbach, N.J., Armisen, J., Lightfoot, H.L., Murfitt, K.J., Bugaut, A., Balasubramanian, S., and Miska, E.A. (2009). LIN-28 and the poly(U) polymerase PUP-2 regulate let-7 microRNA processing in Caenorhabditis elegans. Nat Struct Mol Biol 16, 1016-1020.

Luo, Z., and Chen, Z. (2007). Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. Plant Cell 19, 943-958.

Morozov, I.Y., Jones, M.G., Razak, A.A., Rigden, D.J., and Caddick, M.X. (2010). CUCU modification of mRNA promotes decapping and transcript degradation in Aspergillus nidulans. Mol Cell Biol *30*, 460-469.

Mullen, T.E., and Marzluff, W.F. (2008). Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. Genes Dev *22*, 50-65.

Mustroph, A., Juntawong, P., and Bailey-Serres, J. (2009). Isolation of plant polysomal mRNA by differential centrifugation and ribosome immunopurification methods. Methods Mol Biol *553*, 109
126.

Narsai, R., Howell, K.A., Millar, A.H., O'Toole, N., Small, I., and Whelan, J. (2007). Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in Arabidopsis thaliana. Plant Cell *19*, 34183436.

Norbury, C.J. (2010). 3' Uridylation and the regulation of RNA function in the cytoplasm. Biochem Soc Trans *38*, 1150-1153.

Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B.D., Nourizadeh, S.D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P., and Ecker, J.R. (2006). ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'-->3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 1328613293.

Ozgur, S., Chekulaeva, M., and Stoecklin, G. (2010). Human Pat1b connects deadenylation with mRNA decapping and controls the assembly of processing bodies. Mol Cell Biol 30, 4308-4323.

Potuschak, T., Vansiri, A., Binder, B.M., Lechner, E., Vierstra, R.D., and Genschik, P. (2006). The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis. Plant Cell *18*, 3047-3057.

Ren, G., Chen, X., and Yu, B. (2012). Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in Arabidopsis. Curr Biol.

Reznik, B., and Lykke-Andersen, J. (2010). Regulated and quality-control mRNA turnover pathways in eukaryotes. Biochem Soc Trans *38*, 1506-1510.

Rissland, O.S., Mikulasova, A., and Norbury, C.J. (2007). Efficient RNA polyuridylation by noncanonical poly(A) polymerases. Mol Cell Biol *27*, 3612-3624.

Rissland, O.S., and Norbury, C.J. (2009). Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. Nat Struct Mol Biol *16*, 616-623.

Rymarquis, L.A., Souret, F.F., and Green, P.J. (2011). Evidence that XRN4, an Arabidopsis homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories. RNA *17*, 501-511.

Sachs, A.B., Davis, R.W., and Kornberg, R.D. (1987). A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. Mol Cell Biol *7*, 3268-3276.

Shen, B., and Goodman, H.M. (2004). Uridine addition after microRNA-directed cleavage. Science *306*, 997.

Song, M.G., and Kiledjian, M. (2007). 3' Terminal oligo U-tract-mediated stimulation of decapping. RNA *13*, 2356-2365.

Tharun, S. (2009). Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. Int Rev Cell Mol Biol *272*, 149-189.

Voinnet, O. (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. Trends Plant Sci *13*, 317-328.

Weber, C., Nover, L., and Fauth, M. (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. Plant J *56*, 517-530.

Wyman, S.K., Knouf, E.C., Parkin, R.K., Fritz, B.R., Lin, D.W., Dennis, L.M., Krouse, M.A., Webster, P.J., and Tewari, M. (2011). Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome

complexity. Genome Res *21*, 1450-1461.

Xu, J., Yang, J.Y., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. Plant Cell *18*, 3386-3398.

Zhang, W., Murphy, C., and Sieburth, L.E. (2010). Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 15981-15985.

Zhao, Y., Yu, Y., Zhai, J., Ramachandran, V., Dinh, T.T., Meyers, B.C., Mo, B., and Chen, X. (2012). The Arabidopsis Nucleotidyl Transferase HESO1 Uridylates Unmethylated Small RNAs to Trigger Their Degradation. Curr Biol.

INVENTORY OF SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information includes four Supplemental Figures, one Supplemental Table and Supplemental Experimental Procedures.

- Supplemental Figure S1 shows the characterization of *tut1-1* and *tut1-2* Arabidopsis mutants used in this study and that both mutants share an identical molecular phenotype. Figure S1 is linked to Figure 2 where *tut1* mutants are initially mentioned.
- Supplemental Figure S2 shows that the ethylene-insensitive phenotype of *xrn4* is not shared by *tut1*. Figure S2 is linked to Figure 3.
- Supplemental Figure S3 recapitulates misregulated genes in *tut1* and the corresponding GO analysis. Figure S3 is linked to Figure 5.
- Supplemental Figure S4 further supports the existence of 3' shortened mRNAs in *tut1*. Figure S4 is linked to Figure 5.
- Supplemental Table 1: list of the primers used in this study.
- Supplemental Experimental Procedures: detailed information on the plant material, production and purification of recombinant proteins, activity assay conditions, microarray CATMAvs6.1 description and analysis, northern, RNase H cleavage and qPCR methods.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTAL FIGURES

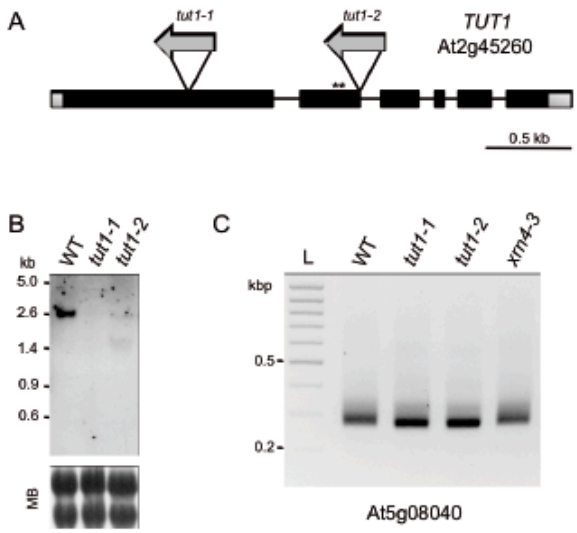


Figure S1. Characterization of *tut1-1* and *tut1-2* mutants.

(A) Schematic representation of *TUT1* gene. 5' and 3' UTRs are indicated by grey boxes, exons by black boxes and introns by solid lines. T-DNA insertions in *tut1-1* and *tut1-2* mutants were confirmed by PCR amplification and sequencing. T-DNA position and orientation are show by grey arrows, the left border is represented by the arrowhead. Positions of the mutations introduced to produce the catalytically-inactive $TUT1^{D491/3A}$ mutant protein are shown by asterisks.

(B) Both *tut1* T-DNA insertions affect *TUT1* mRNA expression. Northern analysis was performed using 20 µg of total RNA and a DIG-labelled probe corresponding to the 5' part of the gene. Equal loading is shown by methylene blue (MB) staining of the membrane.

(C) The mRNA 3' shortening detailed in the text is observed in both *tut1-1* and *tut1-2* as illustrated for At5g08040 transcripts. Genotypes are indicated on top of the panel corresponding to a negative image of an ethidium bromide stained 2% agarose gel. The migration of a DNA ladder (L) (1 to 0.2 kbp, 0.1 kbp size increment) is shown on the left. A slight reduction in the size of the main amplification product corresponding to enhanced deadenylation (see Figure 4 and text) is observed in both *tut1-1* and *tut1-2* mutants as compared to WT and *xrn4*. The sequencing data presented throughout the text were obtained in *tut1*-1.

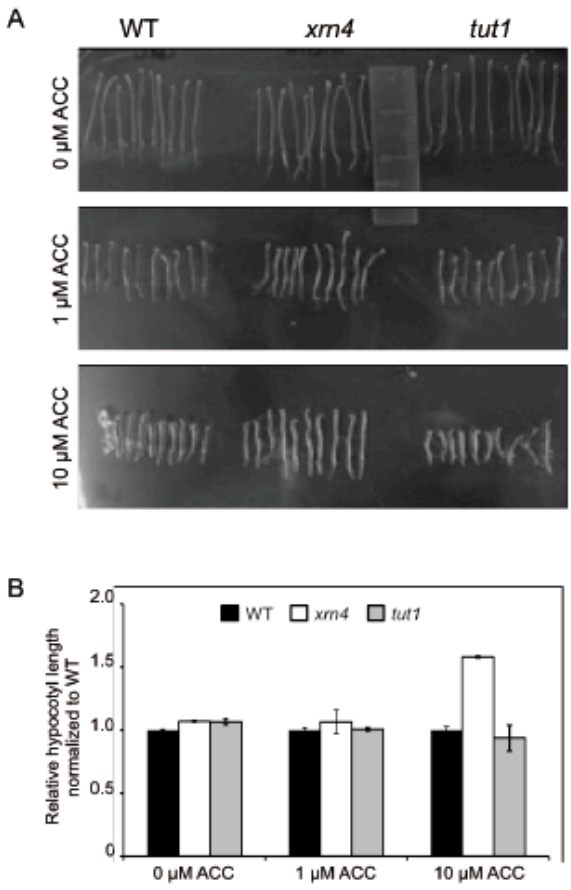


Figure S2. The ethylene-insensitive phenotype of *xrn4* is not observed in *tut1*.

(A) Phenotypes of 3 day-old etiolated seedlings of WT, *xrn4* and *tut1* grown in absence or presence of 1 or 10 µM of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) as described in (Potuschak et al., 2006).

(B) Hypocotyl length measurements of 3 day-old etiolated WT, *xrn4* and *tut1* seedlings germinated in presence of the indicated ACC concentrations. For all genotypes, average hypocotyl lengths were normalized as compared to WT and data are presented as means ∓ SEM, n=2.

AGI	TAIRv8 ANNOTATION	MapMan class (Provart and Zhu, 2003)	MapMan subcategory (Provart and Zhu, 2003)	rep1	adjusted p-value (Benjamini-Hochberg test)	rep2	adjusted p-value (Benjamini-Hochberg test)	rep3	adjusted p-value (Benjamini-Hochberg test)	mean	adjusted p-value (Benjamini-Hochberg test)	half-life (hours) from Narsai et al. 2007	Genes selected for 3' RACE analysis (Fig5D)
AT2G45620	TUT1 "nucleotidyltransferase family protein"			-4,81	6,37E-9	-5,99	6,58E-6	-4,52	7,69E-4	-5,11	0,00E+0	4,8	
AT4G36540	"BEE2 (BR ENHANCED EXPRESSION 2); DNA binding / transcription factor"	RNA	[27.3.6] RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	-2,07	4,46E-6	-2,31	8,33E-5	-1,75	2,36E-2	-2,04	0,00E+0	#N/A	+
AT4G16950	"RPP5 (RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 5)"	stress	[20.1.1001] stress.biotic	-1,59	5,05E-5	-2,33	1,02E-4	-2,19	4,47E-3	-2,04	0,00E+0	2,6	+
AT5G48250	"zinc finger (B-box type) family protein"	RNA	[27.3.7] RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger family	-0,76	1,64E-2	-3,84	4,13E-5	-1,42	2,09E-2	-2,01	0,00E+0	#N/A	+
AT1G24160	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-0,67	3,41E-2	-3,21	4,10E-5	-2,11	3,85E-3	-2,00	0,00E+0	#N/A	+
AT5G66567	snoRNA	RNA	[27.1] RNA.processing	-1,98	8,65E-6	-0,75	9,21E-3	-3,18	4,60E-3	-1,97	0,00E+0	#N/A	
AT2G14080	"disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative"	stress	[20.1.7] stress.biotic.PR-proteins	-2,09	2,97E-5	-1,34	5,68E-4	-2,38	2,25E-3	-1,94	0,00E+0	2,1	+
AT5G11250	"disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative"	stress	[20.1.7] stress.biotic.PR-proteins	-1,61	3,93E-5	-1,43	8,76E-4	-2,68	1,74E-3	-1,91	0,00E+0	2,1	
AT3G57240	"BG3 (BETA-1,3-GLUCANASE 3); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds"	misc	[26.4.1] misc.beta 1,3 glucan hydrolases.glucan endo-1,3-beta-glucosidase	-1,52	6,68E-5	-3,04	6,70E-5	-1,15	2,79E-2	-1,90	0,00E+0	#N/A	+
AT2G21560	"unknown protein"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	-2,08	4,34E-6	-2,01	1,21E-4	-1,60	9,76E-3	-1,90	0,00E+0	#N/A	+
AT1G11330	"S-locus lectin protein kinase family protein"	protein	[29.4] protein.postranslational modification	-1,33	2,04E-4	-3,37	4,61E-5	-0,95	4,97E-2	-1,88	0,00E+0	#N/A	+
AT2G03340	"WRKY3 (WRKY DNA-binding protein 3); transcription factor"	RNA	[27.3.32] RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1,38	1,89E-4	-2,97	4,57E-5	-1,28	2,45E-2	-1,88	0,00E+0	1,3	+
AT5G24490	"30S ribosomal protein, putative"	protein	[29.2.1.1.1.1.53] protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit.S30A	-1,08	1,82E-3	-3,36	3,68E-5	-1,06	3,48E-2	-1,83	0,00E+0	10,1	
AT5G24470	"APRR5 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5); transcription regulator"	RNA	[27.3.66] RNA.regulation of transcription.Psudo ARR transcription factor family	-1,38	1,70E-3	-2,41	1,11E-4	-1,45	2,80E-2	-1,75	0,00E+0	0,5	+
AT3G22104	"phototropic-responsive NPH3 protein-related"	signalling	[30.11] signalling.light	-2,01	5,65E-6	-1,91	1,28E-4	-1,29	4,43E-2	-1,74	0,00E+0	#N/A	+
AT4G18060	"SH3 domain-containing protein 3 (SH3P3)"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	-0,63	3,09E-2	-3,44	4,67E-5	-1,01	4,06E-2	-1,69	0,00E+0	3,4	+
AT4G00234	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-1,08	1,04E-3	-2,73	1,11E-4	-1,16	4,51E-2	-1,66	0,00E+0	#N/A	
AT3G52250	"myb family transcription factor"	RNA	[27.3.25] RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-1,65	3,09E-5	-1,24	1,01E-3	-2,01	4,85E-3	-1,63	0,00E+0	#N/A	
AT5G46260	"disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative"	stress	[20.1.7] stress.biotic.PR-proteins	-0,95	2,87E-3	-2,10	4,19E-4	-1,85	6,19E-3	-1,63	0,00E+0	#N/A	
AT2G40750	"WRKY54 (WRKY DNA-binding protein 54); transcription factor"	RNA	[27.3.32] RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1,77	2,29E-5	-1,84	1,75E-4	-1,18	2,90E-2	-1,60	0,00E+0	1,2	+
AT1G69040	"ACR4 (ACT REPEAT 4); amino acid binding"	amino acid metabolism	[13.99] amino acid metabolism.misc	-1,15	1,17E-3	-2,33	1,62E-4	-1,23	3,41E-2	-1,57	0,00E+0	3,6	
AT5G22800	"aminoacyl-tRNA synthetase family protein"	protein	[29.1] protein.aa activation	-0,77	9,55E-3	-2,24	8,11E-5	-1,54	1,08E-2	-1,52	0,00E+0	#N/A	
AT5G53500	"WD-40 repeat family protein"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	-1,70	4,21E-5	-1,06	1,95E-3	-1,78	1,50E-2	-1,51	0,00E+0	#N/A	
AT1G63680	"atMurE, former PDE316 (PIGMENT DEFECTIVE EMBRYO); ATP binding"	development	[33.99] development.unspecified	-1,25	3,20E-4	-2,05	1,06E-4	-1,19	3,17E-2	-1,50	0,00E+0	0,9	
AT5G36930	"disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative"	stress	[20.1.7] stress.biotic.PR-proteins	-1,50	9,49E-5	-0,86	5,05E-3	-2,11	4,92E-3	-1,49	0,00E+0	#N/A	
AT4G10470	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-1,33	1,91E-4	-1,70	2,50E-4	-1,41	3,92E-2	-1,48	0,00E+0	1,1	
AT3G62910	"APG3 (ALBINO AND PALE GREEN); translation release factor"	protein	[29.2.5] protein.synthesis.release	-1,17	5,94E-4	-2,28	7,91E-5	-0,96	4,81E-2	-1,47	5,10E-14	3,1	
AT3G04740	"SWP (STRUWWELPETER)"	RNA	[27.3] RNA.regulation of transcription	-1,07	4,77E-3	-1,85	1,50E-4	-1,44	3,75E-2	-1,45	9,58E-14	1,5	
AT4G16890	"SNC1 (SUPPRESSOR OF NPR1-1, CONSTITUTIVE 1)"	stress	[20.1.2] stress.biotic.receptors	-0,65	2,57E-2	-2,15	1,80E-4	-1,55	1,72E-2	-1,45	9,58E-14	#N/A	
AT4G39620	"EMB2453 (EMBRYO DEFECTIVE 2453); binding"	not assigned	[35.1.5] not assigned.no ontology.pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	-0,79	1,51E-2	-2,10	2,44E-4	-1,45	1,30E-2	-1,45	9,58E-14	2,6	
AT2G44950	"HUB1 (HISTONE MONO-UBIQUITINATION 1); protein binding / zinc ion binding"	protein	[29.5.11.4.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-1,29	2,92E-4	-1,25	1,06E-3	-1,77	7,66E-3	-1,44	1,40E-13	1,8	
AT3G05730	"unknown protein"	stress	[20.1.7.12] stress.biotic.PR-proteins.plant defensins	-1,18	6,95E-4	-0,76	4,88E-2	-2,37	9,00E-3	-1,44	1,84E-13	#N/A	
AT4G13495	Unknown gene		[]	-1,22	6,34E-4	-1,29	1,08E-3	-1,76	1,11E-2	-1,42	2,71E-13	#N/A	
AT2G44900	"armadillo/beta-catenin repeat family protein / F-box family protein"	protein	[29.5.11.4.3.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	-1,27	6,47E-4	-1,65	2,77E-4	-1,35	1,72E-2	-1,42	3,10E-13	4,7	
AT1G79000	"HAC1 (P300/CBP acetyltransferase-related protein 2 gene); transcription cofactor"	RNA	[27.3.54] RNA.regulation of transcription.Histone acetyltransferases	-1,31	2,47E-4	-1,24	9,64E-4	-1,71	7,32E-3	-1,42	3,49E-13	2,5	
AT2G46340	"SPA1 (SUPPRESSOR OF PHYA-105 1); signal transducer"	signalling	[30.11] signalling.light	-0,63	3,15E-2	-1,77	1,95E-4	-1,75	7,75E-3	-1,38	1,53E-12	#N/A	
AT4G16920	"disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative","RPP5 (RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 5)"	stress	[20.1.7] stress.biotic.PR-proteins	-0,90	9,27E-3	-1,45	6,24E-4	-1,72	1,01E-2	-1,36	4,17E-12	#N/A	
AT5G13950	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-1,61	5,31E-5	-0,87	7,75E-3	-1,58	1,05E-2	-1,35	5,04E-12	1,9	
AT5G63010	"disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	-1,12	1,56E-3	-1,41	5,68E-3	-1,49	2,00E-2	-1,34	9,67E-12	2,1	
AT5G20300	"GTP binding"	protein	[29.3.3] protein.targeting.chloroplast	-1,24	4,25E-4	-1,43	4,59E-4	-1,32	1,98E-2	-1,33	1,20E-11	#N/A	
AT5G56850	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-0,61	3,30E-2	-2,01	1,13E-4	-1,34	1,77E-2	-1,32	1,72E-11	#N/A	
AT2G05230	"DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein","DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein"	stress	[20.2.1] stress.abiotic.heat	-1,53	1,15E-4	-1,32	1,13E-3	-1,10	3,14E-2	-1,32	2,26E-11	#N/A	
AT5G54610	"ANK (ANKYRIN); protein binding"	cell	[31.1] cell.organisation	-1,65	8,39E-5	-0,79	1,43E-2	-1,48	2,48E-2	-1,31	3,32E-11	#N/A	
AT2G21385	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-0,82	6,45E-3	-1,90	1,63E-4	-1,18	2,61E-2	-1,30	4,04E-11	4,7	
AT4G19660	"NPR4 (NPR1-LIKE PROTEIN 4); protein binding"	cell	[31.1] cell.organisation	-1,79	2,55E-5	-0,85	5,08E-3	-1,25	3,53E-2	-1,30	4,59E-11	3,2	
AT1G60560	"SWIM zinc finger family protein"	RNA	[27.3.99] RNA.regulation of transcription.unclassified	-1,15	5,91E-4	-1,09	1,70E-3	-1,54	1,75E-2	-1,26	1,72E-10	0,6	
AT2G34650	"PID (PINOID); kinase"	protein	[29.4] protein.postranslational modification	-1,21	4,20E-4	-0,97	1,23E-2	-1,59	1,40E-2	-1,26	2,00E-10	#N/A	
AT3G04030	"myb family transcription factor"	RNA	[27.3.25] RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-0,57	4,91E-2	-1,38	5,07E-4	-1,78	2,14E-2	-1,24	3,31E-10	#N/A	
AT3G03140	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-1,18	7,02E-4	-0,97	6,23E-3	-1,55	1,08E-2	-1,23	4,85E-10	#N/A	
AT1G27850	"unknown protein"	DNA	[28.1] DNA.synthesis/chromatin structure	-1,20	4,28E-4	-0,79	1,64E-2	-1,70	1,18E-2	-1,23	5,35E-10	2,6	
AT5G48620	"disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative"	stress	[20.1.7] stress.biotic.PR-proteins	-0,63	2,86E-2	-1,82	1,50E-4	-1,22	2,80E-2	-1,22	6,46E-10	#N/A	
AT5G04670	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-1,76	3,03E-5	-0,70	2,54E-2	-1,20	2,41E-2	-1,22	7,47E-10	1,3	
AT3G26750	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-1,90	1,03E-5	-0,62	2,55E-2	-1,11	3,16E-2	-1,21	1,13E-9	3,9	
AT3G30300	"unknown protein"	hormone metabolism	[17.2.3] hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-0,92	5,06E-3	-1,36	8,92E-4	-1,28	4,05E-2	-1,19	2,23E-9	2,2	
AT5G53920	"unknown protein"	protein	[29.2.2] protein.synthesis.misc ribosomal protein	-0,84	6,46E-3	-1,50	5,72E-4	-1,22	2,35E-2	-1,19	2,36E-9	5,9	
AT3G08870	"lectin protein kinase, putative"	signalling	[30.2.19] signalling.receptor kinases.legume-lectin	-0,83	8,51E-3	-0,74	1,01E-2	-1,96	4,92E-3	-1,18	3,55E-9	#N/A	
AT1G30800	"transcription factor jumonji (jmj) family protein / zinc finger (C5HC2 type) family protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-0,86	1,49E-2	-0,69	1,74E-2	-1,95	5,51E-3	-1,17	4,70E-9	#N/A	
AT1G15290	binding	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	-0,94	2,29E-2	-1,44	1,37E-3	-1,10	4,44E-2	-1,16	5,65E-9	2,6	
AT3G10350	"APUM4 (ARABIDOPSIS PUMILIO 4); RNA binding"	transport	[34.18.1] transport.unspecified anions.arsenite-transporting ATPase	-1,38	1,46E-4	-0,85	5,48E-3	-1,25	2,30E-2	-1,16	6,04E-9	5,8	
AT3G47500	"CDF3 (CYCLING DOF FACTOR 3); DNA binding / protein binding / transcription factor"	RNA	[27.3.8] RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) DOF zinc finger family	-0,91	4,02E-3	-1,23	1,07E-3	-1,25	2,30E-2	-1,13	1,70E-8	#N/A	
AT1G67900	"phototropic-responsive NPH3 family protein"	signalling	[30.11] signalling.light	-1,35	3,60E-4	-0,97	2,91E-3	-1,06	3,54E-2	-1,13	1,89E-8	#N/A	
AT4G17880	"basic helix-loop-helix (bHLH) family protein"	RNA	[27.3.6] RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	-1,39	1,38E-4	-0,78	8,37E-3	-1,20	3,00E-2	-1,12	2,02E-8	1,5	
AT1G47056	"VFB1 (VIER F-BOX PROTEINE 1); ubiquitin-protein ligase"	protein	[29.5.11.4.3.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	-0,85	7,74E-3	-1,26	8,31E-4	-1,20	2,45E-2	-1,10	4,21E-8	#N/A	
AT3G18710	"U-box domain-containing protein"	RNA	[27.3.64] RNA.regulation of transcription.PHOR1	-0,77	1,85E-2	-1,11	4,33E-3	-1,42	1,75E-2	-1,10	4,32E-8	#N/A	
AT4G21180	"EMB1417 (EMBRYO DEFECTIVE 1417)"	stress	[20.2.1] stress.abiotic.heat	-0,78	2,00E-2	-0,89	5,08E-3	-1,62	1,03E-2	-1,10	5,27E-8	#N/A	
AT1G50030	"TOR (TARGET OF RAPAMYCIN)"	development	[33.30.1] development.multitarget.target of rapamycin	-1,00	2,37E-3	-0,73	1,08E-2	-1,51	1,11E-2	-1,08	9,14E-8	4,8	
AT2G13370	"CHR5 (chromatin remodeling 5); ATP binding / DNA binding / chromatin binding / helicase"	DNA	[28.1] DNA.synthesis/chromatin structure	-0,82	2,38E-2	-1,16	4,11E-3	-1,23	2,27E-2	-1,07	1,18E-7	1,8	
AT4G04970	"ATGSL1 (GLUCAN SYNTHASE LIKE-1); 1,3-beta-glucan synthase/ transferase, transferring glycosyl groups"	minor CHO metabolism	[3.6] minor CHO metabolism.callose	-1,06	1,28E-3	-0,90	3,91E-3	-1,24	2,20E-2	-1,07	1,23E-7	1,9	
AT2G04230	"F-box family protein"	protein	[29.5.11.4.3.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	-1,14	6,48E-4	-1,00	2,75E-3	-1,02	4,34E-2	-1,05	2,04E-7	2,5	
AT4G16860	"RPP4 (RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 4)"	stress	[20.1.1001] stress.biotic	-0,80	8,77E-3	-1,05	1,99E-3	-1,28	1,97E-2	-1,04	2,52E-7	#N/A	
AT1G61190	"disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative"	stress	[20.1.7] stress.biotic.PR-proteins	-0,68	2,11E-2	-1,16	1,17E-3	-1,29	1,96E-2	-1,04	2,71E-7	#N/A	
AT1G62780	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-0,65	2,67E-2	-1,19	1,07E-3	-1,28	2,00E-2	-1,04	3,11E-7	1,4	
AT3G48110	"EDD1 (EMBRYO-DEFECTIVE-DEVELOPMENT 1)"	protein	[29.1.14] protein.aa activation.glycine-tRNA ligase	-0,81	9,19E-3	-1,31	6,99E-4	-0,99	4,32E-2	-1,04	3,13E-7	1,8	
AT2G28950	"ATEXPA6 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A6)"	cell wall	[10.7] cell wall.modification	-0,64	2,82E-2	-1,18	1,36E-3	-1,29	2,36E-2	-1,04	3,27E-7	#N/A	
AT1G01310	"tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein"	stress	[20.2.99] stress.abiotic.unspecified	-0,85	5,00E-3	-0,57	4,31E-2	-1,67	4,39E-2	-1,03	4,10E-7	#N/A	
AT1G58848	"ATP binding / protein binding","disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative"	stress	[20.1.1001] stress.biotic	-0,68	2,06E-2	-0,91	3,88E-3	-1,48	1,52E-2	-1,02	4,76E-7	#N/A	
AT3E33580			[]	-1,26	3,00E-4	-0,68	1,44E-2	-1,12	4,51E-2	-1,02	5,00E-7	#N/A	
AT3G01460	"MBD9 (METHYL-CPG-BINDING DOMAIN 9); DNA binding"	RNA	[27.3.59] RNA.regulation of transcription.Methyl binding domain proteins	-0,97	2,11E-3	-0,63	2,59E-2	-1,38	2,99E-2	-0,99	1,15E-6	3,4	
AT3G14020	"CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) family protein"	RNA	[27.3.14] RNA.regulation of transcription.CCAAT box binding factor family, HAP2	-0,73	4,09E-2	-1,25	5,40E-3	-0,99	4,35E-2	-0,99	1,28E-6	8,3	

AT5G57630	"CIPK21 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 21); kinase"	protein	[29.4] protein.postranslational modification	-0,59	4,79E-2	-1,26	7,68E-4	-1,06	3,47E-2	-0,97	2,19E-6	1,4		
AT5G48900	"pectate lyase family protein"	cell wall	[10.6.3] cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	-0,60	4,22E-2	-0,99	2,50E-3	-1,32	1,81E-2	-0,97	2,20E-6	#N/A		
AT1G27210	binding	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-1,17	8,87E-4	-0,61	2,53E-2	-1,13	4,09E-2	-0,97	2,21E-6	2,6		
AT3G13690	"protein kinase family protein"	signalling	[30.2.22] signalling.receptor kinases.proline extensin like	-1,00	2,14E-3	-0,73	1,06E-2	-1,16	3,09E-2	-0,96	2,82E-6	#N/A		
AT5G05840	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-0,76	1,52E-2	-0,81	6,82E-3	-1,29	2,34E-2	-0,95	3,62E-6	#N/A		
AT4G00290	"mechanosensitive ion channel domain-containing protein / MS ion channel domain-containing protein"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	-0,69	1,94E-2	-0,96	3,29E-3	-1,20	2,45E-2	-0,95	4,03E-6	#N/A		
AT1G79000	"HAC1 (P300/CBP acetyltransferase-related protein 2 gene); transcription cofactor"	RNA	[27.3.54] RNA.regulation of transcription.Histone acetyltransferases	-0,74	1,35E-2	-0,71	1,43E-2	-1,39	1,55E-2	-0,94	4,42E-6	2,5		
AT5G63300	"NDPK2 (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE 2); ATP binding / nucleoside diphosphate kinase"	protein	[29.2.1.2.1.21] protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S21	-0,68	3,43E-2	-1,11	3,20E-3	-1,03	4,80E-2	-0,94	5,05E-6	#N/A		
AT3G49668	"BAM2 (big apical meristem 2); ATP binding / protein serine/threonine kinase"	micro RNA, natural antisense etc	[32] micro RNA, natural antisense etc	-1,03	1,90E-3	-0,61	2,44E-2	-1,14	3,23E-2	-0,93	7,14E-6	#N/A		
AT1G48560	"zinc finger (Ran-binding) family protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-0,84	6,47E-3	-0,67	3,73E-2	-1,18	2,61E-2	-0,90	1,54E-5	0,8		
AT1G01220	"GHMP kinase-related"	cell wall	[10.1.1.2] cell wall.precursor synthesis.NDP sugar pyrophosphorylase.GDP fucose and fucokinase	-0,68	1,97E-2	-0,62	2,44E-2	-1,39	1,68E-2	-0,90	1,62E-5	1,5		
AT3G23880	"F-box family protein"	protein	[29.5.11.4.3.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBO X	-0,92	3,16E-3	-0,64	2,02E-2	-1,12	3,75E-2	-0,89	1,84E-5	#N/A		
AT5G02310	"PRT6 (PROTEOLYSIS 6): ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding"	protein	[29.5.11] protein.degradation.ubiquitin	-0,65	2,45E-2	-0,77	1,50E-2	-1,24	4,53E-2	-0,89	1,94E-5	#N/A		
AT1G55850	"UPL1 (UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE 1); ubiquitin-protein ligase"	cell wall	[10.2.1] cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	-0,81	7,93E-3	-0,64	3,00E-2	-1,20	3,94E-2	-0,89	2,13E-5	4,0		
AT5G07760	"formin homology 2 domain-containing protein / FH2 domain-containing protein"	not assigned	[35.1.20] not assigned.no ontology.formin homology 2 domain-containing protein	-0,66	2,35E-2	-0,84	8,12E-3	-1,04	4,04E-2	-0,85	5,68E-5	#N/A		
AT3G55510	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	-0,64	2,67E-2	-0,65	3,70E-2	-1,14	3,39E-2	-0,81	1,33E-4	1,4		
AT3G21560	"UGT84A2; UDP-glycosyltransferase/ sinapate 1-glucosyltransferase"	misc	[26.2] misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	-0,63	2,91E-2	-0,76	1,01E-2	-1,00	4,82E-2	-0,79	1,95E-4	#N/A		
AT4G18140	"unknown protein"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	-0,72	1,54E-2	-0,58	3,81E-2	-1,08	3,40E-2	-0,79	2,13E-4	2,7		
AT3G59030	"pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein"	transport	[34.16] transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	-0,58	4,78E-2	-0,78	1,07E-2	-1,00	4,35E-2	-0,79	2,33E-4	#N/A		
AT3G04605		DNA	[28.99] DNA.unspecified	-0,75	2,65E-2	-0,52	4,56E-2	-1,08	4,33E-2	-0,78	2,83E-4	2,2		
AT3G48050	"bromo-adjacent homology (BAH) domain-containing protein"	RNA	[27.3.99] RNA.regulation of transcription.unclassified	-0,72	1,57E-2	-0,54	4,37E-2	-0,97	4,76E-2	-0,74	6,03E-4	#N/A		
AT5G17650	"glycine/proline-rich protein"	not assigned	[35.1.40] not assigned.no ontology.glycine rich proteins	0,63	3,04E-2	0,74	1,04E-2	1,12	3,10E-2	0,83	8,90E-5	17,9		
AT4G22820	"zinc finger (AN1-like) family protein"	rna	[27.3.99] RNA.regulation of transcription.unclassified	0,95	4,31E-3	0,72	1,10E-2	1,02	4,02E-2	0,90	1,61E-5	3,7		
AT3G12580	"HSP70 (heat shock protein 70); ATP binding"	stress	[20.2.1] stress.abiotic.heat	0,67	3,59E-2	0,93	3,44E-3	1,16	3,47E-2	0,92	9,07E-6	#N/A		
AT5G28830	"calcium-binding EF hand family protein"	signalling	[30.3] signalling.calcium	0,79	9,07E-3	0,80	7,00E-3	1,23	2,97E-2	0,94	5,41E-6	#N/A		
AT4G29850	"unknown protein","EMB2757/TAN (EMBRYO DEFECTIVE 2757); nucleotide binding"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	0,94	2,77E-3	0,86	1,20E-2	1,01	4,27E-2	0,94	5,16E-6	#N/A		
AT5G02490	"heat shock cognate 70 kDa protein 2 (HSC70-2) (HSP70-2)"	protein	[29.6] protein.folding	0,71	2,32E-2	0,66	1,75E-2	1,48	2,55E-2	0,95	3,83E-6	#N/A		
AT1G65150	"meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	0,62	3,84E-2	1,29	7,97E-4	1,07	4,50E-2	0,99	1,19E-6	#N/A		
AT2G41750	"DTW domain-containing protein"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	0,77	9,62E-3	0,92	4,03E-3	1,29	1,93E-2	1,00	1,09E-6	#N/A		
AT4G19200	"proline-rich family protein"	not assigned	[35.1.42] not assigned.no ontology.proline rich family	1,07	2,01E-3	1,04	3,95E-3	0,94	4,98E-2	1,02	5,58E-7	27,1		
AT3G50560	"short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein"	misc	[26.22] misc.short chain dehydrogenase/reductase (SDR)	0,95	1,05E-2	1,14	1,35E-3	1,12	4,02E-2	1,07	1,16E-7	7,9		
AT3G60540	"sec61beta family protein"	protein	[29.3.4.99] protein.targeting.secretory pathway.unspecified	0,80	1,29E-2	1,11	2,07E-3	1,33	1,92E-2	1,08	9,11E-8	4,0		
AT5G05040	"cysteine protease inhibitor"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	0,94	3,00E-3	1,39	4,97E-4	0,98	4,81E-2	1,10	4,18E-8	#N/A		
ATMG00640	"encodes a plant b subunit of mitochondrial ATP synthase based on structural similarity and the presence in the F(0) complex."	mitochondrial electron transport	[9.9] mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase	0,74	1,27E-2	1,17	1,61E-3	1,42	1,66E-2	1,11	3,35E-8	#N/A		
AT4G37150	"esterase, putative"	hormone metabolism	[26.8] misc.nitrilases, *nitrile lyases, berberine bridge enzymes, reticuline oxidases, troponine reductases	1,14	7,02E-4	0,79	7,43E-3	1,42	1,78E-2	1,12	2,64E-8	#N/A		
AT1G65845	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	1,09	1,00E-3	0,95	2,99E-3	1,39	2,74E-2	1,14	1,03E-8	#N/A		
AT2G31200	"ADF6 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 6); actin binding"	cell	[31.1] cell.organisation	1,50	1,32E-4	1,07	1,25E-2	0,95	4,81E-2	1,17	3,64E-9	#N/A		
AT1G29320	"ERD2 (ER lumen protein retaining receptor 2); receptor"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	1,89	9,48E-6	0,54	4,71E-2	1,13	3,43E-2	1,19	2,48E-9	#N/A		
AT5G49280	"hydroxyproline-rich glycoprotein family protein"	not assigned	[35.1.41] not assigned.no ontology.hydroxyproline rich proteins	0,69	1,76E-2	1,40	4,67E-4	1,60	9,30E-3	1,23	5,14E-10	2,3		
AT1G66173		micro RNA, natural antisense etc	[32] micro RNA, natural antisense etc	0,85	5,17E-3	1,07	2,34E-3	1,79	1,07E-2	1,24	4,09E-10	#N/A		
AT2G32020	"GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein"	misc	[26.24] misc.GCN5-related N-acetyltransferase	0,78	1,14E-2	1,38	5,41E-4	1,57	1,03E-2	1,25	3,05E-10	3,6		
AT4G01850	"MAT2/SAM-2 (S-adenosylmethionine synthetase 2)"	amino acid metabolism	[13.1.3.4.11] amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.methionine.S-adenosylmethionine synthetase	1,45	1,19E-4	1,13	1,31E-3	1,22	3,12E-2	1,27	1,35E-10	11,5		
AT4G25250	"invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein"	misc	[26.18] misc.invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	1,72	2,33E-5	0,88	1,63E-2	1,33	2,03E-2	1,31	2,88E-11	#N/A		
AT1G05340	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	0,91	3,43E-3	0,71	1,39E-2	2,34	2,48E-3	1,32	2,10E-11	39,9		
AT4G15700	"glutaredoxin family protein"	redox	[21.4] redox.glutaredoxins	1,24	3,51E-4	1,43	4,63E-4	1,33	2,47E-2	1,33	1,20E-11	#N/A		
AT5G44575	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	1,15	6,19E-4	1,35	6,07E-4	1,54	1,06E-2	1,35	6,54E-12	#N/A		
AT1E35450		not assigned	[]	1,01	1,56E-3	1,94	1,43E-4	1,15	4,35E-2	1,37	2,98E-12	#N/A		
AT4G01250	"WRKY22 (WRKY DNA-binding protein 22); transcription factor"	rna	[27.3.32] RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	2,39	7,10E-6	0,61	3,12E-2	1,15	3,45E-2	1,39	1,39E-12	#N/A		
AT2G42350	"zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein"	protein	[29.5.11.4.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	1,36	2,99E-4	1,11	1,94E-3	1,71	2,16E-2	1,39	1,02E-12	#N/A		
AT2G02990	"RNS1 (RIBONUCLEASE 1); endoribonuclease"	rna	[27.1.19] RNA.processing.ribonucleases	1,55	5,55E-5	1,52	2,04E-3	1,14	3,75E-2	1,40	7,09E-13	6,7		
AT2G32190	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	0,82	6,87E-3	1,87	1,41E-4	1,55	2,44E-2	1,41	4,69E-13	32,7		
AT1G05710	"ethylene-responsive protein, putative"	hormone metabolism	[17.5.3] hormone metabolism.ethylene.induced-regulated-responsive-activated	1,53	6,32E-5	1,89	1,62E-4	0,95	4,72E-2	1,46	5,10E-14	4,2		
VANDAL6_789 AT5G35348		not assigned	[]	1,51	1,17E-4	1,84	3,15E-4	1,04	3,81E-2	1,46	5,10E-14	#N/A		
AT1G55265	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	0,85	6,19E-3	1,76	1,73E-4	1,79	2,46E-2	1,47	5,10E-14	#N/A		
AT1G22065	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	0,63	2,97E-2	2,11	1,10E-4	1,71	8,28E-3	1,48	0,00E+0	#N/A		
AT1G17620	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	2,38	1,56E-6	1,04	1,94E-3	1,05	4,51E-2	1,49	0,00E+0	14,6		
AT1G28370	"ATERF11/ERF11 (ERF domain protein 11); DNA binding / transcription factor/ transcriptional repressor"	hormone metabolism	[17.5.2] hormone metabolism.ethylene.signal transduction	1,98	6,89E-6	1,37	6,92E-4	1,11	3,04E-2	1,49	0,00E+0	4,0		
AT3G19550	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	1,38	1,66E-4	1,62	2,65E-4	1,48	2,54E-2	1,50	0,00E+0	#N/A		
AT4G15660	"glutaredoxin family protein"	redox	[21.4] redox.glutaredoxins	1,99	7,39E-6	1,40	5,09E-4	1,12	4,06E-2	1,50	0,00E+0	#N/A		
AT4G27652	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	1,75	2,08E-5	1,41	4,57E-4	1,39	1,96E-2	1,52	0,00E+0	6,3		
AT1G80610	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	2,21	3,95E-6	1,09	1,62E-3	1,31	3,10E-2	1,53	0,00E+0	4,1		
AT3G15260	"SPL5 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 5); DNA binding / transcription factor"	protein	[29.4] protein.postranslational modification	0,90	3,48E-3	1,90	1,41E-4	1,94	4,85E-3	1,58	0,00E+0	7,7		
AT5G10300	"hydrolase, alpha/beta fold family protein"	misc	[26.8] misc.nitrilases, *nitrile lyases, berberine bridge enzymes, reticuline oxidases, troponine reductases	2,30	2,13E-6	1,05	2,44E-3	1,48	1,21E-2	1,61	0,00E+0	4,3		
AT4G17500	"ATERF-1 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 1); DNA binding / transcription factor/ transcriptional activator"	hormone metabolism	[17.5.2] hormone metabolism.ethylene.signal transduction	2,70	1,06E-6	0,75	9,74E-3	1,42	3,94E-2	1,62	0,00E+0	#N/A		
AT5G12880	"proline-rich family protein"	cell wall	[10.5.4] cell wall.cell wall proteins.HRGP	1,97	6,74E-6	1,32	6,14E-4	1,70	7,40E-3	1,66	0,00E+0	5,6		
AT3G03480	"CHAT (ACETYL COA:(Z)-3-HEXEN-1-OL ACETYLTRANSFERASE); acetyl CoA:(Z)-3-hexen-1-ol acetyltransferase"	stress	[20.1.1001] stress.biotic	1,32	2,13E-4	1,24	1,93E-3	2,43	2,44E-3	1,66	0,00E+0	#N/A		
AT5G43420	"zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein"	protein	[29.5.11.4.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	2,39	2,27E-6	1,48	4,93E-4	1,18	2,51E-2	1,68	0,00E+0	#N/A		
AT2G32200	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	3,31	3,05E-7	0,85	1,26E-2	0,96	4,52E-2	1,71	0,00E+0	#N/A		
AT3G17110	pseudogene	not assigned	[35.1.40] not assigned.no ontology.glycine rich proteins	0,97	4,54E-3	1,51	6,12E-4	2,68	3,40E-3	1,72	0,00E+0	#N/A		
AT4G15690	"glutaredoxin family protein"	redox	[21.4] redox.glutaredoxins	1,85	5,70E-5	1,34	1,28E-3	2,12	2,31E-2	1,77	0,00E+0	#N/A		
AT1G18200	"AtRABA6b (Arabidopsis Rab GTPase homolog A6b); GTP binding"	signalling	[30.5] signalling.G-proteins	2,89	2,69E-7	0,63	2,19E-2	1,84	5,53E-3	1,79	0,00E+0	7,2		
AT2G34600	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	3,73	3,16E-8	0,58	3,88E-2	1,20	2,95E-2	1,83	0,00E+0	#N/A		
AT1G05000	"tyrosine specific protein phosphatase family protein"	protein	[29.4] protein.postranslational modification	1,53	5,78E-5	2,33	1,13E-4	1,73	1,31E-2	1,86	0,00E+0	6,9		
AT1G36622	"unknown protein"	not assigned	[35.1.1023] not assigned.no ontology	3,09	1,64E-7	0,79	7,93E-3	1,92	5,27E-3	1,94	0,00E+0	#N/A		
AT3G22961	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	1,01	1,56E-3	1,33	1,24E-3	3,67	8,21E-4	2,00	0,00E+0	#N/A		
AT1G65510	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	2,77	4,88E-7	1,02	2,36E-3	2,40	2,18E-3	2,06	0,00E+0	#N/A		
AT5G28076	transposable element gene; pseudogene, hypothetical protein	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	2,01	6,29E-6	2,43	6,44E-5	1,77	1,55E-2	2,07	0,00E+0	#N/A		
AT1G43590	transposable element gene; similar to unknown protein	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	1,70	2,78E-5	2,30	8,68E-5	2,24	2,75E-3	2,08	0,00E+0	6,3		
AT1G02470	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	1,45	3,33E-4	3,06	6,66E-5	1,89	2,20E-2	2,13	0,00E+0	#N/A		
AT2G22860	"ATPSK2 (PHYTOSULFOKINE 2 PRECURSOR); growth factor"	development	[33.99] development.unspecified	3,10	1,63E-7	1,37	2,93E-3	2,14	3,86E-3	2,20	0,00E+0	#N/A		
AT5G46295	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	2,91	3,51E-7	2,87	4,60E-5	0,99	4,51E-2	2,25	0,00E+0	#N/A		
AT5G03204	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	3,67	9,89E-8	2,06	1,08E-4	1,19	2,95E-2	2,30	0,00E+0	#N/A		
AT4G27654	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	2,66	6,79E-7	3,54	4,29E-5	1,09	4,81E-2	2,43	0,00E+0	#N/A		
AT5G28237	"tryptophan synthase, beta subunit, putative"	amino acid metabolism	[13.1.6.5.5] amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.tryptophan.tryptophan synthase	5,24	6,64E-9	1,10	4,28E-3	1,23	3,23E-2	2,52	0,00E+0	#N/A	+	
AT5G10625	"unknown protein"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	1,59	1,48E-4	2,80	7,26E-5	4,30	4,40E-4	2,89	0,00E+0	#N/A	+	
AT4G36950	"MAPKKK21; ATP binding / protein kinase"	not assigned	[35.2.1001] not assigned.unknown	6,60	1,27E-9	2,48	6,22E-5	1,87	7,91E-3	3,65	0,00E+0	#N/A	+	

164 diffentially expressed

99 down regulated genes
65 upregulated genes

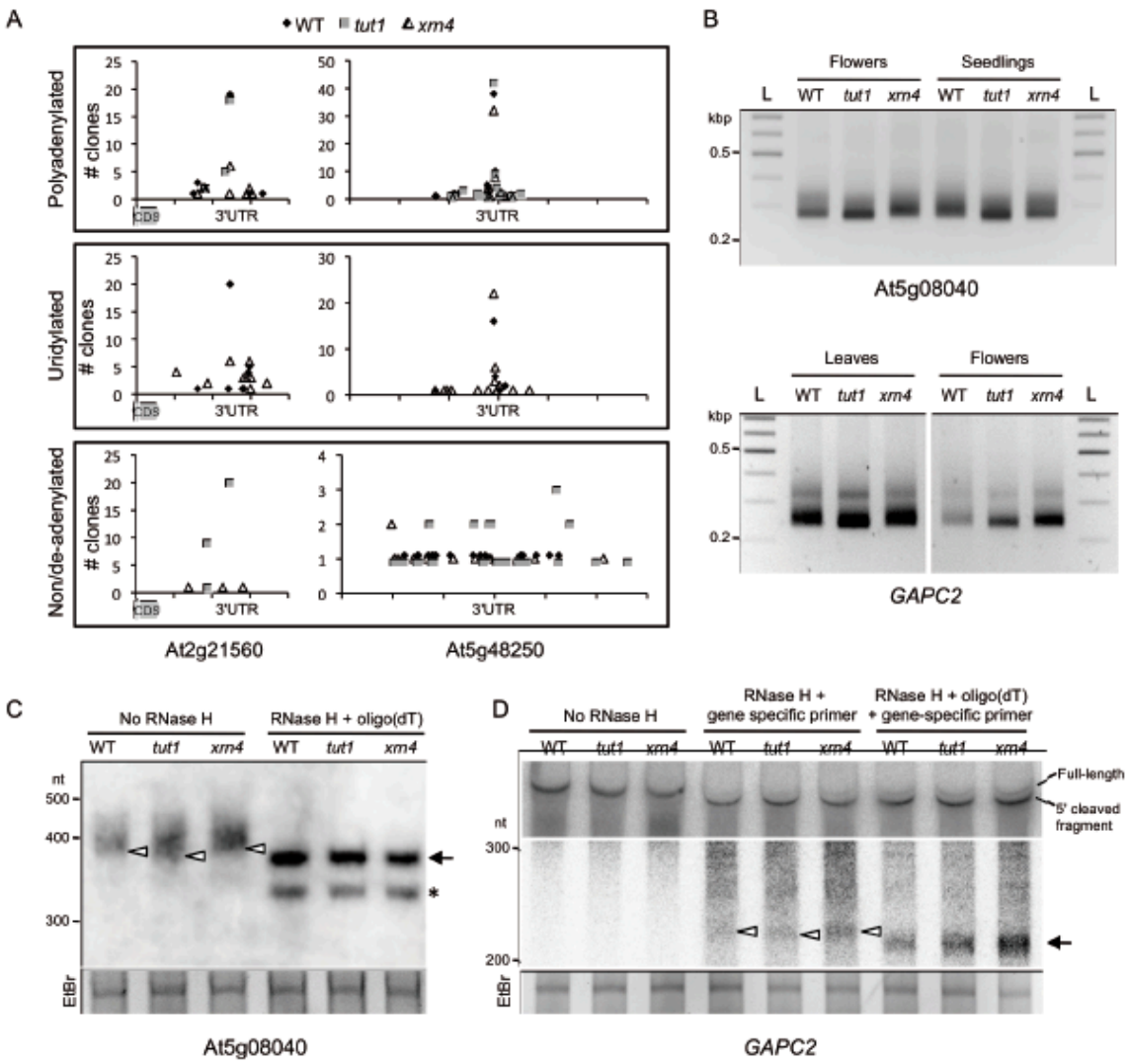


Figure S4. Additional support for mRNA 3' shortening in *tut1*.

(A) 3' RACE PCR analysis of At2g21560 and At5g48250 transcripts. Number of clones (n=163 for At2g21560, n=314 for At5g48250) from two independent experiments corresponding to polyadenylated, uridylated or non/deadenylated (from 0 to 10 As) mRNAs, respectively, were plotted against position alongside the 3' region of each respective mRNA as indicated. One interval on abscissas is 100 nt.

(B) 3' RACE analysis showing 3' shortening of At5g08040 and *GAPC2* transcripts in *tut1*. Genotypes and tissues are indicated on top of panels corresponding to negative images of ethidium bromide stained 2% agarose gels. 3' RACE PCR products were run alongside a DNA ladder (L) with 100 bp size increments.

(C) 6% acrylamide gel northern analysis of At5g08040 transcripts using total RNA extracted from flowers. As indicated on the top of the panel, RNA were either not treated with RNase H or incubated with RNase H and oligo(dT) to remove poly(A) tails. The white arrowheads indicate the bottom of the smears corresponding to adenylated mRNAs whereas the migration of completely deadenylated mRNAs observed upon digestion with RNase H in the presence of oligo(dT) is indicated by a black arrow. The asterisk marks an artefactual band probably due to a partial cleavage by RNase H in a A-rich region within the mRNA sequence. The position of RNA standards run alongside the samples is indicated on the left. A portion of the 6% acrylamide gel stained with ethidium bromide (EtBr) is shown for loading and migration control.

(D) 6 % acrylamide gel northern analysis of *GAPC2* transcripts using total RNA extracted from flowers. As indicated on the top of the panel, RNA were either not treated with RNase H, incubated with RNase H and a gene-specific primer to direct cleavage 208 nt upstream of the polyadenylation site or incubated under the latter conditions plus oligo(dT) to remove poly(A) tails. Both upper panels correspond to portions of Northern blot with two different exposure times. The upper panel shows the migration of the full-length *GAPC2* mRNAs and of the 5' fragment resulting from RNase H cleavage directed by the gene-specific primer. The middle panel shows the portion of the gels where 3' fragments of *GAPC2* transcripts are detected. The rest of the legend is as in C.

Table S1. The sequences of the primers used in this study are given in 5' to 3' direction. fw, forward; rv, reverse; cRT, circular RT-PCR, H rv, rverse primer for RNase H cleavage; q, quantitative RT-PCR primer

Gene ID	Description	5'-3' sequence
At1g01550	BPS1 q fw	GTTTGCTCTGCATAACTTGGAG
	BPS1 q rv	TCTAGTGATGACTGAGCTTTCGAC
At1g11330	At1g11330 fw1	CTGAGGCTGAATCTTCTGACC
	At1g11330 fw2	CAGAGTAGTCAAAAGGTATCTATCAATG
At1g13440	GAPC2 fw1	TTGGTGACAACAGGTCAAGC
	GAPC2 fw2	CGACAACGAATGGGGTTAC
	GAPC2 probe fw	CGACAACGAATGGGGTTAC
	GAPC2 probe rv	CAGTTGGGTTTGAGTTAGCACG
	GAPC2 H rv	CCACACACAAACTCTCGCCG
At1g24160	At1g24160 fw1	GGTTCTCTTCCAATGCGGA
	At1g24160 fw2	CCACCAATGTTGTTCCATCAG
At1g48410	AGO1 fw1	GACTCTAAAATCTGCCACC
	AGO1 fw2	CCAGAGACATCAGACAGTG
At1g63680	MURE q fw	GGTGAAGAAGGTGATATGGTTGTT
	MURE q rv	AACTCTTTCTTTTCACCTTCAAGC
At1g69040	At1g69040 probe fw	TGAAAACAGCCTAACGGTCAC
	At1g69040 probe rv	TGAAGAAGAAGATAATGAGGATTTG
At2g03340	At2g03340 fw1	AAAGAAGAGCAAATCACTTGACAG
	At2g03340 fw2	GTTGCCTCAAAACACCACAG
At2g14080	At2g14080 fw1	CGTTGAGGTGACTTCGGATG
	At2g14080 fw2	AATGGGAGATAGGAGAATGTGG
At2g21560	At2g21560 fw1	TCAGAGAATCACGAGGGCTC
	At2g21560 fw2	GAGGAGGAACCAAAAGGATGA
At2g40340	DREB2C fw1	ACAACAATGTGTCTGGTCAAGAG
	DREB2C fw2	TCAACCCTATGGAGATTGCTC
At2g40750	At2g40750 fw1	CAGCAGTGTGACAGCAATAGACG
	At2g40750 fw2	GTGAGGACTTGTCATTGGTTTG
At2g45160	LOM1 fw1	TGTTGATGAAACGACACCGT
	LOM1 fw2	AGTTTGAGTCAGATGGCGGA
	LOM1 cRT	ACTCTGCTCTTGACCAGGAG
	LOM1 cRT rv1	TCATCCAAACCCATCTGACTAC
	LOM1 cRT rv2	GTTACGGTGGTGTTGGTGAC
At3g07230	At3g07230 fw1	CTCGTATCTTGTAGCAGCCACT
	At3g07230 fw2	CTAAAGCAAAATTCTGAGATCGAA
At3g18780	ACTINE2 q fw	CTTGCACCAAGCAGCATGAA
	ACTINE2 q rv	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT
At3g22104	At3g22104 fw1	TCATACTCAGAATGGAGAAGGTTG
	At3g22104 fw2	AGAATCAAATGGAAGTTATCAAGAAG
At3g54810	BME3 q fw	AAGTCCAGTGTCGGTTCTCG
	BME3 q rv	GGAGGTTGTGTTGGTGGTTT
At3g57240	At3g57240 fw1	TGTTTACGCATCATTAGAGAAAGC
	At3g57240 fw2	AGCGACGGGTGTGGATAAT
At4g16950	At4g16950 fw1	TTGTAGCAGACACAGGATTGG
	At4g16950 fw2+probe fw	AGAAGCATCATCATCAACATCTC
	At4g16950 probe rv	TGCTAATAAAGAGAAAAACAACCTG
At4g17500	ERF q fw	GGAGCTCCGAAGAAGAGGAG
	ERF q rv	CACTTCACCGTCAATCCCTTA
At4g18060	At4g18060 fw1	AGAACGGCTCAGAGAAAACG
	At4g18060 fw2	TGGTTGGTTTCCTATGGCTTAC
At4g20270	BAM3 fw1	GGAAGAAGGGATAGACATTGTGC
	BAM3 fw2	TGTGGCAATGCTATGTGTGC
At4g26410	EXP (Expressed-10) q fw	GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC
	EXP (Expressed-10) q rv	GGTCCGACATACCCATGATCC
At4g34270	TIP4-1LIKE q fw	GTGAAAACTGTTGGAGAGAAGCAA
	TIP4-1LIKE q rv	TCAACTGGATACCCTTTCGCA
At4g36540	At4g36540 fw1	TGTTGTTGTCTTATCCATTTATCTATC
	At4g36540 fw2	CAGAGGAAACCAATCCAAAGA
At4g36950	At4g36950 fw1	TGAGAGTGGCGAAGAAGACG
	At4g36950 fw2	AATGATTCGGTTATGTTTGGTTC
At5g08040	At5g08040 fw1+probe fw	TCAGCAGCAAGATGGTGAAC
	At5g08040 fw2	GAAACTTCTGCGAGCACTTG
	At5g08040 probe rv	AGAAACGAGTTCACACCAATTCTA
At5g10300	At5g10300 probe fw	GGACGATGAGTTTATTGAAGATG
	At5g10300 probe rv	AAGGGGTTTGTTTTATTAGTAACG
At5g10625	At5g10625 fw1	TAAAGGTAGAAGAGAAGATGTGTGC
	At5g10625 fw2	AAAGGAAGCGATGACTATTGGA
At5g24470	At5g24470 fw1	AATGAAGCGAAAGGACAGATG
	At5g24470 fw2	CGTTCGTCAAGTCCAATCCA
At5g28237	At5g28237 fw1	TCCGTAGGTGTTGGGTTAGAG
	At5g28237 fw2	TCGTGCCTACTCTTCGTGATG
At5g48250	At5g48250 fw1	GCTTATGATTACGACCCGATG
	At5g48250 fw2	CTGGAAGCCATTATTGGTTGA
Anchor	anchor rv1	GAATTCATGTCGACGGTCTCA
	anchor rv2	CATGTCGACGGTCTCATCTAG

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Material

The *Arabidopsis thaliana* plants used in this study are of Columbia ecotype (Col-0) and were grown on soil with 16h light/8h darkness cycles. The characterization of *tut1-1* (Salk_087647C) and *tut1-2* (WISCDSLOXHS208_08D) T-DNA insertion lines is shown in Figure S1. Identical 3' RACE profiles were obtained for *tut1-1* and *tut1-2* (as shown for At5g08040 transcripts in Figure S1) and the data shown as *tut1* throughout the text were obtained in *tut1-1*. *xrn4-3* (SALK_014209) has been described previously (Gazzani et al., 2004). Total RNA was isolated using TRI-reagent (MRC) from various tissues as indicated in respective figures.

Expression and purification of recombinant proteins

Recombinant his-tagged GST-TUT1 or the catalytically inactive mutant GST-TUT1D491/3A were produced in BL21(DE3) cells grown at 17°C. Cells were disrupted by sonication in 20 mM MOPS pH 7.5, 250 mM KCl, 15%(v/v) glycerol, 1 mM DTT, 0.1%(v/v) Tween 20 in presence of protease inhibitors (Roche). Recombinant proteins were purified by classical IMAC on NI-NITA resin followed by glutathion affinity chromatography. Purified proteins were dialyzed against 20 mM MOPS pH 7.5, 100 mM NaCl, 15%(v/v) glycerol, 0.1%(v/v) Tween20. Aliquots were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Northern blot analyses

To detect *TUT1* mRNAs (Figure S1), 20 µg of total RNA extracted from flowers were fractionated using 1.5% agarose 3% formaldehyde gels and transferred to a Hybond N+ membrane (Amersham). The TUT1 probe consisted of a DIG-labelled PCR product corresponding to nucleotides 161:840 of TUT1 coding sequence. Hybridization and detection were performed using DIG system kits from Roche according to the manufacturer's recommendations. A similar procedure was followed for northern blot analyses presented in Figures 5A except that [α-32P]-dCTP random-labeled probes were used. Final stringent washes were performed at 68°C with 0.1x SSC, 0.1%(w/v) SDS.

RNase H cleavage

Fifteen µg of total RNA were denatured at 65°C for 2 min in the presence of 25 pmoles of genespecific primer and/or 50 pmoles of oligo(dT)12 primer and incubated at 50°C for 15 min with 0.75 U of RNase H (NEB) under the manufacturer's recommended buffer conditions and in a total volume of 25 µL. RNA were phenol-extracted, precipitated with ethanol, solubilized in formamide, denatured at 65°C for 3 min and run on 6% acrylamide gel containing 7 M urea and 1x TBE. Following transfer to Hybond-N+ membrane (Amersham) and UV crosslinking, membranes were prehybridized and hybridized at 68°C in PerfectHybTM Plus solution (Sigma-Aldrich) with [α-32P]-dCTP random-labeled probes. Final stringent washes were performed at 68°C with 0.5x SSC, 0.1%(w/v) SDS.

Quantitative RT-PCR analyses

For qRT-PCR analysis, cDNA was synthesized from 1-5 µg of total RNA using SuperScript® III reverse transcriptase (Invitrogen) using 37.5 pmol of oligo(dT)20 and 5 ng of random hexamer (Fermentas) per 20 µl reaction according to the

manufacturer's instructions. Three technical triplicates and four biological replicates were analyzed in a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche). Each qPCR reaction contained 1x LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche), 5 pmol of each primer, 0.5 µL of cDNA in a volume of 10 µL. *ACT2*, *TIP41* and *EXP* were used as reference mRNAs.

Microarray analysis

Microarray analysis was carried out at the Unité de Recherche en Génomique Végétale (Evry, France), using the CATMAv6.1 array based on Roche-NimbleGen technology. A single high density CATMAv6.1 microarray slide contains twelve chambers, each containing 135,000 primers representing all the *Arabidopsis thaliana* genes: 30,834 probes corresponding to TAIRv8 annotation (including 476 probes of mitochondrial and chloroplast genes) + 1289 probes corresponding to EUGENE software predictions. Moreover, it included 5,352 probes corresponding to repeat elements, 658 probes for miRNA/MIR, 342 probes for other RNAs (rRNA,tRNA, snRNA, soRNA) and finally 36 controls. Each long primer is triplicate in each chamber for robust analysis. Three independent biological replicates were produced. For each biological repetition, rosette leaves were collected by pooling rosette leaves from five plants (growth stage 6.5) (Boyes et al., 2001). Total RNA was extracted using using TRI-reagent (MRC). For each comparison, one technical replicate with fluorochrome reversal was performed for each biological replicate (*i.e.* six hybridizations per comparison). The labeling of cRNAs with Cy3-dUTP or Cy5-dUTP (Perkin-Elmer-NEN Life Science Products) and the hybridization to the slides were performed as described in (Lurin et al., 2004). Two micron scanning was performed with InnoScan900 scanner (InnopsysR, Carbonne, FRANCE) and raw data were extracted using MapixR software (InnopsysR, Carbonne, FRANCE).

Statistical Analysis of Microarray Data

Experiments were designed with the statistics group of the Unité de Recherche en Génomique Végétale (Evry, France). For each array, the raw data comprised the logarithm of median feature pixel intensity at wavelengths 635 nm (red) and 532 nm (green). For each array, a global intensity dependent normalization using the loess procedure (Yang et al., 2002) was performed to correct the dye bias. The differential analysis is based on the log-ratios averaging over the duplicate probes and over the technical replicates. Hence the numbers of available data for each gene equals the number of biological replicates and are used to calculate the moderated t-test (Smyth, 2004). Under the null hypothesis, no evidence that the specific variances vary between probes is highlighted by Limma and consequently the moderated t-statistic is assumed to follow a standard normal distribution. To control the false discovery rate, adjusted p-values found using the optimized FDR approach of (Storey and Tibshirani, 2003) are calculated. We considered as being differentially expressed the probes with an adjusted p-value ≤ 0.05. Analysis was done with the R software (http://www.R-project.org). The function SqueezeVar of the library Limma has been used to smooth the specific variances by computing empirical Bayes posterior means. The library kerfdr has been used to calculate the adjusted p-values.

Differentially expressed genes were assigned to a MapMan category using the Arabidopsis Classification Superviewer at http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi (Provart and Zhu, 2003) (Figure S3). In addition, a Gene Ontology analysis was performed using the BiNGO plugin (Maere et

al., 2005) to identify GO categories that are significantly overrepresented in the sets of down and up-regulated genes (Figure S3).

Data Deposition

Microarray data from this article were deposited at Gene Expression Omnibus (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), accession no. GSE38902) and at CATdb (http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/; Project: RS11-10_tut1) (Gagnot et al., 2008).

Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., and Gorlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. Plant Cell *13*, 1499-1510.

Gagnot, S., Tamby, J.P., Martin-Magniette, M.L., Bitton, F., Taconnat, L., Balzergue, S., Aubourg, S., Renou, J.P., Lecharny, A., and Brunaud, V. (2008). CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. Nucleic Acids Res *36*, D986-990.

Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., and Sablowski, R. (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. Science *306*, 1046-1048.

Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B.*, et al.* (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. Plant Cell *16*, 2089-2103.

Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. Bioinformatics *21*, 3448-3449.

Potuschak, T., Vansiri, A., Binder, B.M., Lechner, E., Vierstra, R.D., and Genschik, P. (2006). The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis. Plant Cell *18*, 3047-3057.

Provart, N., and Zhu, T. (2003). A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. Currents in Computational Molecular Biology *2003*, 271-272.

Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol *3*, Article3.

Storey, J.D., and Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 9440-9445.

Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Res *30*, e15.

III. Etude du rôle de TUT1 dans l'uridylation d'autres ARN et effet de la surexpression de TUT1

Le nouveau rôle de l'uridylation dans la protection des extrémités 3' des ARNm déadénylés a pu être montré chez *A. thaliana*. Dans le cadre de mon projet de thèse, le rôle potentiel de TUT1 dans l'uridylation d'autres espèces d'ARN cytosoliques a également été étudié. Des expériences visant à déterminer l'effet de la surexpression de TUT1 sur l'expression d'un gène rapporteur *GFP* ont également été entreprises. Cette partie de mon manuscrit présente les résultats préliminaires collectés sur ces travaux toujours en cours au laboratoire.

A. TUT1 n'est pas un acteur majeur de l'uridylation des petits ARN

Jusqu'à quelques semaines de l'écriture de ce manuscrit, aucune Terminal Uridylyl Transférase impliquée dans l'uridylation des petits ARN n'était connue chez *A. thaliana*. Fin avril 2012, deux articles de recherche ont été publiés présentant la caractérisation du rôle de ncPAP5/HESO1 dans l'uridylation des petits ARN (Ren et al., 2012; Zhao et al., 2012). Les auteurs concluent de ces résultats que l'uridylation déstabilise les petits ARN.

L'absence de méthylation des petits ARN par la méthylase HEN1 entraîne une diminution du niveau des petits ARN ainsi qu'une uridylation de ces derniers (Li et al., 2005). Les plantes mutantes *hen1* montrent un phénotype développemental sévère au niveau des rosettes, une fertilité diminuée et un développement plus lent que les plantes sauvages. La double mutation *hen1/heso1* entraîne une complémentation partielle du phénotype développemental dû à la mutation *hen1* ainsi qu'une augmentation du niveau des petits ARN et une diminution du taux d'uridylation de ces derniers (voir introduction III E 2 b). Cependant la mutation du gène *HESO1* dans un mutant *hen1* ne supprime pas complètement l'ajout d'uridine à l'extrémité 3' des petits ARN non méthylés. Ceci révèle l'existence d'une activité redondante pour l'uridylation des petits ARN.

Nous avions entrepris une démarche similaire pour tester une implication potentielle de TUT1 dans l'uridylation des petits ARN. Dans ce cadre, le double mutant *hen1/tut1-1* a été généré au laboratoire. La caractérisation de ce mutant a été

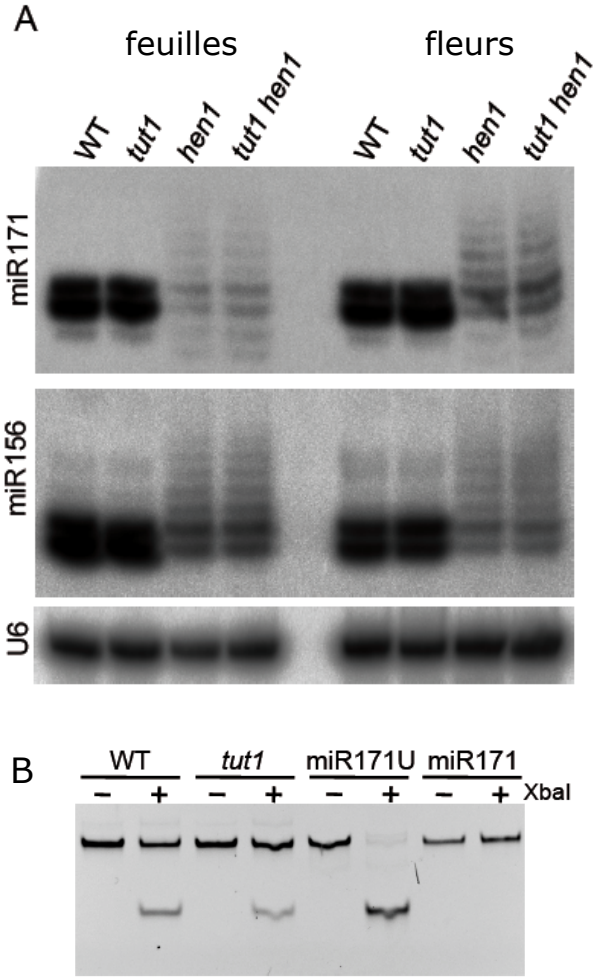


Figure 17 : TUT1 n'est pas nécessaire à l'uridylation des petits ARN

A. L'ampleur de l'addition de nucléotide sur les petits ARN est identique dans les lignées *hen1* et *tut1/hen1*. Une analyse par northern à haute résolution a été effectuée pour analyser les profils des petits ARN dans *tut1-1* (*tut1*), *hen1-6 (hen1*) et le double mutant correspondant (*tut1 hen1*). Les résultats obtenus pour miR171 et miR156 sont présentés. Des résultats identiques ont été obtenus pour d'autres petits ARN. Les mêmes résultats ont été obtenus avec de l'ARN de fleur et de feuille. L'hybridation d'U6 snRNA a été utilisée comme contrôle de charge.

B. Les petits ARN sont toujours uridylés dans *tut1*. Les petits ARN purifiés sur gel pour les plantes sauvage (WT) et la lignée *tut1-1* (*tut1*) ont été ligués à une amorce ARN utilisée pour la transcription inverse. Les produits PCR obtenus avec une amorce sens spécifique de miR171 en combinaison avec une amorce antisens s'hybridant sur sur l'amorce ARN liguée en 3' du miRNA ont été digérés par l'enzyme de restriction XbaI. Une coupure par XbaI révèle la présence d'au moins un résidu uridine non encodé par le génome à l'extrémité 3' du miRNA en reconstituant un site XbaI incomplet présent à l'extrémité 5' de l'amorce ARN liguée. miR171U et miR171 se réfèrent aux ARN synthétiques uridylés et non-uridylés utilisés comme contrôle positif et négatif respectivement. L'image en négatif d'une gel polyacrylamide 17% (p/v) coloré au bromure d'éthidium est présentée. Des résultats identiques ont été obtenus pour miR171b, c et miR408 (résultats non montrés).

réalisée en collaboration avec Mélanie Tanguy de l'équipe de Sébastien Pfeffer à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg. La première information issue de ce croisement est que la mutation *tut1-1* n'entraîne pas de restauration, même partielle, du phénotype développemental dû à la mutation *hen1*. L'analyse de petits ARN candidats par northern effectuée pour différents miRNA dans le contexte du mutant *tut1-1* et du double mutant *hen1/tut1-1* sont présentés en figure 17A. Le niveau de ces petits ARN n'est pas affecté dans le simple mutant *tut1-1* et le profil des petits ARN en northern est le même entre le double mutant *hen1/tut1-1* et le simple mutant *hen1*.

Afin de confirmer que les petits ARN sont toujours uridylés dans le mutant *tut1*, une autre approche, uniquement qualitative, a été utilisée. Cette approche consiste en une 3'RACE PCR (« 3'Rapid Amplification of cDNA End ») sur des miRNA. Après purification des petits ARN à partir d'ARN total, une ligation d'un ARN adaptateur à l'extrémité 3' de ces petits ARN a été réalisée. Une réaction de transcription inverse a ensuite été effectuée à l'aide d'une amorce oligonucléotidique correspondante à la séquence de l'adaptateur. En cas d'uridylation du petit ARN, la ligation de l'adaptateur permet la création d'un site reconnu par l'enzyme de restriction XbaI après transcription inverse et amplification PCR. Les résultats de ces expériences réalisées sur miR171a, présentés en figure 17B, montre que ce petit ARN peut toujours être uridylé dans le mutant *tut1-1*. Cette analyse a également été effectuée pour d'autres petits ARN tel miR171b/c et miR408 et ont également montré que ces petits ARN peuvent toujours être uridylés dans le mutant *tut1*.

Les analyses par northern et PCR n'excluent pas l'implication de TUT1 dans l'uridylation des petits ARN mais indiquent que l'activité de TUT1 n'est pas indispensable à l'uridylation des petits ARN testés chez *A. thaliana*. Des résultats de séquençage de banques de petits ARN issus du mutant *tut1-1* ont permis de confirmer cette hypothèse à l'échelle de la population globale des petits ARN. Le triple mutant *hen1/heso1/tut1-1* devra être généré afin de vérifier si TUT1 est responsable de l'activité redondante d'uridylation des petits ARN en absence d'HESO1.

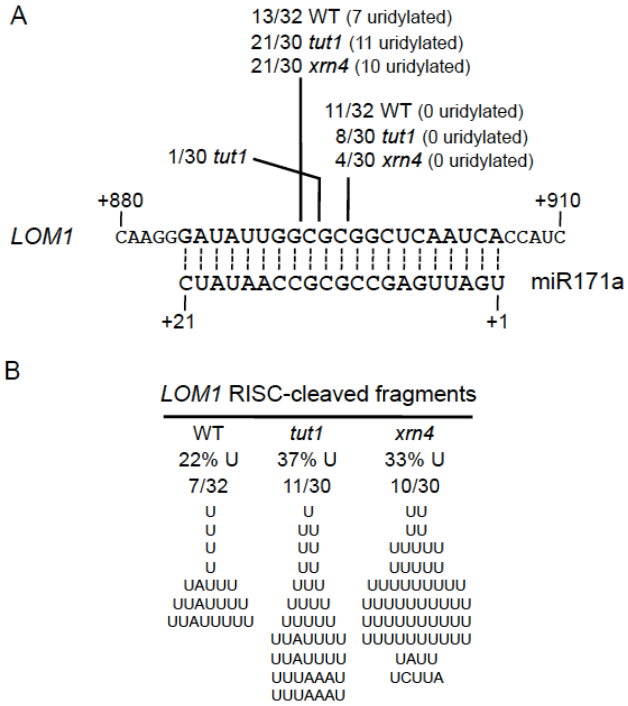


Figure 18 : TUT1 n'est pas nécessaire à l'uridylation des fragments 5' des ARNm LOM1 clivés par le complexe RISC

A. Les différents statuts d'uridylation des ARNm LOM1 clivés par le complexe RISC associé à miR171. La séquence au dessus montre la séquence +880/+910 de l'ARNm LOM1 (+1 étant le premier nucléotide du codon initiateur) et la séquence du dessous correspond à la séquence de miR171a. Les lettres en majuscule indique la complémentarité parfaite entre les séquences de l'ARNm LOM1 et de miR171. La position des extrémités 3' des fragments d'ARNm issus du clivage par RISC a été déterminée par 3'RACE PCR et est indiquée par des lignes pleines. Les ratios indiquent la proportion de clones correspondant à une position donnée. Pour les plantes sauvages (WT) et la lignée *xrn4*, 9 et 5 clones respectivement ont donné des extrémités 3' en amont de la région représentée ici. Le nombre de clones correspondant aux fragments uridylés est indiqué entre parenthèses. Il est important de noter que l'uridylation n'a été mise en évidence que pour les fragments clivés à la position +892.

B. L'absence de TUT1 n'affecte pas la présence, la longueur ou la composition des queues riches en U ajoutées aux fragments issus du clivage par RISC. Le pourcentage et le nombre de clones correspondants aux fragments uridylés sont indiqués.

B. TUT1 n'est pas nécessaire à l'uridylation du fragment 5' de l'ARNm LOM1 issu du clivage par miR171/RISC

Les fragments 5' des ARNm clivés par le complexe RISC ont été montrés comme étant uridylés dans divers organismes et notamment chez *A. thaliana* (Shen and Goodman, 2004) (voir introduction III E 4). L'uridylation de l'extrémité 3' de ces fragments a pu être corrélée à un raccourcissement à leur extrémité 5'. La protéine responsable de ce raccourcissement n'a pas encore été identifiée mais une candidate potentielle pour ce phénomène est XRN4, une 5'-3' exoribonucléase cytosolique d'*A. thaliana*. La TUTase responsable de l'uridylation des fragments 5' des ARNm clivés par RISC n'a pas non plus été identifiée chez *A. thaliana*.

Nous avons montré précédemment que TUT1 est responsable de l'uridylation des ARNm LOM1. Nous avons mis en évidence dans le cadre de l'étude de l'uridylation des ARNm par TUT1 que l'uridylation marquait les transcrits LOM1 décappés et raccourcis à leur extrémité 5' chez *A. thaliana*. Ce statut uridylé en 3' et raccourcis du coté 5' des fragments d'ARNm clivés par RISC rappelle celui des ARNm LOM1 décappés caractérisés au laboratoire.

Pour vérifier le statut d'uridylation des fragments 5' des ARNm LOM1 clivés par miR171/RISC, une approche de 3'RACE PCR a été réalisée (Llave et al., 2002). Cette approche a été utilisée sur des plantes de type sauvage, le mutant *tut1-1* et le mutant *xrn4*. Le mutant *xrn4* a été intégré dans cette étude étant donnée l'implication potentielle de la 5'-3' exoribonucléase XRN4 dans la dégradation de ces fragments 5' d'ARNm issus du clivage par le complexe RISC. Les produits PCR correspondant à l'amplification des extrémités 3' de ces fragments 5' du transcrit LOM1 ont été clonés et séquencés. Les résultats de ces expériences sont présentés en figure 18. L'analyse de ces extrémités 3' a permis de mettre en évidence deux sites majoritaires de clivage par miR171/RISC et que seul le premier site (position +892 dans la figure 18A) présente des fragments uridylés. Pour ce site de clivage, le taux d'uridylation est semblable pour les trois génotypes. Les extensions observées sont de un à dix résidus, majoritairement des uridines, entrecoupées parfois d'adénosines. Ces extensions sont de même nature entre les plantes de type sauvage, le mutant *tut1-1* et le mutant *xrn4* (figure 18B).

Ces résultats montrent que la présence de TUT1 n'est pas nécessaire à l'uridylation des fragments 5' des ARNm LOM1 clivés par le complexe RISC alors que TUT1 est essentielle pour l'uridylation de l'extrémité 3' de ce transcrit. Le résultat négatif concernant l'uridylation par TUT1 des fragments 5' des ARNm LOM1 clivés par RISC devra être confirmé sur d'autres cibles de miRNA ou idéalement d'une manière globale quand une technologie permettra de détecter des ARN uridylés à l'échelle du génome entier.

Nos résultats préliminaires laissent néanmoins supposer que TUT1 pourrait ne pas être impliquée dans l'uridylation des fragments 5' issus du clivage par RISC, ni dans l'uridylation des petits ARN, alors que TUT1 est requise pour l'uridylation des extrémités 3' des ARNm. Ces résultats suggèrent fortement une spécificité remarquable de TUT1 à l'égard des extrémités 3' des ARNm. Un défi majeur de l'étude de TUT1 consiste donc à déterminer les mécanismes moléculaires responsables de la reconnaissance des substrats ARN de TUT1.

C. Etude préliminaire de la surexpression de TUT1 et de son mutant d'activité TUT1** dans un système hétérologue

Nous avons montré au laboratoire le rôle majeur de TUT1 dans l'uridylation des ARNm et le rôle de cette uridylation dans la protection des extrémités 3' des ARNm déadénylés. Cependant, l'approche de génétique inverse utilisée n'a pas permis de caractériser les mécanismes de reconnaissance des substrats de TUT1, ni de montrer si il existait un lien entre l'uridylation des ARNm et l'élimination de la coiffe tel qu'il a été caractérisé chez *S pombe* (Rissland and Norbury, 2009). La prochaine étape de ce projet consiste à décrypter le mécanisme d'action de TUT1. Il est notamment important de comprendre les mécanismes de reconnaissance des substrats ARN par TUT1, qu'ils soient directs ou par l'intermédiaire de protéines partenaires. Pour mieux caractériser ces mécanismes, l'obtention de lignées transgéniques exprimant TUT1 est indispensable. Cependant, malgré de nombreuses tentatives, aucune plante transformée de manière stable avec des constructions codant TUT1 n'a aboutit à l'expression de cette protéine. Dans le but de disséquer le mécanisme d'action de TUT1, j'ai mis au point une série d'expériences basées sur l'expression transitoire de constructions dans un système hétérologue, *Nicotiana benthamiana*. Ces expériences ont pour but d'observer l'effet de l'expression de TUT1

sur la surexpression d'un gène rapporteur, la GFP. Des précautions d'usage s'imposent dans l'interprétation des résultats issus de ce type d'expérience. Cependant, nous avons détecté un effet différent de TUT1 sur l'expression de la GFP et d'un gène endogène et nous avons également identifié un domaine potentiellement important pour la fonction de TUT1.

1) Stratégie expérimentale

L'effet de l'expression ectopique de TUT1 sur un gène rapporteur, la GFP a été testé dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana.* Les différentes constructions (détaillées ci dessous), iGFP, TUT1 actif ou catalytiquement inactif et un inhibiteur de silencing, sont transformées dans *Agrobacterium tumefaciens*. Différentes combinaisons de ces suspensions bactériennes sont infiltrées de manière mécanique dans des feuilles de *N. benthamiana*.

L'expression de la GFP (mGFP5) est sous le contrôle du promoteur et du terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV pour « Cauliflower Mosaic Virus »). Ce promoteur permet une expression forte de la construction. Deux séquences leader oméga du virus de la mosaïque du tabac (TMV pour « Tobacco Mosaic Virus »), connues pour être des augmentateurs de traduction (Gallie, 2002), ont également été incluses. L'intron de la chalcone synthase du pétunia a été inséré dans la 5'UTR de cette construction afin de déterminer le rapport entre transcrit primaire et transcrit mature. La quantité de transcrit primaire non épissé est une indication du niveau de transcription de la construction. Je ferai référence à cette construction dans le texte comme la construction iGFP pour intron GFP. Toutes nos expériences ont été réalisées en présence de l'inhibiteur de silencing P19 qui a la capacité de se lier au duplex de petits ARN (Omarov et al., 2007). Cette inhibiteur qui empêche l'action de siRNA permet une expression maximale de toutes nos constructions. Sa présence permet de voir sous lumière ultra-violette la fluorescence de la GFP au bout de 4,5 jours dans les patches agroinfiltrés.

Afin de tester l'effet de TUT1 sur l'expression de la GFP, plusieurs constructions codantes pour TUT1 ont été générées. La première de ces constructions contient la séquence génomique de *TUT1* avec ses introns, fusionnée à la séquence codant pour quatre étiquettes myc en C terminal de la protéine, le tout sous contrôle du promoteur 35S et du terminateur Nos. Les étiquettes myc seront utilisées pour

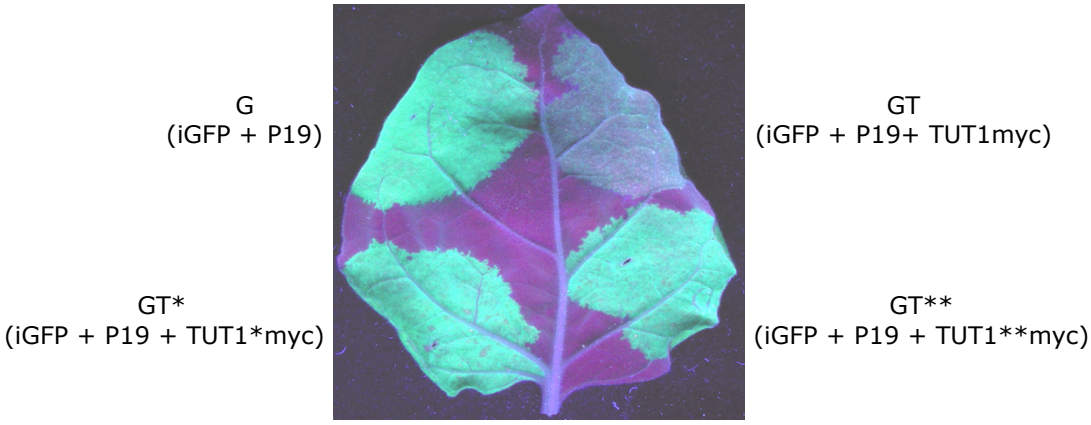


Figure 19 : Effet de l'expression ectopique de TUT1 sur la fluorescence du rapporteur GFP dans les expériences d'agroinfiltration de *N. benthamiana*
Des expériences ont été réalisées pour déterminer l'effet de l'expression ectopique de TUT1 sur l'expression d'un gène rapporteur GFP en présence de l'inhibiteur de silencing P19. Dans ces expériences, la construction intronGFP (iGFP, décrit dans le texte) est agroinfiltrée avec une construction codant pour l'inhibiteur de silencing P19. La surexpression de la GFP en présence de la protéine P19 permet une fluorescence maximale de la GFP (G), visible sous lumière UV. Ces deux constructions ont également été cotransformées avec des constructions codants soit pour TUT1 actif fusionné à quatre étiquettes myc (GT), soit TUT1*myc (GT*) ou TUT1**myc (GT**) pour lesquels un ou deux résidus aspartate ont été mutés respectivement. La mutation de ces résidus dans le domaine nucléotidyltransférase de TUT1 abolit complètement l'activité de la protéine. Une diminution de la fluorescence de la GFP est constatée uniquement en présence de la protéine TUT1myc active.

mettre en évidence la production de protéine par western blot. Cette construction sera appelée TUT1myc dans le reste du texte. Les deux autres constructions codent pour des mutants catalytiques de TUT1. Ces constructions sont exactement les mêmes que TUT1myc à l'exception d'une ou deux mutation en alanines des résidus aspartates (D491 et D493) responsables de la coordination de l'ion magnésium dans le site actif. Ces aspartates sont indispensables à l'activité nucléotidyltransférase de la protéine TUT1. Ces constructions seront appelées TUT1*myc et TUT1**myc dans le reste du texte en fonction du nombre d'aspartates mutées en alanines (1 et 2 respectivement).

Nous avons vérifié l'indépendance des phénotypes observés par rapport à P19 en remplaçant P19 par d'autres inhibiteurs de silencing tels que P0 du virus de la jaunisse de la laitue (« Beet western yellows virus », BWYV) (Pfeffer et al., 2002) et P38 du virus de la frisolée du navet (« Turnip crinkle virus », TCV) (Thomas et al., 2003; Azevedo et al., 2010). Les résultats de ces expériences (non montrés) ont été exactement les mêmes qu'avec l'inhibiteur de silencing P19, ce qui indique que les effets observés sont indépendants de P19. En revanche, ces effets dépendent de la présence d'un inhibiteur de silencing.

L'utilisation d'un inhibiteur de silencing d'origine virale (P19), de promoteurs également d'origine virale (P35S) et d'un système hétérologue (*N. benthamiana*) sont une limitation évidente à l'interprétation des résultats de ces expériences. Tout phénotype observé devra être confirmé *in vivo*. Néanmoins, l'utilisation de ce système nous a permis de mettre en évidence des informations intéressantes quant à l'activité de TUT1 ainsi que l'importance probable du domaine N terminal de TUT1.

2) TUT1 réprime la fluorescence due à l'expression du gène rapporteur GFP

Dans ces expériences, l'utilisation de l'inhibiteur de silencing P19 s'est avérée indispensable pour obtenir une fluorescence de la GFP visible sous lumière UV d'une part, et pour obtenir une expression détectable des constructions TUT1 d'autre part.

Lors de ces expériences, nous avons constaté que l'expression dans le même patch des constructions iGFP, P19 et TUT1myc (GT) diminuait la fluorescence de la GFP de manière reproductible au bout de 4,5 jours par rapport aux patches où TUT1myc est absent (G) ou par rapport à la présence du mutant d'activité TUT1*myc ou TUT1**myc (GT*, GT**) (figure 19). La fluorescence maximale en présence de ces

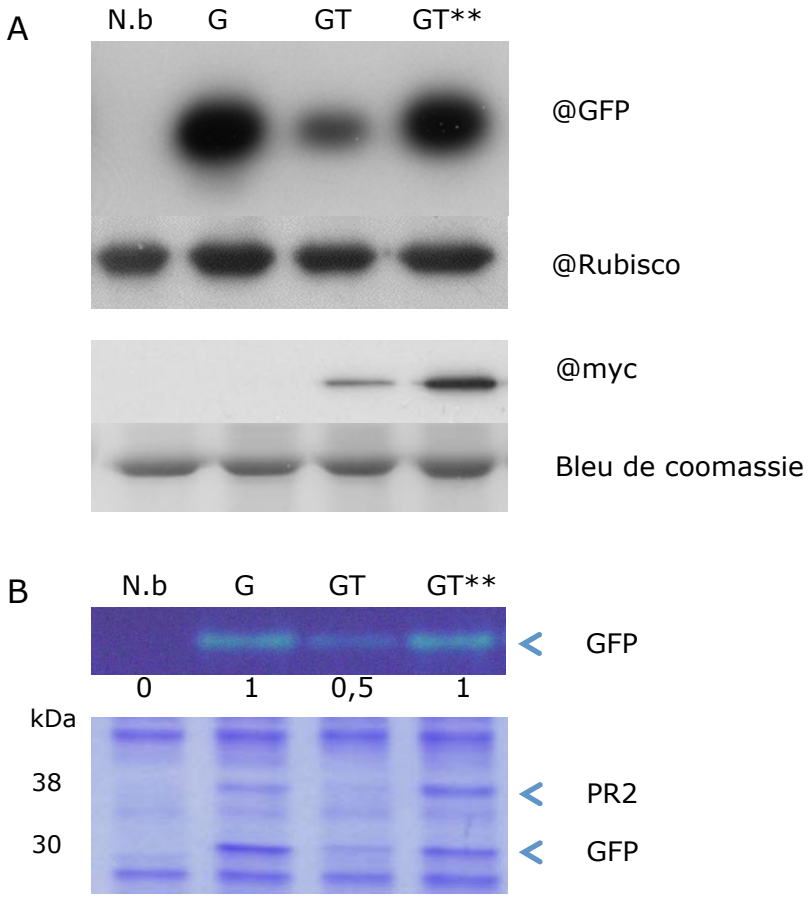


Figure 20 : Etude de la quantité de protéine GFP et PR2 dans les différents patches agroinfiltrés.

A. Les protéines totales extraites de chaque patch agroinfiltré et du contrôle non infiltré (N.b) ont été utilisées pour déterminer la quantité de protéine GFP (au dessus), et de TUT1myc et TUT1**myc (en dessous) par western blot après migration sur un gel SDS PAGE. La détection de la grande sous unité de la rubisco (Rubisco) est utilisé comme contrôle de charge de la quantité de protéine totale pour la détection de la GFP. On constate une diminution du signal correspondant à la GFP dans l'échantillon où TUT1myc actif est présent (GT). Cette quantité réduite de GFP explique la baisse de fluorescence constatée sur les feuilles agroinfiltrées avec TUT1 actif. La détection de l'épitope myc (en dessous) prouve que les constructions TUT1myc et TUT1**myc sont bien exprimées dans *N. benthamiana* et que le mutant d'activité TUT1**myc (GT**) est mieux exprimé que la protéine active TUT1myc (GT). La coloration au bleu de coomassie de la membrane est utilisé comme contrôle de charge.

B. Les protéines solubles ont également été extraites d'une surface définie des différents patches et séparées sur un gel PAGE en conditions native (au dessus). Cette séparation nous a permis de quantifier précisément la fluorescence (valeur relative sous la photo du gel) et donc la quantité de GFP. On constate une diminution d'un facteur 2 de la fluorescence en présence de TUT1myc actif (GT) en comparaison avec l'absence de TUT1myc (G) et la présence du mutant d'activité TUT1**myc (GT**). La migration de la même quantité de protéine pour chaque échantillon sur un gel dénaturant coloré au bleu de coomassie (en dessous) nous a permis de comparer les quantités de protéines dans chaque échantillon pour valider l'analyse en gel natif. Elle nous a permis également de mettre en évidence une protéine endogène ayant le même comportement que la GFP dans ces expériences : absente dans une feuille non infiltrée, et diminuée en présence de TUT1myc actif par rapport aux deux autres échantillons. Une analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier cette protéine comme étant PR2 (« Pathogenesis Related protein 2 »), une glucanase impliquée dans la défense contre les bactéries.

mutants d'activité (GT*, GT**) montre que la diminution de fluorescence en présence de TUT1myc (GT- est bien due à l'activité de la protéine TUT1. Cette conclusion est d'autant plus fondée que le niveau de protéine TUT1*myc et TUT1**myc est toujours supérieur à celui de TUT1myc (figure 20A). Il est également intéressant de noter pour l'interprétation des résultats suivants que l'expression de TUT1 actif par agroinfiltration ne conduit pas à une accumulation massive de la protéine par rapport aux autres protéines testées. Ce niveau d'expression est malheureusement impossible à comparer avec le niveau d'expression de l'orthologue de TUT1 chez *N. benthamiana*, faute d'anticorps capables de détecter cet orthologue.

3) TUT1 modifie le niveau d'expression de la GFP et d'une protéine endogène PR2.

Nous avons ensuite voulu confirmer que la diminution de fluorescence dans les expériences d'agroinfiltration était bien due à une diminution du niveau de protéine GFP. Nous avons tout d'abord réalisé un western blot avec des protéines totales extraites des différents patches d'agroinfiltration, séparées sur un gel SDS-PAGE (figure 20A). Cette expérience montre une diminution de la quantité de GFP dans l'extrait protéique issu du patch où TUT1myc est présent (GT) par rapport aux deux autres échantillons G et GT** (TUT1 absent ou TUT1**myc présent respectivement). Ce western blot confirme la diminution de l'expression de la GFP en présence de TUT1myc.

Pour quantifier la diminution de la GFP en présence de TUT1myc, les protéines solubles ont été extraites à partir d'une surface fixe de feuille agroinfiltrée. Ces protéines sont ensuite séparées sur un gel acrylamide non dénaturant. Le gel est observé sous lumière UV dans un scanner DIGE, ce qui permet de quantifier la fluorescence et donc la protéine GFP dans les différents extraits. Les résultats de ces expériences (figure 20B) montre une diminution de moitié de la fluorescence de la GFP en présence de TUT1myc (GT). La quantification de cette diminution a été effectuée sur 3 répétitions biologiques.

La diminution de la quantité de GFP est également visible en analysant les protéines solubles des différents patches sur un gel SDS PAGE coloré au bleu de coomassie. Un gel représentatif de ces expériences est montré en figure 20 B. De manière intéressante, la séparation des protéines solubles sur un gel dénaturant a

mis en évidence une autre protéine ayant le même comportement que la GFP dans les expériences d'agroinfiltration. Cette protéine est absente des échantillons non infiltrés (N.b) et son accumulation est diminuée en présence de TUT1myc (GT) par rapport à l'échantillon contrôle agroinfiltré où TUT1 est absent (G). De plus, elle s'accumule lors de la surexpression de TUT1**myc (GT**). Une analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier cette protéine. Il s'agit de la protéine PR2 (« Pathogenesis Related protein 2 »), une β 1-3 endoglucanase dégradant les parois bactériennes et dont l'expression est induite par l'agroinfiltration. L'expression du gène *PR2* est induite par l'agroinfiltration et le niveau d'accumulation de la protéine PR2 en présence de TUT1myc est diminué. Ces caractéristiques, proches de celles de notre rapporteur GFP, en font une excellente cible endogène pour nos expériences. Certaines autres protéines solubles présentes dans les extraits ont également pu être identifiées et correspondent toutes à des protéines chloroplastiques, encodées soit par le génome nucléaire, soit par le génome chloroplastique. Leurs niveaux ne changent pas en fonction de la présence des constructions TUT1, ce qui est attendu dans le cas de protéines traduites à partir d'ARNm chloroplastiques. Dans le cas des protéines chloroplastiques encodées par le génome nucléaire, leur niveau reste inchangé vraisemblablement en raison de leur abondance et du temps restreint de l'expérience.

En conclusion, la protéine TUT1myc active provoque une diminution de la GFP et prévient la synthèse d'une protéine endogène, PR2. La protéine TUT1**myc quant à elle provoque l'accumulation de protéine PR2 et ne modifie pas le niveau de GFP.

4) TUT1 réprime l'accumulation de l'ARNm PR2 mais pas celui de la GFP

Afin de déterminer l'origine de la diminution des protéines GFP et PR2 en présence de TUT1myc, des analyses par northern blot et par qPCR ont été réalisées pour déterminer le niveau d'accumulation des ARNm respectifs. Les résultats de cette expérience sont présentés en figure 21.

En northern blot, la quantité d'ARNm codant pour la GFP n'est pas diminuée en présence de TUT1myc. Le niveau de cet ARNm est même légèrement augmenté en présence de TUT1myc et TUT1**myc (figure 21A). Le niveau d'ARNm GFP a également été vérifié par qPCR (figure 21B). La sensibilité accrue de cette méthode nous a également permis de quantifier le pré ARNm GFP en amplifiant une partie de

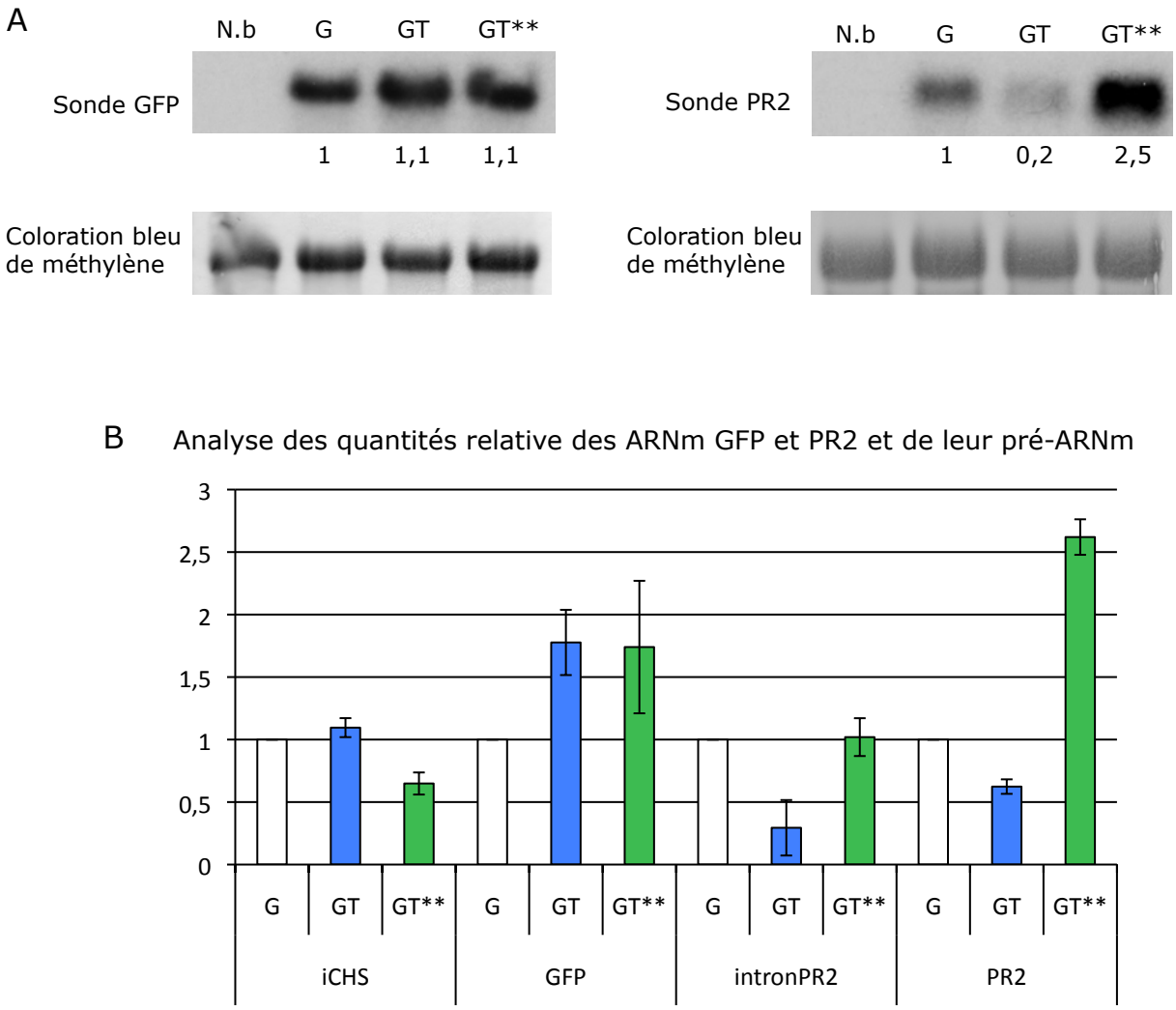


Figure 21 : Etude de la quantité d'ARNm GFP et PR2 et de leur pré-ARNm respectifs dans les différents patches agroinfiltrés

A. Détermination de la quantité d'ARNm GFP et PR2 par northern blot dans les différents patches, non infiltré (N.b) ou agroinfiltrés avec les constructions iGFP et P19 (G), iGFP, P19 et TUT1myc actif (GT) et iGFP, P19 et TUT1**myc (mutant d'activité de TUT1) (GT**). La quantification du signal par Phosphorimager® est donnée sous chaque piste pour chaque échantillon et chaque type d'ARNm. Les signaux des ARNm GFP sont normalisés par rapport au signal de détection de l'intron de la chalcone synthase. Les signaux des ARNm PR2 sont normalisés par rapport au signal de détection de l'ARNr 18S. Les colorations de membranes au bleu de méthylène servent de contrôle de charge pour chaque northern blot. La quantité d'ARNm GFP est sensiblement la même dans les trois échantillons G, GT et GT**. La quantité d'ARNm PR2 est fortement diminuée en présence de TUT1myc actif (0,2) et fortement augmentée en présence de TUT1** (2,5).

B. L'analyse de la quantité relative d'ARNm GFP et PR2 par qPCR a permis de confirmer les résultats obtenus par northern, à ceci près que la quantité d'ARNm GFP dans les échantillons GT et GT** semble plus importante (entre 1,5 et 2). Cette analyse a également permis de déterminer la quantité de pré-ARNm GFP et PR2 en amplifiant une partie de l'intron de la chalcone synthase (iCHS) et une partie de l'intron de PR2 (intron PR2). Cette analyse a permis de montrer que la diminution de la quantité d'ARNm PR2 dans l'échantillon GT (0,5) pouvait être corrélée à une diminution de la quantité de transcrit primaire, révélé par la quantification de l'intron PR2 (0,3). En revanche l'accumulation de l'ARNm PR2 dans l'échantillon GT** n'est pas corrélée à une augmentation de la quantité d'intron PR2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur 3 réplicats biologiques.

l'intron de la chalcone synthase contenu dans la 5'UTR de la construction iGFP. Les résultats de qPCR confirment que l'ARNm GFP mature est accumulé en présence de la construction TUT1myc. Le niveau de transcrit primaire est le même dans les échantillons en présence (GT) et en absence de TUT1myc (G). La diminution de la protéine GFP en présence de TUT1myc ne peut pas être expliquée par une diminution de l'ARNm GFP. Ceci indique que la diminution de protéine GFP est probablement due à une répression traductionnelle sans que l'on sache à l'heure actuelle si cette répression est spécifique ou pas des ARNm GFP.

L'effet de TUT1myc sur l'ARN PR2 est différent de celui sur l'ARNm GFP. Le niveau de l'ARNm PR2 en présence de TUT1myc est diminué comme le montre la quantification du signal northern blot (figure 21 A) et ce résultat est confirmé par l'analyse en qPCR (figure 21 B). La diminution de protéine PR2 en présence de TUT1myc peut donc être corrélée à une diminution de son ARNm. La quantité de transcrit primaire PR2 est également diminuée en présence de TUT1myc (GT) par rapport à l'échantillon contrôle (G) (figure 21 B). Cette diminution de la quantité de transcrit primaire est indicative d'une diminution de la transcription du gène *PR2* qui pourrait expliquer la diminution de la quantité d'ARNm et de protéine PR2. Cet effet transcriptionnel est possible mais devra être confirmé expérimentalement.

TUT1myc a donc un effet différent au niveau des ARNm du transgène et du gène endogène dans ces expériences. La présence de TUT1myc provoque une diminution de la quantité du transcrit primaire et du transcrit mature PR2. Ces diminutions peuvent expliquer la diminution de la quantité de protéine PR2 en présence de TUT1myc. En revanche, la présence de TUT1myc ne provoque pas de diminution de la quantité d'ARNm primaire GFP. Elle provoque même une accumulation de transcrit mature GFP. Dans ce cas, la diminution de protéine GFP ne peut être expliquée que par une inhibition de la traduction des ARNm GFP.

*5) TUT1** provoque l'accumulation d'ARNm PR2*

Les mêmes analyses du niveau des ARNm GFP et PR2 par northern et par qPCR ont été réalisées sur les ARN de l'échantillon où TUT1**myc est présent (figure 21).

En présence de TUT1**myc (GT**), le niveau d'ARNm mature GFP est le même qu'en présence de TUT1myc (GT), c'est à dire légèrement accumulé par rapport au

contrôle (G) (figure 21A et B). En revanche, la quantité de transcrit primaire GFP semble moindre en présence de TUT1**myc que dans les deux autres échantillons (figure 21B). Cet effet sur le niveau d'accumulation du transcrit primaire GFP reste inexpliqué.

De manière très intéressante, l'ARNm mature PR2 est largement accumulé en présence de TUT1**myc (GT**). Cette accumulation est détectée en northern blot et en qPCR (figure 21A et B). Son niveau est 2,5 fois plus important que dans l'échantillon contrôle, ce qui peut expliquer la quantité plus importante de protéine PR2 dans cet échantillon. La quantité de pré ARNm PR2 dans l'échantillon GT** en revanche est le même que dans l'échantillon contrôle (G) (figure 21B). L'ARNm PR2 mature s'accumule donc en présence de TUT1**myc sans que la quantité de transcrit primaire ne soit affectée. Ceci pourrait être expliqué par une inhibition de la dégradation de l'ARNm mature PR2 en présence de TUT1**myc. Pour confirmer cette hypothèse, il conviendra de déterminer la vitesse de dégradation de l'ARNm PR2 en présence de cordycépine, un inhibiteur de transcription.

6) Caractérisation des extrémités 5' et 3' des ARNm GFP

TUT1 étant une terminale uridylyl transférase, nous avons réalisé des expériences dans le but de mieux caractériser les extrémités 3' des ARNm GFP. La taille des queues poly(A) ainsi que la présence de nucléotides ajoutés en 3' des ARNm GFP ont été analysées. La caractérisation de la nature des extrémités 5' de ces ARNm a également été effectuée pour déterminer si l'inhibition de traduction des ARNm GFP pouvait être due à un decapping de ces ARNm.

a) Taux d'uridylation et taille des queues poly(A) des ARNm GFP

Des expériences de 3'RACE PCR (« Rapid Amplification of cDNA End ») ont été réalisées afin de vérifier, entre autres, le statut d'uridylation des ARNm. Cette méthode repose sur la ligation d'un ARN à l'extrémité 3' de tous les ARN. Cet ARN, appelé « adaptateur », est utilisé pour la synthèse des ADN complémentaires (ADNc) en utilisant une amorce complémentaire spécifique de cet adaptateur. Les extrémités 3' des ARNm GFP sont ensuite amplifiées par PCR grâce à une amorce sens spécifique de l'ARNm GFP et une amorce antisens correspondant à l'adaptateur ligué en 3' de tous les ARN. Il est intéressant de noter que les produits PCR obtenus montrent un

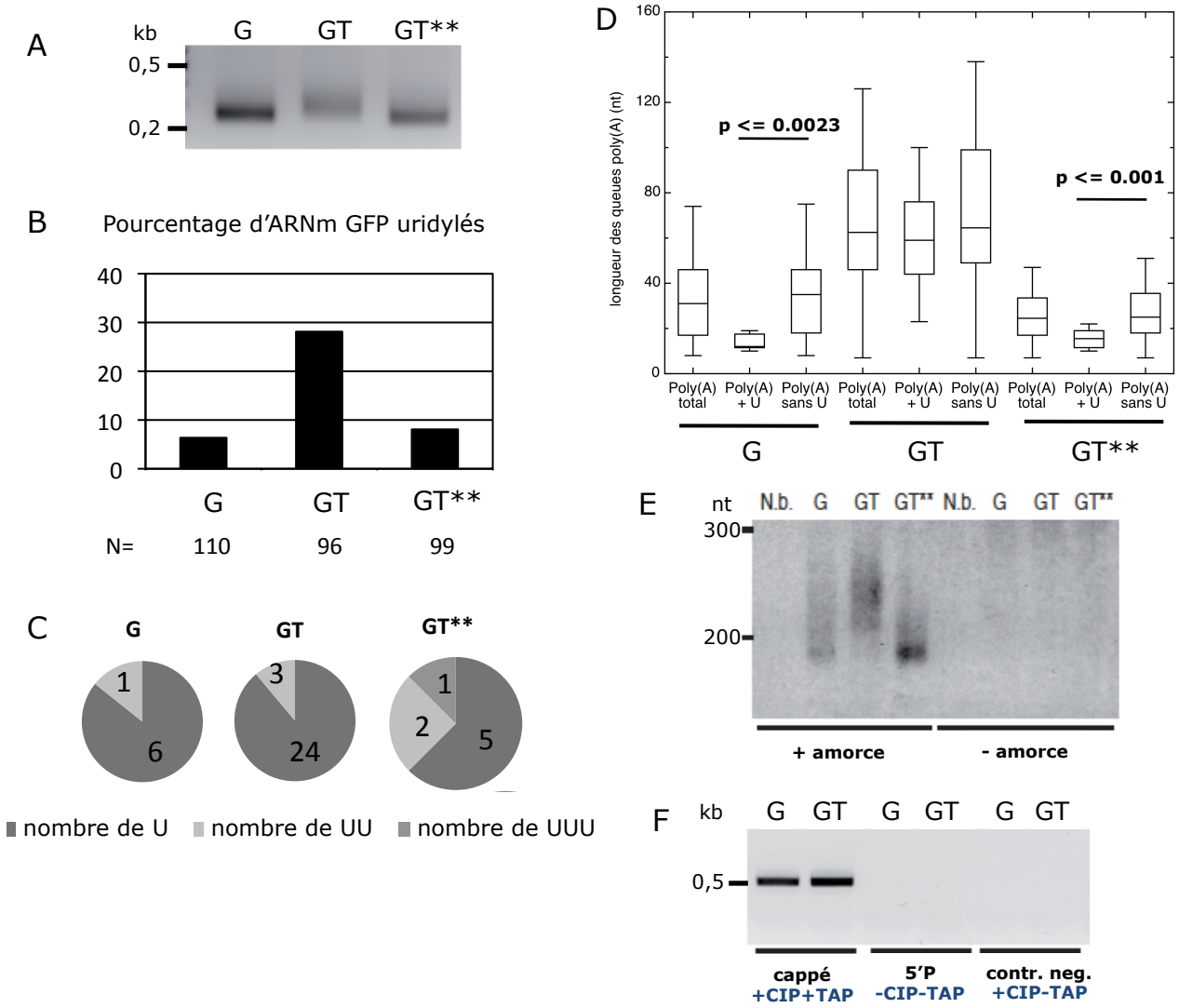


Figure 22 : Analyse des extrémités des ARNm GFP dans les expériences d'agroinfiltration
Les extrémités 3' des ARNm GFP ont été étudiées par deux approches :
A. Les extrémités 3' des ARNm GFP ont tout d'abord été amplifiées par la technique de 3'RACE PCR et ces amplifications ont été clonées et séquencées.
B. Le séquençage de ces produits PCR révèle une augmentation du pourcentage d'ARNm uridylés dans l'échantillon GT (28,1%) (iGFP, P19 et TUT1myc) par rapport à l'échantillon contrôle G (6,4%) (iGFP, P19) et à l'échantillon GT** (8,1%) (iGFP, P19 et TUT1**myc) .
C. Le nombre de résidus uridine ajouté est de 1 U dans la majorité des cas.
D. Analyse de la longueur des différents types de queue poly(A) (total, uridylée et non uridylée) sous forme de boîte à moustache pour chaque échantillon. La taille des queues poly(A) uridylées est significativement plus courte pour les échantillons G et GT** (autour de 15A en moyenne) par rapport aux queues poly(A) non uridylées (entre 25 et 30A en moyenne) indiquant que l'uridylation intervient après déadénylation des ARNm GFP. Dans l'échantillon GT, la taille globale des queues poly(A), indépendamment de leur statut d'uridylation, est augmentée.
E. Une digestion à la RNase H avec une amorce ADN antisens spécifique de la GFP a été réalisée avant migration des ARN sur gel acrylamide et northern blot. La digestion avec amorce spécifique permet de visualiser par northern blot la taille des régions 3' l'ARNm GFP (queue poly(A) incluse) et de comparer ces profils entre les différents échantillons. Cette expérience récapitule le profil observé en 3'RACE PCR. L'échantillon GT accumule des ARNm GFP avec des queues poly(A) de taille supérieure par rapport à G ou GT**.
F. Pour analyser les extrémités 5' des ARNm GFP, une expérience de 5'RACE PCR a été réalisée. A l'aide de différents traitements enzymatiques, il est possible de liguer une amorce ARN sur une certaine population d'ARN en fonction de la nature de l'extrémité 5'. Un traitement CIP (« Calf Intestinal Alkaline Phosphatase ») suivi d'un traitement TAP (« Tobacco Acid Pyrophosphatase ») permet la ligation de l'adaptateur sur les ARNm initialement cappés. L'absence de traitement enzymatique permettra la ligation de l'adaptateur sur des extrémité 5' phosphate (ARNm décappé). Un unique traitement avec la CIP doit empêcher toute ligation de l'adaptateur et est utilisé comme contrôle négatif. Après ligation de l'adaptateur, une réaction de transcription inverse est initiée à l'aide d'une amorce spécifique de la GFP. Une PCR est ensuite réalisée à l'aide d'une amorce sens correspondant à l'adaptateur et une amorce antisens spécifique de la séquence de la GFP. L'échantillon GT n'accumule pas plus d'ARNm GFP décappé par rapport à l'échantillon contrôle G, ce qui aurait pu expliquer la diminution de la traduction des ARNm GFP observée en présence de TUT1myc. Cependant, l'absence d'amplification dans les deux cas ne permet pas de comparer la quantité d'ARNm GFP décappé.

profil opposé à ceux obtenus lors de l'analyse des mutants *tut1* : dans le mutant *tut1*, les produits PCR issus des 3'RACE sur les ARNm sont systématiquement plus petits que dans les plantes sauvages. Lors de l'expression ectopique de TUT1myc dans le système *N. benthamiana*, les produits PCR issus des expériences de 3' RACE sur l'ARNm GFP sont plus grands en présence de TUT1myc (GT) que dans l'échantillon contrôle (G) (Figure 22 A).

Ces produits PCR ont été clonés et une centaine de clones ont été séquencés pour chaque échantillon. L'analyse des résultats de séquençage obtenus pour les extrémités 3' des ARNm GFP ont montré une augmentation du pourcentage de transcrits GFP uridylés en présence de TUT1 actif (Figure 22 B). En absence de TUT1 (G) ou en présence de TUT1**myc (GT**), le pourcentage d'ARNm uridylé est sensiblement le même, à savoir 6,4 et 8,1% respectivement. Cette uridylation des ARNm GFP est vraisemblablement le résultat de l'activité endogène de l'orthologue TUT1 chez *N. benthamiana*. En présence de TUT1myc (GT), le pourcentage d'ARNm uridylé augmente jusque 28,1%. Ce résultat confirme que les ARNm sont une cible de TUT1 *in planta*. Le nombre d'uridine ajouté est de 1 en majorité (figure 22 C).

Malgré le biais dû à l'amplification des queues poly(A) les plus courtes par la PCR, la taille des queues poly(A) non uridylées et uridylées par l'activité de TUT1 endogène a également été mesurée grâce à cette méthode (figure 22 D). En absence de TUT1 ou en présence de TUT1**, la taille moyenne des queues poly(A) des ARNm uridylés est de 15 A (G et GT** poly(A) + U), alors que la taille moyenne de toutes les queues poly(A) dans ces échantillons est respectivement de 36,5 et 28,8 A. Ceci montre que chez *N. benthamiana* comme chez *A. thaliana*, l'uridylation des ARNm intervient préférentiellement sur des queues poly(A) courtes, c'est à dire après déadénylation de ces ARNm.

Par contre, la taille moyenne des queues poly(A) uridylées en présence de TUT1myc est de 63,5 A (GT poly(A) + U) et la taille moyenne des queues poly(A) de la totalité des clones séquencés est de 68,9 A (GT poly(A) total). Lors de la surexpression de TUT1myc, l'uridylation préférentielle des queues poly(A) courtes est abolie et des queues poly(A) de toutes les tailles peuvent être uridylées. Ceci est la première indication que des queues poly(A) longues pourraient être uridylées. Ce résultat devra être confirmé chez *A. thaliana*. En plus de l'augmentation de la taille des queues poly(A) uridylées en présence de TUT1myc, la taille moyenne des queues

poly(A) des ARNm non uridylés augmentent également de manière importante. Celle ci est de 71 A en présence de TUT1myc (GT poly(A) sans U) et de seulement 38,2 A en absence de TUT1 (G poly(A) sans U). Dans le système *N. benthamiana*, la surexpression de TUT1myc provoque donc une augmentation de la taille de toutes les queues poly(A) des ARNm GFP, qu'elles soient uridylées ou non.

De manière intéressante, la taille moyenne de queues poly(A) non uridylées semble diminuer dans l'échantillon GT** par rapport à l'échantillon G. En présence de TUT1**myc, la taille moyenne des queues poly(A) sans U est de 30,1 (GT** poly(A) sans U) alors qu'elle est de 38,2 A dans l'échantillon contrôle. Cependant, cette diminution n'est pas significative au seuil de 5% (p=> 0,056). Seul le séquençage de plus de clones pourra déterminer si la surexpression de TUT1**myc provoque effectivement l'accumulation d'ARNm GFP avec des queues poly(A) courtes.

Les expériences de 3'RACE repose sur la PCR et ont donc tendance à favoriser l'amplification des fragments les plus courts, donc avec les queues poly(A) les plus courtes. Nous avons donc réalisé une expérience qui permet de mesurer la taille globale des queues poly(A) et qui est indépendante de la PCR. La taille de l'ARNm GFP est d'environ 1,3kb. Cette taille est trop importante pour pouvoir mettre en évidence des différences de taille des queues poly(A) entre les différents échantillons par des analyses en northern blot.

Les ARN issus des différents patches ont été soumis à un traitement RNase H en présence ou en absence de l'amorce antisens s'hybridant à 170 nt en amont du site de polyadénylation. La RNase H dégrade spécifiquement les régions ARN hybridées avec de l'ADN. Les fragments 3' issus de cette coupure ont donc une taille de 170 nt (3'UTR de l'ARNm GFP) additionnée de la taille de la queue poly(A). Cette coupure permet donc une meilleure résolution de la taille des 3'UTR et des queues poly(A) des ARNm GFP en northern après migration sur un gel acrylamide (Figure 22 E).

L'échantillon iGFP P19 (G) présente une trainée quasiment uniforme représentant les différentes longueurs de queue poly(A) des ARNm GFP avec un signal très légèrement plus fort tout en bas de la traînée. L'échantillon correspondant à l'expression d'iGFP, P19 et TUT1myc actif (GT) présente une trainée de taille globale semblable mais de répartition différente. Le signal est plus important au milieu de la traînée que dans les autres parties. Dans cet échantillon, il semble que des ARNm avec des queues poly(A) de taille moyenne (environ 50-60A) s'accumulent.

Ce résultat confirme l'augmentation globale de la taille moyenne des queues poly(A) des ARNm GFP en présence de TUT1myc, observée tout d'abord dans le profil 3'RACE PCR et confirmée après détermination de la taille des queues poly(A) globale par séquençage.

Pour l'échantillon iGFP, P19 et TUT1**myc (GT**), un signal fort est observé en bas de la traînée correspondante aux extrémités 3' des ARNm GFP. Mais cette augmentation de signal n'est pas systématiquement observée.

En conclusion, l'expression de TUT1myc dans les expériences d'agroinfiltrations entraine une augmentation du pourcentage d'ARNm GFP uridylés et une augmentation de la taille des queues poly(A) uridylées et non uridylées. La surexpression de TUT1**myc n'a pas d'effet sur le pourcentage ou la taille des queues poly(A) uridylées par la protéine TUT1 endogène de *N. benthamiana* pour les ARNm GFP.

b) Statut des extrémités 5' des ARNm GFP

Nous avons vérifié si la diminution de la traduction des ARNm GFP en présence de TUT1myc était due à une absence de leur coiffe. En effet, il est connu qu'un ARNm sans coiffe n'est plus traduit dans les cellules eucaryotes. Nous avons donc réalisé une expérience de 5'RACE PCR pour vérifier le niveau de transcrit GFP avec ou sans coiffe en présence de TUT1myc.

A l'aide de différents traitements enzymatiques avant la ligation d'un adaptateur à l'extrémité 5' des ARN, il est possible d'amplifier spécifiquement les populations d'un ARNm en fonction de la nature de leur extrémité 5'. Cette expérience montre la présence de transcrit GFP avec coiffe dans les échantillons G et GT (TUT1myc absent et présent respectivement ; figure 22 F). Cependant, aucun de ces deux échantillons n'accumule de transcrit GFP sans coiffe (extrémité 5' P) à des niveaux détectables par cette technique. Bien que négatif, ce résultat suggère que la diminution de la traduction de l'ARNm GFP n'est pas due à une élimination de la coiffe.

La diminution de la traduction des ARNm GFP en présence de TUT1myc ne peut donc pas être expliquée par une accumulation de transcrits sans coiffe. Dans nos expériences, la traduction des ARNm GFP est inhibée et ces derniers s'accumulent sous forme hyperadénylés sans être dégradés. Un cas semblable d'absence de

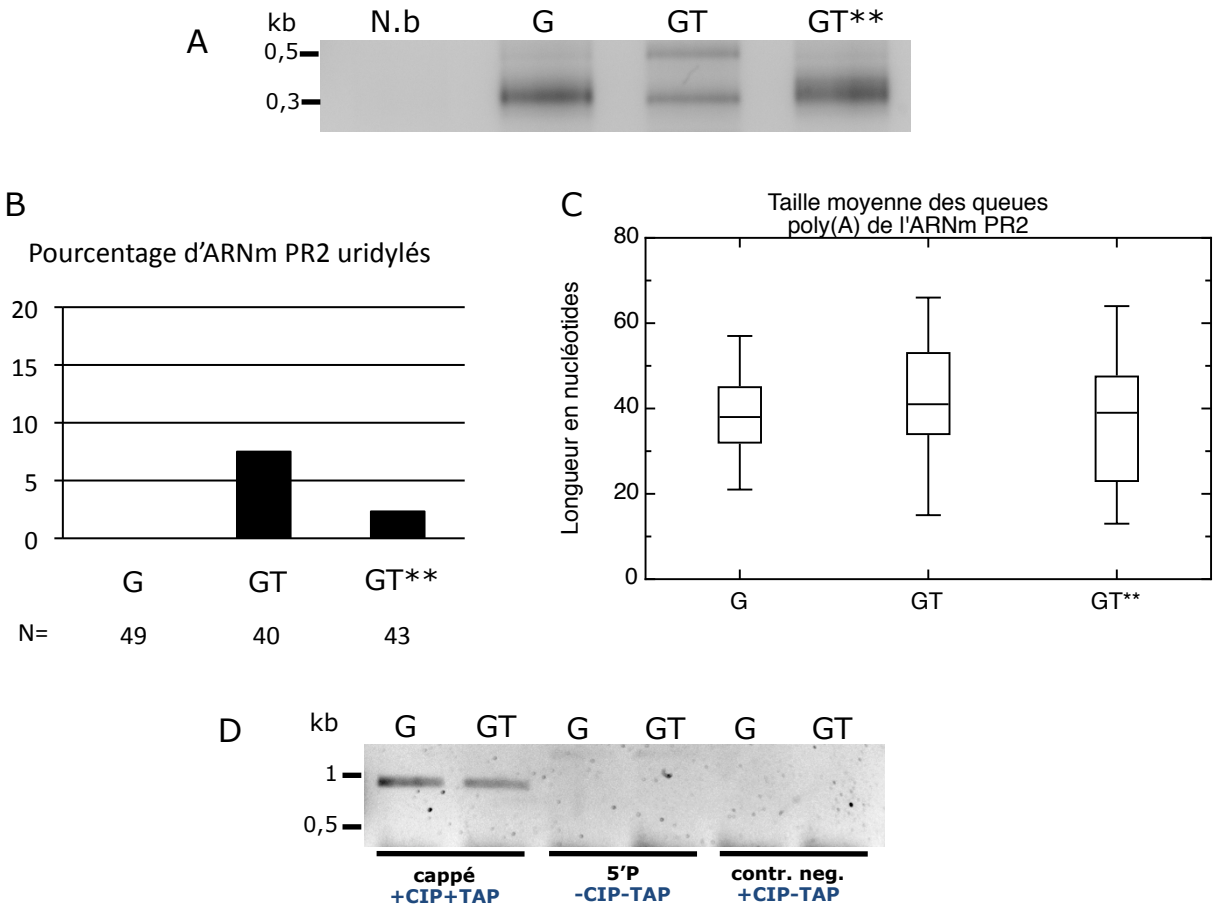


Figure 23 : Analyse des extrémités 5' et 3' des ARNm PR2 dans les expériences d'agroinfiltration

A. Les extrémités 3' des ARNm PR2 ont été amplifiées par 3'RACE PCR, clonées puis séquencées. Les produits PCR correspondants à PR2 se situe à environ 0,3 kb. Un produit PCR aspécifique d'environ 0,5 kb est également amplifié, spécialement dans l'échantillon GT en raison de la quantité moindre de matrice initialement présente (ARNm PR2 diminué en présence de TUT1myc, figure 21).

B. L'analyse de ces clones révèle un pourcentage d'ARNm PR2 uridylés en présence de TUT1myc (GT) et de TUT1**myc (GT**) de 7,5% et 2,3% respectivement. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution étant donné le nombre faible de clones uridylés (3 pour GT et 1 pour GT**). Toutefois, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour l'ARNm GFP (figure 22).

C. L'analyse des tailles de queues poly(A) ne montre pas de différences de la taille de toutes les queues poly(A) (uridylées ou non) en présence de TUT1myc (GT) ou en présence de TUT1**myc (GT**).

D. Comme pour les ARNm GFP, une expérience de 5'RACE PCR a été réalisée pour les ARNm PR2. A l'aide de différents traitements enzymatiques, il est possible de liguer une amorce ARN sur une certaine population d'ARN en fonction de la nature de l'extrémité 5'. Un traitement CIP (« Calf Intestinal Alkaline Phosphatase ») suivi d'un traitement TAP (« Tobacco Acid Pyrophosphatase ») permettra la ligation de l'adaptateur sur les ARNm initialement cappés. L'absence de traitement enzymatique permettra la ligation de l'adaptateur sur des extrémité 5' phosphate (ARNm décappé). Un unique traitement avec la CIP doit empêcher toute ligation de l'adaptateur et est utilisé comme contrôle négatif. Après ligation de l'adaptateur, une réaction de transcription inverse est initiée à l'aide d'une amorce spécifique de l'ARNm PR2. Une PCR est ensuite réalisée à l'aide d'une amorce sens correspondant à l'adaptateur et une amorce antisens spécifique de la séquence de PR2. L'échantillon GT (iGFP, P19 et TUT1myc) n'accumule pas plus d'ARNm PR2 décappé par rapport à l'échantillon contrôle G (iGFP, P19).

traduction d'un ARNm avec coiffe et hyperadénylé a été décrit dans la littérature dans le cas de stress cellulaire dans les cellules humaines (Kumar and Glaunsinger, 2010) (voir discussion).

7) Caractérisation des extrémités 5' et 3' des ARNm PR2

Comme pour les ARNm GFP, les extrémités des ARNm PR2 dans les expériences d'agroinfiltrations ont été analysées. Des expériences de 3'RACE PCR ont été réalisées pour étudier les extrémités 3' des ARNm de PR2 et une quarantaine de clones ont été séquencés pour chaque échantillon (figure 23).

Ces résultats ne sont que préliminaires, notamment en raison du nombre faible de clones uridylés présent dans les échantillons de 3'RACE PCR (0 dans G, 3 dans GT et 1 dans GT**). Néanmoins, les informations rassemblées jusqu'à présent sur les extrémités des ARNm PR2 sont en accord avec les données obtenues lors de l'analyse des transcrits GFP.

La taille de la queue poly(A) du seul clone uridylé dans l'échantillon GT** est de 14A, ce qui est en accord avec l'observation faite jusqu'à présent qu'en absence de l'expression ectopique de TUT1myc, seules les queues poly(A) courtes sont uridylées. Dans l'échantillon GT, 3 clones uridylés ont été identifiés. Les tailles de la queues poly(A) de ces trois clones sont de 28, 29 et 43A. Ces tailles sont supérieures à la taille des queues poly(A) uridylées en absence de l'expression ectopique de TUT1myc. Cette observation conforte celle faite sur les ARNm GFP montrant que la surexpression de TUT1myc permet l'uridylation d'ARNm indépendamment de la taille de la queue poly(A).

Cependant, la présence de TUT1myc ne provoque pas d'augmentation significative de la taille globale des queues poly(A) (GT) (44 A) en comparaison de la taille globale des queues poly(A) de l'échantillon où TUT1 est absent (G) (41 A). La taille globale des queues poly(A) en présence de TUT1**myc est également relativement constante (37,5 A dans GT** contre 41 dans G).

L'expérience de 5'RACE a également été effectuée sur les transcrits PR2 pour comparer le statut des extrémités 5' des ARNm PR2 entre les échantillons G et GT. Les résultats obtenus sont exactement les mêmes que pour l'ARNm GFP. On retrouve des ARNm PR2 avec coiffe dans les deux échantillons et aucune accumulation détectable de transcrit PR2 avec une extrémité 5' phosphate n'a été mise en évidence.

Ces résultats préliminaires sur l'analyse des extrémités des transcrits PR2 confortent les résultats obtenus avec l'ARNm GFP, à l'exception de l'augmentation globale de la taille des queues poly(A) en présence de TUT1myc.

Compte tenu de leur complexité, l'ensemble des résultats obtenus lors de l'infiltration de TUT1myc et TUT1**myc est résumé aux paragraphes 9 à 11.

*8) Le domaine N terminal de la protéine TUT1 est à l'origine de l'accumulation de l'ARNm PR2 en présence de TUT1**myc*

a) Stratégie expérimentale

La présence d'un domaine N terminal intrinsèquement désorganisé chez TUT1 et tous ses homologues chez les angiospermes indique la possibilité de son implication dans la reconnaissance des substrats ou l'interaction avec des protéines partenaires (détaillé dans la partie des résultats II B). Afin de mieux comprendre la fonction du domaine N terminal de TUT1, des constructions délétées de ce domaine ont été réalisées à partir des constructions TUT1myc et TUT1**myc. Les constructions ainsi générées ne codent plus que pour le domaine nucléotidyltransférase et le domaine PAP/OAS. Je ferai référence à ces constructions comme les constructions Nuctr-myc (codant pour le domaine nucléotidyltransférase actif) et Nuctr**myc (codant pour le domaine nucléotidyltransférase inactif).

La construction Nuctr-myc est active comme l'a montré des expériences d'activité *in vitro* réalisées par Emilie Ferrier au laboratoire (Figure 24 A). La protéine recombinante GST-Nuctr est capable d'ajouter des uridines à l'extrémité 3' d'un ARN. Cependant, l'activité optimale de TUT1 semble requérir la présence du domaine N terminal. Nous avons ensuite déterminé l'effet de la présence ou l'absence du domaine N terminal sur l'expression du gène rapporteur *GFP* et sur l'ARNm PR2 dans les expériences d'agroinfiltration.

b) Le domaine N terminal de TUT1 est requis pour la diminution de fluorescence de la GFP et la diminution des pré ARNm et des ARNm PR2

L'agroinfiltration des constructions iGFP, P19 et Nuctr-myc (GNuctr) n'est pas suffisante pour obtenir une diminution de fluorescence dans les conditions de cette

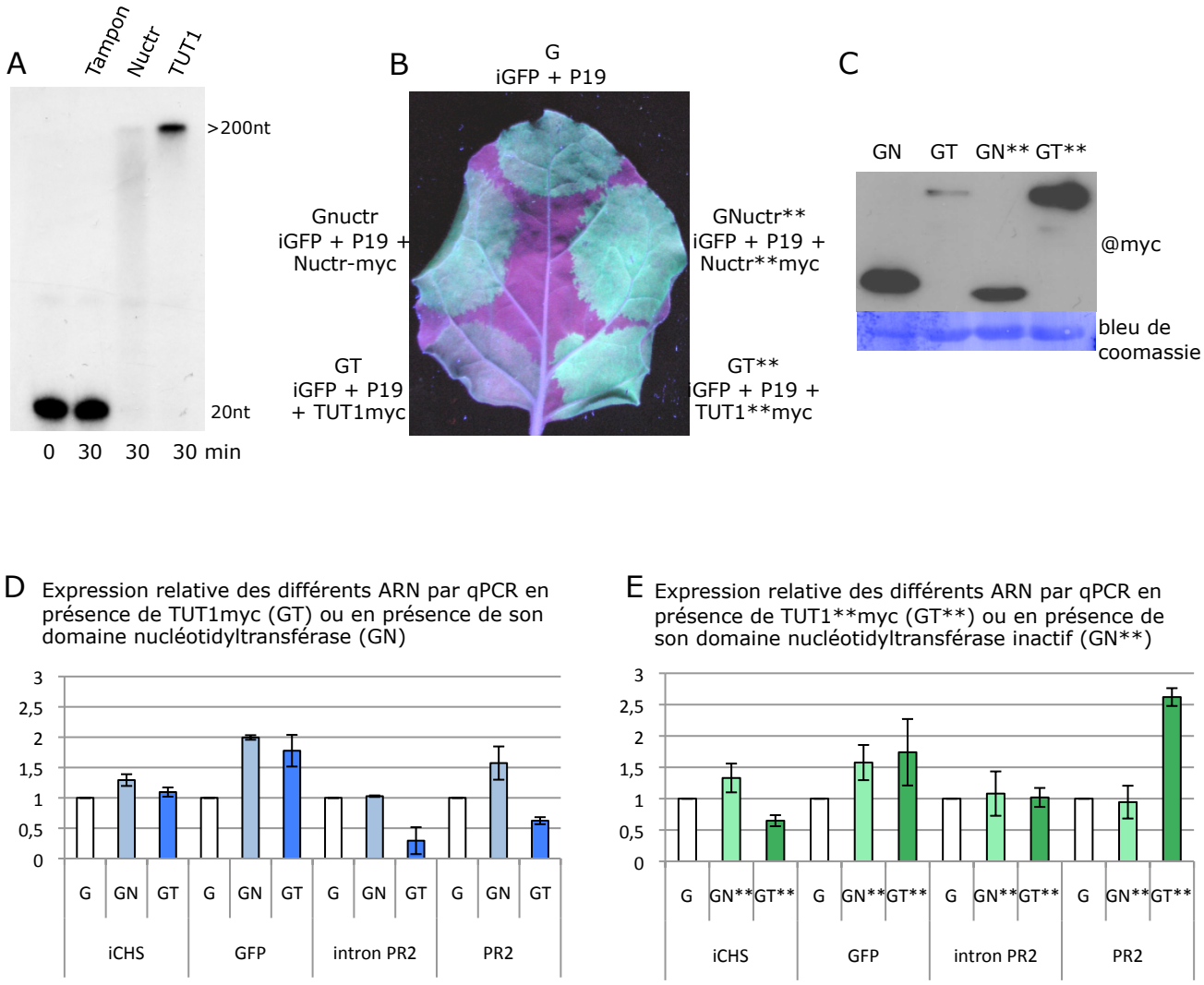


Figure 24 : Le domaine N terminal de TUT1 est requis pour les phénotypes observés dans les expériences d'agroinfiltration

A. La protéine TUT1 est plus active dans les tests d'activité *in vitro* en présence de son domaine N terminal. Une baisse de l'activité TUTase *in vitro* est constatée en absence du domaine N terminal de TUT1 (Nuctr) comparé à l'activité de la protéine entière (TUT1).

B. La construction Nuctr-myc n'a pas le même effet que TUT1myc et ne provoque pas une diminution de la fluorescence de la GFP dans les conditions de ces expériences d'agroinfiltration.

C. Les quatre constructions TUT1 sont exprimées dans les expériences d'agroinfiltration comme le montre le western blot réalisé sur des protéines totales avec un anticorps anti-myc. La construction TUT1myc (GT) est moins exprimée que la construction Nuctr-myc (GN).

D. Expression relative des différents ARN par qPCR dans les différents échantillons des expériences d'agroinfiltration (2 réplicats biologiques) avec des protéines actives. La présence du domaine N terminal de TUT1myc n'influence pas les niveaux d'ARNm GFP ou de pré-ARNm GFP (iCHS). En revanche, la présence du domaine N terminal de TUT1 est nécessaire à la diminution du pré-ARNm PR2 (intron PR2) et de l'ARNm mature PR2.

E. Expression relative des différents ARN par qPCR dans les différents échantillons des expériences d'agroinfiltration (2 réplicats biologiques) avec des protéines inactives. La présence du domaine N terminal de TUT1**myc n'influence pas le niveau d'ARNm GFP mature. La présence du domaine N terminal de TUT1**myc provoque une baisse de la quantité de pré-ARNm GFP (niveau de l'intron CHS diminué dans l'échantillon GT**). L'accumulation des ARNm PR2 mature en présence de TUT1** (2,5) disparaît en l'absence du domaine N terminal (niveau de PR2 dans GN**) alors que la présence du transcrit primaire est équivalente (niveau d'intron PR2 similaire entre G** et GT**).

expérience par rapport à l'agroinfiltration en présence de TUT1myc actif (GT) (figure 24 B). L'analyse par qPCR des différents niveaux de pré ARNm et d'ARNm mature a permis de mieux caractériser la fonction du domaine N terminal de TUT1. Ce domaine est requis pour l'apparition du phénotype moléculaire de la baisse de transcription de l'ARNm PR2 et de la baisse de l'ARNm mature PR2 en présence de TUT1myc (Figure 24 D). Comme expliqué au paragraphe précédent, le domaine N terminal de TUT1 est requis pour une activité optimal de la protéine TUT1. L'absence de ces phénotypes peut donc être expliquée par une activité uridylyl transférase moins importante, bien que le niveau d'accumulation de la protéine Nuctr-myc soit très largement supérieur à l'accumulation de TUT1myc (figure 24 C). Les phénotypes moléculaires sur PR2 et l'effet de diminution de la fluorescence sont donc dépendants de la présence du domaine N terminal de TUT1myc.

c) Le domaine N terminal de TUT1** est requis pour l'accumulation des ARNm PR2

Le résultat principal de cette expérience est la disparition de l'accumulation de l'ARNm PR2 en absence du domaine N terminal de TUT1**myc. En présence de la protéine Nuctr**myc, le niveau d'accumulation de l'ARNm PR2 retrouve celui de l'échantillon contrôle (figure 24 E). Etant donné que les deux protéines inactives sont toutes les deux surexprimées, l'accumulation d'un facteur 2,5 de l'ARNm PR2 est probablement la conséquence directe de la surexpression du domaine N terminal de TUT1**myc. Ce résultat suggère que la surexpression du domaine N terminal de TUT1 est responsable de la répression de la dégradation des ARNm PR2. Ceci renforce l'idée que cette partie N terminale est importante pour la fonction biologique de TUT1, soit pour la reconnaissance de ses substrats, soit pour le recrutement de cofacteurs protéiques impliqués dans la dégradation des ARNm (voir discussion).

9) Récapitulation de l'effet de l'expression de TUT1

Malgré une diminution des niveaux de protéines GFP et PR2 en présence de TUT1myc (figure 20 B), l'effet de TUT1 est différent entre le transgène GFP et l'ARNm endogène PR2. Cette différence reste pour l'instant inexpliquée. Sur le transgène GFP, TUT1myc provoque une légère augmentation de la quantité d'ARNm GFP (Northern

blot figure 21A et qPCR figure 21B), une augmentation générale de la taille des queues poly(A) (3'RACE et digestion RNase H figure 22 D et E), une augmentation du taux d'ARNm uridylés et de la taille de ces queues poly(A) uridylées (3'RACE PCR clonée et séquencée figure 22 B).

Sur l'ARNm PR2, l'expression de TUT1myc provoque une diminution de la quantité de l'ARNm mature, corrélée à une diminution de la transcription de ce dernier comme le suggère la quantification de l'intron de l'ARNm PR2 primaire (figure 21 B). La diminution du niveau de protéine PR2 peut être corrélée dans ce cas à une diminution de l'ARNm PR2 et de son transcrit primaire.

Ces résultats tendent à montrer une inhibition de traduction de l'ARNm GFP et une inhibition de la transcription du gène endogène PR2 par la protéine TUT1myc. Ces effets requierent l'activité de TUT1 et à la présence de son domaine N terminal.

*10) Récapitulation de l'effet de la surexpression de TUT1***

La surexpression de TUT1** a un effet très modéré sur l'accumulation de l'ARNm et de la protéine GFP. Cependant, l'effet sur PR2 est important. TUT1**myc permet d'une part l'accumulation de l'ARNm PR2 (figure 21 B) mais également l'accumulation de protéine PR2 (figure 20 B) alors que la quantité de pré ARNm PR2 est équivalente au contrôle sans TUT1 (figure 21 B). La surexpression de TUT1**myc semble avoir un effet dominant négatif et ralentir la dégradation de l'ARNm PR2. Cet effet dominant négatif pourrait être expliqué par exemple par la déplétion d'un (de) facteur(s) protéique(s) impliqué(s) dans la dégradation des ARNm au niveau de TUT1**myc. Nous avons pu montrer que le domaine N terminal de la protéine TUT1**myc était indispensable pour cet effet dominant négatif. Cependant, d'autres expériences seront nécessaires pour caractériser le mode d'action de ce domaine N terminal.

*11) Conclusion des résultats de l'expression ectopique de TUT1 et de son mutant d'activité TUT1***

L'expression de TUT1 actif par agroinfiltration de *N. benthamiana* n'a pas permis de caractériser le mode d'action de TUT1 dans la protection des extrémités 3' des ARNm déadénylés ou d'étudier un lien entre uridylation et élimination de la coiffe.

Par contre, ces essais révèlent que l'expression ectopique de TUT1 active est toxique (même si le niveau d'expression de TUT1 n'est pas très élevé). De manière intéressante, l'activité uridylyl transférase de TUT1 conjointement avec la présence de son domaine N terminal semblent provoquer un choc cellulaire aboutissant à une diminution de la transcription d'un gène endogène et à l'hyperadénylation des ARNm GFP en 4,5 jours. Nous n'avons pas testé si ces effets dépendent également de la présence d'*A. tumefaciens* mais de manière intéressante, des phénotypes moléculaires similaires (hyperadénylation, inhibition de traduction) ont été décrits lors de l'infection de cellules humaines par le virus de l'herpès (Kumar and Glaunsinger, 2010). Il serait donc intéressant d'étudier ces phénotypes chez des plantes soumises à un stress biotiques sévère.

Les expériences réalisées avec les constructions TUT1 et Nuctr ont permis de commencer à apprécier l'importance du domaine N terminal de TUT1. Ce domaine est requis pour une activité optimale de la protéine TUT1 *in vitro*. Sa surexpression avec un domaine nucléotidyltransférase inactif (TUT1**myc) entraine une accumulation importante de l'ARNm PR2 et de la protéine correspondante. L'effet dominant négatif de TUT1**myc sur la dégradation de l'ARNm PR2 est dépendant de la présence de ce domaine N terminal. Les expériences d'agroinfiltrations de *N. benthamiana* permettront de mieux caractériser la fonction de ce domaine N terminal dans la reconnaissance des substrats ARN de TUT1 et/ou l'interaction avec des cofacteurs protéiques.

Discussion

I. La localisation potentielle de TUT1 en lien avec son rôle biologique

TUT1GFP a montré une localisation potentielle au niveau des P bodies et des granules de stress dans les expériences d'expression transitoire de protéines fluorescentes dans les cellules BY2. Bien sûr, nos résultats de localisation de TUT1GFP sont soumis aux précautions d'usage pour ce type d'expériences. Les localisations de protéines fluorescentes surexprimées dans un système hétérologue sous le contrôle d'un promoteur fort ne peuvent être interprétées comme des preuves de la localisation des protéines *in vivo*. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer si TUT1 est bien localisée au niveau des P bodies et/ou des granules de stress. Néanmoins, l'identification du rôle de TUT1 dans l'uridylation des ARNm après déadénylation est en adéquation avec une localisation au moins dans les P bodies.

Nos expériences ont montré que l'uridylation des ARNm par TUT1 intervient après leur déadénylation, première étape de la dégradation des ARNm eucaryotiques (Parker and Song, 2004). Nous avons également pu montré que jusque 98% des transcrits LOM1 décappés sont uridylés, suggérant que l'étape d'uridylation est liée à l'élimination de la coiffe pour ces ARNm. Ces résultats indiquent donc que l'uridylation par TUT1 des ARNm déadénylés est un processus lié à la dégradation des ARNm. De nombreuses protéines liées à la voie de dégradation des ARNm sont localisées au niveau des P bodies (voir introduction III D 1). Le complexe de decapping d'*A. thaliana* par exemple, peut être localisé au niveau des P bodies (Xu et al., 2006; Weber et al., 2008; Xu and Chua, 2011). Etant donné que l'étape d'uridylation des ARNm est intégrée à une voie de dégradation des ARNm, une localisation de TUT1 au niveau des P bodies est parfaitement plausible.

La localisation potentielle de TUT1 au niveau des granules de stress n'est confortée par aucun de nos résultats actuels. Les granules de stress sont des structures dynamiques formées par l'agrégation d'ARNm dont la traduction est inhibée. L'implication de TUT1 dans ces granules cytosoliques nécessitera des études approfondies pour étudier un lien potentiel entre uridylation et inhibition de la

traduction. De plus, une capacité amoindrie des plantes *tut1* à survivre en cas de stress et surtout à l'étape de recouvrement de stress conforterait l'idée d'un rôle de TUT1 dans ces granules.

Afin de déterminer avec certitude la localisation de la protéine TUT1 dans les cellules d'*A. thaliana*, des outils pour la détection de cette protéine dans les cellules sont indispensables. Ces outils sont des anticorps spécifiques de TUT1 ou des plantes transgéniques exprimant une version de TUT1 fusionnée à une étiquette permettant soit sa reconnaissance par des anticorps commerciaux, soit sa visualisation *in vivo*.

Une tentative de production d'anticorps anti-TUT1 a déjà été réalisée en injectant à des lapins la partie nucléotidyltransférase de la protéine recombinante TUT1. L'immunisation de ces lapins n'a abouti à la production d'aucun anticorps spécifique de TUT1. Deux nouvelles tentatives sont actuellement en cours. Une entreprise privée (Proteogenix) essaie de produire des anticorps dirigés contre un antigène correspondant à 266 acides aminés issus de la partie N terminale de TUT1. En parallèle, des lapins sont en cours d'immunisation avec cette fois des protéines TUT1 recombinantes entières.

Nous avons essayé tout au long de ma thèse d'obtenir des plantes transgéniques exprimant la protéine TUT1 fusionnée à une étiquette ou une protéine fluorescente. Ces transformations ont abouti au criblage de nombreuses plantes transformées (>100) avec différentes constructions codantes pour TUT1 ou le mutant d'activité TUT1**, avec ou sans introns, avec différentes étiquettes fusionnées à l'extrémité N ou C terminale de la protéine. De nouvelles constructions sont en cours de production au laboratoire. Ces constructions seront constituées de la séquence génomique de *TUT1* dans laquelle la séquence codante pour une étiquette est insérée soit juste avant le codon d'initiation de la traduction, soit juste avant le codon stop. L'expression de ces constructions sera sous le contrôle du promoteur et du terminateur du gène *TUT1*, sans garantie que le niveau soit suffisant pour une détection.

La validation de la localisation de TUT1 au niveau des P bodies ou des granules de stress dans les cellules d'*A. thaliana* ne pourra être obtenue que grâce à l'un de ces outils : des anticorps dirigés contre TUT1 ou plusieurs lignées mutantes *tut1* d'*A. thaliana* exprimant une version étiquetée de TUT1. Ces lignées mutantes transformées pourront également être utilisées pour la complémentation du

phénotype moléculaire des extrémités 3' des ARNm dans *tut1*. L'identification de protéines partenaires de TUT1 sera également une bonne indication de sa localisation, spécialement si ces cofacteurs sont des protéines connues pour s'accumuler au niveau de granules cytosoliques.

II. Le nouveau rôle de protection des extrémités 3' des ARNm par l'uridylation caractérisé chez *A. thaliana*

Nos travaux permis de mettre en évidence un nouveau rôle de protection des extrémités 3' des ARNm par l'uridylation. Cette caractérisation conforte l'idée que l'ajout de nucléotides par les enzymes de la famille de poly(A) polymérases non canoniques peut avoir des impacts variés sur la stabilité des ARN, tant positif que négatif.

Les recherches faites précédemment sur l'uridylation des ARNm suggèrent un rôle dans la dégradation des ARNm et dans l'activation du decapping. Cette idée provient de trois études : la première porte sur la dégradation des ARNm histones non polyadénylés chez les mammifères (Mullen and Marzluff, 2008). La dégradation de ces messagers est corrélée à l'uridylation de ces derniers et la TUTase responsable de l'uridylation des ARNm histone a été caractérisée dans les cellules humaines : il s'agit de la protéine ZCCHC11 (Schmidt et al., 2010). Le rôle de la queue poly(U) ajoutée est sans doute de permettre le recrutement du complexe LSM au niveau du messager qui va à son tour permettre le recrutement du complexe de decapping. Dans ce cas, l'uridylation des messagers histones participe activement à leur dégradation. Un point important de cet article est que l'uridylation des ARNm histones provoquent leur dégradation de 5' en 3' mais également de 3' en 5'. Les auteurs proposent que le complexe Lsm, dans ce cas, recrute également l'exosome pour dégrader les messagers histones.

La deuxième étude suggérant un rôle actif de l'uridylation dans la dégradation des ARNm provient de la caractérisation de Cid1, la TUTase responsable de l'uridylation des ARNm chez *S. pombe*. Chez cet organisme, l'uridylation des ARNm est indépendante de la déadénylation et les deux voies de dégradation des ARNm, déadénylation-dépendante et uridylation-dépendante, semblent coexister. L'absence de Cid1 provoque la stabilisation du messager issu du gène *URG1*, suggérant un rôle actif de Cid1 dans sa dégradation (Rissland and Norbury, 2009). Cependant, la

caractérisation d'un seul messager stabilisé en absence de Cid1 semble refléter plus une exception qu'une règle générale dans la dégradation des ARNm dépendante de l'uridylation.

La troisième étude provient de l'identification de l'ARN nucléotidyltransférase CutA du champignon *Aspergillus nidulans* (Morozov et al., 2010). Chez cet organisme, les auteurs hypothétisent que deux voies de dégradation des ARNm coexistent. La première voie est dépendante de la déadénylation par CCR4 principalement et par CAF1 pour un sous-groupe de transcrit. La deuxième voie de dégradation des ARNm est CutA dépendante. CutA est responsable de l'ajout de la séquence consensus CUCU à l'extrémité 3' des ARNm. Dans un contexte sauvage, cette modification n'intervient que sur des ARNm déadénylés (15A) et n'est présente que pour peu d'ARNm gdhA décappés (6 clones sur 69). En revanche, en absence de CCR4 ou de CAF1, l'ajout des résidus CUCU semble suffisante pour déclencher l'élimination de la coiffe. De plus, l'absence de CutA augmente la demi vie de 3 transcrits analysés.

La dégradation de l'ARNm histone non polyadénylé chez l'humain, et les voies de dégradation stimulées par l'ajout d'uridine (*S. pombe*) ou d'extension riches en uridines (*A. nidulans*) chez les champignons pourraient être des exceptions plutôt qu'une règle générale. Nos recherches montrent qu'effectivement, l'uridylation des ARNm intervient au cours de leur dégradation mais que cette uridylation n'a qu'un effet mineur (voire aucun) sur la vitesse de dégradation des ARNm. L'uridylation marque les transcrits sans coiffe et/ou raccourcis chez *A. thaliana* comme chez les autres organismes (Shen and Goodman, 2004; Mullen and Marzluff, 2008; Rissland and Norbury, 2009; Morozov et al., 2010, 2012). Cependant, les plantes d'*Arabidopsis* dans lesquelles l'élimination de la coiffe est compromise par l'absence d'un membre du complexe de decapping meurent au stade cotylédons (Xu et al., 2006; Xu and Chua, 2009). L'absence de phénotype morphologique chez le mutant *tut1* suggère très fortement que l'uridylation des ARNm n'est pas requise pour l'élimination de la coiffe. Pour confirmer ou infirmer le rôle de l'uridylation vis à vis de l'élimination de la coiffe chez *A. thaliana*, il sera nécessaire d'étudier des mutants des différentes déadénylases.

III. L'absence d'uridylation des ARNm a un effet mineur sur la dégradation des ARNm et le transcriptome d'*A thaliana*

Nous avons vu lors de nos expériences sur le mutant *tut1* que l'absence d'uridylation d'ARNm n'avait pas d'impact sur la vitesse de dégradation des transcrits. Ceci est en adéquation avec un processus d'uridylation intervenant après déadénylation des ARNm. La déadénylation est en général la première étape de la dégradation des ARNm et est l'étape limitante dans ce processus de dégradation. Cette déadénylation va provoquer au final l'élimination de la coiffe et la dégradation 5'-3' des ARNm. Les étapes d'élimination de la coiffe et de déadénylation sont indispensables comme le montre les phénotypes létaux associés à l'absence de facteurs impliqués dans ces étapes chez *A. thaliana* (Chiba et al., 2004; Reverdatto et al., 2004; Xu et al., 2006). L'absence de phénotype développemental associé au mutant *tut1* est un argument de plus pour un impact mineur de l'uridylation par TUT1 sur la vitesse de dégradation des ARNm. Cependant, l'absence de AtXRN4, la principale 5'-3' exoribonucléase cytosolique d'*A. thaliana*, n'a également qu'un effet mineur sur le phénotype développemental (Souret et al., 2004). La démonstration récente que AtXRN4 dégrade préférentiellement des ARN possédant certains motifs peut expliquer son impact mineur sur la dégradation des ARN cytosoliques en général chez *A. thaliana* (Rymarquis et al., 2011).

Des analyses transcriptomiques CATMA (« Complete *Arabidopsis* Transcriptome MicroArray ») ont été réalisées pour mettre en évidence des gènes différentiellement régulés dans le mutant *tut1*. Ces analyses ont été faites sur deux types de tissus (plantules et feuilles) et montrent que seul un faible nombre de gènes est affecté par l'absence de TUT1. De plus, aucun gène différentiellement régulé par rapport au type sauvage n'est commun aux deux analyses CATMA effectuées. Ces analyses montrent bien que l'absence de TUT1 n'affecte pas grandement le transcriptome d'*A. thaliana*. Le rôle majeur de l'uridylation des ARNm chez *A. thaliana* est donc la protection des extrémités 3' des ARNm déadénylés.

IV. Devenir des transcrits aberrants du mutant *tut1*

Des transcrits sans queue poly(A) sont produits dans le mutant *tut1*. La manière dont ces transcrits non polyadénylés sont dégradés reste à élucider.

Ces transcrits peuvent potentiellement déclencher la production de siRNA en recrutant RDR6 (« RNA Dependent RNA polymérase 6 ») comme c'est le cas pour des transcrits viraux ou des transgènes sans coiffe ou sans queue poly(A) (Luo and Chen, 2007). Le séquençage de banques de petits ARN issues de différents tissus du mutant *tut1* a été effectué et nous a permis de déterminer que ces transcrits non adénylés ne déclenchent pas la production de siRNA dans le mutant *tut1*. Ceci montre que ces transcrits sans queue poly(A) ne sont pas responsables de la production de siRNA, peut être en raison de leur faible abondance. Il est possible que l'absence d'uridylation ne provoque pas de changement et que ces ARNm aberrants produits au cours du processus de dégradation soient dégradés de 5' en 3' par XRN4 de la même manière que les transcrits oligoadénylés. Il est également possible que ces transcrits soient dégradés par la voie 3'-5' par l'intermédiaire de SOV ou de l'exosome et de ses cofacteurs (RRP44 et RRP6L3) comme suggéré par les recherches faites sur la levure (He and Parker, 2001).

Nous avons pu mettre en évidence que certains transcrits étaient « rognés » à leur extrémité 3' jusque dans leur séquence codante, éliminant ainsi le codon stop de l'ARNm. Etant donné que ces transcrits peuvent potentiellement être associés aux polysomes, il est possible que ces transcrits sans codon stop soient reconnus par le système de contrôle qualité des ARNm appelé NSD (« No Stop Decay ») (Revue dans Isken and Maquat, 2007). Ce système de dégradation, principalement étudié chez *S. cerevisiae* et l'humain, est déclenché lorsqu'un ribosome ne rencontre pas de codon stop à l'extrémité 3' d'un ARNm. Ce phénomène déclenche l'association du domaine C terminal du cofacteur de l'exosome SKI7 au niveau du site A du ribosome. SKI7 permet alors le recrutement de l'exosome par son domaine N terminal et la dégradation de l'ARNm aberrant. Ce mécanisme prévient la formation de protéines tronquées et pourrait donc intervenir dans la dégradation des ARNm en absence de TUT1.

L'identification de la voie de dégradation des transcrits aberrants dans le mutant *tut1* est intéressante dans le cadre d'une caractérisation complète de ce processus d'uridylation des ARNm. Néanmoins, nous considérons que l'identification des mécanismes par lesquels l'uridylation des ARNm les protègent dans les plantes sauvages devrait être prioritaire par rapport au devenir des transcrits aberrants dans le mutant *tut1*.

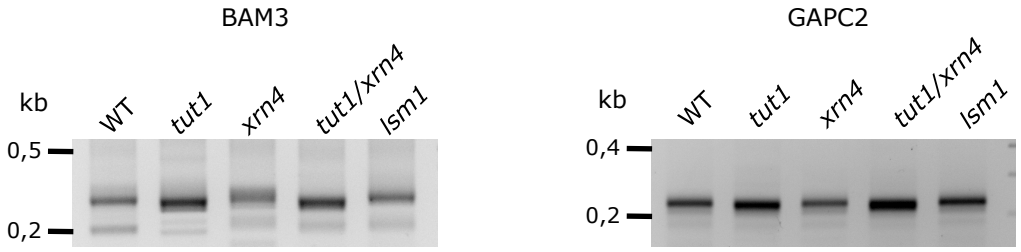


Figure 25 : Le double mutant *tut1/xrn4* phénocopie le mutant *tut1*, mais pas le double mutant *lsm1*

Les profils des produits PCR obtenu par 3'RACE PCR pour les ARNm BAM3 et GAPC2 sont présentés. Ces expériences ont été réalisées à partir d'ARNm de plantes sauvages (WT), du mutant *tut1*, du mutant *xrn4*, du double mutant *tut1/xrn4* et du double mutant *lsm1a/b*. Une photographie en négatif du gel d'électrophorèse coloré au bromure d'éthidium est présenté. Les produits PCR principaux sont de même taille pour les échantillons WT, *xrn4* et *lsm1*. Des produits PCR de taille inférieure sont amplifiés pour les échantillons *tut1* et *tut1/xrn4*.

V. L'uridylation protège les ARNm déadénylés par un mécanisme inconnu

Nous avons pu montrer que l'uridylation des ARNm déadénylés par TUT1 les protègent d'une dégradation par leur extrémité 3'. Même si nous avons pu montrer ce nouveau rôle protecteur de l'uridylation des ARNm, les mécanismes moléculaires par lesquels l'uridylation inhibe la dégradation des extrémités 3' des ARNm ne sont pas encore caractérisés.

Chez *S. cerevisiae*, les protéines Lsm1 et Pat1 et donc par extension le complexe LSM1-7-Pat, ont été montrés comme étant responsables de la protection des extrémités 3' des ARNm déadénylés (Tharun et al., 2005). De plus, l'uridylation des ARNm déadénylés favorise le recrutement du complexe LSM1-7, du moins *in vitro* (Song and Kiledjian, 2007). Nous avons voulu vérifier si le complexe LSM1-7 chez *A. thaliana* était responsable de la protection des extrémités 3' des ARNm déadénylés et uridylés. Pour ce faire, nous avons vérifié si un mutant *lsm1* phénocopie le mutant *tut1* chez Arabidopsis. Chez *A. thaliana*, deux gènes encodent des protéines putatives LSM1 (At1g19120 et At3g14080). Un croisement de mutants d'insertion correspondant à ces deux gènes, réalisé par Joanna Kufel à l'université de Varsovie, a donné naissance au double mutant *lsm1a/b*. En 3'RACE PCR, la taille des amplifications correspondantes aux extrémités 3' des ARNm est la même que dans les plantes sauvages (figure 25). Cette expérience a été réalisée pour plusieurs gènes, ce qui confirme que les ARNm ne sont pas rognés à leur extrémité 3' dans ce double mutant.

Il est possible que l'absence des protéines issues des deux gènes putatifs *LSM1a/b* soit compensée par d'autres mécanismes chez *A. thaliana*. Ou alors, LSM1 n'est pas impliquée dans la protection des extrémités 3' uridylées des ARNm chez *A. thaliana*. Les effets de l'absence de la protéine PAT1 sur les extrémités 3' des ARNm déadénylés n'ont pas encore été testés. Afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquelles l'uridylation protège les extrémités 3' des ARNm déadénylés, il est nécessaire de caractériser les protéines ou les complexes pouvant reconnaître ces extrémités uridylées. A cette fin, une approche *in vitro* pourra être tenter pour purifier les protéines ou complexes protéiques ayant une affinité pour les ARN

oligoadénylés et uridylés. La caractérisation des partenaires protéiques de TUT1 nous donnera peut être également une piste sur l'identité des facteurs impliqués.

VI. Enzymes potentiellement responsables de la production de transcrits aberrants dans le mutant *tut1*

En absence de TUT1, une enzyme non identifiée peut « rogner » les ARNm à partir de leur extrémité 3' jusque dans le corps de cet ARNm. Il serait intéressant d'identifier cette enzyme dont l'action est réprimée par l'uridylation. Cette enzyme doit avoir une activité 3'-5' exoribonucléase. Dans le cytosol des cellules végétales, plusieurs enzymes peuvent correspondre à cette description.

A. Les 3'-5' exoribonucléases génériques cytosoliques

Plusieurs protéines candidates peuvent être impliquées. La première est la 3'-5' exoribonucléase SOV (« suppressor of varicose ») dont la présence supprime partiellement le phénotype due à l'absence de la protéine plateforme du complexe de decapping VARICOSE dans l'écotype Landsberg (Ler) chez *A. thaliana* (Zhang et al., 2010). Cette protéine est localisée dans le cytosol et s'accumule au niveau de granules cytosoliques. La protéine SOV est une enzyme de type RNase II possédant une certaine homologie avec RRP44, une RNase associée à l'exosome. Cependant SOV ne possède pas le domaine PIN ni le domaine CR3, impliqués dans l'association avec le cœur de l'exosome (du moins chez la levure) (Schneider et al., 2009; Schaeffer et al., 2012). La protéine SOV est différente selon les écotypes d'*A. thaliana*. Dans l'écotype Landsberg, son activité permet de réduire l'impact de la mutation *vcs-1* et permet le développement de plantules photosynthétiques. Dans l'écotype Columbia, le mutant *vcs-7* n'est pas secouru par SOV et les plantules correspondantes sont nécrotiques. La différence d'« activité » entre les protéines SOV des écotypes Landsberg et Columbia est due à un seul acide aminé situé à la position 705. Ce résidu arginine dans SOV de l'écotype Columbia est un résidu proline dans l'écotype Landsberg. Cette différence d'un acide aminé est responsable de la différence observée entre les deux écotypes d'*A. thaliana*.

La protéine SOV est peut être responsable de la dégradation des extrémités 3' des ARNm dans le mutant *tut1* (écotype Columbia). Pour investiguer ce rôle potentiel

de SOV, deux stratégies sont possibles : la première consiste a réaliser le double mutant *sov/tut1*. Ce croisement servira à vérifier si il est possible de complémenter le phénotype moléculaire de *tut1* par l'absence de SOV et ainsi de restaurer la taille des extrémités 3' d'ARNm. La deuxième stratégie, complémentaire de la première, consiste à transformer le mutant *tut1* de l'écotype Columbia avec la version du gène *SOV* de l'écotype Landsberg. Ce croisement mettra en évidence si il est possible d'aggraver le raccourcissement des extrémités 3' des ARNm en absence de TUT1 grâce à la protéine SOV de l'écotype Ler.

SOV n'est pas la seule 3'-5' exoribonucléase cytosolique chez *A. thaliana*. Une deuxième protéine candidate a été identifiée au laboratoire. Il s'agit de RRP6L3, une protéine homologue à Rrp6 de la levure, située exclusivement dans le cytosol des cellules d'*A. thaliana* (Lange et al., 2008). RRP6L3 est potentiellement associée à l'exosome cytosolique chez *A. thaliana*. De plus, son activité 3'-5' exoribonucléase distributive serait en accord avec les « rognages » constatés au niveau des extrémités 3' des ARNm dans le mutant *tut1*.

De plus, la sous unité RRP41 de l'exosome d'*A. thaliana* a conservé les résidus nécéssaires à son activité 3'-5' exoribonucléase (Chekanova et al., 2000) et pourrait elle aussi être responsable du « rognage » des ARNm dans le mutant *tut1*. L'implication de l'exosome et de ses cofacteurs dans la dégradation de l'extrémité 3' des ARNm dans *tut1* devra donc être testée.

B. Les déadénylases impliquées dans l'hydrolyse des queues poly(A) des ARNm

Un deuxième type d'enzyme potentiellement responsable de la dégradation de l'extrémité 3' des ARNm dans le mutant *tut1* comprend les déadénylases responsables du raccourcissement final de la queue poly(A). Dans le noyau des cellules de mammifères, il a été montré très récemment que l'adénylation de certains snoRNA par PAPD5 et le rognage de ceux ci par PARN au delà de leur site d'adénylation était un mécanisme de maturation de ces snoRNA (Berndt et al., 2012). Il est donc possible que l'absence d'uridylation des ARNm dans le cytosol provoque la dégradation des queues poly(A) courtes et de l'extrémité 3' des ARNm par une déadénylase.

Jusqu'à présent, quatre grands types de déadénylases ont été caractérisés chez les eucaryotes. Le premier type est constitué des déadénylases PAN2-PAN3

impliquées dans la première vague de déadénylation des ARNm qui va réduire la taille des queues poly(A) à 100 A environ. Ce rôle a été caractérisé dans les cellules de mammifères (Yamashita et al., 2005; Chen and Shyu, 2011). Aucun homologue de ces enzymes n'a encore été caractérisé chez *A. thaliana*, ni identifié par homologie de séquence.

Les trois autres types de déadénylases sont responsables de la deuxième vague de déadénylation et constituent donc des candidats plus intéressants. Ces enzymes sont les déadénylases de la famille des PARN, des CCR4 ainsi que la déadénylase associée à CCR4, CAF1 (« CCR4 Associated Factor 1 »).

CCR4 est la principale déadénylase cytoplasmique chez la levure. Elle est impliquée dans l'activité du complexe CCR4-CAF1-NOT. Quatre homologues potentiels de CCR4 ont été identifiés dans le génome d'*A. thaliana* (Dupressoir et al., 2001), mais aucune d'entre elles n'a été caractérisée *in vivo*. Les protéines CAF forment une famille de 11 protéines potentielles chez *A. thaliana*. Deux d'entre elles, CAF1a et CAF1b, ont été caractérisées comme impliquées dans la déadénylation de transcrit en cas de stress biotique et abiotique (Liang et al., 2009; Walley et al., 2010). L'expression de ces deux gènes est notamment induite par des blessures. Les neuf autres homologues potentiels de CAF1 chez *A. thaliana* ne sont pas tous induits en cas de stress et leur rôle dans la déadénylation des transcrits reste à caractériser.

PARN est la principale déadénylase dans les cellules de mammifères. Son homologue a été identifié chez *A. thaliana* et la mutation nulle du gène correspondant est embryolétale (Chiba et al., 2004; Reverdatto et al., 2004). Un allèle muté non létal de ce gène *PARN* a été caractérisé (Nishimura et al., 2005). Cette mutation provoque une hypersensibilité à l'acide abscissique et à l'acide salicylique en plus d'un phénotype développemental « nain ». Il serait intéressant de croiser cette lignée hypomorphe *parn* avec la lignée *tut1* pour investiguer un rôle potentiel de cette protéine dans la dégradation des extrémités 3' des ARNm dans *tut1*.

Il est bien sûr possible que non pas une, mais plusieurs enzymes soient impliquées dans la dégradation de l'extrémité 3' des ARNm déadénylés en absence de TUT1. En plus, il est possible que ces enzymes soient de plusieurs familles différentes ce qui compliquera l'identification des facteurs responsables du rognage de l'extrémité 3' des ARNm. Une étape dans cette identification pourra être achevée en

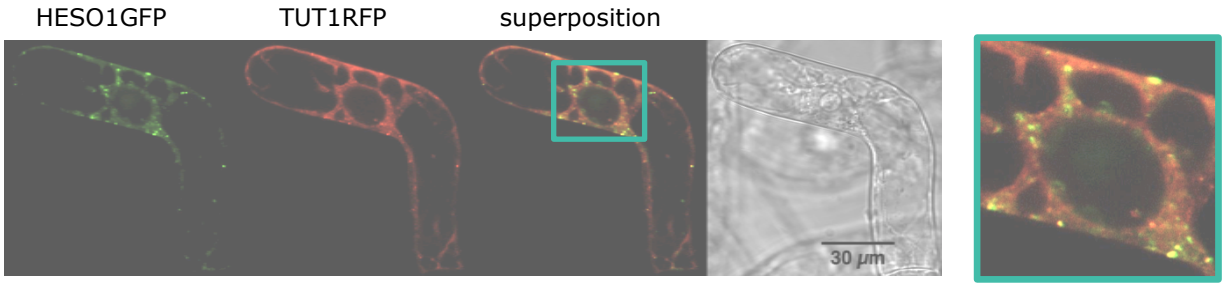


Figure 26 : Les protéines HESO1GFP et TUT1RFP colocalisent au niveau de foci cytosoliques
L'expression transitoire des protéines fluorescentes HESO1GFP et TUT1RFP dans des cellules de tabac BY2 montre une colocalisation des deux protéines de fusion fluorescentes au niveau de foci cytosoliques. Un agrandissement de la superposition des signaux GFP et RFP est montrée à droite. Les ponctuations jaunes indiquent une colocalisation des signaux GFP et RFP.

caractérisant les cofacteurs de TUT1. En effet, une des hypothèses possibles est que TUT1 soit amenée au niveau des ARNm déadénylés par une interaction avec une déadénylase. L'activité 3'-5' exoribonucléase de CCR4 est distributive pour l'élimination des dernières adénosines comme suggéré par les tests d'activité *in vitro* (Chen et al., 2002). Cette distributivité pour le raccourcissement final de la queue poly(A) pourrait permettre à TUT1 de s'associer à l'ARNm avant que sa queue poly(A) ne soit complètement dégradée.

VII. Uridylation des petits ARN

Une enzyme de la famille des ncPAP a récemment été montrée comme responsable de l'uridylation des petits ARN chez *A. thaliana*. Il s'agit de la protéine HESO1 (« Hen1 Suppressor 1 ») (Ren et al., 2012; Zhao et al., 2012). La double mutation *hen1/heso1* complémente partiellement le phénotype développemental dû à la mutation *hen1* et provoque une augmentation du niveau des petits ARN. Cependant, l'absence d'HESO1 n'abolit pas complètement l'uridylation des petits ARN ce qui montre la présence d'une activité redondante. Emilie Ferrier a montré au laboratoire que la protéine recombinante GST-TUT1 était capable d'uridyler *in vitro* n'importe quel ARN possédant une extrémité 3'OH libre (voir paragraphe « activité catalytique de TUT1 »). Il est donc possible que TUT1 puisse remplir cette fonction en absence d'HESO1. Cependant, nous avons montré que TUT1 n'était essentiel à l'uridylation des petits ARN. Malgré tout, TUT1 pourrait être responsable de l'activité d'uridylation des petits ARN en absence d'HESO1 Un argument en faveur de cette hypothèse est la localisation similaire des protéines fluorescentes TUT1-GFP et HESO1-GFP (tableau 3). Les deux protéines sont présentes dans le cytosol des cellules BY2 et s'accumulent sous forme de foci dans nos expériences de surexpression transitoire de protéines fluorescentes. De plus, j'ai réalisé des expériences de colocalisation de ces deux protéines fluorescentes montrant qu'elles s'accumulent dans les mêmes foci (figure 26). La colocalisation de ces deux protéines n'est pas une preuve qu'elles utilisent les mêmes substrats ARN. Cependant, il serait intéressant d'investiguer un rôle potentiel de TUT1 dans l'uridylation des petits ARN en absence d'HESO1. Pour cela, le triple mutant *hen1/heso1/tut1* pourrait être généré afin de vérifier si cette troisième mutation ne permettrai pas une meilleure complémentation du phénotype dû à *hen1* chez *A. thaliana*.

VIII. Uridylation des fragments 5' des ARNm clivés par RISC

Au vu de nos résultats, il est étonnant que TUT1 ne soit pas impliquée dans l'uridylation des fragments 5' issus du clivage des ARNm par le complexe RISC. Les ARNm soumis à une répression traductionnelle ou un clivage par le complexe RISC sont localisés au niveau des P bodies comme le suggère l'accumulation d'AGO1 au niveau de ces structures (Pomeranz et al., 2010). L'uridylation de ces fragments 5' suggère leur prise en charge par la voie 5'-3' de dégradation des ARN et XRN4. Nous avons pu montrer que les ARNm étaient uridylés par TUT1 chez *A. thaliana*, ce qui protège leurs extrémités 3'. Cependant nos expériences montrent également que TUT1 n'est pas nécessaire à l'uridylation du fragment 5' du transcrit LOM1 clivé par miR171/RISC. Les transcrits LOM1 ayant été les seuls étudiés, nous ne pouvons pas conclure quant à l'implication générale de TUT1 dans l'uridylation de ces ARN. Quoi qu'il en soit, l'uridylation de ce fragment est due soit à une autre TUTase, soit à une activité redondante compensant l'absence de TUT1. Comme expliqué précédemment, une deuxième enzyme possédant une activité TUTase est présente dans le cytosol d'*A. thaliana*. Il s'agit de la protéine HESO1, responsable de l'uridylation des petits ARN.

Certaines données montre qu'il est possible que les petits ARN soit uridylés lorsqu'ils sont en complexe avec leur cible. Chez la drosophile, les miRNA associé à AGO1 ne sont pas méthylés. Chez cet organisme, l'abondance d'un miRNA décroit lorsque des transgènes contenant un ou plusieurs sites de reconnaissance par ce miRNA sont exprimés (Ameres et al., 2010). Un haut niveau de complémentarité entre le miRNA associé à AGO1 et son ARNm cible déclenche l'ajout de nucléotide à l'extrémité 3' du miRNA et sa dégradation 3'-5'. De plus, dans des cellules humaines, une analyse cinétique de la dégradation de miR233 montre que la présence de transcrits cibles, spécialement ceux possédant une complémentarité parfaite avec miR233, augmente la vitesse de dégradation de ce miRNA (Baccarini et al., 2011). Des analyses en séquençage à haut débit ont révélé que la fréquence de mono-uridylation de miR233 augmente lors de sa dégradation, suggérant que l'addition du résidu uridine pourrait avoir un effet déstabilisateur. Au vu de ces résultats, et étant donné la proximité des extrémités 3' des miRNA et des fragments 5' d'ARNm issus du clivage par le complexe RISC, il est possible que ce soit la même enzyme qui uridyle ces extrémités, donc HESO1 chez *A. thaliana*. Un cas semblable a déjà été suggéré chez

Chlamydomonas reinhardtii lors de la caractérisation de MUT68 qui a tout d'abord été impliqué dans la polyadénylation des fragments 5' issus des ARNm clivés par RISC (Ibrahim et al., 2006), puis dans l'uridylation des petits ARN (Ibrahim et al., 2010). L'implication directe de MUT68 dans la polyadénylation des fragments 5' issus du clivage par RISC n'a cependant pas été démontrée.

La spécificité de TUT1 pour les ARNm a pu être montrée au laboratoire, ceci grâce au fait qu'aucune autre TUTase d'*A. thaliana* ne compense son activité au niveau de l'uridylation des ARNm. Cependant, l'activité de la protéine recombinante TUT1 *in vitro* ne montre aucune spécificité vis à vis d'un type de substrat ARN précis. Le mécanisme par lequel TUT1 reconnaît les ARNm reste encore à élucider.

IX. Expression ectopique de TUT1 par agroinfiltration de *N. benthamiana*

Les expériences réalisées par agroinfiltrations de *N. benthamiana* ont permis de rassembler des informations intéressantes sur l'activité de TUT1 et la fonction de son domaine N terminal. Elles ont également montré leurs limitations dans notre étude. Le système utilisé est probablement trop artéfactuel pour étudier un lien entre uridylation des ARNm et dégradation ou inhibition traductionnelle. En revanche, ces expériences pourront peut être être utilisées pour étudier l'impact d'un stress cellulaire sévère chez les plantes.

A. TUT1 et le stress cellulaire

L'étude de l'effet de la surexpression de TUT1 sur l'expression d'un gène rapporteur *GFP* a montré les limites du système d'expression transitoire dans *N. benthamiana*. La surexpression ectopique de TUT1 est toxique pour les feuilles de *N. benthamiana* comme l'a montré la nécrose des patch agroinfiltrés au bout de 6 jours lors de la surexpression de TUT1myc. Pourtant, cette surexpression est toute relative. En effet, le niveau d'accumulation de TUT1myc est bien inférieur à toutes les autres protéines exprimées artificiellement dans ces expériences. Nous avons également appris que ce n'est pas la protéine en elle-même qui est toxique mais son activité. En effet, la surexpression de TUT1**myc n'a pas d'effet négatif sur la survie du patch et la surexpression de Nuctr-myc, qui possède une activité moins forte que TUT1, provoque la nécrose du patch à plus long terme. Bien que la toxicité de TUT1 soit

directement liée à son activité TUTase, il n'est pas possible de faire la différence entre un effet direct ou indirect. Nous avons vu lors de nos expériences que TUT1 provoquait une diminution de la transcription du gène *PR2* et une diminution du niveau de la protéine correspondante, une enzyme dégradant les parois bactériennes et dont l'expression est induite par *Agrobacterium tumefaciens*. Il est peu probable que le gène *PR2* soit le seul gène endogène affécté par l'expression de TUT1myc. Il est très probable que l'expression ectopique de TUT1myc affecte la transcription de nombreux gènes. La nécrose du patch peut donc être due à l'incapacité des cellules à se défendre contre les millions de bactéries injectées directement dans la feuille lors de l'agroinfiltration.

Nous avons vu lors du séquençage des produits PCR issus des expériences de 3'RACE sur les transcrits GFP et PR2 que l'activité de TUT1 est dérégulée lors de son expression ectopique. Dans un contexte génétique de type sauvage chez *A. thaliana* ou dans l'échantillon contrôle iGFP P19 dans les expériences d'agroinfiltration, les transcrits uridylés ont une queue poly(A) d'environ 13-15A. Lors de l'expression de TUT1myc, les queues poly(A) uridylées sont de toutes tailles. De plus, l'augmentation générale de la taille des queues poly(A) des ARNm GFP suggère que la répression de la traduction n'est pas seulement due à une inhibition traductionnelle des transcrits uridylés, mais à une inhibition traductionnelle de tous les transcrits. Malgré cela, ces expériences ont montrées que dans une cellule végétale, des transcrits avec une queue poly(A) longue peuvent être uridylés. Cette uridylation peut être un artéfact résultant d'une dérégulation de l'activité de TUT1. L'activité de TUT1 au niveau des transcrits déadénylés uniquement pourrait être due à des cofacteurs important pour l'adressage de TUT1 au niveau de ces transcrits déadénylés. Lors de l'expression ectopique de TUT1myc chez *N. benthamiana*, il est possible que ces cofacteurs potentiels nécessaire à l'adressage de TUT1 soit en quantité limitante. TUT1myc agirait alors de manière non régulée au niveau de n'importe quelle queue poly(A). Cette uridylation peut être un artéfact ou un processus biologique déclenché dans les conditions des expériences d'agroinfiltration. L'uridylation d'ARNm avec des longues queues poly(A) par TUT1 devra être confirmée chez *A. thaliana*.

L'augmentation de la taille globale des queues poly(A) des ARNm GFP et l'inhibition traductionnelle de ces ARNm GFP dans l'échantillon où TUT1myc actif est présent peut refléter un état de stress cellulaire. De manière intéressante, des

phénotypes moléculaires similaires (hyperadénylation, inhibition de traduction) ont été décrits lors de l'infection de cellules humaines par le virus de l'herpès (Kumar and Glaunsinger, 2010). Dans cette situation, les ARNm ne sont plus exportés du noyau et sont retenus sous une forme cappée et hyperadénylée. L'inhibition de la transcription du gène *PR2* peut également refléter un état de stress cellulaire. Un argument supplémentaire en faveur d'un stress cellulaire est le fait qu'au bout de 6 jours, les patches agroinfiltrés exprimant TUT1myc sont complètement nécrosés. Il serait donc intéressant d'étudier ces phénotypes chez des plantes soumises à un stress biotique sévère.

La présence de TUT1 au niveau des granules de stress dans les cellules de tabac BY2 indique un rôle potentiel de l'uridylation par TUT1 dans l'inhibition de la traduction. La surexpression de TUT1myc dans *N. benthamiana* provoque l'inhibition de la traduction des ARNm GFP et leur hyperadénylation. Cependant, il est impossible de dire si l'uridylation inhibe *per se* la traduction ou si cette inhibition est uniquement due à un stress cellulaire provoquant la rétention nucléaire et l'hyperadénylation des transcrits. Il serait intéressant de tenter de concentrer l'activité de TUT1 sur un transcrit particulier avec une approche de type « tethered assay » comme il l'a été fait dans la publication illustrant l'activité de TUT1 dans des oocytes de xénope (Kwak and Wickens, 2007). Cette expérience pourrait limiter l'apparition du stress cellulaire et l'inhibition de la transcription et permettrait d'investiguer le lien potentiel entre uridylation et dégradation ou inhibition traductionnelle.

B. Rôle du domaine N terminal de TUT1

La comparaison des effets de TUT1**myc et Nuctr**myc dans les expériences d'agroinfiltration nous a permis de mettre en évidence un rôle potentiel de la partie N terminale de TUT1 dans la voie de dégradation des ARNm. La surexpression de cette partie N terminale semble inhiber la dégradation de l'ARNm PR2 et favorise l'accumulation de la protéine correspondante. Le mécanisme par lequel cette inhibition de la dégradation intervient n'a pas encore été caractérisé mais il existe au moins deux raisons possibles à cette inhibition.

La première serait que la partie N terminale de TUT1 est impliquée dans le recrutement de cofacteurs protéiques impliqués dans la dégradation des ARNm. La surexpression de TUT1** titrerait ces cofacteurs et empêcherait donc leur action. La

deuxième possibilité serait que TUT1** interagirait avec les ARNm après déadénylation par son domaine N terminal. L'absence d'activité de TUT1** pourrait empêcher la protéine de se dissocier de l'ARNm. Un argument en faveur de cette dernière hypothèse vient du fait que la ou les protéines responsables de la protection de l'extrémité 3' des ARNm chez *A. thaliana* n'ont pas été identifiées. Un candidat évident pour cette protection est le complexe LSM qui a été montré comme responsable de cette protection chez *S. cerevisiae* (Tharun et al., 2005). Cependant, le double mutant *lsm1a/b* d'*A. thaliana* ne montre pas le même phénotype moléculaire que le mutant *tut1*, à savoir un raccourcissement des extrémité 3' (voir paragraphe de la discussion « L'uridylation protège les ARNm déadénylés par un mécanisme inconnu »). Il est possible que l'absence de LSM1 chez *A. thaliana* soit compensée mais il est également possible que ce soit TUT1 lui même qui soit responsable de cette protection en s'associant aux ARNm par l'intermédiaire de son domaine N terminal. La protéine TUT1 aurait alors un rôle structural en plus de son rôle catalytique. Des études d'un mutant d'activité de Trf4 montrent que l'activité de cette protéine n'est pas nécessaire à la dégradation et la maturation des ARN dans le noyau des levures, et qu'elle jouerait donc un rôle avant tout structural dans le complexe TRAMP (San Paolo et al., 2009). Une manière de valider l'hypothèse selon laquelle TUT1 elle-même protège les extrémités 3' des ARNm serait de transformer le mutant *tut1* avec une construction codant pour TUT1**. Cette lignée permettrait de mettre en évidence le rôle de TUT1 indépendamment de son activité.

La caractérisation de ce domaine N terminal et des motifs spécifiques des angiospermes est l'objet de la thèse d'Emilie Ferrier. Les expériences réalisées par agroinfiltration de *N. benthamiana* pourront servir à mieux caractériser le rôle du domaine N terminal de TUT1 et des motifs qui le composent.

Conclusion générale

Le travail effectué pendant ma thèse a permis de définir un nouveau rôle de l'uridylation des ARNm chez *Arabidopsis*. Parmi les 14 gènes codant pour des ncPAP chez *Arabidopsis*, nous avons identifié une terminale uridylyl transférase, TUT1, responsable de l'uridylation des ARNm. Nos résultats montrent que TUT1 uridyle les ARNm après une étape de déadénylation. Cette uridylation ne modifie pas la vitesse de dégradation des ARNm mais est essentielle pour prévenir l'attaque des extrémités 3' des ARNm déadénylés par des activités 3'-5' exoribonucléasiques et la formation de transcrits aberrants tronqués en 3'. De manière intéressante, cette protection par l'uridylation peut être détectée au niveau des polysomes. Une des fonctions biologiques de l'uridylation des ARNm consiste à établir une polarité de 5' en 3' de la dégradation des ARNm. Cette polarité pourrait être essentielle dans le cas d'une dégradation des ARNm en cours de traduction pour permettre l'achèvement de la synthèse de protéine par le dernier ribosome engagé. La localisation potentielle de TUT1 au niveau des P bodies est en accord avec son rôle dans l'uridylation des ARNm au cours de la dégradation des transcrits.

Jusqu'ici, les expériences menées montrent que l'activité de TUT1 est spécifique des ARNm. Ni les fragments 5' des transcrits clivés par RISC, ni les petits ARN ne montrent d'altération de leur niveau d'uridylation dans le mutant *tut1*.

La protéine TUT1 possède un domaine N terminal intrinsèquement désorganisé dans lesquels des motifs conservés chez tous les angiospermes sont séparés par des régions riches en proline. Des expériences visant à déterminer l'effet de la surexpression transitoire de TUT1 sur un gène rapporteur GFP chez *N. benthamiana* ont permis de recueillir des informations sur le rôle du domaine N terminal de TUT1. Ce domaine est important mais pas indispensable pour l'activité nucléotidyltransférase de TUT1 d'une part, et responsable de l'inhibition de la dégradation d'un ARNm endogène d'autre part. Ces expériences ouvrent des pistes sur la caractérisation du domaine N terminal de TUT1 et sur les mécanismes de reconnaissance des substrats ARN de TUT1.

Matériels et méthodes

Cette partie contient les descriptions des matériels et des méthodes utilisés et est un complément des matériels et méthodes présentés dans l'article « Uridylation prevents the formation of aberrant mRNAs ».

Matériel

Souches bactériennes

La souche d'*Escherichia coli* utilisée pour l'amplification des plasmides est TOP10F' (Invitrogen) dont le génotype est : F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *nup*G *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*E15 *gal*K16 *rps*L(Str^R) *end*A1 λ-.

La souche d'*E. coli* utilisée pour la propagation de vecteurs Gateway® non recombinés est SURVIVAL (Invitrogen) dont le génotype est : F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G *fhuA::IS2*

La souche d'*E. coli* utilisée pour la production de protéines recombinantes est BL21(DE3) dont le génotype est : F^- *omp*T *gal dcm lon hsd*SB(rB- mB-) λ(DE3 [*lac*I *lac*UV5-T7 *gene* 1 *ind*1 *sam*7 *nin*5]).

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour transformer les cellules végétales est GV3101 (pMP90). Cette souche, dont le génotype n'est pas disponible, contient le gène de résistance à la rifampicine sur son chromosome ainsi que le gène de résistance à la gentamycine sur son plasmide assistant (Ti) portant les gènes nécessaires à la transformation des cellules végétales.

Plantes et cellules végétales

Arabidopsis thaliana

Les plantes utilisées sont toutes issues de l'écotype Col0 (sauvage ou mutants). Elles sont cultivées en condition de jours longs (16h jour/ 8h nuit, température 22°C/18°C) ou bien en condition de jours courts (8h jour/ 16h nuit, température 22°C/18°C).

Nicotiana benthamiana

Des plantes de *N. benthamiana* âgées de 6 semaines ont été utilisées pour les expériences de transformation transitoire par agroinfiltration. Ces plantes ont été cultivées en conditions de jours longs (16h jour/ 8h nuit, température 22°C/18°C). Les mêmes conditions de culture ont été appliquées après agroinfiltration.

Cellules de tabac BY2

Les cellules de tabac BY2 ont été utilisées pour les expériences de transformation transitoire par bombardement. Les cellules BY2 sont des cellules à croissance rapide, non chlorophylliennes. Elles sont cultivées en milieu liquide BY2 (micro- et macro-éléments de MS221 (Duchefa) 4,3 g/L, thiamine 1 mg/L, KH2PO4 200 mg/L, 2,4D 0,2 mg/L, myoinositol 100 mg/L, saccharose 3%, pH 5,8). Les cultures sont maintenues à l'obscurité sous une agitation de 120 tours par minute à 25°C. Du milieu frais (100 mL) est inoculé toutes les semaines avec 4 mL de culture.

Vecteurs plasmidiques

pGEM-T® easy (Promega®)

Ce vecteur permet le clonage direct de produits de PCR par la technologie de clonage TA. Ce vecteur linéarisé présente un résidu thymidyl sortant à chaque extrémité 3' ce qui permet la ligation de produits de PCR présentant un résidu adénosyl sortant au niveau de leurs extrémités 3'. Ces résidus sont ajoutés de façon matrice indépendante à l'extrémité 3' des produits de PCR par certaines ADN polymérases du type Taq polymérase. Ce vecteur porte le gène codant pour la β-lactamase qui confère aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les

transformants. La cassette de clonage est insérée dans le gène codant pour le peptide α de la β-galactosidase placé sous le contrôle du promoteur lac inductible par l'isopropyl-ß-D-thiogalactoside (IPTG). En absence d'insert, la complémentation de l'activité de la β-galactosidase permet, après induction par l'IPTG, l'hydrolyse de l'X-Gal (analogue du substrat naturel de l'enzyme) présent dans le milieu de culture. Cette hydrolyse conduit à la coloration en bleu des bactéries transformées par un vecteur sans insert. Par contre, la présence d'un insert dans la cassette de clonage modifie le cadre de lecture du peptide α et supprime la complémentation de l'activité β-galactosidase. Les colonies obtenues seront donc blanches. C'est le principe de l'α-complémentation.

pDONR™207/pDONR™221 (Invitrogen®)

Ces vecteurs sont utilisés comme vecteur donneur lors de clonage par la technologie de Gateway®. Ils possèdent les sites de recombinaison attP1 et attP2 permettant le clonage des fragments d'intérêt par recombinaison. Le gène *ccdB*, codant un inhibiteur de gyrase, est présent entre les sites de recombinaison attP1 et attP2. L'expression de ce gène empêche la croissance des bactéries sensibles à ce gène (comme les TOP10) ayant intégrées un vecteur non recombiné. Les vecteurs pDONR207 et pDONR221 possèdent un gène de résistance à la gentamycine et à la kanamycine respectivement.

pB7FWG2

Ce vecteur permet l'expression dans des cellules végétales de protéines d'intérêt fusionnées à la GFP en C terminal de la protéine d'intérêt. Ce vecteur est utilisé comme vecteur de destination lors de clonage par la technologie de Gateway®. Il possède les sites de recombinaison attR1 et attR2 permettant le clonage des fragments d'intérêt par recombinaison. En 5' des sites de recombinaison se trouve le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV). En 3' des sites de recombinaison se trouve la séquence codant pour la GFP suivi du terminateur 35S du CaMV. Le gène *ccdB*, codant un inhibiteur de gyrase, est présent entre les sites de recombinaison attP1 et attP2. L'expression de ce gène empêche la croissance des bactéries sensibles à ce gène (comme les TOP10) ayant intégrées un vecteur non recombiné. Ce vecteur possède un gène de résistance à la spectinomycine.

pH7RWG2

Ce vecteur permet l'expression dans des cellules végétales de protéines d'intérêt fusionnées à la RFP en C terminal de la protéine d'intérêt. Ce vecteur est utilisé comme vecteur de destination lors de clonage par la technologie de Gateway®. Il possède les sites de recombinaison attR1 et attR2 permettant le clonage des fragments d'intérêt par recombinaison. En 5' des sites de recombinaison se trouve le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV). En 3' des sites de recombinaison se trouve la séquence codant pour la RFP suivi du terminateur 35S du CaMV. Le gène *ccdB*, codant un inhibiteur de gyrase, est présent entre les sites de recombinaison attP1 et attP2. L'expression de ce gène empêche la croissance des bactéries sensibles à ce gène (comme les TOP10) ayant intégrées un vecteur non recombiné. Ce vecteur possède un gène de résistance à la spectinomycine.

pGWB617

Ce vecteur permet l'expression dans des cellules végétales de protéines d'intérêt fusionnées aux quatre étiquettes myc en C terminal de la protéine d'intérêt. Ce vecteur est utilisé comme vecteur de destination lors de clonage par la technologie de Gateway®. Il possède les sites de recombinaison attR1 et attR2 permettant le clonage des fragments d'intérêt par recombinaison. En 5' des sites de recombinaison se trouve le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV). En 3' des sites de recombinaison se trouve la séquence codant pour quatre étiquette myc suivi du terminateur de la nopaline synthase (Nos). Le gène *ccdB*, codant un inhibiteur de gyrase, est présent entre les sites de recombinaison attP1 et attP2. L'expression de ce gène empêche la croissance des bactéries sensibles à ce gène (comme les TOP10) ayant intégrées un vecteur non recombiné. Ce vecteur possède un gène de résistance à la spectinomycine.

Anticorps

Anti-myc : Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'étiquette myc ont été utilisés pour reconnaître les protéines d'intérêt fusionnées à une ou plusieurs étiquettes myc

par western blot. Ils ont été produits par Roche® (Numéro de catalogue 11667203001).

Anti-GFP : Des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines GFP ont été utilisés pour reconnaître ces protéines par western blot. Ils ont été produits par Anne Cosset (IBMP) à partir de protéine recombinante GFP.

Amorces oligonucléotidiques

Les oligonucléotides ont été commandés chez Sigma® et Eurofins MWG ®. Les amorces de qRT-PCR ont été choisis en utilisant le logiciel Universal Probe Library (Roche®) et permettent l'amplification de séquences de 60 à 110 pb localisées dans les régions codantes des gènes analysés. Les températures de fusion de ces oligonucléotides sont de 63°C. Une qualité de purification en HPLC a été demandée pour ces amorces.
Pour les autres oligonucléotides (clonages et PCR) les températures de fusion sont calculées par les différents programmes de commande en ligne des fournisseurs. Une qualité basique sans sels (« salt free ») a été demandée pour ces amorces.

Méthodes

PCR

L'appareil utilisé est le "T3000 Thermocycleur" de Biometra ®.
Deux types de PCR ont été effectués :
- Des PCR pour l'amplification des gènes en vue de leur clonage. A cette fin, l'ADN polymérase Phusion (Finnzymes) a été utilisée. Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 20 µL contenant du tampon PCR 1X (la composition de ce tampon est la propriété de Finnzymes), 0,2 à 0,5 µM de chaque amorce, 1,5 mM de MgCl2, 0,2 mM de chaque dNTP et 0,4 U d'ADN polymérase Phusion™. La PCR commence par une étape de dénaturation de 1 min à 98°C, suivie de 25 à 35 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 s à 98°C, une étape de 30 s à la température

d'hybridation la plus basse des amorces et une étape d'élongation à 72°C dont la durée dépend de la longueur du fragment à amplifier (30 s/kb).

- Des PCR de vérification de la présence de l'insert dans des plasmides ou de génotypage. A cette fin, la Taq polymérase Invitrogen® a été utilisée. Le milieu réactionnel d'un volume de 25 µL contient : du tampon de PCR dilué 1X , 0,2 µM de chaque amorce, 1,5 mM de MgCl2, 0,2 mM de chaque dNTP et 0,025 U/µL d'ADN polymérase. La PCR commence par une étape de dénaturation de 1 min à 94°C, suivie de 25 à 35 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 s à 94°C, une étape de 30 s à la température d'hybridation la plus basse des amorces moins 5 degrés et une étape d'élongation à 72°C dont la durée dépend de la longueur du fragment à amplifier (1 min/kb).

Clonage de gène candidat

Les ADNc correspondants aux protéines nécessaires à ce travail ont été clonés grâce à la technologie Gateway ®. Les ADNc ont été amplifiés par PCR soit à partir d'ADNc total de fleurs ou de plantules d'*A. thaliana*, soit à partir de clones RIKEN disponibles (www.brc.riken.jp/lab/epd/catalog/cdnaclone.html). La 5' UTR a été conservée en raison de son influence possible sur la traduction et la localisation des protéines. Les protocoles des réactions de recombinaison sont décrits dans les paragraphes suivants.

Réaction BP pour l'obtention de clones d'entrée

Les réactions de recombinaison sont effectuées selon le protocole du fournisseur (Invitrogen®). Le milieu de recombinaison contient dans un volume final de 5 µL: 75 ng d'ADNc flanqué des séquences attB, 75 ng de vecteur donneur pDONR™207 ou 221 et 1 µL de BP ClonaseTM II Mix (la composition de ce milieu est la propriété du fournisseur). La recombinaison se fait à 25°C pendant 1 heure. La réaction est ensuite arrêtée par incubation du milieu durant 10 min à 37°C avec 0,2 µg/µL de protéinase K. Deux µL de ce milieu réactionnel sont utilisés pour la transformation de bactéries compétentes.

Réaction LR pour l'obtention de clones d'expression

Pour le deuxième événement de recombinaison, le milieu réactionnel de 5 µL contient 75 ng de vecteur d'entrée, 75 ng de vecteur de destination et 1 µL de LR ClonaseTM II Mix (la composition de ce milieu est la propriété du fournisseur). La recombinaison se fait à 25°C pendant 1 heure, la réaction étant bloquée par l'ajout de 0,2 µg/µL de protéinase K à 37°C pendant 10 min. Ce milieu réactionnel est utilisé pour la transformation de bactéries compétentes.

Transformation bactérienne

Transformation d'E. coli par choc thermique

Des bactéries *E. coli* TOP10 (Invitrogen) compétentes (30 µL) sont mises en présence de 5 µL de milieu réactionnel de recombinaison BP ou LR ou de 10 ng de plasmide purifié ou 5 µL de réaction de ligation pGEM-Teasy® et le mélange est incubé pendant 30 min sur la glace. Un choc thermique est effectué en plaçant successivement le tube pendant 30 s dans un bain-marie à 42°C puis 2 min sur la glace. 250 µL de milieu LB (10 g/L de bacto-tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de NaCl, pH 7,2) sont ensuite ajoutés au mélange et le tout est incubé à 37°C pendant une heure. Le mélange est ensuite étalé sur deux boites de Pétri de LB agar (milieu LB avec 1% d'agar (p/v)) additionné de l'antibiotique approprié pour la sélection des bactéries transformées.

Transformation d'A. tumefaciens par choc thermique

Des bactéries *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) (50 µL) sont mises en présence d'environ 300 ng du plasmide à transformer. Un choc thermique est effectué en plaçant successivement le tube pendant 5 min dans un bain-marie à 37°C puis 2 min sur la glace. 1 mL de milieu LB est ajouté et le mélange est incubé à 28°C pendant 2 heures. Après une étape de centrifugation de 15 s à 10000 g, 900 µL du surnageant sont éliminés et le reste, après homogénéisation, est étalé sur une boite de milieu LB agar additionné de rifampicine (34 µg/mL), de gentamycine (15 µg/mL) et de l'antibiotique adapté à la sélection de la construction. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 48 heures.

Préparations d'ADN plasmidique

Suivant la concentration et la pureté des solutions d'ADN plasmidique nécessaires, deux types de préparations ont été effectués. En général, les préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées à l'aide du kit "NucleoSpin Plasmid Quickpure" de Macherey-Nagel selon les indications fournies par le constructeur. Les expériences de bombardement biolistique nécessitent une solution d'ADN plasmidique pure et concentrée (minimum 1μg/μl). A cette fin, les préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées à l'aide du kit "NucleoBond Xtra Midi" de Macherey-Nagel selon les indications fournies par le constructeur.

Bombardement biolistique de cellules BY2

Préparation de billes d'or

Des billes d'or (60 mg, Sigma-Aldrich) sont ajoutées à 1 mL d'éthanol 100%. Le mélange est vortexé 3 min puis centrifugé (10 s à 7000 g) afin d'éliminer le surnageant. Les billes sont rincées 2 fois successivement par addition de 1 mL d'eau suivi de 1 min de vortex et de 1 min de centrifugation à 7000 g afin d'éliminer le surnageant. Les billes sont ensuite reprises dans 500 μL de glycérol 50% stérile.

Fixation de l'ADN plasmidique sur les billes d'or

A 50 μL de billes d'or homogénéisés sont mélangés 5 μg d'ADN plasmidique de chaque construction nécessaire à une concentration minimale de 1 μg/μL. Ce mélange est vortexé pendant 3 min. Après addition de 25 μL de $CaCl_2$ 2,5 M, le mélange est de nouveau vortexé pendant 3 min. De la spermidine 0,1 M (10 μL) est ajoutée au mélange et le tout est à nouveau vortexé pendant 3 min. Un mL d'éthanol 100% est ensuite ajouté au mélange et vortexé pendant 1 min. Après 10 s de centrifugation à 7000 g, le surnageant est éliminé et 1 mL d'éthanol 70% est ajouté aux billes. Après 1 min de vortex et 10 s de centrifugation à 7000 g, le surnageant est éliminé et les billes sont reprises dans 50 μL d'éthanol 100%.

Bombardement biolistique

L'appareil utilisé est le "Model PDS-1000/He Biolistic ® Particle Delivery System" de BioRad avec des disques de rupture résistant à une pression inférieure à 1350 psi. Pour chaque échantillon, 5 à 6 µL de billes sont étalés sur le macro-porteur. L'éthanol résiduel est éliminé par évaporation pendant 5 min. Les billes enrobées d'ADN sont bombardées sur un disque de papier filtre sur lequel 4 mL de culture de cellules BY2 âgées de 3 jours ont été filtrés et déposés sur une boîte de milieu BY2 agar. Après avoir appliqué un vide de 25 Hg dans la chambre de bombardement, le bombardement est effectué par augmentation de la pression dans la chambre à hélium jusqu'à rupture du disque de rupture. L'énergie libérée va projeter les billes d'or enrobées d'ADN sur les cellules BY2. Après bombardement, les disques sont incubés de 4 à 6 heures à 25°C à l'obscurité avant l'observation au microscope confocal.

Observations au microscope confocal

Les observations en microscopie confocale à fluorescence ont été réalisées sur l'appareil LSM700 (Zeiss). Les deux protéines fluorescentes utilisées sont la Green et la Red Fluorescent Protein (GFP et RFP respectivement). La GFP, excitée à 488 nm, a une émission maximale à 508 nm. La RFP est excitée à 558 mm et présente un pic d'émission maximal à 583 nm. Pour la technique de l'ARN vert, les images provenant des lasers GFP et RFP et en lumière blanche (DIC, Differential Interference Contrast) sont acquises simultanément.

Extraction d'ADN génomique d'*A. thaliana*

Dans le but de réaliser des extractions rapides d'ADNg pour PCR, un morceau de feuille (environ 10 mm^2)est placé dans un tube contenant 400 µL de tampon d'extraction ADNg (200 mM Tris HCl pH 7,5 ; 250 mM NaCl ; 25 mM EDTA) ainsi que des billes d'un µm de diamètre. Les échantillons sont broyés par deux agitations successives de 30 sec à 6 500 rpm dans un PreCellys® (Ozyme). Les tubes sont ensuite centrifugés 5 min à 16 000 g. Deux cents µL de surnageant sont prélevés et

additionnés de 150 µL d'isopropanol. Les tubes sont incubés 5 min à température ambiante et centrifugés 5 min à 16 000 g. Les culots sont lavés avec 900 µL d'éthanol 70 % (v/v) puis repris dans 50 µL de tampon TE (5 mM Tris HCl pH 8,5).

Extraction d'ARN total et de protéines totales

Extraction d'ARN

Les différents tissus prélevés (fleurs, feuilles ou plantules) sont immédiatement congelés et broyés dans l'azote liquide. Environ 100 mg de la poudre ainsi obtenue est déposée dans un tube de 2 mL et 1 mL de Tri Reagent® (MRC) est immédiatement ajoutés Après une incubation de 5 min, le chloroforme (0,2 mL) est ajouté au mélange. Après une homogénéisation par vortex pendant 30 s, une première centrifugation de 20 min à 16 000 g à 4°C est réalisée pour permettre la séparation des phases aqueuse et organique. La phase aqueuse contenant les ARN est récupérée et 0,5 volume d'isopropanol est ajouté pour précipiter les acides nucléiques. La phase organique est conservée pour extraction des protéines totales Après 5 min à température ambiante, les tubes sont centrifugés 10 min à 16 000 g à 4°C puis le culot est lavé dans 1 mL d'éthanol 70 % (v/v). Les culots sont ensuite séchés et repris dans de l'eau ultra-pure. Les ARN sont de nouveau précipités avec 2,5 volumes l'éthanol absolu et 0,1 volumes d'acétate de sodium 3 M pH 5,2.

Extraction des protéines totales

Toute la phase aqueuse est éliminée de la phase organique provenant de l'extraction d'ARN. L'ADN génomique est précipité par l'ajout de 0,3 mL d'éthanol absolu, vortex et incubé 15 min à température ambiante puis centrifugé 5 min à 16 000 g à 4°C. Le surnageant est récupéré et les protéines totales sont précipitées par l'ajout de 3 volume d'acétone et incubation 10 min sur la glace. Le mélange est centrifugé pendant 5 min à 10 000 g à 4°C. Le culot de protéine est ensuite lavé avec 1 mL d'acétone 80% (v/v) puis repris dans du tampon protéine (80 mM Tris HCl pH 6,8 ; 0,1 M DTT ; 4 M urée ; 2% SDS ; 10% glycérol).

Extraction et analyse des protéines solubles

Les protéines solubles ont été extraites dans un tampon contenant 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM EDTA et centrifugées à 16000g pour éliminer les débris cellulaires. Ces protéines ont ensuite été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif ou dénaturant. La fluorescence de la GFP a été enregistrée dans les gels natifs en utilisant un scanner DIGE GE Healthcare avec les filtres d'excitation et d'émission réglés sur 480 et 530 nm respectivement. Les signaux fluorescents ont ensuite été intégrés en utilisant le programme informatique ImageJ. Les gels dénaturants ont été colorés au bleu de coomassie et les bandes excisées ont été analysées par spectrométrie de masse.

Préparation des ADNc

Traitement DNase des ARN

Les digestions d'ADN contaminant dans les échantillons d'ARN sont réalisées dans un volume final de 50 µL en présence de 5 unités de DNase RQ1 (Promega®) et d'un dixième du volume de tampon DNase RQ1 10 X (Promega®) (400 mM Tris-HCl pH 8 ; 100 mM $MgSO_4$, 10 mM $CaCl_2$). Les échantillons sont incubés 30 min à 37°C. Un volume de phénol/chloroforme est ensuite ajouté puis les échantillons sont vortexés quelques secondes et centrifugés 5 min à 16 000 g. La phase aqueuse est prélevée et les ARN sont ensuite précipités à l'éthanol absolu et à l'acétate de sodium.

3'RACE PCR

Pour les différentes 3'RACE présentées, 5 µg d'ARN total ont été traités à la « Calf Intestine Phosphatase » (CIP) (Promega®) avant d'être ligués avec une amorce ARN adaptateur (5'P-CUAGAUGAGACCGUCGACAUGAAUUC-3'NH2) grâce à la T4 RNA ligase (New England Biolabs®). Le milieu de ligation (20 µL) contient les 5 µg d'ARN traités CIP, 5 µM de l'amorce ARN adaptateur, 1X de tampon T4 RNA ligase (50 mM Tris-HCl ; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM Dithiothreitol ; 1mM ATP ; pH 7,5). Après ligation les ARN sont purifiés sur une colonne du kit « Nucleospin® RNA plant » (Macherey Nagel®) et élués dans 50 µL d'eau ultra pure. La synthèse d'ADNc a ensuite été réalisée en utilisant la SuperScript III (Invitrogen®) et une amorce ADN antisens complémentaire de l'adaptateur ARN ligué en 3' des ARN (voir « Rétrotranscription

des ARN »). Cette amorce a également été utilisée en PCR en combinaison avec des amorces oligonucléotidiques sens, spécifiques des gènes étudiés.

5'RACE PCR

Pour les 5'RACE PCR, 5 µg d'ARN total ont été traités comme indiqués sur les figures avec de la CIP (Promega®), de la TAP (« Tobacco Acid Pyrophosphatase ») (Epicentre® biotechnologies) selon les recommandations du fabricant. Après une purification phénol/chloroforme, les ARN sont ligués à une amorce ARN adaptateur 5' (5'-GAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA-3') grâce à la T4 RNA ligase (New England Biolabs®) dans les mêmes conditions que pour la 3'RACE. Les étapes de purification suivantes sont les mêmes que pour la 3'RACE.

Rétrotranscription des ARN

Le milieu de rétrotranscription de 20 µL renferme l'ARN à 0,25 µg/µL, 2,5 µM d'oligodT, 5 ng/µL d'hexamères aléatoires (Fermentas), 0,5 mM de chaque dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 5 mM de DTT (Invitrogen), 1X de tampon First-Strand (Invitrogen) (Tampon First Strand 5X : 250 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 375 mM KCl ; 15 mM $MgCl_2$), 0,4 U/µL de RNaseOUT™ (Invitrogen) et 10 U/µL de Reverse Transcriptase SuperScript™ III (Invitrogen). Dans le cas des 5' et 3'RACE, les hexamères aléatoires et les oligo dT sont remplacés par 5 µM d'amorce spécifique. Dans un premier temps, l'ARN, les dNTP, les hexamères aléatoires ainsi que l'oligodT sont mélangés. Les ARN sont alors dénaturés 5 min à 65°C puis maintenus à 0°C pendant 5 min. Le tampon First-Strand, le DTT et la RNaseOUT™ sont ensuite ajoutés. La Reverse Transcriptase SuperScript™ III est le dernier élément ajouté et le mélange est incubé 10 min à 25°C puis 50 min à 50°C. La réaction est stoppée par une incubation de 15 min à 70°C.

RNase H

Pour estimer la taille des queues poly(A) des ARNm par northern blot précédé d'une digestion à la RNase H, 15 µg d'ARN total ont été hybridés avec une amorce oligonucléotidique antisens situé environ 200 nt en amont du site de polyadénylation et digérés avec de la RNaseH (Fermentas). Cette hybridation consiste en une dénaturation de 5 min à 65°C suivie d'une diminution de la température du mélange

jusque 30°C. Les ARN sont ensuite digéré pendant 15 minutes en présence de 2 unités de RNase H à 37°C et de tampon de digestion RNase H 1X (20 mM Tris-HCl (pH 7.8) ; 40 mM KCl ; 8 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT). Des ARN ont également été incubé dans les mêmes conditions mais en présence de 1 μg d'oligo d(T) pour estimer la taille de la région 3' des ARNm. Des ARN ont également été incubés en présence de RNase H et sans amorce comme contrôle. Les ARN ont ensuite été analysés par northern blot en utilisant des gels acrylamide dénaturants.

qRTPCR

Chaque réaction de qRTPCR aura été réalisée en triplicats sur la même plaque. Chaque réaction est réalisée dans un volume final de 10 μL et déposée sur une plaque 384 puits. Le milieu réactionnel comporte 1 μL d'ADNc dilué ou non dilué, 0,5 μM de chacune des deux amorces (sens et anti-sens), 1X de mélange LigthCycler480® SYBR Green I Master (Roche) renfermant le tampon, les dNTP et la FastStart Taq DNA Polymerase. La réaction de PCR ainsi que le suivi de la fluorescence à 530 nm au cours des cycles d'amplification est réalisée dans le LigthCycler480® (Roche). Après une dénaturation de 5 min à 95°C, les échantillons sont soumis à 40 cycles d'amplification de 15 sec à 95°C, 15 sec à 60°C et 15 sec à 72°C. A la fin de l'amplification, une courbe de dénaturation des produits est réalisée. Le logiciel LigthCycler480® Software Version 1.5 (Roche) permet ensuite, à partir des courbes d'amplification, de déterminer les cycles seuils (Ct) pour chaque échantillon par la méthode du maximum des dérivées secondes. Il permet également d'avoir accès aux courbes de dénaturation afin de mettre en évidence la présence d'un ou plusieurs produits d'amplification. Pour couple d'amorces sur chaque plaque, l'efficacité est calculée dans chaque réaction à l'aide du logiciel LinRegPCR (http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&fileName=LinRegPCR.zip&description=LinRegPCR:%20qPCR%20data%20analysis&sub=LinRegPCR) et la moyenne de toutes les efficacités est utilisée pour le calcul des quantités relatives d'ADNc. Le snRNA U6 a été utilisé comme référence pour les qPCR sur *N. benthamiana*.

Northern blot

Electrophorèse sur gel d'agarose/formaldéhyde.

Ce type d'électrophorèse est utilisé pour la séparation d'ARN de taille supérieure à 500 nt. La quantité désirée d'ARN (entre 15 et 30 µg) est précipitée à l'éthanol et acétate de sodium. Le culot est repris dans 15 à 20 µL de solution de dépôt (80 µl H20 ;80 µl 10x tampon MOPS ;160 µl formaldéhyde ;400 µl formamide ;80 µl tampon de charge (50% glycerol, 10 mM EDTA, 0,25% (w/v) bromophenol blue, 0,25% (w/v) xylene cyanol)). Les échantillons sont ensuite chauffés 5 min à 70°C puis placés immédiatement dans la glace. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel renfermant de l'agarose 1,5 % (p/v), du tampon MOPS 1X (20 mM MOPS pH 7 ; 2 mM acétate de sodium ; 1 mM EDTA pH 8) et 18 % (v/v) de formaldéhyde. La migration est réalisée pendant 2,5 h à 70V dans un tampon MOPS 1X.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide/urée

Ce type d'électrophorèse est utilisé pour la séparation d'ARN de taille inférieure à 500 nt. La quantité désirée d'ARN (10 à 20 µg) est mélangée volume à volume avec du tampon de charge polyacrylamide (formamide déionisée 95 % (v/v), EDTA 20 mM, bleu de Bromophénol 0,05 % (p/v), Xylène cyanol 0,05 % (p/v)). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel renfermant du tampon TBE 1X (90 mM Tris-Borate pH 7, 2 mM EDTA), 6 % de mélange acrylamide/bisacrylamide (19/1), 7 M d'urée, 0,07 % (p/v) de persulfate d'ammonium, 0,035 % (v/v) de TEMED. La migration est effectuée à 200 V dans du tampon TBE 1X pendant une à deux heures.

Transfert sur membrane.

Les ARN séparés par électrophorèse sur gel d'agarose/formaldéhyde sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham). Pour cela, trois éponges carrées sont déposées dans un récipient et imbibées de tampon SSC 10X (200 mM citrate trisodique pH 7 ; 3 M NaCl). Deux papiers Whatman 3MM, puis le gel et enfin la membrane sont ensuite déposés sur les éponges, suivi de 3 papiers Whatman 3MM. Une grande quantité de papier absorbant est déposée sur le montage et surmontée d'une plaque de verre et d'un poids (environ 1 kg). Le transfert est réalisé sur la nuit.

Les ARN séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide/urée sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham) par électrotransfert semi sec. Pour cela, la membrane est positionnée sur le gel et l'ensemble est placé en sandwich entre deux feuilles de papier Whatman 3MM et placé dans un appareil de transfert semi sec (BioRad). Le transfert est effectué dans du tampon TBE 0,5X à température ambiante pendant 45 min à 80 mA.

Dans les deux cas, les ARN transférés sont fixés sur la membrane par une exposition de 1200 μJ de lumière UV dans un appareil Stratalinker (Agilent Genomics).

Sondes marquées à la digoxygénine

Les sondes marquées DIG consistent en des produits PCR dans lesquels des rédidus dUMP-DIG est incorporé à la place du dTMP et ont une taille d'environ 500 bp. Le marquage des sondes à la digoxigénine est réalisé par PCR dans un volume final de 50 μL à l'aide du PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche). Le milieu réactionnel renferme 1X de « PCR buffer with $MgCl_2$ » (Roche), 0,1 volume de PCR DIG Probe Synthesis Mix (Roche) (dATP, dCTP, dGTP à 2 mM chacuns, dTTP à 1,3 mM DIG-11-dUTP alkali-labile 0,7 mM, pH 7) renfermant du dUTP-DIG, 1 μM de chacune des deux amorces (sens et anti-sens), 0,05 U/μL d'Enzyme mix (Roche) et 10 ng d'ADN matrice correspondant à un produit de PCR. Le marquage est réalisé par 30 cycles d'amplifications avec une étape d'élongation à 72°C de 7 min supplémentaires en fin de réaction.

Sondes marquées au ^{32}P

Pour les sondes radioactives, le kit DECAprime™ II (Ambion) a été utilisé. La réaction se déroule dans un volume de 25 μL final. 20 ng de matrice ADN correspondant à un produit PCR sont incubés en présence d'hexamères aléatoires à 100°C pendant 3 min puis transféré sur la glace. 5 μL de tampon de réaction –dCTP 5X sont ajoutés au mélange, suivi de 25 μCi d'alpha dCTP marqué au ^{32}P. 5 unités d'Exo– Klenow sont ajouté au mélange avant incubation 15 min au bain-marie à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par ajout d'1 μL d'EDTA 0,5 M. Après ajout de 25 μL d'eau, les

nucléotides non incorporés sont éliminés par filtration sur une colonne de sephadex G50.

Hybridation des sondes marquées à la digoxygénine

La membrane est pré-incubée dans un rouleau d'hybridation pendant 30 min à 42°C en présence de tampon DIG Easy Hyb (Roche). La sonde (1 μL), préalablement dénaturée, est ensuite ajoutée à 3 mL de tampon DIG Easy Hyb (Roche) pré-chauffé à 42°C. L'hybridation est réalisée sur la nuit à 42°C. Un lavage de 5 min à température ambiante dans du tampon SSC 2X, SDS 0,1 % (p/v) est ensuite réalisé suivi de deux lavages de 15 min à 68°C dans du tampon SSC 0,5X ; SDS 0,1 % (p/v). La révélation est réalisée par chimioluminescence par l'intermédiaire d'anticorps anti-digoxigénine couplés à la phosphatase alcaline (PAL) et à l'ajout du substrat : le CSPD (Roche). Pour cela, la membrane est lavée quelques minutes en présence de solution de lavage (0,1 M acide maléique ; 0,15 M NaCl ; pH 7,5, Tween 20 0,3 % (v/v)) puis incubée pendant 30 min à température ambiante en présence de « Blocking Solution » (Roche). Les anticorps anti-digoxigénine couplés à la PAL (Roche) sont ensuite dilués au 1/10 000ème dans la « Blocking solution » (Roche). La membrane est incubée pendant 30 min avec cette solution d'anticorps. Deux lavages de 15 min sont ensuite réalisés dans la solution de lavage, suivi d'une incubation de 5 min dans le tampon de détection (0,1 M Tris-HCl ; 0,1 M NaCl ; pH 9,5). La réaction enzymatique est initiée par incubation de 5 min à 37°C en présence du substrat, le CSPD (Roche). La révélation est réalisée par exposition de la membrane à un film autoradiographique à 25°C.

Tampon SSC 1X : Citrate trisodique pH 7 20 mM, NaCl 0,3 M.

Hybridation des sondes marquées au ^{32}P

La membrane est pré-incubée dans un rouleau d'hybridation pendant 1 h à 65°C avec 5 mL de tampon d'hybridation (0,5 M NaPi pH 7,2 ; 7% SDS). Le tampon est alors enlevé et remplacer par 2 mL de tampon d'hybridation dans lesquelles la sonde radioactive préalablement dénaturée a été ajoutée. L'hybridation est réalisée sur la nuit à 65°C. Un lavage de 15 min à 65°C dans du tampon SSC 2X, SDS 0,1 % (p/v) est ensuite réalisé suivi d'un lavage de 15 min à 65°C dans du tampon SSC 1X ; SDS 0,1 % (p/v), suivi d'un lavage de 15 min à 65°C dans du tampon SSC 0,5X ; SDS 0,1 % (p/v).

Après rinçage de la memebrane dans du tampon 0,5X SSC, la révélation est réalisée par exposition de la membrane à un film autoradiographique à -80°C en présence d'un écran ou par exposition de la membrane à une plaque PhosphorImager à température ambiante.

Analyse des protéines

Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation des protéines est réalisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les mailles de la matrice sont définies par le rapport polyacrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (37.5/1 dans le cas de gel de protéines). Le gel (8 cm x 12 cm x 0,1 cm) comporte deux parties : un gel de concentration (hauteur 3 cm) (Acrylamide 4%, Tris-HCl pH 6,8 100 mM, SDS 0,1% (p/v)) et un gel de séparation (Acrylamide 10 à 15% selon la taille des protéines à fractionner, Tris-HCl pH 8,8 100 mM, SDS 0.1% (p/v)). La polymérisation de l'acrylamide est catalysée par l'ajout d'APS 0,1% (p/v) et de TEMED 0.05% (v/v). Les protéines additionnées 0,2 volumes de tampon de charge protéines (Tris-HCl pH 6,8 100 mM, glycérol 10%, SDS 2% (p/v), 0,1% bleu de bromophénol (p/v), β-mercaptoéthanol 3% (v/v)) sont chargées sur le gel et la migration s'effectue dans du tampon de migration (Tris-HCl pH 8,3 25 mM, glycine 250 mM, SDS 0,1% (p/v)) pendant environ 1 h sous ampérage constant de 25 mA. La migration est contrôlée par la visualisation du front de migration, qui doit avoir atteint le bas du gel.

Transfert des protéines sur membrane.

Après séparation sur un gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon-P 0.45 µm (Millipore) que l'on mouille grâce à du méthanol 100%. L'ensemble est disposé en « sandwich » entre 4 feuilles de papier Whatman imbibées avec du tampon de transfert (48 mM Tris ; 39 mM glycine) et placé dans un appareil de transfert semi sec (BioRad). Gel et membrane sont placés de sorte que les protéines se fixent sur la membrane en migrant de la cathode vers l'anode. Ce transfert est effectué en ampérage constant à 75 mA pendant 45 min.

Immunorévélation de type western blot. Fixation des anticorps

La membrane est équilibrée dans le tampon de lavage (Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.2% (v/v)) et les sites aspécifiques de fixation sont saturés par incubation, pendant 1 heure sous agitation constante, dans du tampon bloquant (Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.2% (v/v), lait écrémé en poudre 5% (p/v)). L'anticorps primaire spécifique est ajouté à la solution, puis l'ensemble est incubé toujours sous agitation constante, une nuit à 4°C ou 1 à 2 h à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 min dans du tampon bloquant, puis les anticorps secondaires (anticorps de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de lapin ou de souris et couplés à la peroxydase (Kirkegaard & Perry Laboratories)) sont ajoutés à du tampon bloquant à la dilution 1/10 000. L'ensemble est agité une heure à température ambiante, puis lavé une fois 5 min dans le tampon bloquant et 2 fois 15 min avec le tampon de lavage avant révélation.

Révélation de la fixation des anticorps

Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase. La révélation s'effectue avec le kit Lumi Light^{Plus} (Roche) qui consiste en une réaction de chimioluminescence catalysée par la peroxydase et produisant une émission de photons au lieu de fixation des anticorps secondaires. Dans la pratique, les conditions préconisées par le fournisseur sont suivies et l'émission lumineuse est révélée par exposition à des films autoradiographiques.

Coloration des protéines après électrotransfert sur membrane

Après révélation de la fixation des anticorps, les protéines transférées sont visualisées par coloration avec une solution de coloration (bleu de Coomassie R250 0,25% (p/v), méthanol 50% (v/v), acide acétique 7% (v/v)) à base de bleu de Coomassie puis décolorées au méthanol 50%. Le colorant est éliminé totalement par lavage prolongé au méthanol 100%.

Agroinfiltration de feuilles de Nicotiana benthamiana

Constructions plasmidiques

La séquence génomique de *TUT1* a été amplifiée à partir d'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* (Col0). Les mutations TUT1* (D491A) et TUT1** (D491A, D493A) ont été introduites par mutagénèse dirigée. Les différentes constructions de TUT1 ont été clonées en utilisant la technologie Gateway® (Invitrogen) dans le vecteur binaire pGWB617 (Nakamura et al., 2010) pour exprimer des protéines fusionnées à 4 étiquettes myc en C terminal de la protéine d'intérêt. La GFP, TUT1, TUT1*, TUT1** et l'inhibiteur de silencing P19 ont tous été exprimés sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du choux fleur (CaMV pour « Cauliflower Mosaic Virus). Le terminateur de la GFP et de P19 a également pour origine le CaMV (terminateur 35S) et le terminateur inclut dans les vecteurs pGWB est le terminateur de la nopaline synthase (terminateur Nos). La construction iGFP contient la séquence amélioratrice de traduction oméga (« omega translation enhancer ») du virus de la mosaïque du tabac (TMV pour « Tobacco Mosaic Virus ») et l'intron de 1,774 kb de la chalcone synthase du pétunia juste en amont de la séquence codant de GFP5. Tous les vecteurs binaires ont été transformés dans la souche GV3101 (pMP90) d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Agroinfiltrations

Une culture saturante est obtenue par inoculation d'une colonie d'*A. tumefaciens* dans 2 mL de milieu YEB (5 g/L d'extrait de bœuf, 5 g/L de bacto tryptone, 1 g/L d'extrait de levure, 1 g/L de bacto peptone, pH 7,4 avec NaOH. Après stérilisation, ajout de $MgSO_4$ 2 mM final et saccharose 5 g/L) additionnés de rifampicine (34 µg/mL), de gentamycine (15 µg/mL) et de l'antibiotique approprié à la sélection de la construction. Cette culture est incubée à 28°C pendant 48 heures sous agitation (200 tours/min). Dix mL de milieu YEB additionnés des mêmes antibiotiques et d'acétosyringone 20 µM sont inoculés avec 500 µL de la préculture saturante et incubés une nuit à 28°C sous agitation. La culture est ensuite centrifugée pendant 10 min à 5000 g et le surnageant est éliminé et remplacé par 5 mL de tampon d'agroinfiltration (10 mM $MgCl_2$, 150 µM acétosyringone) dans lequel les bactéries sont remises en suspension. Ce mélange est dilué afin que l'absorbance à 600 nm soit

égal à 0,5. Les suspensions d'Agrobacterium ont été préparées en mélangeant un volume de suspension P19, un volume de suspension iGFP et un volume de suspension de soit pER8 (vecteur vide transformé dans *A. tumefaciens*), soit TUT1, soit TUT1* ou TUT1**. Des feuilles de *N. benthamiana* âgées de 6 semaines sont ensuite agroinfiltrées côté abaxial avec une seringue de 1 mL après avoir fait une légère blessure à l'aide d'une aiguille. Les feuilles ont été photographiées sous lumière UV et échantillonnées 4,5 jours après agroinfiltration.

Amorces oligonucléotidiques

Gène	**Description**	**Sequence 5'-3'**	**Application**
intron chalcone synthase	qiCHS.1	ACCCAAACGGGTTCTATG	qPCR
	qiCHS.2	CATCTTATTCCCTCCGTTTC	qPCR
GFP	qmGFP5.1	CATGCCTGAGGGATACGTG	qPCR
	qmGFP5.2	TTGTAGTTCCCGTCGTCCTT	qPCR
N.b PR2	qPR2intron.1	GGTCTCTCACTATCTCTCTCATCGC	qPCR
	qPR2intron.2	GATAAGTTGTCCATATCATACAAG GTGC	qPCR
	qPR2.1	GCACCATTTGTTGCTCCTG	qPCR
	qPR2.2	TTCGGTTGAGACCTTGATTTG	qPCR
N.b U6 snRNA	qU6.1	GGGACATCCGATAAAATTGG	qPCR
	qU6.2	TTCTCGATTTGTGCGTGTC	qPCR
At2g45620	qTUT1.1	TGGGAAGAAGGATAGCAAGACT	qPCR
	qTUT1.2	TTCGACATGCCATATACATTTTAAC	qPCR
	qTUT1.3	TTGCAATCGAAGGTGATGAT	qPCR
	qTUT1.4	CAATTGGAACCCTAGCTCGT	qPCR
GFP	GFPfw.1	AACGAAAAGAGAGACCAC	3'RACE
	GFPfw.2	CTAGAGTCCGCAAAAATCACC	3'RACE
	GFPrv.1	TAGTTCCCGTCGTCCTTG	5'RACE
	GFPrv.2	TGAAGAAGTCGTGCCG	5'RACE
	GFP.RNaseH	GGTGATTTTTGCGGACTCTAG	digestion RNase H
	GFPprobe.fw	TCTCCTATCATTATCCTCG	sonde
	GFPprobe.rv	GTGTCTCCCTCAAACTTG	sonde
N.b PR2	NbPR2fw.1	TGGATTCTATGTATTTTGCT	3'RACE
	NbPR2fw.2	GCCATGTTTGATGAAAAT	3'RACE
	NbPR2rv.1	TTGTACACATTTTGCATGGC	5'RACE
	NbPR2rv.2	TGCTAATGCATTGTACACATTTTG	5'RACE
	PR2probe.fw	ATCAAATCAAGGTCTCAAC	sonde
	PR2probe.rv	ATTTTCATCAAACATGGC	sonde
At1g08370	DCP1.35fw	CGAAGTGCGTTCCAAAAG	clonage DCP1
	DCP1.1277rv	ATTGTTGAAGTGCATTTTGTA	clonage DCP1
At5g13570	DCP2.4fw	CACCTTTTAGATACACACAATCG	clonage DCP2
	DCP2.1354rv	AAGCTGAATTACCAGATTCC	clonage DCP2

At3g51375	miR171a.fw	TGATTGAGCCGCGCCAA	3'RACE
At1g11735/ At1g62035	miR171bc.fw	TTGAGCCGTGCCAATAT	3'RACE
	miR408	ATGCACTGCCTCTTCCCTGG	3'RACE
At2g45160	RISC-cleavedLOM1.fw	AATCCTCCGTTATCTCCACC	3'RACE
At2g45620	TUT1.3fw	CATTGTAAGATCTTCGACTTGG	clonage TUT1
	TUT1.2349rv	GTTGTGGCCTTGTCCATTATTAT	clonage TUT2
	TUT1**mut.fw	AAGAGCGCCATCGCCGTT	mutagénèse dirigée
	TUT1**mut.rv	AACGGCGATGGCGCTCTT	mutagénèse dirigée
	TUT1.1337fw	ATGGTTAAAATGTATATGGCATGT	clonage construction Nuctr
At2g39740	HESO1.13fw	GACTTTTCATTGTCTTCGCC	Clonage HESO1
	HESO1.1724rv	ACTGCTCATGTCTCGGTCTC	Clonage HESO2
At5g53770	ncPAP1.5fw	CATAACTTTTAAGTTTTGTAGCTCC	clonage ncPAP
	ncPAP1.1647rv	GTAGGTCCATGTGAGTCCAAC	clonage ncPAP
At4g00060	ncPAP2.59fw	GCTGTGAAAGGAATAGATCAGG	clonage ncPAP
	ncPAP2.2762rv	AGATGAAATGATACTTGGGATGA	clonage ncPAP
At2g40520	ncPAP3-1.14fw	TTATTTGCTTGAGTTTTAGAAAGC	clonage ncPAP
	ncPAP3-2.11fw	CGCTAAGCTGCCATTTTCTCC	clonage ncPAP
	ncPAP3-3.1fw	ATTTTGTTCTTGCTCTGTTCTG	clonage ncPAP
	ncPAP3-4.7fw	TCTTGCTTGTATTGTTTTGAAGC	clonage ncPAP
	ncPAP3-4.1707rv	AGGATTCTTTTTGGACTCTTGAG	clonage ncPAP
At3g45750	ncPAP6.23fw	CCACCATTGTCTCTCTCC	clonage ncPAP
	ncPAP6.2242rv	AATGGTAAAACGATCTACCTAA	clonage ncPAP
At3g51620	ncPAP7.41fw	CTGAGACATCTCTCGATTC	clonage ncPAP
	ncPAP7.2473rv	ACCCTACATGTACATCACG	clonage ncPAP
At3g56320	ncPAP8.16fw	TCCCTTCCGTTTCATTTTAC	clonage ncPAP
	ncPAP8.2123rv	AAGAGCCGTTCATGGTTTG	clonage ncPAP
At3g61690	ncPAP9.12fw	CCGCACGATTTCAGTCC	clonage ncPAP
	ncPAP9.rv	CTTTCCCCTGTTTAGTGAAATC	clonage ncPAP
At1g28090	btPAP1-1.13fw	AAGATTCCGATCTGTTTAGCTTC	clonage ncPAP
	btPAP1-3.39fw	TTATTCTAATGAAGCGGGAATTG	clonage ncPAP
	btPAP1.1690rv	GGCCAGAGGGTAAATGGTATC	clonage ncPAP
At2g17580	btPAP2.2fw	GTTCTACTTTTGGCTTAAAGAGC	clonage ncPAP
	btPAP2.2293rv	CCTGAAGAGACTTGAGAGTTTTC	clonage ncPAP
At3g48830	btPAP3.10fw	CTTCAAAAACCCTAACATTTCTG	clonage ncPAP
	btPAP3.1684rv	ACAACTCTTGAGGTGGGTT	clonage ncPAP
At5g23690	btPAP4.24fw	ACTAGAACCCTAACTTCTCTGC	clonage ncPAP
	btPAP4.1683rv	CAATTCTTGAGATAGGTTTAATG	clonage ncPAP

Références

Albert, T.K., Lemaire, M., van Berkum, N.L., Gentz, R., Collart, M.A., and Timmers, H.T. (2000). Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. Nucleic Acids Res. *28*, 809–817.

Ambros, V., and Chen, X. (2007). The regulation of genes and genomes by small RNAs. Development *134*, 1635–1641.

Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.-H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. Science *328*, 1534–1539.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature *290*, 457–465.

Andrade, J.M., Hajnsdorf, E., Régnier, P., and Arraiano, C.M. (2009). The poly(A)-dependent degradation pathway of rpsO mRNA is primarily mediated by RNase R. RNA *15*, 316–326.

Andreeva, A., Howorth, D., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E., Hubbard, T.J.P., Chothia, C., and Murzin, A.G. (2008). Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. Nucleic Acids Res. *36*, D419–425.

Andrei, M.A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., and Lührmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. RNA *11*, 717–727.

Aphasizheva, I., Maslov, D., Wang, X., Huang, L., and Aphasizhev, R. (2011). Pentatricopeptide repeat proteins stimulate mRNA adenylation/uridylation to activate mitochondrial translation in trypanosomes. Mol. Cell *42*, 106–117.

Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T., and Hannon, G.J. (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. Mol. Cell *31*, 785–799.

Aravind, L., and Koonin, E.V. (1999). DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. Nucleic Acids Res. *27*, 1609–1618.

Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T., et al. (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. Genes Dev. *24*, 904–915.

Baccarini, A., Chauhan, H., Gardner, T.J., Jayaprakash, A.D., Sachidanandam, R., and Brown, B.D. (2011). Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. Curr. Biol. *21*, 369–376.

Bah, A., Wischnewski, H., Shchepachev, V., and Azzalin, C.M. (2012). The telomeric transcriptome of Schizosaccharomyces pombe. Nucleic Acids Res. *40*, 2995–3005.

Bai, Y., Salvadore, C., Chiang, Y.C., Collart, M.A., Liu, H.Y., and Denis, C.L. (1999). The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. Mol. Cell. Biol. *19*, 6642–6651.

Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H.B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? Nucleic Acids Res. *33*, 7138–7150.

Baumberger, N., and Baulcombe, D.C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 11928–11933.

Bernardi, A., and Spahr, P.F. (1972). Nucleotide sequence at the binding site for coat protein on RNA of bacteriophage R17. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *69*, 3033–3037.

Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stöhr, N., Zirkel, A., Dohm, J.C., Himmelbauer, H., Tavanez, J.-P., Hüttelmaier, S., and Wahle, E. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. RNA *18*, 958–972.

Bernstein, J., Patterson, D.N., Wilson, G.M., and Toth, E.A. (2008). Characterization of the essential activities of Saccharomyces cerevisiae Mtr4p, a 3'->5' helicase partner of the nuclear exosome. J. Biol. Chem. *283*, 4930–4942.

Bernstein, P., Peltz, S.W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. Mol. Cell. Biol. *9*, 659–670.

Boeck, R., Lapeyre, B., Brown, C.E., and Sachs, A.B. (1998). Capped mRNA degradation intermediates accumulate in the yeast spb8-2 mutant. Mol. Cell. Biol. *18*, 5062–5072.

Booth, B.L., Jr, and Pugh, B.F. (1997). Identification and characterization of a nuclease specific for the 3' end of the U6 small nuclear RNA. J. Biol. Chem. *272*, 984–991.

Borja, M.S., Piotukh, K., Freund, C., and Gross, J.D. (2011). Dcp1 Links Coactivators of mRNA Decapping to Dcp2 by Proline Recognition. RNA *17*, 278–290.

Bouché, N., Lauressergues, D., Gasciolli, V., and Vaucheret, H. (2006). An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. EMBO J. *25*, 3347–3356.

Brannan, K., Kim, H., Erickson, B., Glover-Cutter, K., Kim, S., Fong, N., Kiemele, L., Hansen, K., Davis, R., Lykke-Andersen, J., et al. (2012). mRNA decapping factors and the exonuclease Xrn2 function in widespread premature termination of RNA polymerase II transcription. Mol. Cell *46*, 311–324.

Brengues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs

between polysomes and cytoplasmic processing bodies. Science *310*, 486–489.

Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. Cell *128*, 1089–1103.

Briggs, M.W., Burkard, K.T., and Butler, J.S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. J. Biol. Chem. *273*, 13255–13263.

Brodsky, A.S., and Silver, P.A. (2000). Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. RNA *6*, 1737–1749.

Bruni, F., Gramegna, P., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A. (2012). The mystery of mitochondrial RNases. Biochem. Soc. Trans. *40*, 865–869.

Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Nishibu, T., Ukekawa, R., Funakoshi, T., Kurokawa, T., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., et al. (2010). A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. Genome Res. *20*, 1398–1410.

Callahan, K.P., and Butler, J.S. (2010). TRAMP complex enhances RNA degradation by the nuclear exosome component Rrp6. J. Biol. Chem. *285*, 3540–3547.

Carballo, E., Lai, W.S., and Blackshear, P.J. (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. Science *281*, 1001–1005.

Carneiro, T., Carvalho, C., Braga, J., Rino, J., Milligan, L., Tollervey, D., and Carmo-Fonseca, M. (2007). Depletion of the yeast nuclear exosome subunit Rrp6 results in accumulation of polyadenylated RNAs in a discrete domain within the nucleolus. Mol. Cell. Biol. *27*, 4157–4165.

Carroll, J.S., Munchel, S.E., and Weis, K. (2011). The DExD/H box ATPase Dhh1 functions in translational repression, mRNA decay, and processing body dynamics. J. Cell Biol. *194*, 527–537.

Celesnik, H., Deana, A., and Belasco, J.G. (2007). Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. Mol. Cell *27*, 79–90.

Chekanova, J.A., Shaw, R.J., Wills, M.A., and Belostotsky, D.A. (2000). Poly(A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from Arabidopsis thaliana rescues 5.8 S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast ski6 mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells. J. Biol. Chem. *275*, 33158–33166.

Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. Wiley Interdiscip Rev RNA *2*, 167–183.

Chen, F., MacDonald, C.C., and Wilusz, J. (1995). Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. Nucleic Acids Res. *23*, 2614–2620.

Chen, H.-W., Rainey, R.N., Balatoni, C.E., Dawson, D.W., Troke, J.J., Wasiak, S., Hong,

J.S., McBride, H.M., Koehler, C.M., Teitell, M.A., et al. (2006). Mammalian polynucleotide phosphorylase is an intermembrane space RNase that maintains mitochondrial homeostasis. Mol. Cell. Biol. *26*, 8475–8487.

Chen, J., Chiang, Y.-C., and Denis, C.L. (2002). CCR4, a 3|[prime]|–5|[prime]| poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. The EMBO Journal *21*, 1414–1426.

Chiba, Y., Johnson, M.A., Lidder, P., Vogel, J.T., van Erp, H., and Green, P.J. (2004). AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis. Gene *328*, 95–102.

Chowdhury, A., Mukhopadhyay, J., and Tharun, S. (2007). The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. RNA *13*, 998–1016.

Chowdhury, A., and Tharun, S. (2008). lsm1 mutations impairing the ability of the Lsm1p-7p-Pat1p complex to preferentially bind to oligoadenylated RNA affect mRNA decay in vivo. RNA *14*, 2149–2158.

Chujo, T., Ohira, T., Sakaguchi, Y., Goshima, N., Nomura, N., Nagao, A., and Suzuki, T. (2012). LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria. Nucleic Acids Research.

Cohen, L.S., Mikhli, C., Jiao, X., Kiledjian, M., Kunkel, G., and Davis, R.E. (2005). Dcp2 Decaps m2,2,7GpppN-capped RNAs, and its activity is sequence and context dependent. Mol. Cell. Biol. *25*, 8779–8791.

Colgan, D.F., and Manley, J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. Genes Dev. *11*, 2755–2766.

Collart, M.A., and Panasenko, O.O. (2012). The Ccr4--not complex. Gene *492*, 42–53.

Coller, J., and Parker, R. (2005). General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping. Cell *122*, 875–886.

Condon, C. (2007). Maturation and degradation of RNA in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. *10*, 271–278.

Cougot, N., Babajko, S., and Séraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. J. Cell Biol. *165*, 31–40.

Deana, A., Celesnik, H., and Belasco, J.G. (2008). The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. Nature *451*, 355–358.

Decker, C.J., and Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. Genes Dev. *7*, 1632–1643.

Decker, C.J., Teixeira, D., and Parker, R. (2007). Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in Saccharomyces cerevisiae. The Journal of Cell Biology *179*, 437–449.

Deutscher, M.P. (2003). Degradation of stable RNA in bacteria. J. Biol. Chem. *278*, 45041–45044.

Duborjal, H., Beugnot, R., Mousson de Camaret, B., and Issartel, J.-P. (2002). Large functional range of steady-state levels of nuclear and mitochondrial transcripts coding for the subunits of the human mitochondrial OXPHOS system. Genome Res. *12*, 1901–1909.

Dunckley, T., and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae and contains a functional MutT motif. EMBO J. *18*, 5411–5422.

Dunckley, T., Tucker, M., and Parker, R. (2001). Two related proteins, Edc1p and Edc2p, stimulate mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *157*, 27–37.

Dupressoir, A., Morel, A.P., Barbot, W., Loireau, M.P., Corbo, L., and Heidmann, T. (2001). Identification of four families of yCCR4- and Mg2+-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. BMC Genomics *2*, 9.

Etheridge, R.D., Aphasizheva, I., Gershon, P.D., and Aphasizhev, R. (2008). 3' adenylation determines mRNA abundance and monitors completion of RNA editing in T. brucei mitochondria. EMBO J. *27*, 1596–1608.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. Mol. Cell. Biol. *27*, 3970–3981.

Feddersen, A., Dedic, E., Poulsen, E.G., Schmid, M., Van, L.B., Jensen, T.H., and Brodersen, D.E. (2012). Saccharomyces cerevisiae Ngl3p is an active 3'-5' exonuclease with a specificity towards poly-A RNA reminiscent of cellular deadenylases. Nucleic Acids Res. *40*, 837–846.

Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B., and Lykke-Andersen, J. (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. Mol. Cell *20*, 905–915.

Franks, T.M., and Lykke-Andersen, J. (2007). TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. Genes Dev. *21*, 719–735.

Fuke, H., and Ohno, M. (2008). Role of poly (A) tail as an identity element for mRNA nuclear export. Nucleic Acids Res. *36*, 1037–1049.

Gagliardi, D., Stepien, P.P., Temperley, R.J., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A. (2004). Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. Trends Genet. *20*, 260–267.

Gallie, D.R. (2002). The 5′-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. Nucleic Acids Research *30*, 3401.

Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., and Sablowski, R. (2004). A Link Between mRNA Turnover and RNA Interference in Arabidopsis. Science *306*, 1046 –1048.

Gregory, B.D., O'Malley, R.C., Lister, R., Urich, M.A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A.H., and Ecker, J.R. (2008). A Link between RNA Metabolism and Silencing Affecting Arabidopsis Development. Developmental Cell *14*, 854–866.

Guleria, P., Mahajan, M., Bhardwaj, J., and Yadav, S.K. (2011). Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. Genomics Proteomics Bioinformatics *9*, 183–199.

Gy, I., Gasciolli, V., Lauressergues, D., Morel, J.-B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H., and Mallory, A.C. (2007). Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. Plant Cell *19*, 3451–3461.

Haas, G., Braun, J.E., Igreja, C., Tritschler, F., Nishihara, T., and Izaurralde, E. (2010). HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa. The Journal of Cell Biology *189*, 289 –302.

Hagan, J.P., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. Nat. Struct. Mol. Biol *16*, 1021–1025.

Halic, M., and Moazed, D. (2010). Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. Cell *140*, 504–516.

Hamill, S., Wolin, S.L., and Reinisch, K.M. (2010). Structure and function of the polymerase core of TRAMP, a RNA surveillance complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 15045–15050.

Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H., and Baulcombe, D.C. (2010). The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. Plant Cell *22*, 321–334.

He, L., Söderbom, F., Wagner, E.G., Binnie, U., Binns, N., and Masters, M. (1993). PcnB is required for the rapid degradation of RNAI, the antisense RNA that controls the copy number of ColE1-related plasmids. Mol. Microbiol. *9*, 1131–1142.

He, W., and Parker, R. (2001). The yeast cytoplasmic LsmI/Pat1p complex protects mRNA 3' termini from partial degradation. Genetics *158*, 1445–1455.

Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. Mol. Cell *32*, 276–284.

Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V.A., Foulaki, K., Hornig, H., Brahms, H., and Lührmann, R. (1995). snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. EMBO J. *14*, 2076–2088.

Herr, A.J., Molnàr, A., Jones, A., and Baulcombe, D.C. (2006). Defective RNA processing

enhances RNA silencing and influences flowering of Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 14994–15001.

Hirose, Y., and Manley, J.L. (1998). RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. Nature *395*, 93–96.

Horwich, M.D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P., and Zamore, P.D. (2007). The Drosophila RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. Curr. Biol. *17*, 1265–1272.

Hu, W., Sweet, T.J., Chamnongpol, S., Baker, K.E., and Coller, J. (2009). Co-translational mRNA decay in Saccharomyces cerevisiae. Nature *461*, 225–229.

Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. Nat. Rev. Genet. *12*, 99–110.

Ibrahim, F., Rohr, J., Jeong, W.-J., Hesson, J., and Cerutti, H. (2006). Untemplated Oligoadenylation Promotes Degradation of RISC-Cleaved Transcripts. Science *314*, 1893–1893.

Ibrahim, F., Rymarquis, L.A., Kim, E.-J., Becker, J., Balassa, E., Green, P.J., and Cerutti, H. (2010). Uridylation of mature miRNAs and siRNAs by the MUT68 nucleotidyltransferase promotes their degradation in Chlamydomonas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *107*, 3906–3911.

Igea, A., and Méndez, R. (2010). Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4. EMBO J. *29*, 2182–2193.

Isken, O., and Maquat, L.E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. Genes Dev. *21*, 1833–3856.

Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. Nat. Cell Biol. *7*, 1267–1274.

Jia, H., Wang, X., Liu, F., Guenther, U.-P., Srinivasan, S., Anderson, J.T., and Jankowsky, E. (2011). The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex. Cell *145*, 890–901.

Joanny, G., Le Derout, J., Bréchemier-Baey, D., Labas, V., Vinh, J., Régnier, P., and Hajnsdorf, E. (2007). Polyadenylation of a functional mRNA controls gene expression in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. *35*, 2494–2502.

Jones, M.R., Quinton, L.J., Blahna, M.T., Neilson, J.R., Fu, S., Ivanov, A.R., Wolf, D.A., and Mizgerd, J.P. (2009). Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. Nat. Cell Biol *11*, 1157–1163.

Jouannet, V., Moreno, A.B., Elmayan, T., Vaucheret, H., Crespi, M.D., and Maizel, A. (2012). Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. The EMBO Journal *31*, 1704–1713.

Juliano, C., Wang, J., and Lin, H. (2011). Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms. Annu. Rev. Genet. *45*, 447–469.

Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., and Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in S. cerevisiae. Genes Dev. *18*, 1227–1240.

Kadaba, S., Wang, X., and Anderson, J.T. (2006). Nuclear RNA surveillance in Saccharomyces cerevisiae: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. RNA *12*, 508–521.

Kamminga, L.M., Luteijn, M.J., den Broeder, M.J., Redl, S., Kaaij, L.J.T., Roovers, E.F., Ladurner, P., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2010). Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. EMBO J. *29*, 3688–3700.

Kao, C.-Y., and Read, L.K. (2005). Opposing effects of polyadenylation on the stability of edited and unedited mitochondrial RNAs in Trypanosoma brucei. Mol. Cell. Biol. *25*, 1634–1644.

Kastenmayer, J.P., and Green, P.J. (2000). Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: Evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. Proceedings of the National Academy of Sciences *97*, 13985 –13990.

Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T., and Suzuki, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3′ adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. Genes & Development *23*, 433 –438.

Kawaguchi, R., and Bailey-Serres, J. (2002). Regulation of translational initiation in plants. Curr. Opin. Plant Biol. *5*, 460–465.

Keller, R.W., Kühn, U., Aragón, M., Bornikova, L., Wahle, E., and Bear, D.G. (2000). The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. J. Mol. Biol. *297*, 569–583.

Khidr, L., Wu, G., Davila, A., Procaccio, V., Wallace, D., and Lee, W.-H. (2008). Role of SUV3 helicase in maintaining mitochondrial homeostasis in human cells. J. Biol. Chem. *283*, 27064–27073.

Khraiwesh, B., Zhu, J.-K., and Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Biochim. Biophys. Acta *1819*, 137–148.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 126–139.

Konarska, M.M., and Sharp, P.A. (1986). Electrophoretic separation of complexes involved in the splicing of precursors to mRNAs. Cell *46*, 845–855.

Körner, C.G., and Wahle, E. (1997). Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. J. Biol. Chem. *272*, 10448–10456.

Kshirsagar, M., and Parker, R. (2004). Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *166*, 729–739.

Kumar, G.R., and Glaunsinger, B.A. (2010). Nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein restricts gene expression via hyperadenylation and nuclear retention of mRNA. Mol. Cell. Biol. *30*, 4996–5008.

Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., et al. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. Genes Dev. *22*, 908–917.

Kwak, J.E., Drier, E., Barbee, S.A., Ramaswami, M., Yin, J.C.P., and Wickens, M. (2008). GLD2 poly(A) polymerase is required for long-term memory. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 14644–14649.

Kwak, J.E., and Wickens, M. (2007). A family of poly(U) polymerases. RNA *13*, 860–867.

LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. Cell *121*, 713–724.

LaGrandeur, T.E., and Parker, R. (1998). Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. EMBO J. *17*, 1487–1496.

Lai, W.S., Carballo, E., Thorn, J.M., Kennington, E.A., and Blackshear, P.J. (2000). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA. J. Biol. Chem. *275*, 17827–17837.

Lange, H., Holec, S., Cognat, V., Pieuchot, L., Le Ret, M., Canaday, J., and Gagliardi, D. (2008). Degradation of a Polyadenylated rRNA Maturation By-Product Involves One of the Three RRP6-Like Proteins in Arabidopsis thaliana. Molecular and Cellular Biology *28*, 3038–3044.

Lange, H., Sement, F.M., Canaday, J., and Gagliardi, D. (2009). Polyadenylation-assisted RNA degradation processes in plants. Trends Plant Sci *14*, 497–504.

Lange, H., Sement, F.M., and Gagliardi, D. (2011). MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in Arabidopsis thaliana. Plant J. *68*, 51–63.

Larimer, F.W., Hsu, C.L., Maupin, M.K., and Stevens, A. (1992). Characterization of the XRN1 gene encoding a 5'-->3' exoribonuclease: sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-disrupted yeast cells. Gene *120*, 51–57.

Lehnik-Habrink, M., Lewis, R.J., Mäder, U., and Stülke, J. (2012). RNA degradation in Bacillus subtilis: an interplay of essential endo- and exoribonucleases. Mol. Microbiol. *84*, 1005–1017.

Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. Curr. Biol. *15*, 1501–

1507.

Liang, W., Li, C., Liu, F., Jiang, H., Li, S., Sun, J., Wu, X., and Li, C. (2009). The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. Cell Res. *19*, 307–316.

Lin, M.-D., Jiao, X., Grima, D., Newbury, S.F., Kiledjian, M., and Chou, T.-B. (2008). Drosophila processing bodies in oogenesis. Dev. Biol. *322*, 276–288.

Liu, H.Y., Badarinarayana, V., Audino, D.C., Rappsilber, J., Mann, M., and Denis, C.L. (1998). The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. EMBO J. *17*, 1096–1106.

Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. Cell *127*, 1223–1237.

Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. Science *297*, 2053–2056.

Lu, G., Zhang, J., Li, Y., Li, Z., Zhang, N., Xu, X., Wang, T., Guan, Z., Gao, G.F., and Yan, J. (2011). hNUDT16: a universal decapping enzyme for small nucleolar RNA and cytoplasmic mRNA. Protein Cell *2*, 64–73.

Lubas, M., Christensen, M.S., Kristiansen, M.S., Domanski, M., Falkenby, L.G., Lykke-Andersen, S., Andersen, J.S., Dziembowski, A., and Jensen, T.H. (2011). Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting complex. Mol. Cell *43*, 624–637.

Luo, Z., and Chen, Z. (2007). Improperly Terminated, Unpolyadenylated mRNA of Sense Transgenes Is Targeted by RDR6-Mediated RNA Silencing in Arabidopsis. The Plant Cell Online *19*, 943 –958.

Mallory, A., and Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. Plant Cell *22*, 3879–3889.

Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D., and Maizel, A. (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. Plant Cell *22*, 1104–1117.

Martin, G., and Keller, W. (2007). RNA-specific ribonucleotidyl transferases. RNA *13*, 1834–1849.

Mathy, N., Bénard, L., Pellegrini, O., Daou, R., Wen, T., and Condon, C. (2007). 5′-to-3′ Exoribonuclease Activity in Bacteria: Role of RNase J1 in rRNA Maturation and 5′ Stability of mRNA. Cell *129*, 681–692.

Mathy, N., Hébert, A., Mervelet, P., Bénard, L., Dorléans, A., Li de la Sierra-Gallay, I., Noirot, P., Putzer, H., and Condon, C. (2010). Bacillus subtilis ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. Molecular Microbiology *75*, 489–498.

McLauchlan, J., Gaffney, D., Whitton, J.L., and Clements, J.B. (1985). The consensus sequence YGTGTTYY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini. Nucleic Acids Res. *13*, 1347–1368.

Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. Cell *91*, 457–466.

Moenne, A., Camier, S., Anderson, G., Margottin, F., Beggs, J., and Sentenac, A. (1990). The U6 gene of Saccharomyces cerevisiae is transcribed by RNA polymerase C (III) in vivo and in vitro. EMBO J. *9*, 271–277.

Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2000). Polynucleotide phosphorylase, RNase II and RNase E play different roles in the in vivo modulation of polyadenylation in Escherichia coli. Mol. Microbiol. *36*, 982–994.

Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. Cell *133*, 128–141.

Morozov, I.Y., Jones, M.G., Gould, P.D., Crome, V., Wilson, J.B., Hall, A.J.W., Rigden, D.J., and Caddick, M.X. (2012). mRNA 3′ Tagging Is Induced by Nonsense-Mediated Decay and Promotes Ribosome Dissociation. Mol. Cell. Biol. *32*, 2585–2595.

Morozov, I.Y., Jones, M.G., Razak, A.A., Rigden, D.J., and Caddick, M.X. (2010). CUCU modification of mRNA promotes decapping and transcript degradation in Aspergillus nidulans. Mol. Cell. Biol. *30*, 460–469.

Motamedi, M.R., Verdel, A., Colmenares, S.U., Gerber, S.A., Gygi, S.P., and Moazed, D. (2004). Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. Cell *119*, 789–802.

Mullen, T.E., and Marzluff, W.F. (2008). Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5′ to 3′ and 3′ to 5′. Genes & Development *22*, 50 –65.

Munoz-Tello, P., Gabus, C., and Thore, S. (2012). Functional implications from the cid1 poly(u) polymerase crystal structure. Structure *20*, 977–986.

Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T., and Ueda, T. (2005). Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. J. Biol. Chem. *280*, 19721–19727.

Nagao, A., Hino-Shigi, N., and Suzuki, T. (2008). Measuring mRNA decay in human mitochondria. Meth. Enzymol. *447*, 489–499.

Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., et al. (2010). Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. Biosci. Biotechnol. Biochem *74*, 1315–1319.

Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T. (2005). Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in Arabidopsis. Plant J. *44*, 972–984.

Norbury, C.J. (2010). 3' Uridylation and the regulation of RNA function in the cytoplasm. Biochem. Soc. Trans *38*, 1150–1153.

Okamura, K. (2012). Diversity of animal small RNA pathways and their biological utility. Wiley Interdiscip Rev RNA *3*, 351–368.

Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B.D., Nourizadeh, S.D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P., and Ecker, J.R. (2006). ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5′→3′ exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 13286 –13293.

Omarov, R.T., Ciomperlik, J.J., and Scholthof, H.B. (2007). RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in Tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 1714–1719.

Otsuka, Y., Kedersha, N.L., and Schoenberg, D.R. (2009). Identification of a cytoplasmic complex that adds a cap onto 5'-monophosphate RNA. Mol. Cell. Biol. *29*, 2155–2167.

Ozgur, S., Chekulaeva, M., and Stoecklin, G. (2010). Human Pat1b Connects Deadenylation with mRNA Decapping and Controls the Assembly of Processing Bodies. Mol. Cell. Biol. *30*, 4308–4323.

Pantaleo, V. (2011). Plant RNA silencing in viral defence. Adv. Exp. Med. Biol. *722*, 39–58.

Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. Nat. Struct. Mol. Biol. *11*, 121–127.

Paule, M.R., and White, R.J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acids Res. *28*, 1283–1298.

Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K.E., Jonard, G., and Ziegler-Graff, V. (2002). P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. J. Virol. *76*, 6815–6824.

Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J.E., LaPierre, R.J., Pothoulakis, C., Hagan, J.P., Iliopoulos, D., and Gregory, R.I. (2011). Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. Cell *147*, 1066–1079.

Pomeranz, M.C., Hah, C., Lin, P.-C., Kang, S.G., Finer, J.J., Blackshear, P.J., and Jang, J.-C. (2010). The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA. Plant Physiol. *152*, 151–165.

Portnoy, V., Evguenieva-Hackenberg, E., Klein, F., Walter, P., Lorentzen, E., Klug, G.,

and Schuster, G. (2005). RNA polyadenylation in Archaea: not observed in Haloferax while the exosome polynucleotidylates RNA in Sulfolobus. EMBO Rep. *6*, 1188–1193.

Portnoy, V., and Schuster, G. (2008). Mycoplasma gallisepticum as the first analyzed bacterium in which RNA is not polyadenylated. FEMS Microbiol. Lett. *283*, 97–103.

Potuschak, T., Vansiri, A., Binder, B.M., Lechner, E., Vierstra, R.D., and Genschik, P. (2006). The Exoribonuclease XRN4 Is a Component of the Ethylene Response Pathway in Arabidopsis. The Plant Cell Online *18*, 3047 –3057.

Proudfoot, N.J., and Brownlee, G.G. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature *263*, 211–214.

Qi, Y., Denli, A.M., and Hannon, G.J. (2005). Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. Mol. Cell *19*, 421–428.

Radford, H.E., Meijer, H.A., and de Moor, C.H. (2008). Translational control by cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. Biochim. Biophys. Acta *1779*, 217–229.

Reichenbach, B., Maes, A., Kalamorz, F., Hajnsdorf, E., and Görke, B. (2008). The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of glmS expression and is subject to regulation by polyadenylation in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. *36*, 2570–2580.

Reijns, M.A.M., Alexander, R.D., Spiller, M.P., and Beggs, J.D. (2008). A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. J. Cell. Sci. *121*, 2463–2472.

Reis, C.C., and Campbell, J.L. (2007). Contribution of Trf4/5 and the nuclear exosome to genome stability through regulation of histone mRNA levels in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *175*, 993–1010.

Ren, G., Chen, X., and Yu, B. (2012). Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in Arabidopsis. Curr. Biol. *22*, 695–700.

Reverdatto, S.V., Dutko, J.A., Chekanova, J.A., Hamilton, D.A., and Belostotsky, D.A. (2004). mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. RNA *10*, 1200–1214.

Richards, J., Liu, Q., Pellegrini, O., Celesnik, H., Yao, S., Bechhofer, D.H., Condon, C., and Belasco, J.G. (2011). An RNA pyrophosphohydrolase triggers 5'-exonucleolytic degradation of mRNA in Bacillus subtilis. Mol. Cell *43*, 940–949.

Rissland, O.S., Mikulasova, A., and Norbury, C.J. (2007). Efficient RNA Polyuridylation by Noncanonical Poly(A) Polymerases. Mol. Cell. Biol. *27*, 3612–3624.

Rissland, O.S., and Norbury, C.J. (2009). Decapping is preceded by 3[prime] uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. Nat Struct Mol Biol *16*, 616–623.

Rorbach, J., Nicholls, T.J.J., and Minczuk, M. (2011). PDE12 removes mitochondrial

RNA poly(A) tails and controls translation in human mitochondria. Nucleic Acids Res *39*, 7750–7763.

Rymarquis, L.A., Souret, F.F., and Green, P.J. (2011). Evidence that XRN4, an Arabidopsis homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories. RNA *17*, 501–511.

San Paolo, S., Vanacova, S., Schenk, L., Scherrer, T., Blank, D., Keller, W., and Gerber, A.P. (2009). Distinct roles of non-canonical poly(A) polymerases in RNA metabolism. PLoS Genet *5*, e1000555.

Sandler, H., Kreth, J., Timmers, H.T.M., and Stoecklin, G. (2011). Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. Nucleic Acids Res. *39*, 4373–4386.

Schaeffer, D., Reis, F.P., Johnson, S.J., Arraiano, C.M., and van Hoof, A. (2012). The CR3 motif of Rrp44p is important for interaction with the core exosome and exosome function. Nucleic Acids Research.

Schmidt, M.-J., West, S., and Norbury, C.J. (2010). The human cytoplasmic RNA terminal U-transferase ZCCHC11 targets histone mRNAs for degradation. RNA.

Schneider, C., Anderson, J.T., and Tollervey, D. (2007). The exosome subunit Rrp44 plays a direct role in RNA substrate recognition. Mol. Cell *27*, 324–331.

Schneider, C., Leung, E., Brown, J., and Tollervey, D. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. Nucl. Acids Res. *37*, 1127–1140.

Schott, J., and Stoecklin, G. (2010). Networks controlling mRNA decay in the immune system. Wiley Interdiscip Rev RNA *1*, 432–456.

Schwartz, D., Decker, C.J., and Parker, R. (2003). The enhancer of decapping proteins, Edc1p and Edc2p, bind RNA and stimulate the activity of the decapping enzyme. RNA *9*, 239–251.

Shen, B., and Goodman, H.M. (2004). Uridine Addition After MicroRNA-Directed Cleavage. Science *306*, 997.

Sherstnev, A., Duc, C., Cole, C., Zacharaki, V., Hornyik, C., Ozsolak, F., Milos, P.M., Barton, G.J., and Simpson, G.G. (2012). Direct sequencing of Arabidopsis thaliana RNA reveals patterns of cleavage and polyadenylation. Nature Structural & Molecular Biology.

Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. Science *300*, 805–808.

Silva, I.J., Saramago, M., Dressaire, C., Domingues, S., Viegas, S.C., and Arraiano, C.M. (2011). Importance and key events of prokaryotic RNA decay: the ultimate fate of an RNA molecule. Wiley Interdiscip Rev RNA *2*, 818–836.

Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., and Aravin, A.A. (2011). PIWI-interacting small RNAs:

the vanguard of genome defence. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 246–258.

Sloan, K.E., Schneider, C., and Watkins, N.J. (2012). Comparison of the yeast and human nuclear exosome complexes. Biochem. Soc. Trans. *40*, 850–855.

Slomovic, S., Fremder, E., Staals, R.H.G., Pruijn, G.J.M., and Schuster, G. (2010). Addition of poly(A) and poly(A)-rich tails during RNA degradation in the cytoplasm of human cells. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 7407–7412.

Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D., and Schuster, G. (2005). Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. Mol. Cell. Biol. *25*, 6427–6435.

Slomovic, S., Portnoy, V., Yehudai-Resheff, S., Bronshtein, E., and Schuster, G. (2008). Polynucleotide phosphorylase and the archaeal exosome as poly(A)-polymerases. Biochim. Biophys. Acta *1779*, 247–255.

Song, M.-G., and Kiledjian, M. (2007). 3' Terminal oligo U-tract-mediated stimulation of decapping. RNA *13*, 2356–2365.

Song, M.-G., Li, Y., and Kiledjian, M. (2010). Multiple mRNA decapping enzymes in mammalian cells. Mol. Cell *40*, 423–432.

Souret, F.F., Kastenmayer, J.P., and Green, P.J. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. Mol. Cell *15*, 173–183.

Spiller, M.P., Boon, K.-L., Reijns, M.A.M., and Beggs, J.D. (2007). The Lsm2-8 complex determines nuclear localization of the spliceosomal U6 snRNA. Nucleic Acids Res. *35*, 923–929.

Stagno, J., Aphasizheva, I., Aphasizhev, R., and Luecke, H. (2007). Dual role of the RNA substrate in selectivity and catalysis by terminal uridylyl transferases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 14634–14639.

Stoecklin, G., Colombi, M., Raineri, I., Leuenberger, S., Mallaun, M., Schmidlin, M., Gross, B., Lu, M., Kitamura, T., and Moroni, C. (2002). Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. EMBO J. *21*, 4709–4718.

Takagaki, Y., and Manley, J.L. (2000). Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. Mol. Cell. Biol. *20*, 1515–1525.

Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. RNA *11*, 371–382.

Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M., and Wahle, E. (2004). A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in Drosophila. EMBO J. *23*, 2862–2871.

Tharun, S. (2009). Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function.

Int Rev Cell Mol Biol *272*, 149–189.

Tharun, S., He, W., Mayes, A.E., Lennertz, P., Beggs, J.D., and Parker, R. (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. Nature *404*, 515–518.

Tharun, S., Muhlrad, D., Chowdhury, A., and Parker, R. (2005). Mutations in the Saccharomyces cerevisiae LSM1 gene that affect mRNA decapping and 3' end protection. Genetics *170*, 33–46.

Tharun, S., and Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. Mol. Cell *8*, 1075–1083.

Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C., and Maule, A.J. (2003). Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in Nicotiana benthamiana. Virology *306*, 33–41.

Thomas, M.G., Loschi, M., Desbats, M.A., and Boccaccio, G.L. (2010). RNA granules: The good, the bad and the ugly. Cell Signal.

Tomecki, R., Dmochowska, A., Gewartowski, K., Dziembowski, A., and Stepien, P.P. (2004). Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase. Nucleic Acids Res. *32*, 6001–6014.

Tourrière, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J.M., Bertrand, E., and Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. J. Cell Biol. *160*, 823–831.

Trippe, R., Guschina, E., Hossbach, M., Urlaub, H., Lührmann, R., and Benecke, B.-J. (2006). Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase. RNA *12*, 1494–1504.

Trippe, R., Sandrock, B., and Benecke, B.-J. (1998). A Highly Specific Terminal Uridylyl Transferase Modifies the 3′-End of U6 Small Nuclear RNA. Nucl. Acids Res. *26*, 3119–3126.

Tritschler, F., Eulalio, A., Truffault, V., Hartmann, M.D., Helms, S., Schmidt, S., Coles, M., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2007). A divergent Sm fold in EDC3 proteins mediates DCP1 binding and P-body targeting. Mol. Cell. Biol. *27*, 8600–8611.

Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrad, D., and Parker, R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. *21*, 1427–1436.

Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L., and Parker, R. (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in Saccharomyces cerevisiae. Cell *104*, 377–386.

Udagawa, T., Swanger, S.A., Takeuchi, K., Kim, J.H., Nalavadi, V., Shin, J., Lorenz, L.J., Zukin, R.S., Bassell, G.J., and Richter, J.D. (2012). Bidirectional Control of mRNA

Translation and Synaptic Plasticity by the Cytoplasmic Polyadenylation Complex. Molecular Cell *47*, 253–266.

Vaňáčová, Š., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. (2005). A New Yeast Poly(A) Polymerase Complex Involved in RNA Quality Control. PLoS Biol *3*, e189.

Villalba, A., Coll, O., and Gebauer, F. (2011). Cytoplasmic polyadenylation and translational control. Curr. Opin. Genet. Dev. *21*, 452–457.

Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell *136*, 669–687.

Walley, J.W., Kelley, D.R., Nestorova, G., Hirschberg, D.L., and Dehesh, K. (2010). Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. Plant Physiol. *152*, 866–875.

Wang, D.D.-H., Shu, Z., Lieser, S.A., Chen, P.-L., and Lee, W.-H. (2009). Human mitochondrial SUV3 and polynucleotide phosphorylase form a 330-kDa heteropentamer to cooperatively degrade double-stranded RNA with a 3'-to-5' directionality. J. Biol. Chem. *284*, 20812–20821.

Wang, G., Chen, H.-W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M., et al. (2010). PNPASE regulates RNA import into mitochondria. Cell *142*, 456–467.

Waters, L.S., and Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. Cell *136*, 615–628.

Weber, C., Nover, L., and Fauth, M. (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. Plant J *56*, 517–530.

Wells, D.G., Dong, X., Quinlan, E.M., Huang, Y.S., Bear, M.F., Richter, J.D., and Fallon, J.R. (2001). A role for the cytoplasmic polyadenylation element in NMDA receptor-regulated mRNA translation in neurons. J. Neurosci. *21*, 9541–9548.

Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., and Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. Mol. Cell *2*, 135–140.

Win, T.Z., Draper, S., Read, R.L., Pearce, J., Norbury, C.J., and Wang, S.-W. (2006). Requirement of fission yeast Cid14 in polyadenylation of rRNAs. Mol. Cell. Biol. *26*, 1710–1721.

van Wolfswinkel, J.C., Claycomb, J.M., Batista, P.J., Mello, C.C., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2009). CDE-1 affects chromosome segregation through uridylation of CSR-1-bound siRNAs. Cell *139*, 135–148.

Wydro, M., Bobrowicz, A., Temperley, R.J., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010). Targeting of the cytosolic poly(A) binding protein PABPC1 to mitochondria causes mitochondrial translation inhibition. Nucleic Acids Res. *38*, 3732–3742.

Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.-C., Dufour, M.-E., Boulay, J.,

Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., et al. (2005). Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. Cell *121*, 725–737.

Wyman, S.K., Knouf, E.C., Parkin, R.K., Fritz, B.R., Lin, D.W., Dennis, L.M., Krouse, M.A., Webster, P.J., and Tewari, M. (2011). Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. Genome Res. *21*, 1450–1461.

Xu, J., and Chua, N.-H. (2009). Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. Plant Cell *21*, 3270–3279.

Xu, J., and Chua, N.-H. (2011). Processing bodies and plant development. Curr. Opin. Plant Biol. *14*, 88–93.

Xu, J., and Chua, N.-H. (2012). Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. EMBO J. *31*, 1975–1984.

Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE Form a Decapping Complex Required for Postembryonic Development. Plant Cell *18*, 3386–3398.

Yamashita, A., Chang, T.-C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. Nat. Struct. Mol. Biol. *12*, 1054–1063.

Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B., and Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. Nucleic Acids Res. *34*, 667–675.

Yates, L.A., Fleurdépine, S., Rissland, O.S., De Colibus, L., Harlos, K., Norbury, C.J., and Gilbert, R.J.C. (2012). Structural basis for the activity of a cytoplasmic RNA terminal uridylyl transferase. Nature Structural & Molecular Biology.

Yu, B., Bi, L., Zhai, J., Agarwal, M., Li, S., Wu, Q., Ding, S.-W., Meyers, B.C., Vaucheret, H., and Chen, X. (2010). siRNAs compete with miRNAs for methylation by HEN1 in Arabidopsis. Nucleic Acids Res. *38*, 5844–5850.

Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X. (2005a). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. Science *307*, 932–935.

Yu, J.H., Yang, W.-H., Gulick, T., Bloch, K.D., and Bloch, D.B. (2005b). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. RNA *11*, 1795–1802.

Zhang, W., Murphy, C., and Sieburth, L.E. (2010). Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *107*, 15981–15985.

Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes:

mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *63*, 405–445.

Zhao, Y., Yu, Y., Zhai, J., Ramachandran, V., Dinh, T.T., Meyers, B.C., Mo, B., and Chen, X. (2012). The Arabidopsis Nucleotidyl Transferase HESO1 Uridylates Unmethylated Small RNAs to Trigger Their Degradation. Curr. Biol. *22*, 689–694.

Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., and Zhu, J.-K. (2007). Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. EMBO J. *26*, 1691–1701.

Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. Science *299*, 716–719.

Zimmer, S.L., Schein, A., Zipor, G., Stern, D.B., and Schuster, G. (2009). Polyadenylation in Arabidopsis and Chlamydomonas organelles: the input of nucleotidyltransferases, poly(A) polymerases and polynucleotide phosphorylase. Plant J *59*, 88–99.

Annexes

Contribution mineure à un autre projet

En marge de mon sujet principal, j'ai également participé au projet mené par Heike Lange au laboratoire, ayant pour but la caractérisation de l'hélicase potentielle AtMTR4, un cofacteur de l'exosome. Cette hélicase est impliquée dans la biogénèse des ARNr chez *A. thaliana*. AtMTR4 est localisée dans le nucléole, tout comme la 3'-5' exoribonucléase RRP6L2, cofacteur de l'exosome. AtMTR4 et RRP6L2 participent à la maturation de l'ARNr 5,8S et à l'élimination des sous produits de maturation des ARNr. L'absence de AtMTR4 provoque un développement retardé d'*A. thaliana*, des premières feuilles pointues et une organisation des veines altérée. Ces phénotypes ressemblent à ceux de mutants de protéines ribosomiques et de nucléolines, et peuvent être expliqués par un retard dans la biogénèse des ribosomes comme le montre le taux réduit d'accumulation des ARNr chez *mtr4*.

AtMTR4 n'est pas la seule hélicase potentielle de la sous-famille des hélicases Ski2/Mtr4 à être présente dans le noyau des cellules d'*A. thaliana*. Une deuxième hélicase potentielle, HEN2, est également présente mais ne participe pas à la biogénèse des ARNr. Cette hélicase est en cours de caractérisation au laboratoire et il semblerait qu'elle participe à la dégradation d'autres types d'ARN nucléaires. Ma contribution à ce projet a été la détermination de la localisation de ces deux hélicases nucléaires potentielles, AtMTR4 et HEN2. Ces protéines possèdent des localisations différentes dans le noyau des cellules d'*A. thaliana*. AtMTR4 est accumulée dans le nucléole, et HEN2 est accumulée dans le nucléoplasme. La localisation de AtMTR4 dans le nucléole est en adéquation avec son rôle dans la biogénèse des ARNr.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

François SEMENT

ibmp
www.ibmp.fr

Identification d'une Terminal Uridylyl Transférase impliquée dans la protection de l'extrémité 3' des ARNm déadénylés chez *Arabidopsis thaliana*

Réumé

Le travail présenté dans ce manuscrit a permis de définir un nouveau rôle de l'uridylation des ARNm en utilisant *Arabidopsis* comme organisme d'étude. L'uridylation des ARN est catalysée par des ARN nucléotidyltransférases de la famille des poly(A) polymérases non canoniques ou ncPAP. Parmi les 14 gènes codant pour des ncPAP chez Arabidopsis, nous avons identifié une terminale uridylyl transférase, TUT1, responsable de l'uridylation des ARNm. Nos résultats montrent que TUT1 uridyle les ARNm après une étape de déadénylation. Cette uridylation ne modifie pas la vitesse de dégradation des ARNm mais est essentielle pour prévenir l'attaque des extrémités 3' des ARNm déadénylés par des activités 3'-5' exoribonucléasiques et la formation de transcrits aberrants tronqués en 3'. De manière intéressante, cette protection par l'uridylation peut être détectée au niveau des polysomes. Une des fonctions biologiques de l'uridylation des ARNm consiste à établir une polarité de 5' en 3' de la dégradation des ARNm. Cette polarité pourrait être essentielle dans le cas d'une dégradation des ARNm en cours de traduction.

Uridylation – Arabidopsis – ARN messager – Dégradation des ARN

Résumé en anglais

The work presented in this manuscript defines a new role of mRNA uridylation, using *Arabidopsis* as a model organism. RNA uridylation is catalyzed by RNA nucleotidyltransferases belonging to the non canonical poly(A) polymerase (ncPAP) family. Among the 14 genes encoding ncPAPs in *Arabidopsis*, we identified a terminal uridylyl transferase, TUT1, responsible for mRNA uridylation. Our results show that mRNAs are uridylated by TUT1 after a deadenylation step. Uridylation doesn't modify mRNA degradation rates but is essential for deadenylated mRNA 3' end protection against 3'-5' exoribonucleolytic attacks and to prevent 3' truncated aberrant mRNA formation. Interestingly, this protection by uridylation is detected in polysomes. One biological function of mRNA uridylation is to establish a 5'-3' mRNA degradation polarity that could be essential in the case of cotranslational mRNA decay.

Uridylation – Arabidopsis – Messenger RNA – RNA degradation