



HAL
open science

Rôle de la protéine EB2 du virus d'Epstein-Barr dans le métabolisme des ARN messagers

Fabrice Mure

► **To cite this version:**

Fabrice Mure. Rôle de la protéine EB2 du virus d'Epstein-Barr dans le métabolisme des ARN messagers. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT: 2016LYSEN071 . tel-01420597

HAL Id: tel-01420597

<https://theses.hal.science/tel-01420597>

Submitted on 20 Dec 2016

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.



Numéro National de Thèse : 2016LYSEN071

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée par

l'École Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale N°340

Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Sciences Exactes et Expérimentales

Discipline : Sciences de la Vie

Laboratoire : Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

Soutenue publiquement le 14 décembre 2016 par :

Fabrice MURE

Rôle de la protéine EB2 du virus d'Epstein-Barr dans le métabolisme des ARN messagers

Directeur de thèse : Dr Henri GRUFFAT

Devant le jury composé de :

Dr Bertrand SERAPHIN

Rapporteur

Dr Hervé LE HIR

Rapporteur

Dr Céline VERHEGGEN

Examinatrice

Dr Pierre JALINOT

Examinateur

Dr Henri GRUFFAT

Directeur de thèse



Numéro National de Thèse : 2016LYSEN071

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée par

l'École Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale N°340

Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Sciences Exactes et Expérimentales

Discipline : Sciences de la Vie

Laboratoire : Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

Soutenue publiquement le 14 décembre 2016 par :

Fabrice MURE

Rôle de la protéine EB2 du virus d'Epstein-Barr dans le métabolisme des ARN messagers

Directeur de thèse : Dr Henri GRUFFAT

Devant le jury composé de :

Dr Bertrand SERAPHIN

Rapporteur

Dr Hervé LE HIR

Rapporteur

Dr Céline VERHEGGEN

Examinatrice

Dr Pierre JALINOT

Examineur

Dr Henri GRUFFAT

Directeur de thèse

“In research the front line is always in a fog.”
Francis Crick – *What Mad Pursuit : A Personal View
of Scientific Discovery* (1988)

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie particulièrement mes rapporteurs, le Dr Bertrand Séraphin et le Dr Hervé Le Hir, pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture attentive et critique de ce manuscrit. Je remercie aussi chaleureusement le Dr Céline Verheggen et le Dr Pierre Jalinot en leur qualité d'examineurs.

Je remercie mon directeur de thèse, le Dr Henri Gruffat, et le Dr Evelyne Manet de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse dans leur équipe, et de m'avoir laissé une grande autonomie dans la conduite de mes projets.

Ma gratitude s'adresse également au Dr François-Loïc Cosset, directeur du CIRI, pour m'avoir permis d'effectuer ce doctorat en parallèle de mon travail de technicien de recherche au laboratoire.

Cette thèse n'aurait pas pu se passer dans de bonnes conditions sans que de nombreuses personnes n'y aient été impliquées. Aussi, je remercie tous les membres présents et passés du laboratoire : Roberta, Florian, Valentin, Thibaut, Quentin, Franceline et François. Je remercie aussi nos collaborateurs et tout le personnel des plateformes technologiques qui ont participé à ces travaux. Baptiste et Emiliano, j'ai beaucoup apprécié nos collaborations, ainsi que nos longues discussions scientifiques et extra-scientifiques.

Un grand merci aux étudiantes que j'ai encadré au cours de mon doctorat : Pauline, Sabine et Carine. Ces expériences m'ont permis d'apprendre probablement autant que ce que j'ai essayé de leur enseigner au cours de leur stage.

Je remercie vivement toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer au cours de ces dernières années et qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse : Elodie, Louise, Amandine, Chloé J., Sandrine, Nicolas, Gergès, Aurélien, Jocelyn, Mathilde, Xuan-Nhi, Romain, Lucie, Mégane, Véronique, Stéphanie, Paulina, Juliana, Chloé M., Philippe, Antoine, Ricardo, Taran, Aurélie, Axel, Rachel, Maname, Sébastien, Sonia, Vincent, Claire, Manon, Clémence et Laure.

Une pensée spéciale va à ma correctrice d'orthographe qui dira, à la lecture de ces quelques lignes, qu'elle n'y est pour rien alors qu'elle y est pour beaucoup.

Enfin, cette thèse doit également beaucoup à tous ceux qui ont toujours été présents à mes côtés. Que mes frères, parents, grands-parents et amis trouvent ici le témoignage de ma plus grande reconnaissance.

AVANT-PROPOS

Les virus contiennent de petits génomes, qui peuvent être manipulés plus facilement que les génomes cellulaires et, dans les cellules infectées, les virus produisent souvent des niveaux très élevés de leurs transcrits, qui peuvent être plus facilement isolés et caractérisés que la plupart des ARN cellulaires. Pour ces raisons, il est intéressant de constater que, depuis la formulation en 1958 par Francis Crick du dogme central de la biologie moléculaire (Crick 1958), la virologie et la biologie des ARN sont deux disciplines étroitement liées.

Ainsi, de façon historique, la preuve définitive de l'existence de l'ARN messager (ARNm) est apportée au début des années 1960 par une série d'expériences réalisées sur la bactérie *Escherichia coli* infectée par le bactériophage T2, conjointement par l'équipe de François Gros et James Watson (Gros et al. 1961), et par les travaux conduits par Sydney Brenner, François Jacob et Matthew Meselson (Brenner et al. 1961). En 1977, une série d'expériences bouleverse le principe de linéarité entre gène et protéine mis en évidence chez *E. coli*. En effet, les équipes de Phillip Sharp (Berget et al. 1977) et Richard Roberts (Gelinias and Roberts 1977) observent sur des clichés obtenus par microscopie électronique que les hybrides constitués entre les ARNm et l'ADN génomique de l'adénovirus 2 forment des régions non appariées. En 1978, Walter Gilbert propose de nommer « introns » (*intragenic regions*) les régions du gène qui sont éliminées de l'ARNm final et « exons » les régions du gène conservées (Gilbert 1978). Dans les années 1980, l'analyse des séquences virales du poliovirus (PV) et du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) par les équipes de Nahum Sonenberg (Pelletier and Sonenberg 1988) et Eckard Wimmer (Jang et al. 1988) a conduit à la description des séquences IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), qui permettent l'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe des ARNm. Par ailleurs, les rétrovirus complexes, dont le prototype est le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1), ont été un système expérimental clé pour étudier l'export nucléocytoplasmique des ARNm. La transcription du provirus HIV-1 conduit à la synthèse de trois espèces d'ARNm : l'ARN génomique non épissé, et des ARNm partiellement ou complètement épissés. L'équipe de Bryan Cullen a montré que le virus HIV-1 code pour la protéine Rev, capable de reconnaître une séquence cible RRE (*Rev-Response Element*) présente sur les ARNm viraux non épissés, et d'interagir avec l'exportine Crm1 afin de permettre l'export de ces ARNm dans le cytoplasme (Malim et al. 1988; 1989). Enfin, il est intéressant de noter que les premiers longs ARN non codants (ARNnc) ont été décrits chez le virus d'Epstein-Barr (EBV) dès les années 1980 par l'équipe de Joan Steitz (Lerner et al.

1981; Glickman et al. 1988), avant même l'utilisation du terme long ARNnc et l'identification des ARNnc cellulaires.

Au vu de ces multiples exemples non exhaustifs, on peut donc supposer que les travaux de recherche en virologie, et plus généralement en infectiologie¹, continueront au cours des prochaines décennies d'éclairer notre compréhension de la fonction des ARN codants et non codants.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit sont le fruit de mon travail de thèse des quatre dernières années réalisé sous la direction du Dr Henri Gruffat dans l'équipe « Herpesvirus Oncogènes » au CIRI à l'ENS de Lyon. À mon arrivée au laboratoire en 2007 en tant que technicien de recherche Inserm, on m'a rapidement confié des tâches communes car je suis depuis cette date la personne compétente en radioprotection (PCR) du CIRI. J'ai également initié et participé à plusieurs projets de recherche visant principalement à caractériser la fonction de la protéine EB2 du virus d'Epstein-Barr. Ces travaux ont abouti à plusieurs publications scientifiques (annexes I, II et III) dont deux en tant que co-premier auteur. Parallèlement, j'ai suivi des cours à l'Université Lyon I et obtenu en 2011 un Master 2 Recherche, et j'ai ensuite décidé de préparer un doctorat.

Mes travaux de thèse se situent au croisement de deux disciplines : la virologie et la biologie des ARN. Les virologues et les biologistes moléculaires trouveront, je l'espère, en introduction bibliographique les éléments clés nécessaires à la compréhension de mes résultats de thèse. Dans le chapitre I, j'aborderai la biogenèse des ARNm en mettant l'accent sur le rôle majeur des RBPs (*RNA-Binding Proteins*) et en décrivant plus précisément les étapes de contrôle-qualité et de traduction des ARNm. Dans le chapitre II, je décrirai le cycle biologique des herpèsvirus infectant l'homme, et en particulier celui du virus d'Epstein-Barr, et je présenterai les principales caractéristiques de la protéine EB2 en la comparant avec ses analogues fonctionnels chez les autres herpèsvirus.

Les principales données expérimentales obtenues au cours de mon doctorat seront ensuite présentées sous forme de trois publications scientifiques (articles I, II et III). Mon travail de technicien m'a également permis durant ma thèse de participer à d'autres projets dans l'équipe, qui ont dans un cas déjà été publié (annexe IV).

¹ L'étude des génomes bactériens a permis l'identification très récente du système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) qui facilite un découpage ciblé de l'ADN grâce à un guidage par de petits ARN (Jinek et al. 2012).

Enfin, dans une discussion générale, je resituerai mes résultats de thèse par rapport aux résultats antérieurs et à l'état actuel des connaissances scientifiques, afin d'avoir une vision globale du rôle essentiel des RBPs dans le métabolisme des ARNm.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS..... | 9 |
| AVANT-PROPOS | 11 |
| TABLE DES MATIÈRES | 15 |
| TABLE DES ABRÉVIATIONS | 19 |
| RÉSUMÉ..... | 21 |
| ABSTRACT | 22 |
| LISTE DES PUBLICATIONS | 23 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 25 |
| INTRODUCTION - DE LA SYNTHÈSE À LA DÉGRADATION DES ARN MESSAGERS | 27 |
| CHAPITRE I - L'IMPORTANCE DES RBPs DANS LA BIOGENÈSE DES ARNm..... | 33 |
| I - La dégradation et le contrôle-qualité des ARNm | 35 |
| 1. Les acteurs de la dégradation des ARNm..... | 36 |
| <i>a - Les déadénylases.....</i> | <i>37</i> |
| <i>b - Les enzymes de clivage de la coiffe</i> | <i>38</i> |
| <i>c - Les exoribonucléases</i> | <i>40</i> |
| <i>d - L'exosome à ARN</i> | <i>42</i> |
| <i>e - Les Terminal Uridyl Transferases (TUTases)</i> | <i>45</i> |
| <i>f - Les endoribonucléases</i> | <i>47</i> |
| 2. Les mécanismes de surveillance des ARNm..... | 48 |
| <i>a - Surveillance co-translationnelle des ARNm.....</i> | <i>49</i> |
| <i>b - Surveillance nucléaire des ARNm</i> | <i>52</i> |
| 3. Les RBPs et le contrôle-qualité des ARNm nucléaires | 58 |
| <i>a - Le complexe TRAMP</i> | <i>58</i> |
| <i>b - Le complexe NEXT.....</i> | <i>60</i> |
| <i>c - Le complexe CBC</i> | <i>63</i> |
| <i>d - La protéine PABPN1</i> | <i>64</i> |
| II - La traduction des ARNm | 67 |
| 1. Le ribosome..... | 67 |
| 2. L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe..... | 68 |
| <i>a - Le complexe eIF4F et la protéine PABP</i> | <i>71</i> |
| <i>b - Le complexe de pré-initiation 43S.....</i> | <i>76</i> |
| <i>c - Le balayage de la région 5' UTR de l'ARNm par le complexe 43S PIC.....</i> | <i>78</i> |
| <i>d - La reconnaissance du codon d'initiation et l'assemblage du ribosome.....</i> | <i>79</i> |

| | |
|---|-----|
| 3. Les RBPs et le contrôle de la traduction | 80 |
| <i>a - Le complexe EJC</i> | 80 |
| <i>b - Les protéines SR</i> | 83 |
| 4. Régulation de la traduction par les virus | 87 |
| <i>a - Les protéases virales</i> | 87 |
| <i>b - Les séquences IRES</i> | 89 |
| CHAPITRE II - LA PROTÉINE EB2 : UNE RBP VIRALE MULTI-FONCTIONNELLE..... | 93 |
| I - Le Virus d'Epstein-Barr (EBV)..... | 93 |
| 1. Généralités sur le virus EBV | 94 |
| <i>a - Taxonomie</i> | 94 |
| <i>b - Structure du virion</i> | 95 |
| <i>c - Caractéristiques du génome viral</i> | 96 |
| 2. Cycle biologique d'EBV | 97 |
| <i>a - Mode de transmission</i> | 97 |
| <i>b - Infection et latence virale</i> | 97 |
| <i>c - Cycle viral productif</i> | 99 |
| 3. Physiologie de l'infection <i>in vivo</i> | 102 |
| 4. Pathologies associées à EBV | 104 |
| II - La protéine EB2 et ses analogues : des régulateurs post-transcriptionnels des gènes du cycle productif des herpesvirus | 107 |
| 1. EB2 est indispensable à la production de virions | 107 |
| 2. Structure de la RBP virale EB2 et de ses analogues | 109 |
| 3. EB2, comme ses analogues, a des propriétés de facteur d'export des ARNm issus de gènes sans intron | 110 |
| <i>a - Navette nucléo-cytoplasmique</i> | 111 |
| <i>b - Liaison à l'ARN</i> | 111 |
| <i>c - Accumulation cytoplasmique de ses ARNm cibles</i> | 114 |
| 4. Interactions d'EB2 et ses analogues avec des protéines cellulaires | 116 |
| 5. Les RBPs des herpesvirus agissent à différentes étapes du métabolisme des ARNm | 120 |
| <i>a - L'épissage des pré-ARNm</i> | 120 |
| <i>b - La stabilité des ARNm</i> | 121 |
| <i>c - L'export nucléo-cytoplasmique des ARNm</i> | 123 |
| <i>d - La traduction des ARNm</i> | 123 |
| 6. Régulations post-traductionnelles de la protéine EB2 et de ses analogues..... | 125 |
| 7. Les RBPs virales comme cibles thérapeutiques | 127 |

| | |
|--|------------|
| 8. Problématique du sujet de thèse..... | 128 |
| RÉSULTATS..... | 131 |
| ARTICLE I - The splicing factor SRSF3 is functionally connected to the nuclear RNA exosome for intronless mRNA decay..... | 133 |
| ARTICLE II - <i>In vitro</i> translation of mRNAs that are in their native ribonucleoprotein complexes..... | 177 |
| ARTICLE III - Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates translation initiation of mRNAs through direct interactions with both PABP and eIF4G..... | 189 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... | 227 |
| I - Les protéines EB2 et SRSF3 : à l'interface entre le contrôle-qualité et l'export des ARNm | 231 |
| II - Rôle de la protéine EB2 dans la traduction des ARNm | 237 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE..... | 243 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 245 |
| ANNEXES..... | 307 |
| ANNEXE I - Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs. | 309 |
| ANNEXE II - Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2..... | 327 |
| ANNEXE III - Protein kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles | 341 |
| ANNEXE IV - Epstein-Barr virus late gene transcription depends on the assembly of a virus-specific preinitiation complex..... | 355 |

TABLE DES ABRÉVIATIONS

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ARNnc : ARN non codant

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

B

BL : Burkitt's Lymphoma

BP : Branch Point

C

CAT : Chloramphenicol

AcetylTransferase

CBC : Cap-Binding Complex

CBP : Cap-Binding Protein

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CLIP : Cross-Linking

ImmunoPrecipitation

CMV : CytoMegalovirus

CTD : C-Terminal Domain

C-terminal : Carboxyl-terminal

D

Da : Dalton

E

EBER : Epstein-Barr Encoded RNA

EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigen

EBV : Epstein-Barr Virus

eEF : eukaryotic Elongation Factor

eIF : eukaryotic Initiation Factor

EJC : Exon Junction Complex

EMCV : EncephaloMyoCarditis Virus

eRF : eukaryotic Release Factor

ESE : Exonic Splicing Enhancer

ESS : Exonic Splicing Silencer

F

FMDV : Foot-and-Mouth Disease Virus

G

GST : Glutathione S-Transferase

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

H

HCV : Hepatitis C Virus

HD : Hodgkin's Disease

HHV : Human HerpesVirus

HIV : Human Immunodeficiency Virus

hnRNP : heterogeneous nuclear

RiboNucleoProtein

HSV : Herpes-Simplex Virus

I

IRES : Internal Ribosome Entry Site

ISE : Intronic Splicing Enhancer

ISS : Intronic Splicing Silencer

K

KSHV : Kaposi's Sarcoma-associated
HerpesVirus

L

LCL : Lymphoblastoid Cell Line
LMP : Latent Membrane Protein
LRR : Leucine-Rich Repeat

M

miRNA : microRNA
MNI : MonoNucléose Infectieuse
mRNP : messenger RiboNucleoprotein
Particle

N

NES : Nuclear Export Signal
NEXT : Nuclear EXosome Targeting
NGD : No-Go mRNA Decay
NLS : Nuclear Localization Signal
NMD : Nonsense-Mediated mRNA
Decay
NoLS : Nucleolar Localization Signal
NPC : Nuclear Pore Complex
NSD : Non-Stop mRNA Decay
N-terminal : amino-terminal

O

ORE : ORF57-Response Element
ORF : Open Reading Frame

P

PABP : Poly(A)-Binding Protein
PAP : Poly(A) Polymerase
PAS : Poly(A) Signal
PIC : Pre-Initiation Complex
PROMPT : PROMoter uPstream
Transcript
PTLD : Post-Transplant
Lymphoproliferative Disorder

R

RBD : RNA-Binding Domain
RBM : RNA-Binding Motif
RBP : RNA-Binding Protein
RIP : RNA ImmunoPrecipitation
RRE : Rev-Response Element
RRL : Rabbit Reticulocyte Lysate
RRM : RNA Recognition Motif
RS : Serine/aRginine-rich

S

siRNA : small interfering RNA
snoRNA : small nucleolar RNA
snRNA : small nuclear RNA
SS : Splice Site

T

TBP : TATA-Binding Protein
TRAMP : Trf4/5-Air1/2-Mtr4
Polyadenylation
TREX : TRanscription/Export
TSS : Transcription Start Site

U

UTR : UnTranslated Region
UV : UltraViolet

V

VZV : Varicella-Zoster Virus

Z

ZCCHC : Zinc finger, CCHC domain

RÉSUMÉ

La régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique est basée sur un réseau complexe et dynamique d'interactions ARN-protéines. Un défi important est de comprendre les mécanismes par lesquels ces protéines de liaison à l'ARN (RBPs) influencent chaque étape du métabolisme des ARNm. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de caractériser de nouvelles fonctions de la RBP virale EB2 qui est indispensable à la production du virus d'Epstein-Barr (EBV). Des travaux antérieurs ont montré qu'EB2 favorise l'accumulation cytoplasmique de la majorité des ARNm viraux, dont la caractéristique est d'être transcrit à partir de gènes sans intron. Nous montrons que le rôle d'EB2 ne se limite pas à celui de facteur d'export des ARNm car cette RBP stabilise aussi ses ARNm cibles dans le noyau en les protégeant de la dégradation par l'exosome. Nos résultats indiquent qu'en absence d'EB2 : (i) certains ARNm viraux sont instables car ils contiennent des sites cryptiques d'épissage ; (ii) le facteur d'épissage SRSF3 déstabilise ces ARNm en interagissant à la fois avec l'exosome et le complexe NEXT, un des cofacteurs nucléaires de l'exosome. Par ailleurs, nous montrons également qu'EB2 est associée aux polysomes et stimule efficacement la traduction de ses ARNm cibles, en interagissant avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G et PABP. Le développement d'un nouveau système de traduction *in vitro* nous a permis de montrer que l'effet d'EB2 sur la traduction nécessite le passage nucléaire de ses ARNm cibles. Ainsi, l'ensemble de nos travaux démontre le rôle clé d'une RBP virale dans le couplage entre les étapes nucléaires et cytoplasmiques de la biogenèse des ARNm.

MOTS-CLÉS : protéines de liaison à l'ARN / herpèsvirus / dégradation des ARNm / traduction

ABSTRACT

Post-transcriptional regulation of gene expression is based on a complex and dynamic network of RNA-proteins interactions. A major challenge is to understand the precise contribution of these RNA-binding proteins (RBPs) to each step of mRNA metabolism. During this thesis, we have characterized new functions of the EB2 viral RBP which is essential for the production of the Epstein-Barr virus (EBV). Previous works have shown that EB2 promotes cytoplasmic accumulation of most intronless viral mRNAs. Here, we show that EB2 is not just an mRNA export factor because this RBP also stabilizes its target mRNAs in the nucleus by protecting them from RNA exosome degradation. Our results indicate that in the absence of EB2 : (i) some viral mRNAs are unstable because they contain cryptic splice sites ; (ii) the splicing factor SRSF3 destabilizes these mRNAs by interacting with both the RNA exosome and the Nuclear EXosome Targeting (NEXT) complex. Moreover, we also show that EB2 is associated with polysomes and it strongly stimulates translation of its target mRNAs through interactions with the eIF4G and PABP initiation factors. Interestingly, the development of a new *in vitro* translational assay allowed us to show that EB2's translation stimulation requires that EB2 binds its target mRNAs in the nucleus. Taken together, our works demonstrate the key function of a viral RBP in the coordination of the nuclear and cytoplasmic steps of mRNA biogenesis.

KEYWORDS : RNA-binding proteins / herpesvirus / mRNA decay / translation

LISTE DES PUBLICATIONS

ARTICLE I :

Mure F, Benbahouche H, Bertrand E, Manet E, Gruffat H. *The splicing factor SRSF3 is functionally connected to the nuclear RNA exosome for intronless mRNA decay*. Nucleic Acids Res. 2016 (article en révision).

ARTICLE II :

Mure F*, Panthu B*, Gruffat H, Ohlmann T. *In vitro translation of mRNAs that are in their native ribonucleoprotein complexes*. Biochem J. 2015 Sep 8 (*co-premier auteur).

ARTICLE III :

Mure F, Panthu B, Zanella-Cléon I, Delolme F, Manet E, Ohlmann T, Gruffat H. *Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates translation initiation of mRNAs through direct interactions with both PABP and eIF4G*. J Virol. 2016 (article en révision).

ANNEXE I :

Mure F*, Juillard F*, Bazot Q*, Tafforeau L, Macri C, Rabourdin-Combe C, Lotteau V, Manet E, Gruffat H. *Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs*. Nucleic Acids Res. 2012 Aug;40(14):6834-49 (*co-premier auteur).

ANNEXE II :

Mure F*, Ricci EP*, Gruffat H, Decimo D, Medina-Palazon C, Ohlmann T, Manet E. *Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2*. Nucleic Acids Res. 2009 Aug;37(15):4932-43 (*co-premier auteur).

ANNEXE III :

Medina-Palazon C, Gruffat H, **Mure F**, Filhol O, Vingtdoux-Didier V, Drobecq H, Cochet C, Sergeant N, Sergeant A, Manet E. *Protein kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles*. J Virol. 2007 Nov;81(21):11850-60.

ANNEXE IV :

Aubry V, **Mure F**, Mariamé B, Deschamps T, Wyrwicz LS, Manet E, Gruffat H. *Epstein-Barr virus late gene transcription depends on the assembly of a virus-specific preinitiation complex*. J Virol. 2014 Nov;88(21):12825-38.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

DE LA SYNTHÈSE À LA DÉGRADATION DES ARN MESSAGERS

Chez les eucaryotes, l'expression génique est constituée d'un ensemble de processus généralement présentés comme séquentiels : transcription de l'ADN en ARN pré-messager (pré-ARNm), maturation en ARN messager (ARNm), export nucléo-cytoplasmique et traduction de l'ARNm en protéine (Figure 1).

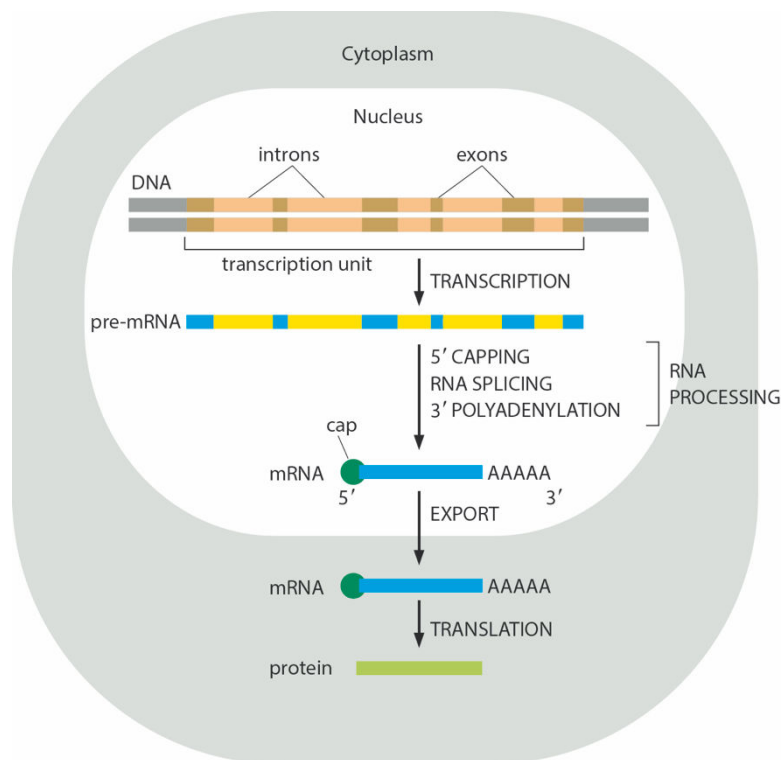


Figure 1 : Étapes de l'expression génique chez les eucaryotes. Vision linéaire de l'expression d'un gène codant pour une protéine : transcription de l'ADN, maturation et export de l'ARNm puis traduction en protéine.

Toutes ces étapes ont été extrêmement bien étudiées indépendamment les unes des autres, notamment à l'aide de systèmes *in vitro*. Cependant, il est maintenant clair que la régulation de l'expression génique est plus complexe car toutes les étapes forment un ensemble continu, chacune d'elles étant liée aux suivantes et pouvant les influencer. En effet, dès sa synthèse, le pré-ARNm s'associe à des protéines de liaison à l'ARN ou RBPs (*RNA-Binding Proteins*) pour former une particule ribonucléoprotéique ou mRNP

(*messenger RiboNucleoprotein Particle*) (Moore 2005; Singh et al. 2015). La composition protéique d'une mRNP est très dynamique et joue un rôle majeur à chaque étape de la vie d'un ARNm car elle va réguler sa maturation, sa localisation, sa traduction ou encore sa dégradation (Moore and Proudfoot 2009; Mitchell and Parker 2014) (Figure 2).

Dès sa transcription dans le noyau par l'ARN polymérase II, le transcrit va être modifié et mûri, grâce au domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II qui joue un rôle central dans ce couplage (McCracken et al. 1997; Hsin and Manley 2012; Zaborowska et al. 2016). La première modification du pré-ARNm est l'ajout d'une structure coiffe à l'extrémité 5' dès que la longueur du pré-ARNm a atteint 22-25 nucléotides (Shatkin 1976). La coiffe (m⁷GpppN) est constituée d'un résidu guanosine méthylé en position N7 qui est relié au premier nucléotide retrouvé en 5' de l'ARNm *via* une liaison 5'-5' tri-phosphate. La formation de la structure coiffe est catalysée par une succession de trois réactions enzymatiques impliquant l'action d'une ARN tri-phosphatase (RTPase), d'une ARN guanylyl-transférase (GTase), puis d'une ARN-(guanine-7)-méthyltransférase (N7MTase) (Decroly et al. 2012). Cette structure est fondamentale chez les eucaryotes car elle est spécifiquement reconnue par le CBC (*Cap-Binding Complex*) dans le noyau, puis par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (*eukaryotic Initiation Factor 4E*) dans le cytoplasme (Izaurre et al. 1994; Sonenberg et al. 1978). En plus de stabiliser l'ARNm en le protégeant de l'action des exoribonucléases, la coiffe joue un rôle important dans l'épissage, l'export et la traduction des ARNm (Topisirovic et al. 2011).

Une autre modification co-transcriptionnelle est l'épissage du pré-ARNm, i.e. la réaction permettant d'exciser les introns par deux réactions successives de transestérification et de lier ensuite les exons pour former un ARNm. Chaque intron est défini par la présence d'éléments situés en *cis* au sein de la séquence ARN : les sites 5' SS et 3' SS d'épissage (*Splice Site*), le site de branchement BP (*Branch Point*) et la séquence riche polypyrimidique (*Poly(Y) tract*). Ces séquences sont reconnues par le spliceosome, un complexe macromoléculaire composé de 5 petites ribonucléoprotéines nucléaires snRNPs (U1, U2, U4/U6 et U5) (*small nuclear RiboNucleoProteins*) ainsi que de nombreuses autres protéines telles que les facteurs SF1 (*Splicing Factor 1*) et U2AF (*U2 snRNP Auxiliary Factor*) (Wahl et al. 2009; Will and Lührmann 2011; Chen and Moore 2014; Papasaïkas and Valcárcel 2016). D'autres éléments *cis*-régulateurs exoniques ou introniques, activateurs ou répresseurs, jouent un rôle important dans l'épissage du pré-ARNm. Ces séquences sont reconnues par des facteurs *trans*-régulateurs dont les principaux membres appartiennent à la famille des protéines SR (*Serine/aRginine-rich*

proteins) et celle des protéines hnRNP (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins*) (Busch and Hertel 2012). De manière intéressante, de nombreux facteurs d'épissage sont recrutés co-transcriptionnellement par le CTD de l'ARN polymérase II (Das et al. 2006; Listerman et al. 2006). Réciproquement, le spliceosome influe sur la vitesse d'élongation de la transcription (Fong and Zhou 2001), et il permet le recrutement de deux complexes protéiques jouant un rôle majeur dans le devenir des ARNm épissés : le complexe EJC (*Exon Junction Complex*) (Le Hir et al. 2000a; 2000b; 2001) et le complexe TREX (*TRanscription/EXport complex*) (Masuda et al. 2005).

La dernière modification co-transcriptionnelle de l'ARNm est l'ajout à l'extrémité 3' d'une queue poly(A) de 200 à 250 nucléotides chez les métazoaires. Celle-ci se déroule en deux étapes successives : (i) le clivage endonucléotidique de l'ARNm par le complexe CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), CstF (*Cleavage stimulation Factor*), CFI et CFII (*Cleavage Factor I and II*) ; (ii) la polyadénylation par la PAP (*Poly(A) Polymerase*) associée à la protéine PABPN1 (*Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1*) qui interagit avec la queue poly(A) de l'ARNm dans le noyau (Elkon et al. 2013; Shi and Manley 2015). Une fois dans le cytoplasme, la protéine PABPN1 est remplacée par la protéine PABPC (*PABP Cytoplasmic*) (Blobel 1973). Comme précédemment, le CTD de l'ARN polymérase II joue un rôle important en facilitant le recrutement des facteurs de clivage et polyadénylation (Meinhart and Cramer 2004). L'ajout d'une queue poly(A) a de multiples fonctions : elle protège l'ARNm des exoribonucléases, et joue un rôle dans la circularisation de l'ARNm en cours de traduction (Goss and Kleiman 2013).

À la suite de toutes ces étapes de maturation nucléaire, l'ARNm dit « mature » est compétent pour l'export dans le cytoplasme. En effet, les RBPs associées à l'ARNm permettent (i) la modification de la structure de la mRNP et son compactage grâce notamment aux interactions entre le complexe EJC et les protéines SR (Singh et al. 2012; Kato et al. 2012; Han et al. 2012), (ii) le recrutement du facteur d'export TAP/NXF1 grâce en particulier au complexe TREX (Cheng et al. 2006) et aux protéines SR (Huang and Steitz 2001; Huang et al. 2003; Müller-Mcnicoll et al. 2016). L'interaction de TAP/NXF1 avec à la fois l'ARNm et certaines nucléoporines du NPC (*Nuclear Pore Complex*) permet alors la translocation polarisée de l'ARNm dans le cytoplasme (Katahira 2015).

Une fois dans le cytoplasme, la mRNP subit un profond remodelage de sa composition protéique, grâce entre autres à l'action d'ARN hélicases (Bourgeois et al. 2016). Certaines RBPs sont dissociées de l'ARNm comme le facteur d'export TAP/NXF1. D'autres RBPs, comme le complexe CBC et la protéine PABPN1, sont remplacées respectivement par les

protéines eIF4E et PABPC. Les RBPs liées à l'ARNm vont alors moduler sa traduction, sa dégradation ou encore sa localisation cytoplasmique (Mitchell and Parker 2014).

L'ARNm oscille dans le cytoplasme entre l'état dit « polysomal », dans lequel il est activement traduit en protéines, et l'état non-polysomal, dans lequel l'ARNm est réprimé traductionnellement et peut former des granules (Anderson and Kedersha 2009; Buchan 2014). Ces granules d'ARN assurent plusieurs fonctions importantes : (i) le transport de l'ARNm à distance du noyau, comme c'est le cas par exemple dans l'axone ; (ii) le stockage transitoire de l'ARNm dans les granules de stress (SG, *Stress Granules*) ; (iii) le site de dégradation de l'ARNm dans les P-bodies (*Processing-bodies*). La formation de ces granules cytoplasmiques et non membranaires est très dynamique et permet une adaptation rapide de la répression ou de l'activation de la traduction de l'ARNm (Balagopal and Parker 2009; Decker and Parker 2012; Protter and Parker 2016).

La dernière étape de la régulation de l'expression génique est la dégradation de l'ARNm (Houseley and Tollervey 2009; Schoenberg and Maquat 2012). Celle-ci permet à la fois d'éliminer les ARNm en fin de vie et/ou de dégrader les ARNm aberrants, comme ceux par exemple ayant un codon stop précoce (PTC, *Premature Termination Codon*) au cours de la NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*). Dans le cas de la NMD, la dégradation de l'ARNm est couplée à la terminaison de la traduction, et fait intervenir des protéines des familles UPF (*UP-Frameshift*) et SMG (*Suppressor with Morphological effect on Genitalia*) (Lykke-Andersen and Jensen 2015; Popp and Maquat 2016). De façon remarquable, le complexe EJC joue un rôle central dans la NMD chez les métazoaires (Kim et al. 2001; Lykke-Andersen et al. 2001), illustrant ainsi que les étapes nucléaire et cytoplasmique du métabolisme des ARNm sont étroitement liées.

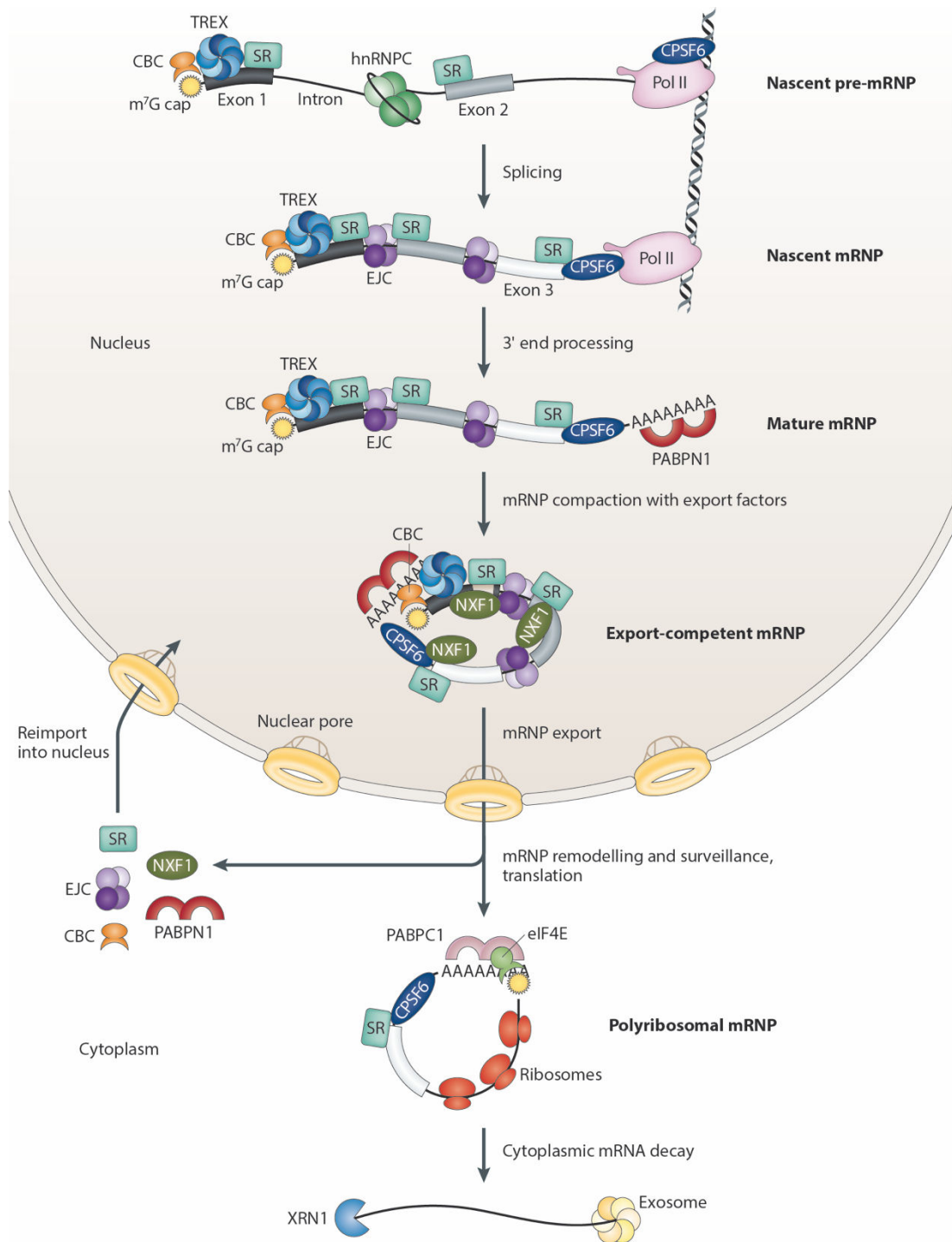


Figure 2 : L'assemblage et le remodelage de la mRNP : de la transcription à la traduction et la dégradation. Vision contemporaine de l'expression d'un gène codant pour une protéine : au cours de la transcription et de la maturation du pré-ARNm, des RBPs s'associent à l'ARNm pour former une mRNP. Ces RBPs influencent toutes les étapes de la vie de l'ARNm ; de nombreux exemples sont décrits dans le texte principal (adapté de (Müller-Mcnicoll and Neugebauer 2013)).

CHAPITRE I

L'IMPORTANCE DES RBPs DANS LA BIOGENÈSE DES ARNm

Les protéines de liaison à l'ARN ou RBPs (*RNA-Binding Proteins*) contrôlent chaque étape de la vie des ARNm. Leur diversité de fonctions pourrait suggérer une grande variété de structures responsables de la reconnaissance de l'ARN. Cependant, la majorité des RBPs ne présentent que quelques domaines structuraux de reconnaissance de l'ARN : le domaine RRM (*RNA-Recognition Motif*), le domaine KH (*hnRNP K-homology*), le domaine RGG (*aRginine-Glycine-Glycine-rich*), le domaine dsRBD (*dsRNA-Binding Domain*), et les domaines en doigts de zinc de type ZCCHC ou ZCCH (Lunde et al. 2007; Ankö and Neugebauer 2012). Afin d'assurer leur spécificité de liaison à l'ARN et leurs diverses fonctions, les RBPs ont généralement une structure modulaire, constituée d'un ou plusieurs motif(s) de reconnaissance de l'ARN associé à un ou plusieurs domaine(s) fonctionnel(s). Parmi les domaines fonctionnels des RBPs, on trouve par exemple le domaine RS (*Serine/aRginine-rich*), ou les domaines hélicases DExH/DEAD-box. Ainsi, la liaison de plusieurs motifs de reconnaissance de l'ARN et de domaines fonctionnels permet par une simple combinaison d'augmenter la spécificité d'interaction des RBPs avec à la fois l'ARN et leurs partenaires protéiques (Mackereth and Sattler 2012; Ray et al. 2013; Gerstberger et al. 2014; Jankowsky and Harris 2015).

Les RBPs ont initialement été caractérisées par des études biochimiques. Ainsi, le cross-link aux UV (254 nm) des protéines interagissant directement avec les ARN dans les cellules, suivi de la purification et l'immunodétection des protéines associées aux ARN polyadénylés, a permis d'identifier dans les années 1980 les protéines hnRNP (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein*) (Dreyfuss et al. 1984; Piñol-Roma et al. 1988). Les progrès récents des techniques de protéomique ont permis d'identifier le répertoire complet des RBPs dans les cellules humaines HEK293 et HeLa, les cellules souches embryonnaires murines (mESC), et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Baltz et al. 2012; Castello et al. 2012; Kwon et al. 2013; Mitchell et al. 2013). Dans ces études d'interactome des ARNm, les complexes ARN-protéines sont cross-linkés aux UV, puis les ARN polyadénylés sont immunoprécipités avec des oligo(dT), et les protéines associées sont analysées par spectrométrie de masse (Figure 3). De manière très intéressante, ces études ont identifié 797 RBPs dans les cellules HEK293 et 860 RBPs dans les cellules HeLa, dont 545 RBPs en commun dans les deux lignées cellulaires (Baltz et al.

2012; Castello et al. 2012). Parmi celles-ci, la majorité était déjà connue mais plus de 100 nouvelles RBPs (appelées « enigmRBPs ») ont été identifiées avec aucun domaine classique de liaison à l'ARN, dont 23 enzymes métaboliques (Beckmann et al. 2015; Castello et al. 2016). Un défi important pour le futur est de déterminer le domaine de liaison à l'ARN et la fonction biologique de ces nouvelles RBPs.

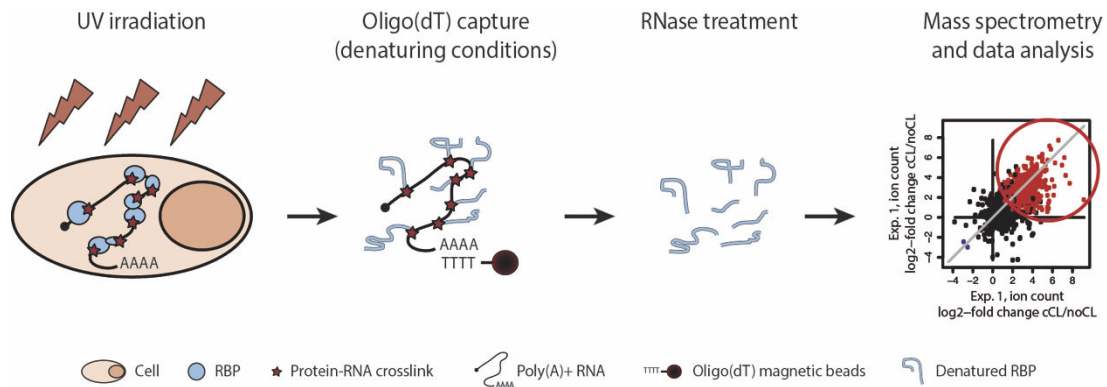


Figure 3 : Représentation schématique de la capture de l'interactome des ARNm. Les cellules sont irradiées aux UV (254 nm) pour lier de manière covalente les interactions ARN-protéines, puis les ARN polyadénylés et leurs protéines associées sont isolés avec des oligo(dT) couplés à des billes magnétiques. Après traitement à la RNase, le répertoire des RBPs est déterminé par spectrométrie de masse (adapté de (Castello et al. 2015)).

I - La dégradation et le contrôle-qualité des ARNm

La dégradation des ARNm a longtemps été considérée comme une simple étape d'élimination des ARNm en fin de vie. Au cours des deux dernières décennies, cette vision a été totalement remise en cause puisqu'il a été montré que les temps de demi-vie des ARNm, révélateurs de leur vitesse de dégradation, peuvent varier considérablement. Ainsi, une étude chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a montré que la demi-vie des ARNm les plus instables est approximativement de 2 à 3 minutes, et celle des ARNm les plus stables est supérieure à 90 minutes (Wang et al. 2002a). Plus récemment, l'analyse du turnover global des ARNm dans des fibroblastes murins NIH3T3 a révélé que la stabilité des ARNm codant pour des protéines appartenant à une même voie biologique est comparable (Schwanhäusser et al. 2011). La dégradation des ARNm n'est donc pas un processus par défaut mais une composante essentielle de la régulation de l'expression génique.

En plus de réguler la quantité d'ARN, la dégradation des ARN assure au moins trois autres fonctions essentielles : (i) l'élimination des ARNm défectueux, qui conduiraient à la synthèse de protéines aberrantes et potentiellement délétères pour la cellule, grâce à un mécanisme de surveillance ou « contrôle-qualité » des ARN (Doma and Parker 2007; Isken and Maquat 2007) ; (ii) l'élimination des sous-produits (e.g. les introns) générés au cours de la maturation des transcrits primaires (Houseley and Tollervey 2009; Schoenberg and Maquat 2012) ; et (iii) l'élimination des transcrits intergéniques, intragéniques ou antisens, fonctionnels ou non et qui résultent parfois de la transcription pervasive du génome (Jensen et al. 2013; Porrua and Libri 2013).

Nos connaissances actuelles des mécanismes de dégradation des ARNm reposent en grande partie sur des travaux réalisés chez la levure *S. cerevisiae* (Parker 2012). Chez cet organisme modèle, les mécanismes de dégradation des ARN semblent plus simples que chez d'autres organismes eucaryotes car le nombre de cofacteurs régulant l'activité des ribonucléases est moindre. Néanmoins, il est important de noter que les principales enzymes responsables de la dégradation des ARNm (i.e. les déadénylases, les enzymes de décoiffage et les ribonucléases) sont très conservées entre tous les eucaryotes. De plus, ces enzymes sont impliquées à la fois dans la dégradation nucléaire et cytoplasmique des ARNm, leur spécificité étant apportée par des cofacteurs.

Dans cette partie, nous détaillerons les principaux acteurs impliqués dans la dégradation des ARNm, puis nous exposerons l'état des connaissances des mécanismes de surveillance des ARNm.

1. Les acteurs de la dégradation des ARNm

Comme nous l'avons vu en introduction, les ARNm matures possèdent une coiffe à leur extrémité 5' et une queue poly(A) à leur extrémité 3'. Dans le cytoplasme, ces structures sont liées par des protéines spécifiques, respectivement les protéines eIF4E et PABP, et protègent les ARNm de l'action des exoribonucléases. Les ARNm sont également associés à des RBPs qui les protègent de coupures endonucléolytiques non spécifiques.

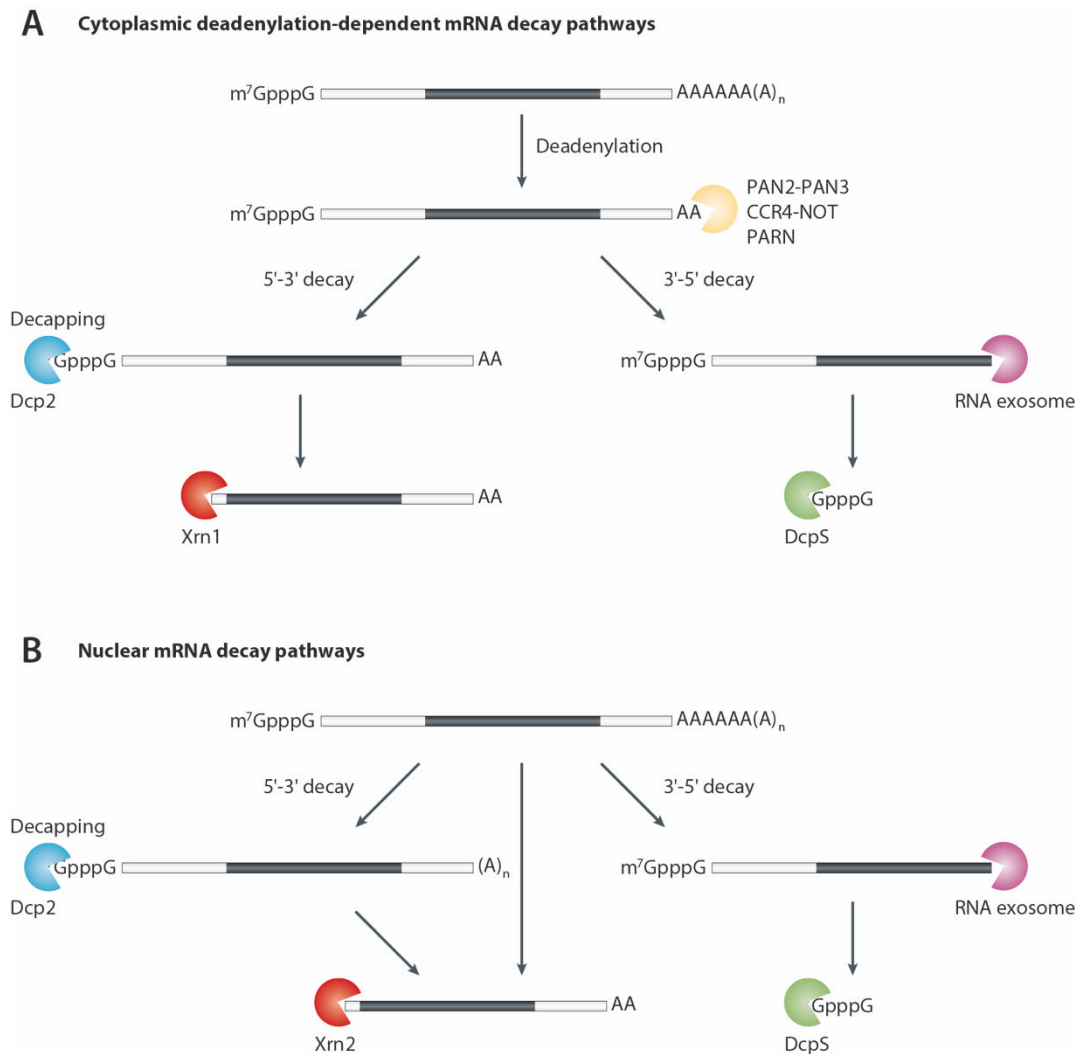


Figure 4 : Principales voies de dégradation des ARNm cytoplasmiques et nucléaires. (A) La dégradation cytoplasmique des ARNm est initiée par le complexe PAN2-PAN3 et poursuivie par les complexes CCR4-NOT et PARN. Après déadénylation, le corps de l'ARNm est dégradé par une des deux voies 5'-3' ou 3'-5'. Dans la voie 5'-3', la coiffe est clivée par l'enzyme Dcp2 puis l'ARNm est dégradé par Xrn1. Dans la voie 3'-5', l'ARNm est dégradé par l'exosome ; la coiffe est finalement dégradée par l'enzyme Dcp5. (B) La voie majoritaire de dégradation des ARNm nucléaires est la voie 3'-5' et fait intervenir l'exosome. Une alternative est la voie de dégradation 5'-3' qui implique l'exoribonucléase Xrn2. Lorsque les ARNm sont coiffés, Dcp2 hydrolyse la structure m7GpppN avant l'action de Xrn2.

La dégradation cytoplasmique des ARNm chez les eucaryotes débute le plus souvent par un raccourcissement de leur queue poly(A). Après cette étape de déadénylation, les ARNm peuvent être dégradés soit à partir de leur extrémité 5' par l'exoribonucléase Xrn1 après le retrait de leur coiffe par l'enzyme Dcp2, soit à partir de leur extrémité 3' par l'exosome (Garneau et al. 2007; Chen and Shyu 2011; Schoenberg and Maquat 2012) (Figure 4A).

Dans le noyau, la dégradation des ARNm concerne généralement les ARNm qui ont des défauts de maturation. Celle-ci fait également intervenir l'enzyme Dcp2 avec l'exoribonucléase Xrn2 qui dégrade les ARNm dans le sens 5'-3', ou l'exosome qui dégrade les ARNm dans le sens 3'-5' (Saguez et al. 2005; Fasken and Corbett 2009; Schmid and Jensen 2010; Mühlemann and Jensen 2012) (Figure 4B).

a - Les déadénylases

La déadénylation est la première étape de la voie canonique de dégradation des ARNm cytoplasmiques. Cette étape est généralement limitante et joue un rôle clé dans la transition entre la traduction et la dégradation des ARNm.

Plusieurs complexes protéiques possédant une activité de déadénylation ont été caractérisés. Les complexes PAN2-PAN3 et CCR4-NOT sont hautement conservés entre la levure, la drosophile et les mammifères. Les mammifères possèdent également une déadénylase supplémentaire : l'enzyme PARN (Goldstrohm and Wickens 2008; Wiederhold and Passmore 2010).

Le complexe PAN2-PAN3, également appelé PAN (*Poly(A) Nuclease*) intervient dans la première phase de déadénylation des ARNm. La protéine PAN2 est la sous-unité catalytique (Boeck et al. 1996), alors que la protéine PAN3 est la sous-unité régulatrice du complexe (Brown et al. 1996). Le complexe PAN2-PAN3 est recruté et stimulé par la protéine PABP associée à la queue poly(A) des ARNm (Uchida et al. 2004; Siddiqui et al. 2007; Wolf et al. 2014). Chez la levure, PAN2-PAN3 est impliqué dans le raccourcissement de la queue poly(A) jusqu'à atteindre une taille d'environ 60 à 80 nucléotides (Brown and Sachs 1998). De même, chez les mammifères, l'étude de la dégradation de l'ARNm rapporteur β -globine a montré que ce complexe raccourcit la taille initiale de la queue poly(A) de 200 nucléotides à environ 80 nucléotides (Yamashita et al. 2005). La seconde phase de déadénylation est ensuite réalisée par le complexe CCR4-NOT (Yamashita et al. 2005).

Le complexe CCR4-NOT est composé chez la levure *S. cerevisiae* de neuf protéines dont deux d'entre elles, Ccr4 et Caf1/Pop2, ont une activité exonucléase (Daugeron et al. 2001; Tucker et al. 2002). Il est le principal complexe de déadénylation chez *S. cerevisiae* car des souches de levures mutantes $\Delta ccr4$ ou $\Delta pop2$ ont un phénotype avec des défauts de déadénylation des ARNm aboutissant à leur stabilisation (Tucker et al. 2001). Ce complexe est conservé chez la drosophile (Temme et al. 2004) et chez l'homme (Bianchin et al. 2005), mais il existe chez l'homme deux homologues de la protéine Ccr4 de levure : hCCR4a (CNOT6) et hCCR4b (CNOT6L), ainsi que deux homologues de la protéine Caf1 : hCAF1 (CNOT7) et hPOP2 (CNOT8) (Bartlam and Yamamoto 2010; Winkler and Balacco 2013). Récemment, la purification par affinité en tandem (TAP ; (Rigaut et al. 1999)) de la protéine CNOT7 exprimée dans des cellules HEK293, suivie de l'analyse par spectrométrie de masse des protéines associées a permis d'identifier deux nouvelles sous-unités du complexe CCR4-NOT humain : les protéines C2ORF29/CNOT11 et CNOT10 (Mauxion et al. 2013).

La déadénylase PARN (*Poly(A)-specific RiboNuclease*) est retrouvée chez de nombreuses espèces eucaryotes comme *Xenopus laevis* (Korner et al. 1998), *Arabidopsis thaliana* (Chiba et al. 2004), et chez les mammifères (Korner and Wahle 1997). Toutefois, elle est absente chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Drosophila melanogaster*. L'enzyme PARN agit sous la forme d'un homodimère et son activité est dépendante de la coiffe des ARNm (Dehlin et al. 2000; Gao et al. 2000), mais est inhibée par la protéine PABP et les protéines qui lient la coiffe (Balatsos et al. 2006; Wu et al. 2009). La protéine PARN ne semble pas participer au processus général de déadénylation, mais est impliquée dans la déadénylation de certains types d'ARNm (e.g. les ARNm maternels lors de la maturation des ovocytes de *Xenopus laevis*) (Alonso 2012; Godwin et al. 2013).

Lorsqu'un nombre minimal d'adénosine restant sur l'ARNm est atteint, de l'ordre de 10 chez la levure et de 15 à 25 chez les mammifères, l'ARNm devient très instable et s'engage alors dans une voie de dégradation rapide et irréversible dans le sens 5'-3' et/ou 3'-5' (Parker and Song 2004; Garneau et al. 2007) (Figure 4).

b - Les enzymes de clivage de la coiffe

Chez la levure *S. cerevisiae*, des études complémentaires de génétique et de biochimie ont montré que la dissociation de la coiffe des ARNm est effectuée par l'hétérodimère Dcp2-Dcp1 (*Decapping enzymes 2 and 1*) (Beelman et al. 1996; LaGrandeur and Parker 1998) (Figure 5). La protéine Dcp2 est la sous-unité catalytique grâce à son domaine Nudix/MutT, et appartient à la famille des pyrophosphatases (Dunckley and Parker 1999).

Dcp2 clive la coiffe m7GpppN qui protège l'extrémité 5' de l'ARNm et libère du m7GDP et un ARN 5' monophosphate accessible aux exoribonucléases (Steiger et al. 2003; Collier and Parker 2004). Bien que cette enzyme soit principalement cytoplasmique, Dcp2 clive également la coiffe des pré-ARNm nucléaires chez *S. cerevisiae* (Kufel et al. 2004). La sous-unité Dcp1 est un membre de la famille des protéines EVH1/WH1 et interagit avec la protéine Dcp2 afin de stimuler son activité catalytique (She et al. 2004; 2008; Deshmukh et al. 2008; Valkov et al. 2016).

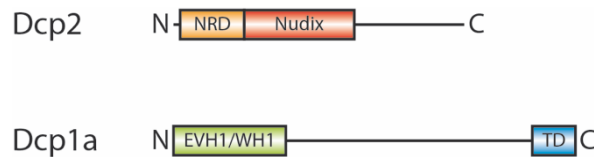


Figure 5 : Organisation des domaines fonctionnels des protéines Dcp2 et Dcp1a. L'enzyme Dcp2 de *Hs* (*Homo sapiens*) contient un domaine NRD (*N-terminal Regulatory Domain*) suivi d'un domaine catalytique Nudix (*Nucleotide diphosphate linked to an X moiety*). La protéine Dcp1a de *Hs* est composée d'un domaine N-terminal EVH1/WH1 (*Ena VASP Homology 1/WASP Homology 1*), qui interagit avec le motif NRD de Dcp2, et un domaine C-terminal TD (*Trimerization Domain*). Ces domaines sont très conservés avec les protéines Dcp2 et Dcp1 de *Saccharomyces cerevisiae* et *Drosophila melanogaster*.

Le complexe Dcp2-Dcp1 est conservé chez les mammifères (van Dijk et al. 2002; Wang et al. 2002b). Cependant, l'interaction Dcp2-Dcp1 n'est pas directe et nécessite des cofacteurs, comme la protéine Edc4 (*Enhancer of decapping 4*) (Tritschler et al. 2009). Par analogie avec la levure, il a été supposé pendant de nombreuses années que l'enzyme Dcp2 est la seule responsable du clivage de la coiffe chez les mammifères. Cette hypothèse a été récemment réfutée car une étude a identifié, dans les cellules murines et humaines, une seconde enzyme Nudt16 capable de dissocier la coiffe des ARNm (Song et al. 2010). De plus, l'analyse de tous les membres de la famille des protéines Nudix a montré que six protéines (Nudt2, Nudt3, Nudt12, Nudt15, Nudt17 et Nudt19) ont *in vitro* une activité de clivage de la coiffe (Song et al. 2013). Une question importante pour le futur est de déterminer si ces enzymes ont une fonction redondante ou bien spécifique de certains ARNm.

De façon remarquable, le clivage de la coiffe des ARNm est régulé par de nombreuses RBPs chez la levure et chez l'homme. Par exemple, le complexe heptamérique Lsm1-7 (*Sm-like 1-7*) se lie à l'extrémité 3' de l'ARNm oligoadénylé et active l'enzyme Dcp2 *via* la

protéine Pat1 (Bouveret et al. 2000; Tharun et al. 2000; Chowdhury et al. 2007; 2014). La protéine Pat1 et l'ARN hélicase à DEAD-box Dhh1 (appelée RCK/DDX6 chez les mammifères) sont à la fois des stimulateurs de l'hétérodimère Dcp2-Dcp1 et des inhibiteurs de la traduction (Coller and Parker 2005; Nissan et al. 2010). Les protéines Edc1 et Edc2 (*Enhancer of decapping 1 and 2*) interagissent avec l'ARN et le complexe Dcp2-Dcp1, ce qui stimule l'activité catalytique de Dcp2 (Schwartz et al. 2003; He and Jacobson 2015a).

Les cellules eucaryotes contiennent aussi un second type d'enzyme capable de dégrader la coiffe des ARNm : la protéine DcpS (*Scavenger Decapping enzyme*) (ou Dcs1 chez la levure) (Liu et al. 2002; 2004). L'enzyme DcpS appartient à la famille des pyrophosphatases à domaine HIT (*Histidine triad*) (Séraphin 1992; Liu et al. 2002). Contrairement à la protéine Dcp2 qui clive la coiffe des ARNm dont la longueur est supérieure à 25 nucléotides, DcpS dégrade spécifiquement la coiffe des oligoribonucléotides inférieure à 10 nucléotides. Ainsi, DcpS hydrolyse à la fois la coiffe m⁷GpppN générée au cours de la dégradation 3'-5' de l'ARNm par l'exosome (Wang and Kiledjian 2001; Liu et al. 2002), et le m⁷GDP produit par l'enzyme Dcp2 lors de la dégradation 5'-3' (van Dijk et al. 2003). De manière intéressante, une étude récente a caractérisé *in vitro* et *in vivo* de nouvelles enzymes impliquées dans l'élimination des structures coiffe : la protéine FHIT chez l'homme et son homologue Aph1 chez la levure (Taverniti and Séraphin 2015). Ces enzymes permettent en combinaison avec DcpS d'éliminer le m⁷GpppN et ses dérivés produits au cours de la dégradation de l'ARNm (Taverniti and Séraphin 2015).

c - Les exoribonucléases

Suite au clivage de la coiffe, l'ARNm est dégradé de façon processive par les enzymes Xrn1 dans le cytoplasme, ou Xrn2 dans le noyau. Ces protéines appartiennent à la famille des 5'-3' exoribonucléases XRN, et ont de fortes homologues de séquence et de fonction dans leur partie N-terminale (Zuo and Deutscher 2001; Nagarajan et al. 2013) (Figure 6).

Xrn1 est localisée dans le cytoplasme et est une protéine de 175 kDa. Cette enzyme contient dans sa région N-terminale deux domaines CR1 et CR2 (*Conserved Regions 1 and 2*) présents chez tous les membres de la famille XRN (Chang et al. 2011). La protéine Xrn1 a initialement été identifiée chez *S. cerevisiae* (Larimer and Stevens 1990). Des homologues ont ensuite été décrits chez *D. melanogaster* (appelé Pacman) (Till et al. 1998), *A. thaliana* (appelé AtXRN4) (Kastenmayer and Green 2000), et les mammifères (Bashkirov 1997). L'exoribonucléase Xrn1 est la principale enzyme responsable de la

dégradation 5'-3' des ARNm cytoplasmiques car les ARNm déadénylés et non coiffés s'accumulent dans une souche de levure $\Delta xrn1$ (Muhlrad et al. 1994). De manière intéressante, l'analyse des profils de sédimentation des ARNm non coiffés dans une souche de levure $\Delta xrn1$ a montré que ces ARNm sont associés aux polysomes, ce qui indique que la dégradation des ARNm peut être co-translationnelle (Hu et al. 2009). Par ailleurs, une étude récente a montré une interaction directe entre Xrn1 et les facteurs Dcp1 et Edc4, démontrant ainsi que le recrutement de Xrn1 est couplé au clivage de la coiffe des ARNm (Braun et al. 2012).

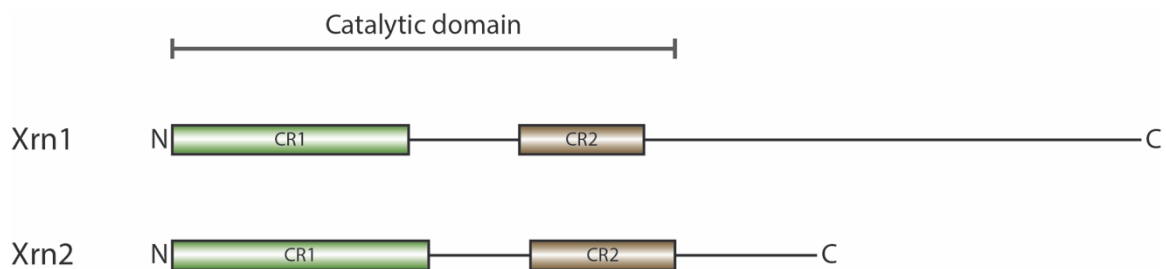


Figure 6 : Structure et fonction des exoribonucléases Xrn1 et Xrn2. Les protéines Xrn1 et Xrn2 de *Hs* contiennent deux régions très conservées CR1 et CR2 (*Conserved Regions 1 and 2*), dont l'homologie de séquence est supérieure à 50 %. Le domaine catalytique de ces enzymes est localisé dans leur région N-terminale.

L'enzyme Xrn2 (ou Rat1 chez la levure) est une protéine nucléaire de 115 kDa dont l'activité catalytique est similaire à celle de Xrn1 car elle dégrade spécifiquement les ARN 5' monophosphate (Amberg et al. 1992; Xiang et al. 2009; Miki and Großhans 2013). Les protéines Xrn1 et Xrn2/Rat1 sont fonctionnellement interchangeable. En effet, la mutation du domaine NLS (*Nuclear Localization Signal*) de Rat1 restaure la dégradation des ARNm cytoplasmiques dans une souche de levure $\Delta xrn1$ (Johnson 1997). Inversement, la fusion du NLS de l'antigène T du virus SV40 à la protéine Xrn1 permet sa localisation nucléaire, et complémente chez *S. cerevisiae* le défaut de viabilité du mutant thermosensible *rat1-ts* (Johnson 1997). Cependant, les protéines Xrn1 et Xrn2 ont des différences intrinsèques car Xrn1 ne complémente pas toutes les fonctions de Xrn2/Rat1, notamment celle dans la terminaison de la transcription (Luo et al. 2006). De nombreuses fonctions des exoribonucléases Rat1 et Xrn2 ont été rapportées : (i) Xrn2/Rat1 favorise la terminaison de la transcription en dégradant le brin d'ARN non coiffé associé à l'ARN polymérase II après le site de clivage/polyadénylation (Kim et al. 2004; West et al. 2004; Porrúa and Libri 2015) ; (ii) Rat1 dégrade l'ARN TERRA (*Telomeric repeat-containing*

RNA), un long ARNnc qui régule l'activité de la télomérase (Luke et al. 2008) ; (iii) Xrn2/Rat1 joue un rôle majeur dans la maturation en 5' des précurseurs des ARNr 5.8S et 28S (Henry et al. 1994; Geerlings et al. 2000; Wang and Pestov 2011). Par ailleurs, il a été montré que Xrn2/Rat1 interagit avec de nombreuses protéines comme Dcp2 et Dcp1 (Brannan et al. 2012), les facteurs d'épissage PSF (*Polypyrimidine tract-binding protein (PTB)-associated factor*) et p54nrb (Kaneko et al. 2007), ou la protéine Rtt103 chez *S. cerevisiae* qui interagit avec le domaine CTD de l'ARN polymérase II (Kim et al. 2004). Le rôle exact de ces interactions n'a pas été caractérisé, mais on peut supposer qu'elles permettent le recrutement de l'exoribonucléase Xrn2/Rat1 sur ses divers substrats.

d - L'exosome à ARN

L'exosome à ARN, communément appelé exosome, est un complexe protéique possédant une activité exoribonucléase 3'-5', et caractérisé par l'équipe de David Tollervey à la fin des années 1990 (Mitchell et al. 1996; 1997; Allmang et al. 1999). Historiquement, des défauts de maturation à l'extrémité 3' de l'ARNr 5.8S ont été observés chez *S. cerevisiae* dans un mutant du gène *RRP4* (*Ribosomal RNA Processing 4*) (Mitchell et al. 1996). La combinaison d'analyse biochimique et génétique a montré que la protéine Rrp4 n'a pas d'activité exonucléase intrinsèque, mais fait partie d'un complexe appelé exosome (Mitchell et al. 1997). Par la suite, les homologues humains de neuf composants de l'exosome de levure ont été identifiés, dont deux sont des membres du complexe PM-Scl (*Polymyositis-scleroderma overlap syndrom*)¹ (Allmang et al. 1999).

De manière intéressante, l'exosome est très conservé au cours de l'évolution car on le retrouve à la fois dans les cellules eucaryotes et les archées, tandis que les bactéries ont un complexe plus simple appelé dégradosome qui a des fonctions similaires (Lykke-Andersen et al. 2009; Jackowiak et al. 2011; Makino et al. 2013b; Hui et al. 2014; Mohanty and Kushner 2016) (Figure 7 et Tableau 1). Chez la levure, l'exosome est constitué d'un cœur de neuf sous-unités (Exo9) : six sont des ribonucléases homologues à la RNase PH bactérienne, et trois sont des protéines de liaison à l'ARN de type S1 ou KH. La structure cristallographique de l'exosome eucaryote a révélé que les sous-unités RNase PH forment un anneau hexamérique et sont connectées entre elles par les trois autres sous-unités S1/KH, qui constituent une plateforme de recrutement pour les ribonucléases associées et les cofacteurs de l'exosome (Liu et al. 2006; Bonneau et al. 2009; Makino et al. 2013a;

¹ Le complexe PM-Scl comporte onze à seize polypeptides reconnus par les anticorps de patients souffrant de la maladie auto-immune de polymyosite (Staals and Pruijn 2010).

Wasmuth et al. 2014; Makino et al. 2015; Kowalinski et al. 2016; Han and van Hoof 2016). Paradoxalement, le cœur de l'exosome eucaryote est catalytiquement inerte car ses sous-unités ont perdu leur activité enzymatique. Afin d'être actif, les neuf sous-unités du cœur de l'exosome s'associent à une ou deux sous-unités supplémentaires : les ribonucléases Dis3/Rrp44 et Rrp6 (Dziembowski et al. 2006; Briggs et al. 1998). Contrairement à la protéine Dis3/Rrp44 dont l'activité exoribonucléase est processive, Rrp6 dégrade l'ARN de façon distributive et est homologue à la RNase D de *E. coli* (Chlebowski et al. 2013; Schneider and Tollervey 2013; Januszyk and Lima 2014). De plus, la sous-unité Dis3/Rrp44 possède à la fois une activité d'exoribonucléase 3'-5', et d'endoribonucléase grâce à son domaine N-terminal PIN (Lebreton et al. 2008). L'activité d'endoribonucléase de Dis3/Rrp44 permet vraisemblablement de faciliter la progression de l'exosome sur des substrats hautement structurés. Récemment, deux études transcriptomique indépendantes chez *S. cerevisiae*, par tiling arrays (Gudipati et al. 2012) et par CRAC (*in vivo RNA-protein cross-linking and cDNA analysis*) (Schneider et al. 2012), ont montré que les ribonucléases Rrp6 et Dis3/Rrp44 ont des rôles distincts et communs dans la dégradation de divers ARN. Par exemple, Rrp6 est en grande partie responsable de la dégradation des précurseurs de snRNA et de snoRNA, alors que Dis3/Rrp44 joue un rôle important dans la dégradation des pré-ARNm non épissés (Gudipati et al. 2012; Schneider et al. 2012).

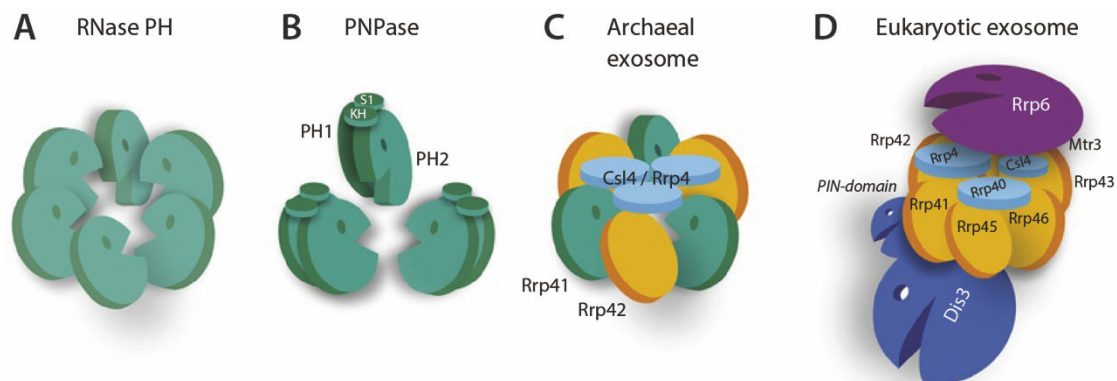


Figure 7 : Architecture des RNase PH et PNPase bactériennes, de l'exosome d'archée et de l'exosome eucaryote. (A) La RNase PH est composée de 6 sous-unités qui forment un anneau hexamérique. (B) La PNPase est homotrimerique : chaque monomère contient deux domaines catalytiques PH1 et PH2, et deux domaines de liaison à l'ARN S1 et KH. (C) L'exosome d'archée est constitué de l'hétérodimère Rrp41-Rrp42 qui a une activité RNase PH-like ; ce dimère trimérise pour former un anneau et s'associe aux protéines S1/KH-like Csl4 et Rrp4. (D) L'exosome eucaryote est composé d'un cœur de 9 sous-unités catalytiquement inertes, et d'une ou deux sous-unités enzymatiques : Dis3/Rrp44 et Rrp6 (adapté de (Lubas et al. 2012)).

| | Domaine(s) | <i>Archaea</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>H. sapiens</i> |
|--------------------------|---------------|----------------|----------------------|-------------------------|
| Cœur de l'exosome | S1, KH | Csl4 | Csl4 | hCsl4/EXOSC1 |
| | S1, KH | Rrp4 | Rrp4 | hRrp4/EXOSC2 |
| | S1, KH | / | Rrp40 | hRrp40/EXOSC3 |
| | RNase PH | Rrp41 | Rrp41 | hRrp41/EXOSC4 |
| | RNase PH | / | Rrp46 | hRrp46/EXOSC5 |
| | RNase PH | / | Mtr3 | hMtr3/EXOSC6 |
| | RNase PH | Rrp42 | Rrp42 | hRrp42/EXOSC7 |
| | RNase PH | / | Rrp43 | hRrp43/EXOSC8 |
| | RNase PH | / | Rrp45 | hRrp45/EXOSC9/PM-Scl75 |
| Sous-unités catalytiques | RNase D | / | Rrp6 | hRrp6/EXOSC10/PM-Scl100 |
| | RNase II, PIN | / | Dis3/Rrp44 | hDis3 hDis3L1 |

Tableau 1 : Composition de l'exosome des *Archaea*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Homo sapiens*.

La structure et les sous-unités de l'exosome sont très bien conservées entre la levure et l'homme (Figure 8). Toutefois, l'homologue de la ribonucléase Rrp6 (hRrp6) est présent à la fois dans le noyau et le cytoplasme chez l'homme, alors que cette protéine est exclusivement nucléaire chez *S. cerevisiae* (Brouwer et al. 2001; van Dijk et al. 2007). En outre, le génome humain contient trois paralogues du gène *DIS3* de levure : hDis3, hDis3L1 (*hDis3-like 1*) et hDis3L2 (*hDis3-like 2*). De façon surprenante, l'exoribonucléase hDis3L2 dégrade les ARNm cytoplasmiques indépendamment du cœur de l'exosome (Lubas et al. 2013; Malecki et al. 2013). Les protéines hDis3 et hDis3L1 sont associées au cœur de l'exosome mais ont des localisations subcellulaires différentes puisque hDis3 est principalement nucléaire, alors que hDis3L1 est exclusivement cytoplasmique (Staals et al. 2010; Tomecki et al. 2010). Suite à ces résultats, l'exosome humain apparaît donc plus complexe que l'exosome de levure. On peut supposer que le fait d'avoir deux homologues de Dis3/Rrp44, l'un nucléaire et l'autre cytoplasmique, confère à l'exosome humain une plus grande plasticité et la possibilité d'interagir avec des cofacteurs différents.

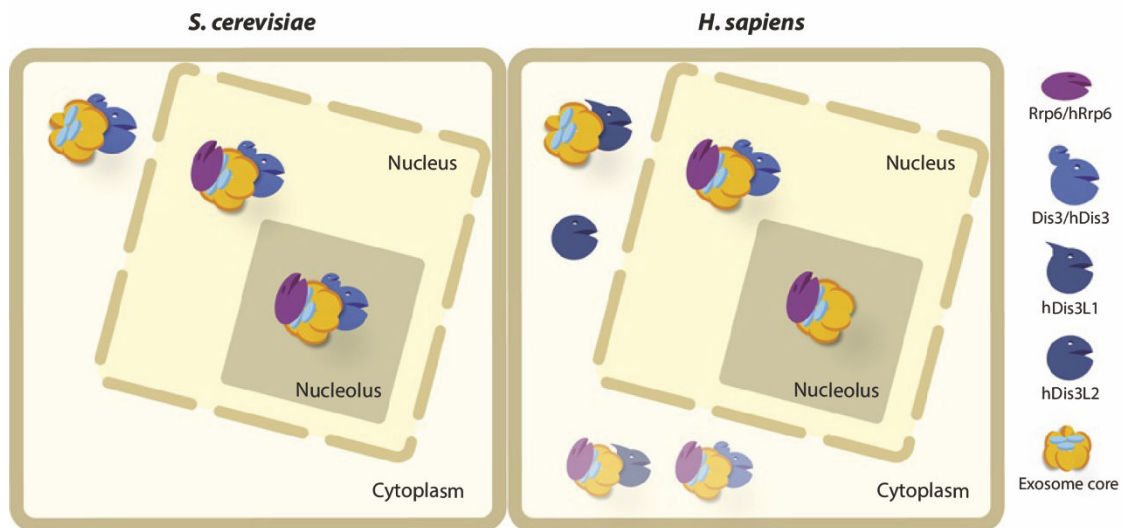


Figure 8 : Composition de l'exosome nucléaire et cytoplasmique chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Homo sapiens*. Les ribonucléases associées au cœur de l'exosome (Exo9) diffèrent chez la levure et chez l'homme en fonction de la localisation subcellulaire de l'exosome. (A) Chez la levure, le cœur de l'exosome s'associe aux sous-unités Dis3/Rrp44 et Rrp6 dans le cytoplasme (Exo11), mais uniquement à Rrp6 dans le noyau (Exo10). (B) Chez l'homme, Exo11 est présent à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Cependant, il existe trois homologues de la ribonucléase Dis3/Rrp44 : hDis3 est principalement localisée dans le noyau à l'exception du nucléole, alors que hDis3L1 est strictement cytoplasmique. La protéine hDis3L2 est aussi localisée dans le cytoplasme mais n'est pas associée au cœur de l'exosome (adapté de (Lubas et al. 2012)).

e - Les Terminal Uridyl Transferases (TUTases)

Il est intéressant de constater que l'addition à l'extrémité 3' d'une queue poly(A) stabilise les ARNm chez les eucaryotes, alors que celle-ci déstabilise les ARNm chez les bactéries. Chez les eucaryotes, des travaux récents ont révélé que l'uridylation des ARNm, i.e. l'addition d'une queue poly(U), joue un rôle important dans le contrôle de leur stabilité. Cette modification des ARNm est catalysée par des Terminal Uridyl Transferases (TUTases), appelées aussi Poly(A) Polymerases non canoniques (ncPAP). Bien que ces enzymes soient absentes chez *S. cerevisiae*, elles sont retrouvées à la fois chez *S. pombe*, *C. elegans*, *A. thaliana* et *H. sapiens* (Norbury 2013; Scott and Norbury 2013; Lee et al. 2014; Scheer et al. 2016).

L'uridylation des ARNm a été initialement décrite à l'extrémité 3' des produits de clivage des microRNA (Shen and Goodman 2004). L'addition d'une queue poly(U) a aussi été détectée dans le cas des ARNm d'histones, dont la particularité est d'être non polyadénylés et d'avoir une structure en tige boucle à leur extrémité 3' (Mullen and Marzluff 2008; Marzluff et al. 2008). Ainsi, ces ARNm sont oligouridylés puis dégradés à

la fin de la phase S du cycle cellulaire ou lorsque la réplication de l'ADN est inhibée (Mullen and Marzluff 2008). Par la suite, il a été montré que la protéine TUT4/ZCCHC11 (*Zinc finger, CCHC domain*) est l'enzyme responsable de cette uridylation (Schmidt et al. 2010). Ceci aboutit à la liaison de la protéine Lsm1 et à la dégradation rapide des ARNm d'histones à la fois dans le sens 5'-3' par les enzymes Dcp2 et Xrn1, et dans le sens 3'-5' par l'exosome et l'exonucléase Eri1 (3'hExo) (Mullen and Marzluff 2008; Hoefig et al. 2013; Slevin et al. 2014).

En outre, l'uridylation des ARNm ne se limite pas aux ARNm non polyadénylés, comme ceci a été démontré chez la levure *S. pombe* (Rissland et al. 2007; Rissland and Norbury 2009). L'analyse de six ARNm par la technique de cRACE (*circularized rapid amplification of cDNA ends*) a révélé que ces ARNm ont tous plusieurs uridines à la fin de leur queue poly(A) (Rissland and Norbury 2009). Cette même étude a montré que la fréquence d'uridylation des ARNm est augmentée dans des mutants de *S. pombe* des enzymes de déadénylation $\Delta ccr4$ ou de clivage de la coiffe *dcp1-ts* (Rissland and Norbury 2009). De plus, la stabilité de l'ARNm *urg1* est augmentée dans un mutant $\Delta cid1$, dont le produit du gène code pour une TUTase (Rissland et al. 2007; Rissland and Norbury 2009). Suite à ces résultats, il a été proposé que l'uridylation et la déadénylation stimuleraient de façon redondante le clivage de la coiffe des ARNm.

L'analyse par TAIL-seq à l'échelle du génome de l'extrémité 3' des ARNm a révélé que l'uridylation des ARNm est aussi très répandue chez les mammifères (Chang et al. 2014). En effet, plus de 85 % des ARNm exprimés dans les cellules HeLa et NIH3T3 sont uridylés à une fréquence supérieure à 1 % (Chang et al. 2014). De manière très intéressante, la majorité des ARNm uridylés ont une courte queue poly(A) (inférieure à 25 nucléotides), suggérant que la déadénylation des ARNm précède leur uridylation. Une étude récente a identifié les protéines TUT4/ZCCHC11 et TUT7/ZCCHC6 comme les TUTases responsables de l'uridylation des ARNm chez les mammifères (Lim et al. 2014). Ces enzymes uridylient *in vitro* et *in vivo* spécifiquement les ARNm avec une courte queue poly(A), et sont inhibées par la protéine PABP (Lim et al. 2014). Étant donné que (i) la déplétion dans des cellules de TUT4 et TUT7 stabilise les ARNm, et (ii) les ARNm oligouridylés s'accumulent dans des cellules déplétées des principaux acteurs de la dégradation des ARNm cytoplasmiques (i.e. Xrn1, Dcp2-Dcp1 et/ou l'exosome), ces nouvelles données indiquent que l'uridylation permet de marquer les ARNm afin que ceux-ci soient dégradés. Les travaux futurs devront déterminer la ou les protéine(s) qui détecte(nt) cette modification des ARNm.

f- Les endoribonucléases

Le clivage endonucléolytique est probablement la manière la plus efficace de dégrader un ARNm car il génère deux fragments d'ARN : un fragment 5' coiffé et dépourvu de queue poly(A) pris en charge par l'exosome (ou l'enzyme hDis3L2), et un fragment 3' sans coiffe dégradé par l'exoribonucléase Xrn1 dans le cytoplasme (Tomecki and Dziembowski 2010; Schoenberg 2011) (Figure 9).

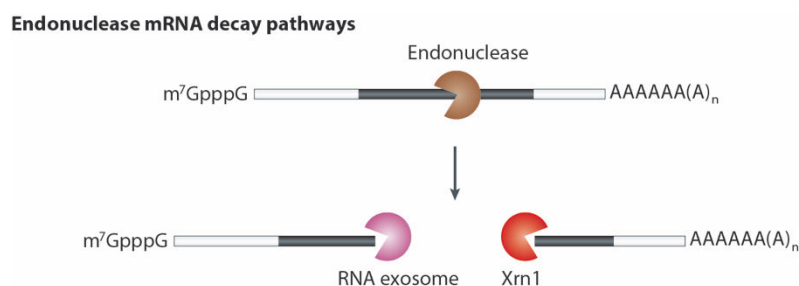


Figure 9 : Dégradation des ARNm par clivage endonucléolytique. La dégradation de certains ARNm est initiée par des endoribonucléases spécifiques. L'ARNm est ensuite dégradé simultanément dans le sens 5'-3' par l'enzyme Xrn1, et dans le sens 3'-5' par l'exosome. Des exemples d'endoribonucléases sont cités dans le texte principal.

À l'exception des endoribonucléases impliquées dans la voie de dégradation initiée par les miRNA, très peu d'endoribonucléases spécifiques ont été décrites dans la littérature. Parmi celles-ci, on trouve les protéines SMG6 (Eberle et al. 2009), PMR1 (Yang and Schoenberg 2004), APE1 (Barnes et al. 2009), IRE1 (Hollien et al. 2009), et ZC3H12a (Matsushita et al. 2009).

D'autres exemples intéressants sont les endoribonucléases virales, et en particulier celles codées par les herpèsvirus (Glaunsinger and Ganem 2006; Kronstad and Glaunsinger 2012). Ces protéines s'appellent BGLF5 chez EBV (*Epstein-Barr Virus*) (Rowe et al. 2007), vhs chez HSV-1 (*Herpes Simplex Virus type-1*) (Elgadi et al. 1999), et SOX chez KSHV (*Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus*) (Glaunsinger and Ganem 2004). L'endoribonucléase SOX est la mieux caractérisée et clive spécifiquement dans le cytoplasme les ARN cellulaires transcrits par l'ARN polymérase II, ce qui aboutit à leur dégradation par l'enzyme Xrn1 (Covarrubias et al. 2009; 2011; Gaglia et al. 2012; Hogg 2016). Le mode de reconnaissance de ces ARNm n'a pas été défini mais ceux-ci doivent être associés aux polysomes, suggérant que l'enzyme SOX ne reconnaît pas une séquence précise mais interagit avec la machinerie cellulaire de traduction afin de cibler les ARNm

activement traduits. De façon tout à fait remarquable, des travaux récents ont montré que la dégradation cytoplasmique des ARNm cellulaires induite par SOX réprime la transcription de ces gènes, en diminuant le recrutement de l'ARN polymérase II sur leur promoteur (Abernathy et al. 2015). Ceci a été mis en évidence par des expériences de « pulse labeling » des ARNm avec du 4sU (4-thiouridine) dans des cellules infectées soit par KSHV, soit par un virus mutant KSHV Δ SOX, et par des expériences de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*) avec un anticorps dirigé contre l'ARN Polymérase II. Cette même étude a montré que l'expression des gènes viraux n'est pas affectée avec le virus mutant KSHV Δ SOX (Abernathy et al. 2015). L'ensemble de ces résultats indiquent que le virus KSHV, et probablement tous les herpesvirus, utilisent un rétrocontrôle négatif pour inhiber l'expression de certains gènes cellulaires, et favoriser ainsi l'expression des gènes viraux.

2. Les mécanismes de surveillance des ARNm

Les cellules eucaryotes ont sélectionné au cours de l'évolution des systèmes très performants de surveillance, ou de contrôle-qualité, dans le but de détecter puis dégrader les mRNPs aberrantes et/ou défectueuses. En effet, au cours de la biogenèse des ARNm, deux types d'erreurs peuvent être introduits : (i) des altérations en *cis* dans la séquence de l'ARN, liées à des dysfonctionnements de l'ARN polymérase II ou à des stress génotoxiques, et (ii) des erreurs en *trans*, liées à un défaut d'assemblage, à la perte d'un facteur de maturation ou d'une protéine constitutive des mRNPs (e.g. CBC, PABP...). De tels mécanismes de surveillance des ARNm sont essentiels car l'accumulation de mRNPs défectueuses serait délétère pour les cellules (Houseley et al. 2006; Doma and Parker 2007; Isken and Maquat 2007; Mühlemann and Jensen 2012; Eberle and Visa 2014).

La surveillance des ARNm implique deux étapes successives : l'identification des ARNm aberrants, puis leur dégradation par les mêmes enzymes que celles impliquées dans la dégradation normale des ARNm (i.e. Xrn1/Xrn2, Dcp2-Dcp1 et/ou l'exosome). Les travaux de recherche réalisés au cours des deux dernières décennies se sont majoritairement concentrés sur les mécanismes de reconnaissance des mRNPs défectueuses dans le cytoplasme. Ces mécanismes restent en revanche largement indéterminés dans le noyau.

a - Surveillance co-traductionnelle des ARNm

Dans le cytoplasme, le contrôle-qualité des ARNm est directement connecté à leur traduction, et permet l'élimination des ARNm qui conduiraient à la synthèse de protéines tronquées et/ou aberrantes (Graille and Séraphin 2012; Shoemaker and Green 2012; Lykke-Andersen and Bennett 2014). Trois voies de dégradation co-traductionnelle des ARNm ont été décrites : la voie NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*), la voie NGD (*No-Go mRNA Decay*) et la voie NSD (*Non-Stop mRNA Decay*) (Figure 10).

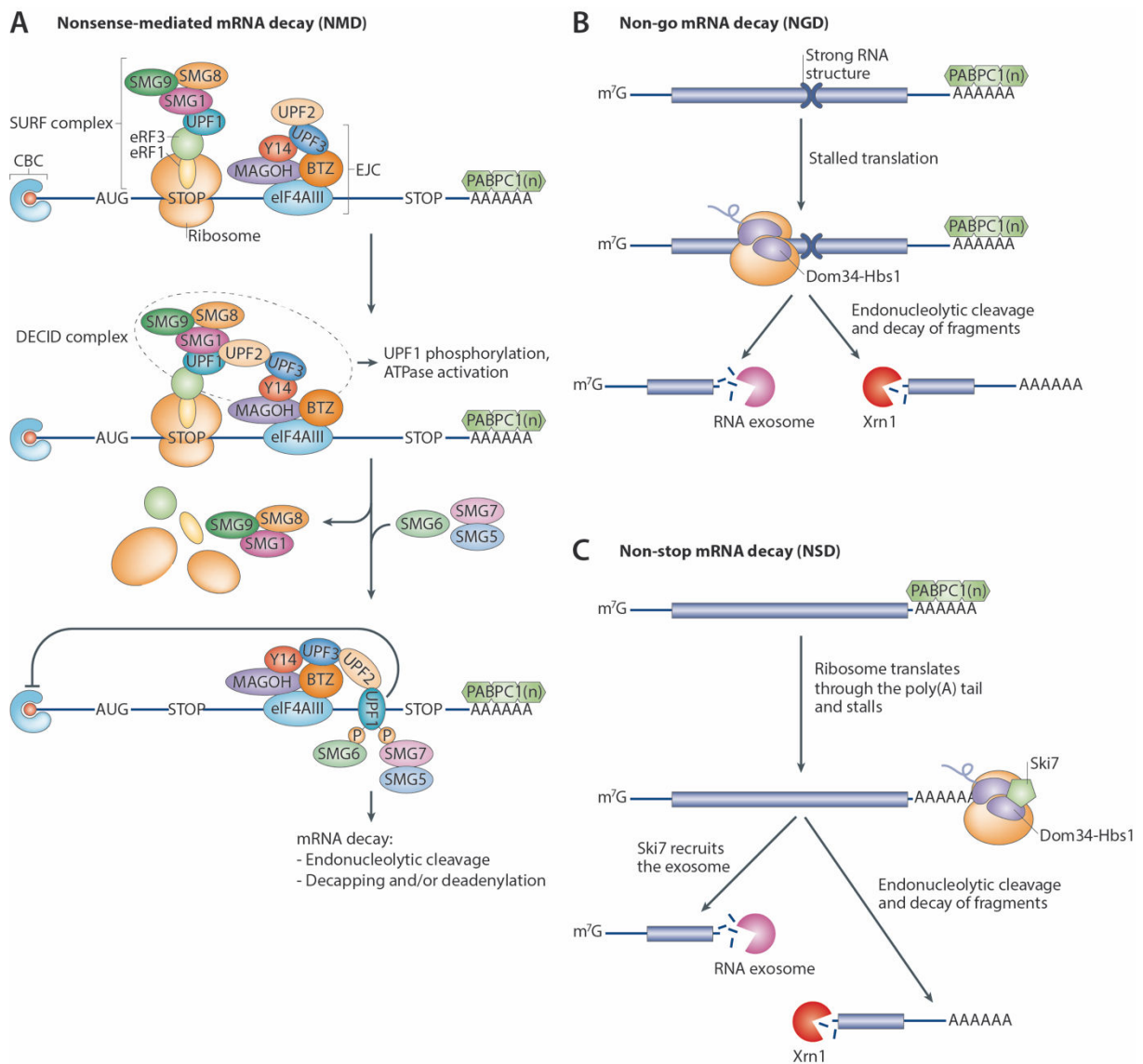


Figure 10 : Dégradation des ARNm par les voies NMD, NGD et NSD. (A) La voie NMD est initiée par la reconnaissance d'un codon stop précoce par le ribosome et la formation du complexe SURF. À la suite de la transition du complexe SURF au complexe DECID, la phosphorylation du facteur UPF1 permet le recrutement des enzymes de dégradation des ARNm. (B) La voie NGD débute lorsque le ribosome est bloqué sur l'ARNm au cours de l'élongation. La liaison du complexe Dom34-Hbs1

provoque la dissociation des sous-unités du ribosome et le clivage de l'ARNm en deux fragments 5' et 3', dégradés respectivement par l'exosome et l'exoribonucléase Xrn1. (C) La voie NSD dégrade les ARNm ne possédant pas de codon stop. Le blocage du ribosome sur la queue poly(A) ou à l'extrémité 3' de l'ARNm entraîne la liaison de la protéine Ski7, du complexe Ski et de l'exosome. Le complexe Dom34-Hbs1 est également impliqué dans ce processus. Finalement, les substrats de la NSD sont dégradés par l'exosome et/ou l'enzyme Xrn1.

La voie NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay)

La voie NMD permet de dégrader les ARNm possédant un codon stop précoce (PTC, *Premature Termination Codon*) (Kervestin and Jacobson 2012; Popp and Maquat 2013; Schweingruber et al. 2013; He and Jacobson 2015b; Brogna et al. 2016; Hug et al. 2016). Bien que la voie NMD soit retrouvée chez tous les eucaryotes, celle-ci diffère quelque peu d'une espèce à l'autre. Brièvement, les protéines UPF (*UP-Frameshift*) et SMG (*Suppressor with Morphological effect on Genitalia*) constituent le cœur de la machinerie NMD chez les métazoaires. Le modèle actuel indique que les substrats de la NMD sont à la fois les ARNm qui lient le complexe CBC, et ceux qui lient la protéine eIF4E (Durand and Lykke-Andersen 2013; Rufener and Mühlemann 2013). Les mécanismes permettant de distinguer un PTC d'un codon stop normal sont encore mal compris. Chez les mammifères, il a été montré qu'un codon stop est reconnu comme précoce si celui-ci est situé à une distance supérieure à 50-55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon, marquée par le complexe EJC (Lykke-Andersen et al. 2000; 2001). D'autres travaux ont montré que la longueur et la composition de la région 3' UTR sont des caractéristiques importantes des substrats de la NMD (Amrani et al. 2004; Hogg and Goff 2010; Boehm et al. 2014; Toma et al. 2015). En d'autres termes, certains composants de la machinerie NMD, et en particulier la protéine UPF1, sont capables de détecter un PTC en estimant la distance qui le sépare de la queue poly(A) (Hogg and Goff 2010). Dans tous les cas, l'identification d'un PTC au cours de la traduction aboutit à la formation d'un complexe de surveillance SURF (*SMG1-UPF1-eRF1-eRF3*) (Kashima et al. 2006). Les facteurs SMG8 et SMG9 s'associent également au complexe SURF, régulant ainsi la phosphorylation de UPF1 par SMG1 (Yamashita et al. 2009). L'ARN hélicase DHX34 permet alors l'interaction de la protéine UPF1 avec les protéines UPF2 et UPF3 du complexe EJC pour former le complexe DECID (*DECay-Inducing*) (Hug and Cáceres 2014). À ce stade, la phosphorylation de UPF1 par la kinase SMG1 marque un point de non-retour dans la dégradation des ARNm contenant un PTC (Kurosaki et al. 2014). Celle-ci entraîne d'une part la répression de la traduction (Isken et al. 2008), et d'autre part la liaison de l'endonucléase SMG6 et des protéines SMG5-SMG7 aboutissant au recrutement des enzymes de clivage de la coiffe et/ou de

déadénylation (Ohnishi et al. 2003; Eberle et al. 2009; Okada-Katsuhata et al. 2012; Loh et al. 2013; Durand et al. 2016). La contribution de chacune de ces voies de dégradation reste encore inconnue chez les mammifères, et il est probable qu'elles agissent de façon simultanée. Enfin, de manière intéressante, l'ARN hélicase et translocase UPF1 permet un profond remodelage de la mRNP indispensable à sa dégradation (Franks et al. 2010; Fiorini et al. 2013; 2015). Ceci soulève une question importante pour le futur, i.e. déterminer les ARN hélicases jouant ce rôle dans les autres voies de dégradation des mRNPs.

La voie NGD (No-Go mRNA Decay)

Une deuxième voie co-translationnelle a été décrite, la voie NGD, permettant de détecter et dégrader les ARNm avec des structures ou séquences qui obligent le ribosome à s'arrêter en cours de traduction (e.g. des structures en tige-boucle, des pseudo-nœuds, des séquences riches en GC ou des bases endommagées) (Harigaya and Parker 2010; Graille and Séraphin 2012). Cette voie de dégradation a été mise en évidence chez *S. cerevisiae* où des analyses génétiques ont montré que l'insertion d'une tige-boucle dans l'ARNm rapporteur PGK1 induit une coupure endonucléolytique de cet ARNm en amont du ribosome arrêté puis sa dégradation (Doma and Parker 2006). Les protéines Dom34 et Hbs1, qui présentent des similarités respectivement avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3, ont été identifiées comme des acteurs importants de la voie NGD (Doma and Parker 2006; Graille et al. 2008; van den Elzen et al. 2010; Tsuboi et al. 2012). Des études biochimiques ont montré que le complexe Dom34-Hbs1 se lie directement au site A du ribosome et dissocie les deux sous-unités (Shoemaker et al. 2010), et que cette réaction est stimulée par l'ATPase Rli1/ABCE1 (Pisareva et al. 2011; Shoemaker and Green 2011). De plus, les protéines Dom34 et Hbs1 induisent le clivage endonucléolytique de l'ARNm à proximité du site de pause du ribosome, ce qui aboutit à sa dégradation par l'exoribonucléase Xrn1 et l'exosome.

La voie NSD (Non-Stop mRNA Decay)

Enfin, les ARNm qui ne possèdent pas de codon de terminaison (e.g. à la suite d'un clivage/polyadénylation alternatif) sont dégradés par la voie NSD (Graille and Séraphin 2012; Klauer and van Hoof 2012). Initialement, des études chez la levure ont montré que la protéine Ski7 joue un rôle central dans cette voie. En effet, le domaine C-terminal de Ski7 reconnaît le ribosome bloqué à l'extrémité 3' de l'ARNm, et son domaine N-terminal

recrute l'exosome et le complexe Ski, entraînant la dégradation de l'ARNm dans le sens 3'-5' (Frischmeyer et al. 2002; van Hoof et al. 2002). Cependant, il a été mis en évidence par la suite que la voie NSD peut être initiée indépendamment de la protéine Ski7 car les ARNm sans codon stop sont instables dans une souche de levure mutante $\Delta ski7$ (Inada and Aiba 2005). En outre, la protéine Ski7 est absente chez les mammifères. Des travaux récents indiquent que le complexe Dom34-Hbs1 joue aussi un rôle important dans la voie NSD en permettant la dissociation des sous-unités du ribosome et le clivage endonucléolytique des ARNm sans codon stop (Tsuboi et al. 2012; Saito et al. 2013). Ceci entraîne alors la dégradation de ces ARNm dans le sens 5'-3' et 3'-5'. Au vu de ces résultats, il semble donc que les voies NGD et NSD soient *in fine* deux voies de dégradation des ARNm très proches car elles font intervenir les mêmes acteurs.

b - Surveillance nucléaire des ARNm

Peu d'études se sont intéressées au contrôle-qualité des ARNm dans le noyau, et nos connaissances actuelles reposent en grande partie sur des travaux réalisés chez la levure *S. cerevisiae* (Moore 2002; Jensen et al. 2003; Saguez et al. 2005; Schmid and Jensen 2010; Tutucci and Stutz 2011; Schmid and Jensen 2013; Kilchert and Vasiljeva 2013; Porrua and Libri 2013).

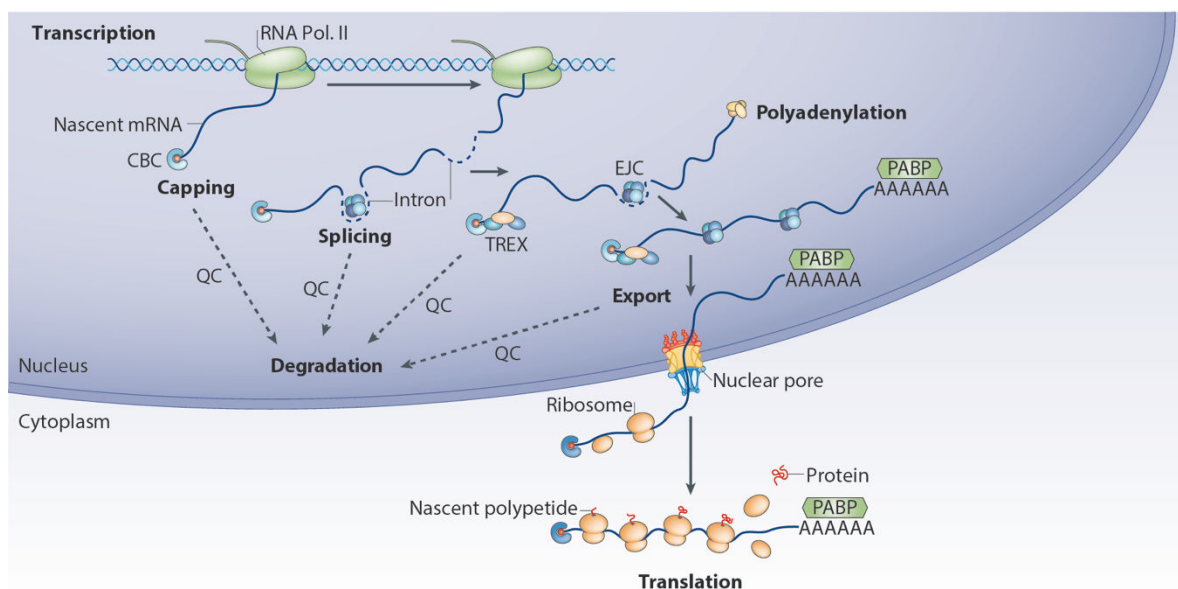


Figure 11 : Contrôle-qualité des mRNPs nucléaires. Le contrôle-qualité (QC) de l'assemblage des particules ARNm-protéines (mRNPs) se produit à chaque étape de la biogenèse des ARNm. Ainsi, des défauts lors de l'ajout de la coiffe, de l'épissage, de la polyadénylation ou de l'export des ARNm entraînent la dégradation nucléaire de ces mRNPs.

De façon remarquable, la surveillance nucléaire des ARNm contrôle chaque étape de leur biogenèse (i.e. l'ajout de la coiffe, l'épissage, la polyadénylation et l'export des ARNm) (Figure 11). La plupart de ces mécanismes de contrôle-qualité des ARNm sont co-transcriptionnels, ce qui a l'avantage pour les cellules d'économiser de l'énergie dans la maturation et le transport des mRNPs aberrantes. Le modèle actuel de reconnaissance de ces mRNPs indique que ce serait la dynamique d'assemblage des complexes ARNm-protéines qui serait contrôlée. En d'autres termes, il existerait une compétition entre les étapes de maturation et dégradation des ARNm, et chaque étape de la biogenèse des mRNPs disposerait d'une fenêtre d'opportunité très précise pour se réaliser, sinon ces mRNPs seraient rapidement détournées vers les voies de dégradation (Mühlemann and Jensen 2012; Eberle and Visa 2014; Oeffinger and Montpetit 2015). En accord avec ce modèle, deux études récentes ont montré chez la levure que la susceptibilité aux enzymes de dégradation des ARNm et des longs ARNnc est différente, et que cela serait dû à la composition protéique de ces RNPs (Tuck and Tollervey 2013; Andersson et al. 2014).

À l'heure actuelle, il n'a pas été mis en évidence de système de réparation nucléaire des mRNPs aberrantes. En général, la détection de ces ARNm aboutit à leur dégradation dans le sens 3'-5' par l'exosome, ou plus rarement dans le sens 5'-3' par l'enzyme Xrn2. De manière intéressante, la détection de mRNPs défectueuses peut aussi aboutir à leur rétention nucléaire, et parfois à l'arrêt de la transcription du gène correspondant (Jensen and Moore 2005; Vanacova and Stefl 2007; Eberle and Visa 2014; Kilchert et al. 2016).

Contrôle-qualité (QC) en 5' des ARNm

Chez *S. cerevisiae*, l'exoribonucléase Rat1/Xrn2 agit conjointement avec l'enzyme pyrophosphohydrolase Rai1 et l'enzyme de clivage de la coiffe Dxo1 (Xiang et al. 2009). L'analyse génétique d'une souche de levure mutante $\Delta rai1$ a révélé que la stabilité des ARNm coiffés mais non méthylés est augmentée (Jiao et al. 2010), démontrant ainsi qu'il existe un mécanisme de contrôle-qualité de l'ajout de la coiffe en 5' des ARNm. Par la suite, il a été montré que les ARNm non coiffés sont stables dans une souche de levure mutante $\Delta rai1$ et $\Delta dxo1$, et que la protéine Dxo1 possède une double activité enzymatique de clivage de la coiffe et 5'-3' exoribonucléase (Chang et al. 2012). Chez les mammifères, une étude récente a montré que l'homologue de Dxo1, la protéine Dom3Z/DXO, a aussi des activités pyrophosphohydrolase, de clivage de la coiffe et 5'-3' exoribonucléase (Jiao et al. 2013). Ainsi, il apparaît donc que la protéine Dom3Z/DXO joue un rôle central dans le contrôle-qualité en 5' des ARNm.

En outre, des expériences de ChIP-seq ont montré que l'enzyme Xrn2 se localise à proximité des sites d'initiations de la transcription (TSSs), ainsi que les protéines Edc3, Dcp1a et Dcp2 (Brannan et al. 2012). Cependant, un rôle direct de l'exoribonucléase Xrn2 dans le contrôle-qualité en 5' des ARNm n'a jamais été démontré.

Contrôle-qualité (QC) de l'épissage des pré-ARNm

La réaction d'épissage des pré-ARNm est la source potentielle de nombreuses erreurs, mais les processus de reconnaissance et de dégradation de tels ARNm dans le noyau sont mal connus.

Chez les mammifères, l'étude de la dégradation de l'ARNm rapporteur β -globine contenant un site d'épissage muté a montré que ces ARNm aberrants sont dégradés co-transcriptionnellement par la sous-unité hRrp6 de l'exosome et l'exoribonucléase Xrn2 (Davidson et al. 2012). De manière intéressante, cette même étude a montré que de nombreux pré-ARNm endogènes sont aussi dégradés par Xrn2 lorsque l'épissage est inhibé par la spliceostatin A (SSA)¹ (Davidson et al. 2012). Toutefois, la façon dont l'extrémité 5' non coiffé de l'ARNm est générée n'est pas comprise. Il est probable qu'elle soit le résultat de l'action de l'enzyme Dcp2 et/ou de l'endoribonucléase hDis3/hRrp44 de l'exosome.

Chez la levure *S. cerevisiae*, des travaux pionniers ont montré que l'exosome joue un rôle important dans le contrôle-qualité des pré-ARNm non épissés (Bousquet-Antonelli et al. 2000). Des travaux plus récents ont montré qu'en effet, les pré-ARNm non épissés représentent une classe importante des substrats de l'exosome (Gudipati et al. 2012; Schneider et al. 2012). De plus, l'accumulation des pré-ARNm chez des souches de levure mutantes de l'exosome est souvent corrélée à une augmentation de l'épissage de certains transcrits (Bousquet-Antonelli et al. 2000; Gudipati et al. 2012), suggérant que certains pré-ARNm cibles de l'exosome peuvent être épissés. Pour toutes ces raisons, il a été proposé qu'il existerait une compétition entre l'épissage et la surveillance nucléaire par l'exosome des pré-ARNm (Bousquet-Antonelli et al. 2000; Gudipati et al. 2012; Niemela et al. 2014). En d'autres termes, un épissage lent des pré-ARNm aboutirait à une forte proportion de dégradation des transcrits par l'exosome et donc à peu d'ARNm, alors qu'un épissage rapide aboutirait au contraire à un niveau élevé d'ARNm (Figure 12).

¹ La spliceostatin A bloque la formation du complexe SF3b du spliceosome, et par conséquent inhibe la réaction d'épissage (Kaida et al. 2007; Roybal and Jurica 2010).

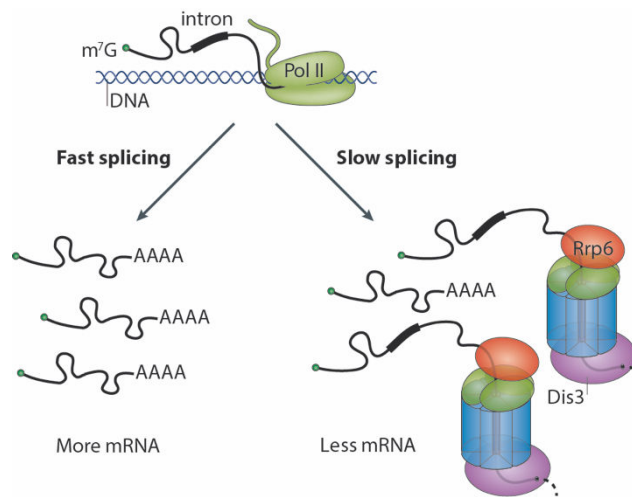


Figure 12 : Modèle d'interaction entre les processus d'épissage et de dégradation des pré-ARNm. Lorsque l'épissage des pré-ARNm se produit rapidement, tous les transcrits naissants sont maturés et une grande quantité d'ARNm est générée. Par contre, lorsque l'épissage est lent, beaucoup de transcrits non épissés sont dégradés par l'exosome, et peu d'ARNm sont donc produits. Grâce à ce mécanisme, la régulation négative de la maturation des pré-ARNm peut réprimer l'expression des gènes de manière très efficace (adapté de (Kilchert et al. 2016)).

En accord avec ce modèle, plusieurs études très récentes démontrent un lien direct entre les machineries d'épissage et de dégradation des pré-ARNm. Chez la levure *S. cerevisiae*, les protéines SR-like Gbp2 (*G-strand binding protein 2*) et Hrb1 (*Hypothetical RNA-binding protein 1*) semblent être des facteurs clés de la surveillance nucléaire des ARNm (Hackmann et al. 2014). En effet, (i) une forte proportion d'ARNm non épissé est retrouvée dans le cytoplasme en absence de ces protéines (Hackmann et al. 2014) ; (ii) les facteurs d'épissage Gbp2 et Hrb1 interagissent génétiquement et physiquement avec des protéines impliquées dans le contrôle-qualité des ARNm nucléaires (Hackmann et al. 2014). Par ailleurs, chez la levure *S. pombe*, le complexe MTREC (*Mtl1-Red1 core*), aussi appelé complexe NURS (*Nuclear RNA silencing*), se lie spécifiquement aux ARN CUTs (*Cryptic Unstable Transcripts*) et aux ARNm non épissés, et ciblent ces ARN pour la dégradation par l'exosome dans le noyau (Lee et al. 2013b; Egan et al. 2014; Zhou et al. 2015b). Paradoxalement, chez *S. pombe*, l'épissage des pré-ARNm semble être stimulé par le recrutement co-transcriptionnel au niveau des séquences introniques de cofacteurs de l'exosome (Kong et al. 2014). Ceci pourrait être le résultat d'une meilleure efficacité d'élimination des produits intermédiaires de maturation des ARNm. Enfin, chez les mammifères, une étude a montré par des expériences de co-immunoprécipitation à partir d'extraits nucléaires de cellules HEK293 que le complexe tri-snRNP U4/U6.U5 interagit avec plusieurs composants de la machinerie de dégradation des ARNm, dont la protéine

hRrp6/PM-Scl100 de l'exosome (Nag and Steitz 2012). L'ensemble de ces données suggèrent que l'épissage et le contrôle-qualité des pré-ARNm sont étroitement liés. Un défi important pour le futur est la compréhension de la régulation de ce processus.

Contrôle-qualité (QC) en 3' des ARNm

La surveillance nucléaire de la maturation en 3' des ARNm a été décrite pour la première fois chez la levure *S. cerevisiae* (Hilleren et al. 2001; Libri et al. 2002; Milligan et al. 2005). Dans ces études, l'analyse de mutants thermosensibles du gène *pap1*, codant pour la PAP (*Poly(A) Polymerase*), a montré que les ARNm avec des défauts de polyadénylation sont retenus au niveau des sites de transcription, mais en absence de la protéine Rrp6, ces ARNm ne sont plus retenus (Hilleren et al. 2001; Libri et al. 2002; Milligan et al. 2005). Ainsi, il a été proposé que l'exosome joue un rôle central dans la vérification de l'intégrité des ARNm lors de leur maturation co-transcriptionnelle en 3' (Jensen et al. 2003; Saguez and Jensen 2009).

Ce mécanisme de contrôle-qualité en 3' des ARNm semble être conservé chez les mammifères. En effet, la mutation du site de clivage/polyadénylation dans le gène rapporteur β -globine entraîne la rétention des transcrits non maturés au niveau des sites de transcription avec l'ARN polymérase II, et ceci de façon dépendante de la sous-unité hRrp6 de l'exosome (de Almeida et al. 2010). Ces résultats démontrent un lien direct entre la terminaison de la transcription et la surveillance nucléaire des ARNm par l'exosome.

Contrôle-qualité (QC) de l'export des ARNm

Plusieurs observations suggèrent que l'exosome participe également au contrôle-qualité de l'assemblage des mRNPs dans le noyau. Ainsi, il a été mis en évidence chez la levure *S. cerevisiae* des liens génétiques entre l'exosome et le complexe THO, qui relie la transcription et l'export des ARNm (Jensen et al. 2001; Rougemaille et al. 2007; 2008; Assenholt et al. 2008; Saguez et al. 2008).

De façon remarquable, différents phénotypes sont associés à la délétion ou la mutation individuelle d'un composant du complexe THO chez *S. cerevisiae* : (i) certains ARNm, comme par exemple l'ARNm de choc thermique HSP104, sont retenus au niveau des sites de transcription et ont des défauts de polyadénylation (Jensen et al. 2001; Rougemaille et al. 2007; Saguez et al. 2008) ; (ii) d'autres transcrits sont rapidement dégradés par l'exosome car ces ARNm s'accumulent dans une souche de levure mutante $\Delta rrp6$ (Rougemaille et al. 2007; Assenholt et al. 2008). Les mécanismes permettant de détecter

ces défauts d'assemblage et de cibler ces mRNPs vers l'exosome sont à l'heure actuelle totalement inconnus.

Rétention nucléaire des transcrits

La dégradation des ARNm est seulement un aspect du contrôle-qualité des mRNPs nucléaires. Plusieurs études ont démontré que la détection de défauts de maturation des ARNm aboutit souvent à la rétention de ces transcrits aberrants au niveau de la chromatine (Custódio et al. 1999; Hilleren et al. 2001; Thomsen et al. 2003; Galy et al. 2004; Prasanth et al. 2005; Eberle et al. 2010; Kallehauge et al. 2012; Bahar Halpern et al. 2015). Ceci a pu être mis en évidence grâce au développement de la technique de RNA-FISH (*RNA-Fluorescence In Situ Hybridization*) qui permet de détecter des molécules d'ARN grâce à une sonde fluorescente spécifique.

Il existe un lien étroit entre la rétention nucléaire et la dégradation des mRNPs aberrantes chez les eucaryotes. En effet, des travaux chez *S. cerevisiae* ont montré que dans une souche de levure mutante $\Delta rrp6$, les ARNm avec des défauts de polyadénylation ne sont plus retenus au niveau des sites de transcription (Hilleren et al. 2001). Ceci a également été démontré chez les mammifères car la déplétion de hRrp6 par siRNA supprime l'accumulation au niveau de la chromatine du pré-ARNm rapporteur β -globine contenant des sites d'épissage mutés (Eberle et al. 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires restent incompris.

En outre, l'utilisation comme modèle de la levure *S. cerevisiae* indique que la rétention nucléaire des transcrits agit comme un contrôle-qualité supplémentaire afin d'empêcher l'expression de mRNPs aberrantes (Kallehauge et al. 2012). En effet, dans une souche de levure mutante $\Delta mex67$, les ARNm sont retenus au niveau de la chromatine, et lorsque le facteur d'export Mex67 est surexprimé, les ARNm relâchés précocement de la chromatine ne sont pas traduits alors que ceux qui sont relâchés tardivement sont traductionnellement actifs (Kallehauge et al. 2012). Ces résultats sont particulièrement intéressants et suggèrent que la rétention nucléaire des transcrits a un double objectif : (i) elle empêche la libération dans le cytoplasme des mRNPs défectueuses, et (ii) elle octroie un temps additionnel afin que ces mRNPs soient correctement maturées et assemblées dans le noyau.

3. Les RBPs et le contrôle-qualité des ARNm nucléaires

Les travaux de recherche réalisés au cours des deux dernières décennies ont permis de caractériser précisément les acteurs de la dégradation nucléaire des ARNm, et de décrire les systèmes de surveillance des ARNm. À l'heure actuelle, un défi important est de comprendre comment ces ARNm aberrants sont reconnus afin d'être rapidement éliminés dans le noyau.

De façon surprenante, l'activité enzymatique de l'exosome est relativement faible *in vitro* (Liu et al. 2006; Dziembowski et al. 2006), suggérant que des protéines cellulaires régulent son activité et/ou permettent la reconnaissance de ses substrats. Des travaux récents indiquent que certaines RBPs jouent un rôle fondamental dans le contrôle-qualité et la dégradation nucléaire des ARN par l'exosome (Chlebowski et al. 2013; Makino et al. 2013b; Losh and van Hoof 2015; Thoms et al. 2015). C'est le cas en particulier des complexes TRAMP (*Trf4/5-Air1/2-Mtr4 Polyadenylation*) et NEXT (*Nuclear EXosome Targeting*), et des protéines qui lient la coiffe et la queue poly(A) des ARNm (i.e. CBC et PABPN1).

a - Le complexe TRAMP

La spécificité de dégradation des ARN par l'exosome semble être apportée par des adaptateurs ou cofacteurs, dont les mieux caractérisés sont chez la levure *S. cerevisiae* le complexe cytoplasmique Ski (*Superkiller*) (Brown et al. 2000; Halbach et al. 2013) et le complexe nucléaire TRAMP (*Trf4/5-Air1/2-Mtr4 Polyadenylation*) (LaCava et al. 2005; Vanacova et al. 2005; Wyers et al. 2005; Schmidt and Butler 2013). De façon remarquable, ces deux complexes contiennent chacun une ARN hélicase à DExH-box, respectivement les protéines Ski2 (Anderson and Parker 1998) et Mtr4 (la Cruz et al. 1998), avec une activité enzymatique ATPase et hélicase 3'-5' directionnelle.

Récemment, la structure cristallographique des protéines Mtr4 (Jackson et al. 2010b; Weir et al. 2010) et Ski2 (Halbach et al. 2012) a révélé qu'en plus de leur domaine hélicase, ces enzymes contiennent un domaine unique KOW (*Kyrpides-Ouzounis-Woese*) indispensable à leur fonction. Ce domaine flexible en forme d'arche peut lier *in vitro* l'ARN (Weir et al. 2010; Halbach et al. 2012), et *in vivo* des défauts de maturation de l'ARNr 5.8S sont observés dans une souche de levure mutante *mtr4-archless* (Klauer and van Hoof 2013). Ceci suggère fortement que le domaine KOW de Mtr4 pourrait être impliqué dans la reconnaissance de ses substrats.

En plus de l'ARN hélicase Mtr4, le complexe TRAMP est également composé chez *S. cerevisiae* de la poly(A) polymérase Trf4 ou Trf5, et de la protéine de liaison à l'ARN à doigt de zinc Air1 ou Air2. Il existe deux formes du complexe TRAMP *in vivo* : TRAMP4 (*Trf4-Air2-Mtr4*) et TRAMP5 (*Trf5-Air1-Mtr4*) mais le complexe TRAMP4 est largement prédominant de par la forte expression de Trf4 comparée à celle de Trf5 (Houseley and Tollervey 2006; Egecioglu et al. 2006; San Paolo et al. 2009; Hamill et al. 2010; Schmidt et al. 2012; Falk et al. 2014). Trf4 et Trf5 appartiennent à la super-famille des poly(A) polymérases non canoniques (Martin and Keller 2007; Norbury 2013). À la différence de l'enzyme Pap1, Trf4 et Trf5 ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ARN, et ne peuvent donc pas polyadényler leur substrat en l'absence des RBPs Air1 ou Air2 (Holub et al. 2012; Schmidt et al. 2012). En outre, la polyadénylation des ARN par Trf4 et Trf5 est distributive *in vitro*, par opposition à l'activité processive de Pap1 (Vanacova et al. 2005).

Le complexe TRAMP peut stimuler la dégradation des ARN par l'exosome de plusieurs façons différentes. D'une part, l'addition par Trf4 d'une courte queue poly(A) permettrait à Mtr4 de déplier la molécule d'ARN grâce à son activité hélicase (Jia et al. 2011; 2012; Taylor et al. 2014). D'autre part, l'oligoadénylation de l'ARN pourrait fournir à l'exosome une extrémité 3' non structurée capable d'entrer dans le cœur de l'exosome et d'être dégradée de façon processive par la sous-unité Dis3/Rrp44 (Wasmuth and Lima 2012; Draskowska et al. 2013; Liu et al. 2014; Wasmuth et al. 2014). En accord avec ce modèle, les ARN hautement structurés tels que les ARNt sont de faibles substrats de l'exosome, et leur dégradation efficace nécessite les protéines Trf4 et Mtr4 (Vanacova et al. 2005). Enfin, il a été montré que le complexe TRAMP peut stimuler *in vitro* l'exoribonucléase Rrp6 de l'exosome de façon indépendante de la polyadénylation de l'ARN, mais le mécanisme de cette stimulation reste à être élucidé (Callahan and Butler 2010).

Des travaux chez la levure *S. cerevisiae* ont montré que le complexe TRAMP est impliqué dans la dégradation des ARN CUTs (*Cryptic Unstable Transcripts*) (Wyers et al. 2005), dans la maturation des pré-ARNr (la Cruz et al. 1998), et dans la surveillance des snRNA, snoRNA, ARNt et ARNm (Kadaba et al. 2004; Grzechnik and Kufel 2008; Wlotzka et al. 2011; Stuparevic et al. 2013). Toutefois, les mécanismes de reconnaissance de ses substrats par le complexe TRAMP restent largement indéterminés.

De façon remarquable, il existe chez l'homme un complexe hTRAMP nucléaire putatif (Lubas et al. 2011; Fasken et al. 2011). Ce complexe est composé de l'ARN hélicase hMTR4/SKIV2L2, de la poly(A) polymérase hTRF4-2/PAPD5 (*PAP-associated domain-containing protein 5*) et de la protéine à doigt de zinc ZCCHC7 (*Zinc finger, CCHC domain*). Ces protéines ont chacune des domaines fonctionnels identiques à leur

homologue chez *S. cerevisiae* (Lubas et al. 2011; Fasken et al. 2011; Osman et al. 2011; Rammelt et al. 2011) (Figure 13).

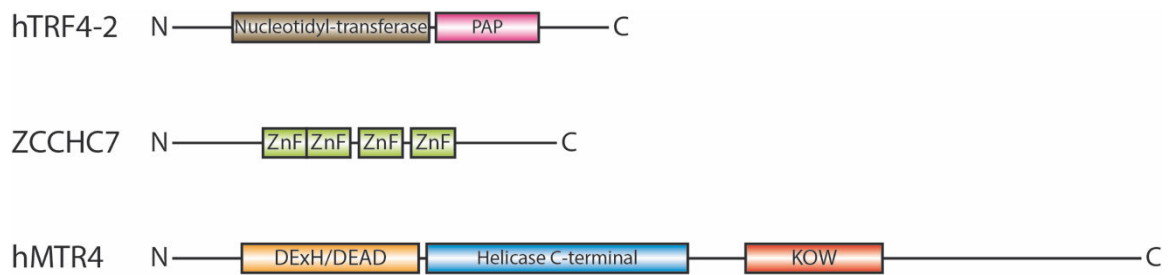


Figure 13 : Structure et fonctions des protéines hTRF4-2, ZCCHC7 et hMTR4 du complexe hTRAMP. La protéine hTRF4-2/PAPD5 est composée d'un domaine Nucléotidyl-transférase et d'un domaine PAP-associated (PAP). La protéine ZCCHC7 contient quatre domaines en doigts de zinc (ZnF) de type ZCCHC. Enfin, l'ARN hélicase hMTR4/SKIV2L2 contient trois domaines fonctionnels : un domaine DExH/DEAD liant l'ATP, un domaine Hélicase C-terminal et un domaine unique Kyrpidis-Ouzounis-Woese (KOW).

Le complexe hTRAMP a été identifié dans des cellules HEK293 suite à l'analyse par spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec la sous-unité hRrp6 de l'exosome (Lubas et al. 2011). De plus, cette même étude a montré par microscopie à fluorescence que les trois protéines hTRF4-2, ZCCHC7 et hMTR4 sont localisées dans le nucléole, même si l'ARN hélicase hMTR4 est également retrouvée dans le nucléoplasme des cellules (Lubas et al. 2011). En accord avec sa localisation nucléolaire, il a été montré que le complexe hTRAMP participe comme chez la levure à la maturation des pré-ARNr (Lubas et al. 2011; Sudo et al. 2016). Étant donné que le complexe hTRAMP est localisé dans le nucléoplasme, l'ensemble de ces nouvelles données indiquent qu'il existe dans les cellules de mammifères une compartimentation nucléaire des adaptateurs de l'exosome (Lubas et al. 2011; Norbury 2011).

b - Le complexe NEXT

Dans les cellules humaines HEK293, l'analyse par spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec les sous-unités hRrp6 et hRrp41 de l'exosome a révélé la présence de nombreuses RBPs (Tomecki et al. 2010; Lubas et al. 2011). Parmi celles-ci, il a été montré que les trois protéines hMTR4, RBM7 et ZCCHC8 interagissent de façon stable et stœchiométrique au sein d'un complexe appelé NEXT (*Nuclear EXosome*

Targeting) (Lubas et al. 2011). Les protéines RBM7 et ZCCHC8 ont une localisation strictement nucléoplasmique et s'associent avec les fractions non nucléolaires de hMTR4 et de l'exosome (Figure 14).

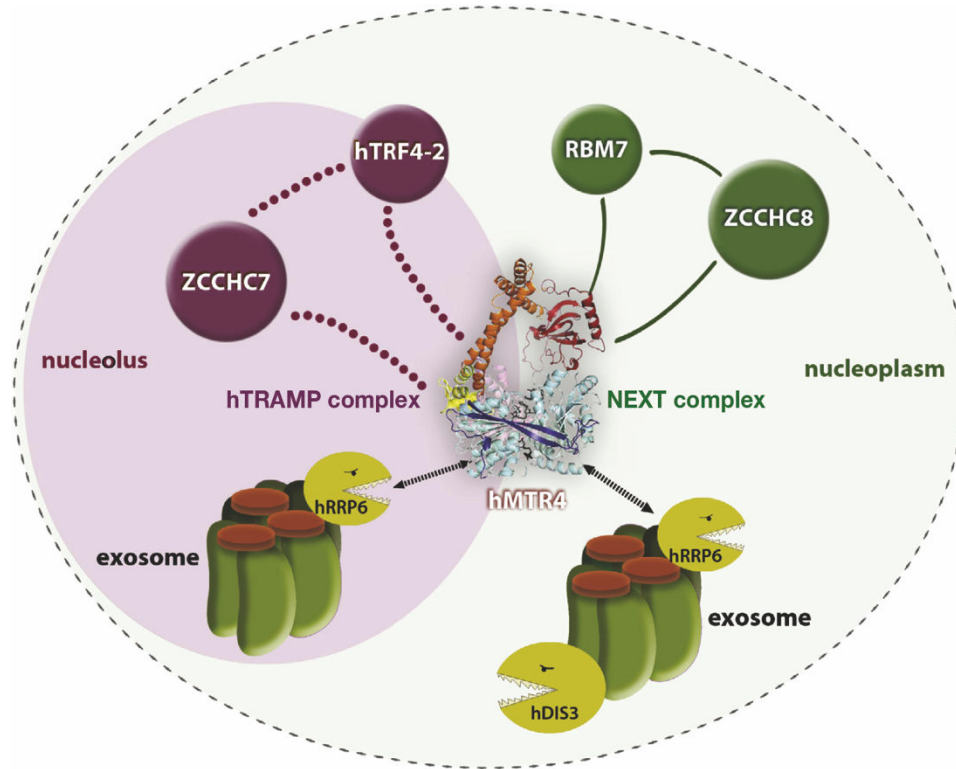


Figure 14 : Localisation subnucléaire des cofacteurs de l'exosome hTRAMP et NEXT. L'ARN hélicase hMTR4 joue un rôle central car elle s'associe dans le nucléoplasme aux protéines RBM7 et ZCCHC8 pour former un complexe stable et trimérique NEXT. Dans le nucléole, hMTR4 interagit avec les protéines hTRF4-2 et ZCCHC7 au sein du complexe hTRAMP. La protéine hTRF4-2 est également retrouvée sous forme libre dans la fraction nucléoplasmique du noyau (adapté de (Lubas et al. 2011)).

Il existe des homologues des protéines RBM7 et ZCCHC8 chez tous les vertébrés. L'étude structurale de la protéine RBM7 a permis de mettre en évidence un domaine canonique RRM (*RNA Recognition Motif*) lui permettant de lier l'ARN *in vivo* (Guo et al. 2003; Hrossova et al. 2015; Sofos et al. 2016). La protéine ZCCHC8 contient également un domaine de liaison à l'ARN de type ZCCHC (*Zinc finger, CCHC domain*) participant certainement à la reconnaissance des substrats du complexe NEXT (Gustafson et al. 2005) (Figure 15).

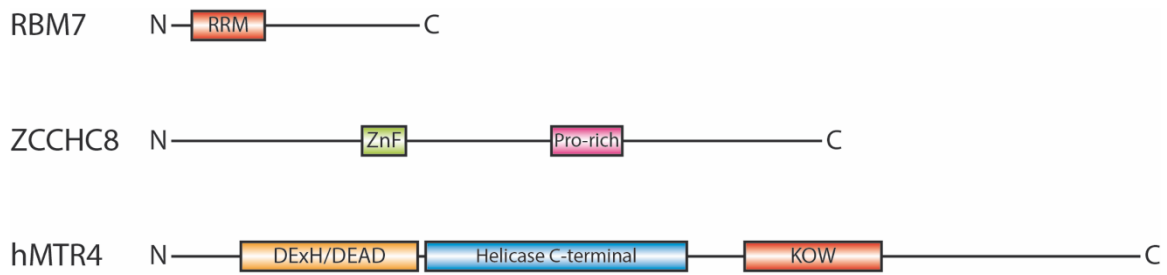


Figure 15 : Structure et fonctions des protéines RBM7, ZCCHC8 et hMTR4 du complexe NEXT. La protéine RBM7 contient un domaine de liaison à l'ARN de type RRM. La protéine ZCCHC8 est composée de deux domaines fonctionnels : un domaine en doigt de zinc (ZnF) de type ZCCHC et un domaine riche en proline. L'ARN hélicase hMTR4/SKIV2L2, commune au complexe hTRAMP nucléolaire, contient un domaine DExH/DEAD liant l'ATP, un domaine Hélicase C-terminal et un domaine unique Kyrpides-Ouzounis-Woese (KOW).

Au niveau fonctionnel, il a été rapporté que le complexe NEXT participe avec l'exosome à la dégradation de plusieurs classes d'ARN tels que les PROMPTs¹ (*PROMoter uPstream Transcripts*) et les précurseurs des snRNAs (Lubas et al. 2011; Andersen et al. 2013; Hrossova et al. 2015). En effet, la déplétion par siRNA de RBM7 ou ZCCHC8 stabilise efficacement les PROMPTs dans le noyau (Lubas et al. 2011), et il a été montré par la suite par des expériences de RIP (*RNA ImmunoPrecipitation*) que ces deux protéines interagissent avec les PROMPTs (Andersen et al. 2013).

Toutefois, la reconnaissance de ses substrats par le complexe NEXT reste mal comprise. Afin de répondre en partie à cette question, une étude très récente a cartographié par iCLIP (*individual-nucleotide resolution UV Cross-Linking and ImmunoPrecipitation*) les sites de fixation *in vivo* de la protéine RBM7 à l'échelle du transcriptome (Lubas et al. 2015). Les résultats montrent que RBM7 s'associe à tous les transcrits de l'ARN polymérase II, et s'accumule dans les pré-ARNm à l'extrémité 3' des introns (Lubas et al. 2015). De plus, des expériences de « pulse labeling » des ARN démontrent que RBM7 s'associe aux ARN nouvellement synthétisés (Lubas et al. 2015). Ces nouveaux résultats sont très intéressants et suggèrent que le complexe NEXT pourrait participer à un contrôle-qualité précoce des ARNm au cours de leur biogenèse.

¹ Les PROMPTs sont des ARNnc coiffés et polyadénylés. Ils sont générés suite à la transcription bi-directionnelle de la plupart des promoteurs de gènes codant pour des protéines et clivés/polyadénylés à un site PAS proche du TSS. Ces ARNnc nucléaires sont très instables de par leur dégradation par l'exosome (Preker et al. 2008; Almada et al. 2013; Ntini et al. 2013; Jensen et al. 2013).

c - Le complexe CBC

Le complexe CBC (*Cap-Binding Complex*), composé de l'hétérodimère CBP20-CBP80, est recruté co-transcriptionnellement sur différentes classes d'ARN tels que les (pré-)ARNm, snRNA, snoRNA et PROMPTs. Ce complexe joue un rôle central dans le métabolisme des ARN car il permet le lien entre les étapes de transcription, d'épissage, de maturation en 3', d'export nucléo-cytoplasmique, de traduction et de dégradation des ARN (Izaurre et al. 1994; 1995; Flaherty et al. 1997; Mazza et al. 2001; Balatsos et al. 2006; Merz et al. 2007; Kim et al. 2009; Lenasi et al. 2011; Pabis et al. 2013).

De manière très intéressante, des études récentes ont caractérisé deux sous-complexes distincts avec CBC qui ciblent les ARN soit vers l'export nucléo-cytoplasmique, soit vers la dégradation (Hallais et al. 2013; Andersen et al. 2013).

La première étude a identifié le complexe CBCAP composé de CBC et des protéines ARS2 et PHAX (Hallais et al. 2013). La protéine ARS2 (*Arsenic resistance protein 2*) interagit avec les ARN contenant des tiges-boucles, comme les pri-miRNA et les ARNm d'histones, et contrôle leur transcription, leur maturation en 3' et leur stabilité (Gruber et al. 2009; 2012). La protéine PHAX (*Phosphorylated adaptor for RNA export*) est un facteur d'export des snRNA et de transport intranucléaire des snoRNA (Ohno et al. 2000; Boulon et al. 2004) ; son recrutement sur les longs ARN coiffés comme les ARNm est inhibé par la protéine hnRNP C (McCloskey et al. 2012). Dans cette étude, il a été montré que la protéine ARS2 stimule à la fois la formation des extrémités 3' de plusieurs familles d'ARN dont les snRNA, et le recrutement de PHAX sur le CBC (Hallais et al. 2013). Ainsi, le complexe CBCAP permet le couplage entre les étapes de maturation et d'export nucléo-cytoplasmique des snRNA (Hallais et al. 2013).

Une autre étude a identifié un second complexe appelé CBCN et constitué de CBC, ARS2 et du complexe NEXT associé à la protéine à doigt de zinc ZC3H18 (Andersen et al. 2013). En combinant des expériences de RIP et de déplétion par siRNA des composants de CBCN, il a été montré que ce complexe CBCN recrute l'exosome et stimule la dégradation de certains ARN comme les PROMPTs, les snRNA et les ARNm d'histones (Andersen et al. 2013).

L'ensemble de ces nouveaux résultats indiquent que le complexe CBC-ARS2 détermine le destin de certains ARN car il peut soit promouvoir leur export nucléo-cytoplasmique, soit leur dégradation en fonction de son association avec PHAX ou NEXT-ZC3H18 (Hallais et al. 2013; Andersen et al. 2013; Müller-Mcnicoll and Neugebauer 2014). Il serait très intéressant de déterminer maintenant comment le complexe CBC-ARS2 discrimine les ARN entre ceux qui doivent être exportés dans le cytoplasme, et ceux qui

doivent être dégradés dans le noyau. Il est probable que d'autres RBPs recrutées co-transcriptionnellement, comme des facteurs d'épissage et/ou la protéine PABPN1, participent à cette sélection.

d - La protéine PABPN1

Comme nous l'avons mentionné en introduction, la queue poly(A) des ARNm lie dans le noyau la protéine PABPN1 (*Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1*) et la protéine PABPC (*PABP Cytoplasmic*) dans le cytoplasme, même si chacune de ces protéines est capable de faire la navette entre les deux compartiments cellulaires (Lemay et al. 2010b).

Chez *S. cerevisiae*, plusieurs PABP ont également été caractérisées : Pab1 et Nab2, qui sont respectivement majoritairement cytoplasmique et nucléaire, et homologues des protéines humaines PABPC et ZC3H14. La protéine Nab2 lie avec une très forte affinité les ARNm polyadénylés *via* ses sept domaines à doigt de zinc dans sa région C-terminale (Brockmann et al. 2012). Nab2 est recrutée sur les ARNm au cours de leur synthèse, facilite leur export nucléo-cytoplasmique en interagissant avec les protéines Yra1 et Mex67, puis est remplacée dans le cytoplasme par Pab1 (Hector et al. 2002; Fasken et al. 2008; Iglesias et al. 2010). De manière intéressante, il a été montré que la liaison de Nab2 à la queue poly(A) est fortement augmentée en absence de Rrp6 à la fois *in vitro* et *in vivo* (Schmid et al. 2012). De plus, la déplétion de la protéine Nab2 aboutit à l'accumulation de certains ARNm (Schmid et al. 2012), suggérant que Nab2 et l'exosome nucléaire régulent de façon conjointe le niveau de certains ARNm. Une fonction similaire de faciliter la dégradation de certains pré-ARNm et snoRNA par l'exosome a été montrée pour la protéine nucléaire Pab2 chez *S. pombe* (Lemay et al. 2010a; Lemieux et al. 2011). Cette fonction semble être conservée chez l'homme car (i) la déplétion par siRNA de PABPN1 stabilise dans le noyau certains longs ARNnc et pré-ARNm, et (ii) la protéine PABPN1 favorise l'hyperadénylation de certains ARN nucléaires (Beaulieu et al. 2012; Bresson and Conrad 2013; Bresson et al. 2015; Muniz et al. 2015). Cependant, il est difficile d'avoir à l'heure actuelle une vision claire du rôle de la protéine PABPN1 dans le contrôle-qualité des ARNm nucléaires.

Récemment, la fonction de la protéine Nab2 dans la biogenèse des ARNm chez *S. cerevisiae* a été mieux caractérisée grâce au système « anchor-away »¹ (Schmid et al. 2015). Cette étude a montré que la déplétion rapide de Nab2 aboutit à une diminution globale de la quantité d'ARNm, mais pas d'ARN non polyadénylé (Schmid et al. 2015). Cette

¹ La technique « anchor-away » (AA) permet chez la levure la déplétion nucléaire et rapide d'une protéine en présence de rapamycine (Haruki et al. 2008).

diminution est due à un événement nucléaire indépendant de la transcription, et la déplétion de Nab2 conduit à une dégradation rapide des ARNm néo-synthétisés par l'exosome nucléaire (Schmid et al. 2015). Ces nouvelles données peuvent apparaître contradictoires avec les résultats plus anciens montrant que la déplétion à long terme de Nab2 aboutit à l'accumulation nucléaire de certains ARNm (Schmid et al. 2012), mais cette observation est probablement le résultat d'un défaut d'export des ARNm matures. Aussi, la protéine Nab2 semble agir à deux étapes du métabolisme des ARNm dans le noyau : sa liaison aux ARNm polyadénylés les protège d'abord de la dégradation précoce par l'exosome, puis elle permet le recrutement des facteurs d'export Yra1 et Mex67.

II - La traduction des ARNm

La traduction des ARNm chez les eucaryotes est un processus complexe soumis à une régulation fine et élaborée. La traduction peut être divisée en trois étapes principales : (i) l'initiation au cours de laquelle la petite sous-unité ribosomale (40S) est recrutée sur l'ARNm, progresse le long de la région 5' non traduite (5' UTR) jusqu'à atteindre le codon d'initiation où le ribosome complet (80S) s'assemble ; (ii) l'élongation au cours de laquelle le ribosome se déplace le long de la séquence codante de l'ARNm et fait correspondre à chaque codon rencontré un acide aminé spécifique ; (iii) enfin, la terminaison provoquée par l'arrivée du ribosome à un codon stop, le ribosome se détache alors de l'ARNm, libère la chaîne polypeptidique synthétisée et les sous-unités ribosomales sont recyclées (Hershey et al. 2012).

Ce processus en plusieurs étapes permet une régulation à différents niveaux, mais l'initiation est l'étape qui fait intervenir le plus de facteurs, et qui est généralement considérée comme limitante (Shah et al. 2013). Néanmoins, des exemples de régulation des phases d'élongation et de terminaison de la traduction ont également été décrits (Dever and Green 2012; Chu et al. 2014; Yu et al. 2015).

Dans cette partie, nous allons nous concentrer sur les mécanismes de l'initiation de la traduction, et sur la régulation de la traduction par les virus et certaines RBPs cellulaires à travers différents exemples illustratifs.

1. Le ribosome

Le ribosome constitue la centrale cellulaire de production des protéines, et est un complexe ribonucléoprotéique composé d'ARN ribosomiaux (ARNr) associés à des protéines ribosomales. Sa masse moléculaire totale atteint 2.3 MDa chez la bactérie, 3.3 MDa chez la levure et 4.3 MDa chez l'homme (Yusupova and Yusupov 2014) (Figure 16).

Chez les eucaryotes, le ribosome complet 80S est composé de deux sous-unités 40S et 60S. La petite sous-unité ribosomale 40S est elle-même composée d'un seul ARNr (18S, 1870 bases) et de 33 protéines rpS (*ribosomal protein Small*). La sous-unité 40S joue un rôle majeur dans la recherche du codon d'initiation au cours de la phase d'initiation, et assure l'interaction entre les codons de l'ARNm et les anticodons des ARN de transfert (ARNt) lors de l'élongation. La grande sous-unité 60S se compose de trois ARNr (5S, 5.8S et 28S de 121, 156 et 5034 bases respectivement) et de 47 protéines rpL (*ribosomal protein*

Large). La sous-unité 60S est porteuse de l'activité peptidyl-transférase du ribosome qui catalyse la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés.

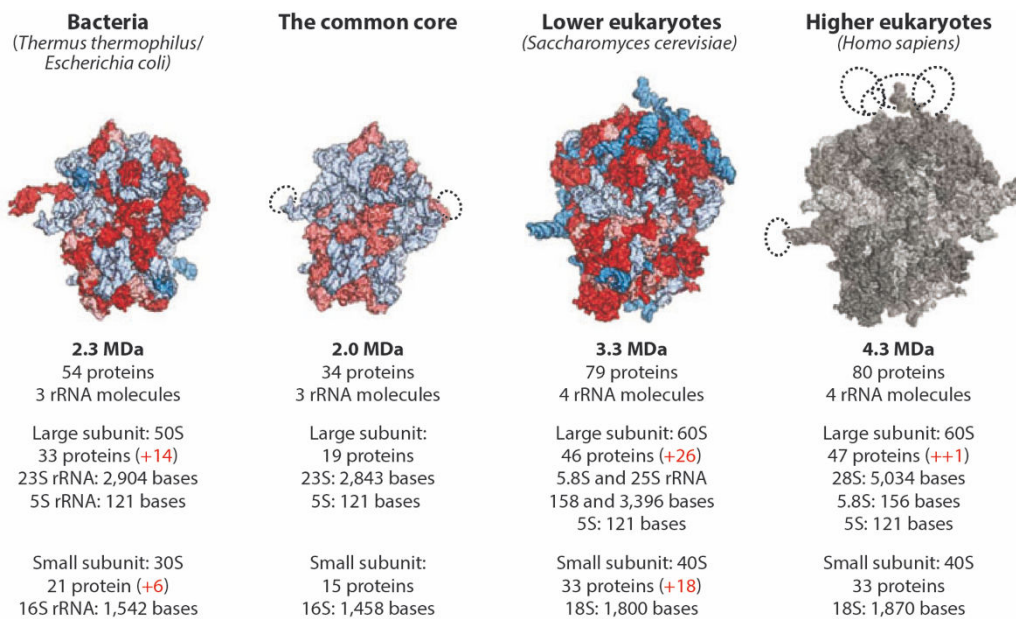


Figure 16 : Composition des ribosomes bactérien et eucaryotes. Les ribosomes bactérien et eucaryotes partagent un noyau conservé (« the common core ») composé d'ARNr (bleu clair) et de protéines ribosomales (rouge clair), auxquels s'ajoutent des ARNr et des protéines ribosomales qui leur sont propres. D'après (Yusupova and Yusupov 2014).

Au cours de la dernière décennie, les structures cristallographiques du ribosome de bactérie, de levure et de drosophile ont été déterminées (Cate et al. 1999; Ben-Shem et al. 2011; Anger et al. 2013). Récemment, la structure atomique du ribosome humain avec une résolution supérieure à 3.0 Å a été visualisée par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) (Khatter et al. 2015). Le modèle obtenu représente les 220 000 atomes qui constituent les deux sous-unités du ribosome et permet, pour la première fois, d'explorer son agencement en détail et d'identifier les différents acides aminés et nucléotides en trois dimensions. Cette connaissance de la structure et de la dynamique du ribosome humain ouvre la voie à de nouvelles perspectives. Ainsi, il est désormais envisageable d'étudier les effets secondaires de certains antibiotiques, destinés à s'attaquer au ribosome bactérien, et qui ciblent par erreur le ribosome humain.

2. L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe

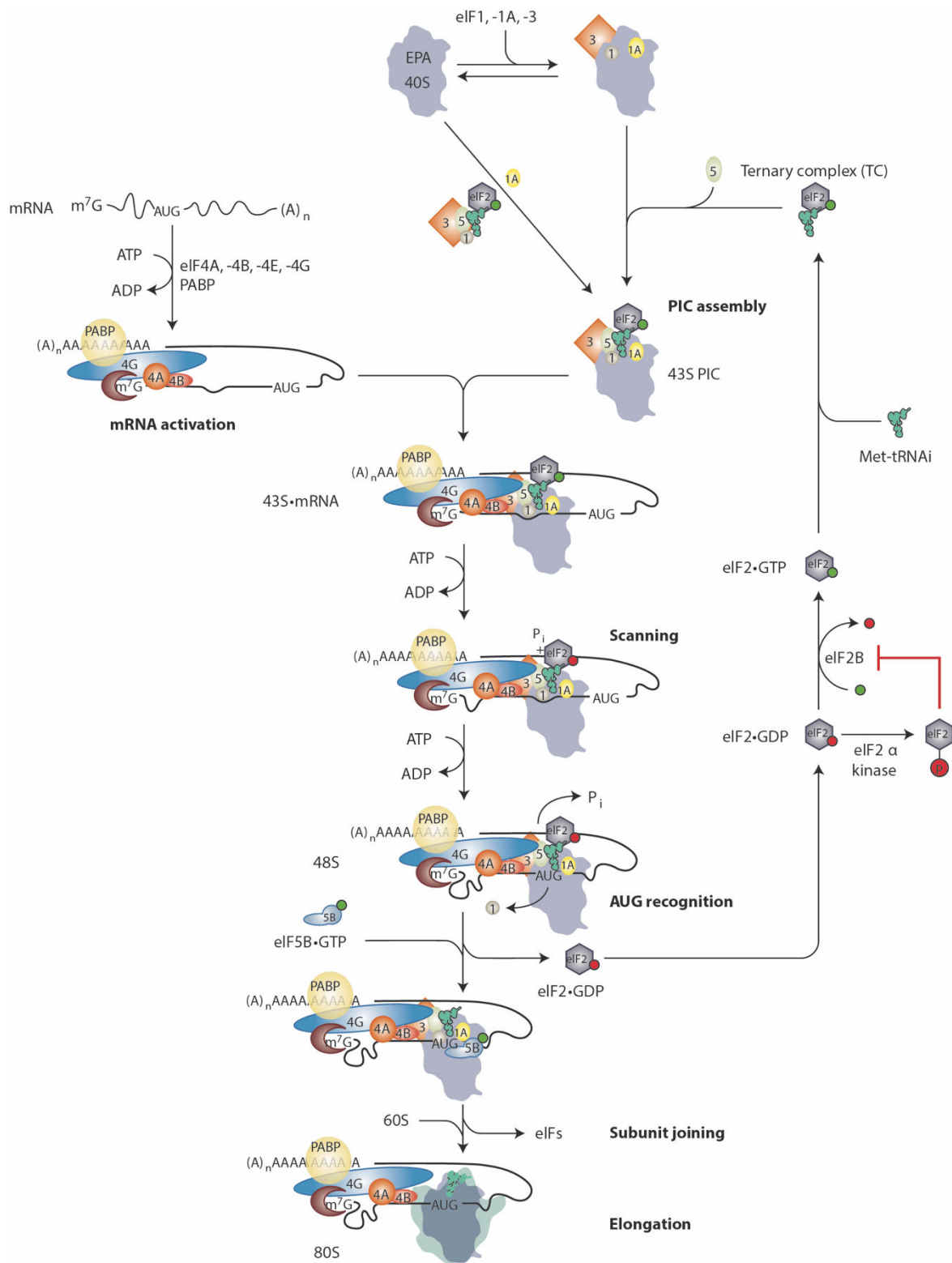


Figure 17 : Étapes de l'initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes. L'initiation de la traduction débute par le recrutement du complexe 43S PIC grâce au complexe eIF4F qui interagit avec la coiffe méthylée de l'ARNm. Le complexe balaie ensuite la région 5' UTR de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation, où la sous-unité 60S interagit alors avec la sous-unité 40S pour former un ribosome 80S compétent pour l'élongation (adapté de (Hinnebusch 2014)).

| Nom | Nombre de sous-unités et masse moléculaire (kDa) | Fonction |
|--|---|--|
| <i>Facteurs d'initiation canoniques</i> | | |
| eIF1 | 1 (12.7) | Assure la fidélité de la reconnaissance du codon d'initiation ; favorise le balayage ; stimule la liaison de eIF2-GTP-Met-tRNAi à la sous-unité 40S ; empêche l'hydrolyse prématurée de eIF2-GTP par eIF5 |
| eIF1A | 1 (16.5) | Stimule la liaison de eIF2-GTP-Met-tRNAi à la sous-unité 40S ; coopère avec eIF1 dans le balayage et la sélection du codon d'initiation |
| eIF2 | 3 (36.1, 38.4 et 51.1) | Forme un complexe ternaire (TC) eIF2-GTP-Met-tRNAi qui se lie à la sous-unité 40S |
| eIF2B | 5 (33.7, 39.0, 50.2, 59.7 et 80.3) | Facteur d'échange de la guanosine (GEF) qui permet le recyclage de eIF2-GDP en eIF2-GTP |
| eIF3 | 13 (800 au total) | Interagit avec la sous-unité 40S, eIF1, eIF4G et eIF5 ; stimule la liaison de eIF2-GTP-Met-tRNAi à la sous-unité 40S ; favorise le recrutement du complexe 43S PIC sur l'ARNm ; possède une activité anti-association entre les sous-unités 40S et 60S |
| eIF4A | 1 (46.1) | ARN hélicase ATP-dépendante à DEAD-box |
| eIF4B | 1 (69.3) | RBP qui augmente l'activité hélicase de eIF4A |
| eIF4E | 1 (24.5) | Lie la coiffe m7GpppG de l'ARNm |
| eIF4F | 3 (246.1 au total) | Complexe de liaison cytoplasmique de la coiffe de l'ARNm comprenant eIF4A, eIF4E et eIF4G |
| eIF4G | 1 (175.5) | Interagit avec eIF4A, eIF4E, eIF3, PABP et l'ARNm ; stimule l'activité hélicase de eIF4A |
| eIF4H | 1 (27.4) | RBP qui augmente l'activité hélicase de eIF4A et est homologue à un fragment de eIF4B |
| eIF5 | 1 (49.2) | Active l'activité GTPase de eIF2-GTP lors de la reconnaissance du codon d'initiation |
| eIF5B | 1 (138.9) | GTPase dépendante du ribosome qui assure l'association des sous-unités 40S et 60S |
| <i>Facteurs auxiliaires</i> | | |
| DHX29 | 1 (155.3) | ARN hélicase à DExH-box qui lie la sous-unité 40S et favorise le balayage des régions 5' UTR longues et structurées |
| eIF6 | 1 (26.6) | Facteur anti-association qui lie la sous-unité 60S et empêche son association avec la sous-unité 40S |
| PABP | 1 (70.7) | Interagit avec la queue poly(A) de l'ARNm, eIF4G et eRF3 ; stabilise l'association de eIF4F à la coiffe de l'ARNm |

Tableau 2 : Rôle des facteurs eIFs impliqués dans l'initiation de la traduction coiffe-dépendante des ARNm.

Chez les eucaryotes, l'initiation de la traduction de la majorité des ARNm est dépendante de leur structure coiffe m⁷GpppN en 5'. Elle fait intervenir au moins 12 facteurs canoniques d'initiation (eIFs, *eukaryotic Initiation Factors*) dont le recrutement est temporellement et spatialement régulé (Sonenberg and Hinnebusch 2009; Hinnebusch and Lorsch 2012; Hinnebusch et al. 2016). L'initiation de la traduction peut être divisée en quatre étapes principales (Figure 17 et Tableau 2) : (i) la formation d'un complexe eIF4F à l'extrémité 5' de l'ARNm) ; (ii) la formation d'un complexe de pré-initiation 43S (43S PIC, *Pre-Initiation Complex*) ; (iii) le recrutement du complexe 43S PIC par le complexe eIF4F et le balayage de la région 5' UTR de l'ARNm ; (iv) la reconnaissance du codon d'initiation AUG et l'assemblage du ribosome 80S.

a - Le complexe eIF4F et la protéine PABP

Le complexe hétérotrimérique eIF4F est composé du facteur eIF4E, de l'ARN hélicase eIF4A et de la protéine eIF4G (Grifo et al. 1983; Merrick 2015).

Le facteur eIF4E

Le facteur d'initiation eIF4E est une protéine de 24.5 kDa dont la fonction principale est de lier la structure coiffe de l'ARNm, comme cela a été démontré par chromatographie d'affinité avec des billes m⁷GTP-Sepharose (Sonenberg et al. 1978; 1979). La protéine eIF4E interagit avec la coiffe 7-méthylguanosine grâce à deux résidus tryptophane spécifiques (Marcotrigiano et al. 1997) (Figure 18). eIF4E interagit aussi avec le facteur d'initiation eIF4G sur sa face opposée, ce qui augmente son affinité pour la coiffe de l'ARNm (Haar et al. 2000). *In vitro*, dans un lysat de réticulocytes de lapin (RRL), il est possible de titrer la protéine eIF4E par l'ajout d'analogues moléculaires de la coiffe, ce qui inhibe l'initiation de la traduction coiffe-dépendante de l'ARNm (Soto Rifo et al. 2007). Physiologiquement, l'activité de eIF4E peut être régulée par les protéines 4E-BP (*eIF4E-Binding Proteins*) (Pause et al. 1994). Chez les mammifères, trois protéines 4E-BP1-3 ont été décrites dont les activités sont régulées par phosphorylation *via* la voie de signalisation mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). Sous leurs formes hypophosphorylées, les protéines 4E-BP interagissent avec eIF4E et inhibent la traduction, alors que les protéines 4E-BP hyperphosphorylées ne lient pas eIF4E (Gingras et al. 1999; Ma and Blenis 2009). Comme les protéines 4E-BP et eIF4G ont un site de liaison commun, ces protéines entrent donc en compétition pour interagir avec le facteur eIF4E (Mader et al. 1995; Peter et al. 2015).

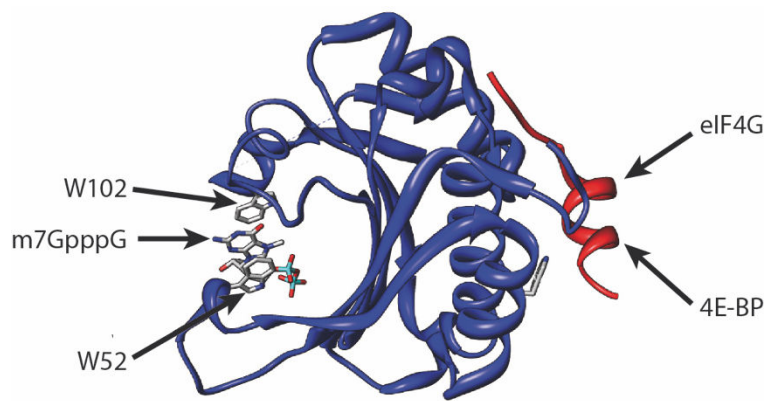


Figure 18 : Structure tridimensionnelle du facteur d'initiation eIF4E. La protéine eIF4E interagit avec la coiffe de l'ARNm grâce à deux résidus tryptophane W52 et W102 qui forment une cavité. Les protéines eIF4G et 4E-BP interagissent de façon mutuellement exclusives avec la surface opposée de eIF4E (adapté de (Goodfellow and Roberts 2008)).

Le facteur eIF4A

La deuxième sous-unité du complexe eIF4F est la protéine eIF4A. eIF4A est une protéine de 46 kDa qui possède une activité hélicase ARN et ATP dépendante (Grifo et al. 1982; Ray et al. 1985). eIF4A participe à la fois au déroulement de la structure secondaire de l'ARNm à proximité immédiate de la coiffe afin d'augmenter le recrutement du complexe 43S PIC, et au déroulement des autres structures secondaires lors du balayage de la région 5' UTR de l'ARNm (Rozen et al. 1990; Svitkin et al. 2001).

L'étude structurale de eIF4A a permis de mettre en évidence un motif très conservé parmi de nombreuses hélicases appelé DEAD-box, en référence à sa séquence en acides aminés (acide aspartique – acide glutamique – alanine – acide aspartique) (Linder et al. 1989) (Figure 19). Les hélicases de la famille DEAD-box ou DDX (*DEAD-box RNA helicase*) partagent toutes neuf motifs conservés impliqués dans leur activité ATPase et/ou de liaison à l'ARN (Linder and Jankowsky 2011). *In vitro*, l'initiation de la traduction peut être diminuée en ciblant la protéine eIF4A à l'aide de molécules chimiques comme l'hippuristanol ou la pateamine A (Bordeleau et al. 2006b; 2006a). *In vivo*, l'activité de eIF4A est finement régulée par deux autres facteurs d'initiation, eIF4B et eIF4H (Rogers et al. 2001).

De manière intéressante, il existe trois isoformes d'eIF4A chez les mammifères : eIF4AI, eIF4AII et eIF4AIII. eIF4AI et II ont une homologie de 95 % et sont fonctionnellement identiques, alors que la protéine eIF4AIII a seulement une homologie

de 65 % avec ces protéines, et est une protéine du cœur de l'EJC (*Exon Junction Complex*) (Chan et al. 2004).

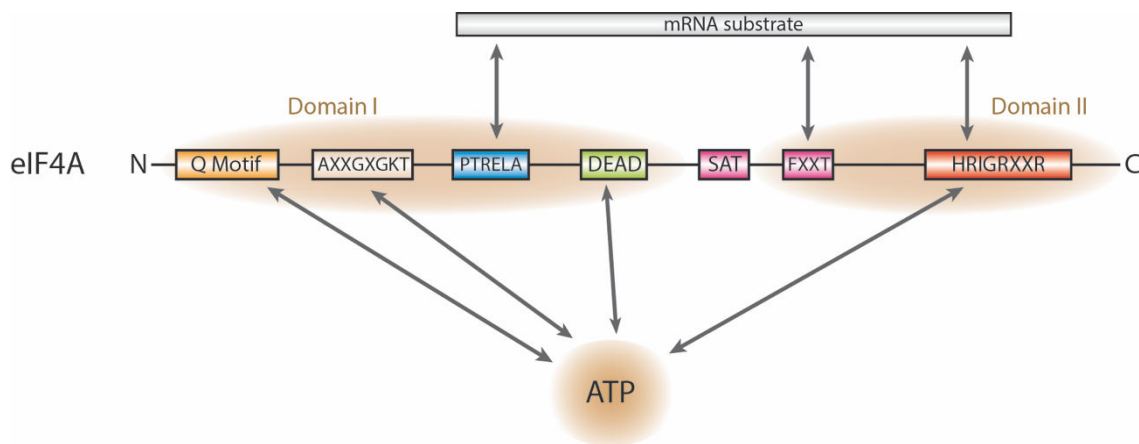


Figure 19 : Structure et fonctions de l'ARN hélicase à DEAD-box eIF4A. La protéine eIF4A peut être divisée en deux grands domaines, un domaine N-terminal (domaine I) et un domaine C-terminal (domaine II). Dans le domaine I, plusieurs motifs tels que le motif Q, AXXGXGKT et DEAD se lient à l'ATP et portent l'activité ATPase. Le motif PTRELA lie l'ARN cible. Dans le domaine II, les motifs FXXT et HRIGRXXR lient tous les deux l'ARNm cible. De plus, le motif HRIGRXXR interagit avec l'ATP ; le motif SAT lie et hydrolyse l'ATP nécessaire au changement de conformation pour l'activité hélicase d'eIF4A.

Le facteur eIF4G

La dernière sous-unité du complexe eIF4F est la protéine eIF4G. eIF4G est une protéine de 175 kDa qui a initialement été caractérisée comme étant capable de restaurer la synthèse protéique dans un lysat de cellules préalablement infectées par le poliovirus (PV) (Tahara et al. 1981).

La protéine eIF4G joue un rôle central dans la traduction en interagissant avec de nombreux facteurs d'initiation, assurant ainsi le lien entre la coiffe de l'ARNm et la sous-unité 40S du ribosome (Figure 20). Au sein du complexe eIF4F, eIF4G interagit à la fois avec eIF4E grâce à son domaine N-terminal, et avec l'ARN hélicase eIF4A grâce à ses domaines central- et C-terminal (Lamphear et al. 1995; Imataka and Sonenberg 1997; Morino et al. 2000; Korneeva et al. 2001). Le domaine central d'eIF4G interagit aussi avec le facteur eIF3, ce qui lui permet de recruter la sous-unité 40S du ribosome au sein du complexe 43S PIC (Marcotrigiano et al. 2001; LeFebvre et al. 2006). En outre, eIF4G est également capable de lier l'ARNm à travers plusieurs domaines RBD, dont un domaine de type RRM (Prévôt et al. 2003b; Yanagiya et al. 2009).

En plus de son rôle direct dans le recrutement du complexe 43S PIC, le facteur eIF4G interagit aussi grâce à sa région N-terminale avec la protéine PABP, qui lie la queue poly(A) de l'ARNm (Imataka et al. 1998). De façon remarquable, l'interaction eIF4G/PABP permet le rapprochement des extrémités 5' et 3' de l'ARNm sous une conformation particulière appelée « closed-loop » (Wells et al. 1998).

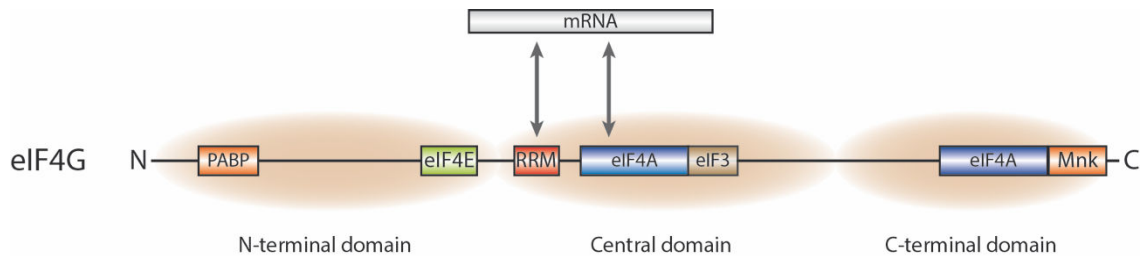


Figure 20 : Structure et fonctions du facteur d'initiation eIF4G. La protéine eIF4G peut être divisée en trois domaines fonctionnels : un domaine N-terminal qui lie les protéines PABP et eIF4E ; un domaine central impliqué dans l'interaction avec eIF4A et eIF3, et qui a aussi deux domaines de liaison à l'ARNm ; enfin, un domaine C-terminal qui contient un site supplémentaire d'interaction avec eIF4A, et une région d'interaction avec la kinase Mnk qui phosphoryle notamment le facteur d'initiation eIF4E.

La protéine PABP

La protéine PABP (aussi appelée PABP1 ou PABPC1) impliquée dans l'initiation de la traduction est une protéine de 70 kDa capable d'interagir avec la queue poly(A) de l'ARNm (Blobel 1973). La PABP lie 12 adénosines mais recouvre au total 25 à 27 nucléotides et peut multimériser le long de la queue poly(A) (Baer and Kornberg 1980; 1983; Sachs et al. 1987).

Chez l'homme, plusieurs PABP ont été identifiées et regroupées au sein d'une famille de protéines comprenant cinq membres : PABPC1, PABPC3 et PABPC5 (*PABP Cytoplasmic 1, 3 and 5*) ; iPABP (*inducible PABP*) ; PABPN1 (*PABP Nuclear 1*) (Eliseeva et al. 2013; Goss and Kleiman 2013). PABPN1 interagit dans le noyau avec la queue poly(A) des ARNm au cours de leur maturation. La protéine PABPC5 est liée au chromosome X alors que la protéine iPABP est exprimée spécifiquement dans les lymphocytes T. PABPC1 est exprimée de façon ubiquitaire et est principalement cytoplasmique, mais elle peut être relocalisée dans le noyau à la suite d'un stress cellulaire ou d'une infection virale (Afonina et al. 1998; Smith et al. 2014). La protéine PABPC1, plus communément appelée PABP, est celle dont la fonction est la mieux caractérisée.

Structurellement, la protéine PABP contient plusieurs domaines fonctionnels : un domaine N-terminal comprenant quatre RRM distincts, et un domaine C-terminal modulant son activité (Adam et al. 1986; Melo et al. 2003) (Figure 21). Les deux premiers RRM (RRM1+2) ont une forte affinité pour la queue poly(A), alors que les autres RRM (RRM3+4) interagissent faiblement avec l'ARN et auraient donc un rôle de régulateur (Burd et al. 1991; Deo et al. 1999; Khanam et al. 2006). De plus, le RRM2 est impliqué dans la liaison de PABP avec le facteur d'initiation eIF4G (Kessler and Sachs 1998). Le domaine C-terminal de PABP contient une région riche en proline (appelée « Linker ») impliquée dans l'homodimérisation de PABP, suivi d'un domaine MLLE (methionine – leucine – leucine – acide glutamique) responsable d'interactions avec d'autres protéines (Kozlov et al. 2001; Derry et al. 2006). Ainsi, le domaine MLLE (auparavant appelé PABC) lie le facteur d'initiation eIF4B (Bushell et al. 2001), et régule l'activité de PABP en interagissant avec les protéines Paip-1 et Paip-2 (*PABP-interacting protein-1 and -2*) (Craig et al. 1998; Khaleghpour et al. 2001).

La protéine PABP a une fonction importante dans le contrôle de la dégradation des ARNm cytoplasmiques qui débute généralement par leur déadénylation (Schoenberg and Maquat 2012). Elle est également impliquée dans la voie des miRNA car elle interagit avec la protéine GW182 du complexe miRISC (*miRNA-Induced Silencing Complex*) (Jonas and Izaurralde 2015). Enfin, de par son interaction avec eIF4G, la protéine PABP permet aussi la circularisation des ARNm et la stimulation de leur traduction (Kahvejian et al. 2005). Cette conformation des ARNm appelée « closed-loop » a été visualisée à la fois par microscopie à force atomique et par microscopie électronique (Wells et al. 1998; Kopeina et al. 2008), et est également soutenue par des études fonctionnelles (Soto Rifo et al. 2007; Amrani et al. 2008). *In vitro*, la traduction d'ARNm coiffés et polyadénylés dans un lysat de RRL est plus efficace que la traduction d'ARNm non-coiffés et/ou non-polyadénylés (Soto Rifo et al. 2007), démontrant la synergie de la coiffe et de la queue poly(A) dans la traduction. Le mécanisme par lequel l'interaction eIF4G/PABP stimule la traduction reste encore peu compris. Comme la protéine PABP interagit aussi avec le facteur d'initiation eIF4B et le facteur de terminaison eRF3, il a été proposé que l'interaction eIF4G/PABP favoriserait le recyclage des sous-unités du ribosome vers la coiffe de l'ARNm après la dissociation du ribosome 80S à un codon stop (Amrani et al. 2008).

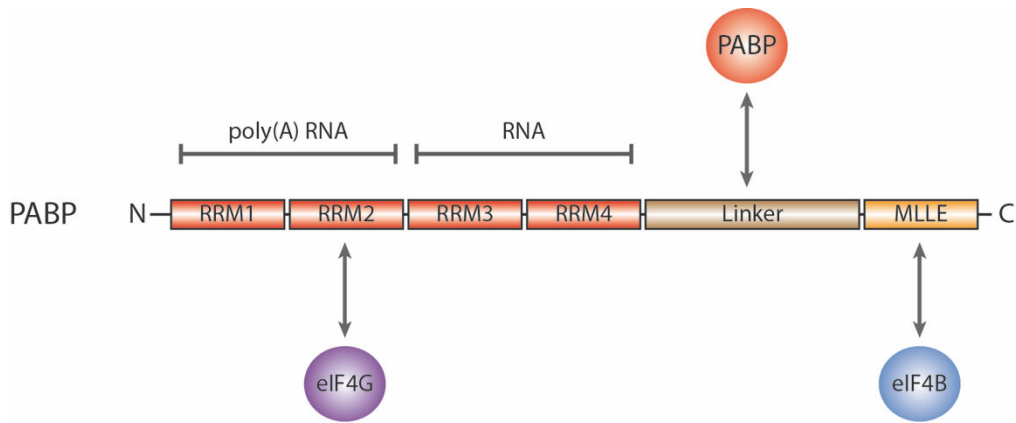


Figure 21 : Structure et fonctions de la protéine cytoplasmique PABP. La protéine PABP contient 4 RRM dans sa région N-terminale ; les RRM1 et 2 sont responsables de l'interaction avec la queue poly(A) alors que les RRM3+4 lie l'ARN de façon non-spécifique. Le RRM2 est par ailleurs responsable de l'interaction avec eIF4G. La région C-terminale de PABP contient un domaine Linker important dans l'homodimérisation de PABP, suivi d'un domaine MLE impliqué dans l'interaction avec le facteur d'initiation eIF4B.

b - Le complexe de pré-initiation 43S

En parallèle à la formation du complexe eIF4F au niveau de la coiffe de l'ARNm, le complexe de pré-initiation 43S (43S PIC) est assemblé. Ce complexe comprend le complexe ternaire eIF2-TC (*eIF2-Ternary Complex*) et la sous-unité 40S du ribosome associée aux facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 (Jackson et al. 2010a; Hinnebusch 2014).

Le complexe ternaire eIF2-TC est constitué du facteur d'initiation eIF2 associé au GTP et à l'ARNt-Méthionine initiateur (Met-tRNA_i) (Figure 22). Le facteur eIF2 est composé de trois sous-unités : α , β et γ . eIF2 γ interagit à la fois avec une molécule de GTP et le Met-tRNA_i, et a une activité GTPase (Erickson and Hannig 1996; Kapp and Lorsch 2004). eIF2 β lie le Met-tRNA_i et le facteur d'initiation eIF5, mais semble jouer un rôle mineur (Asano et al. 1999; Naveau et al. 2013). Enfin, la sous-unité α régule le recyclage de la forme eIF2-GDP inactive à la forme eIF2-GTP active *via* le facteur eIF2B qui a une fonction de GEF (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*) (Rowlands et al. 1988; Gordiyenko et al. 2014). De manière intéressante, eIF2 α peut être phosphorylée par quatre sérine-thréonine kinases : PKR (*Protein Kinase dsRNA-dependent*), PERK (*PKR-like ER Kinase*), GCN2 (*General Control Non-derepressible-2*) et HRI (*Heme-Regulated Inhibitor*), qui sont activées en réponse à différents stress (Donnelly et al. 2013). La phosphorylation de eIF2 α

sur le résidu Ser-51 inhibe le recyclage de la forme eIF2-GDP à eIF2-GTP, et par conséquent l'initiation de la traduction (Dever et al. 1992; Dever 2002).

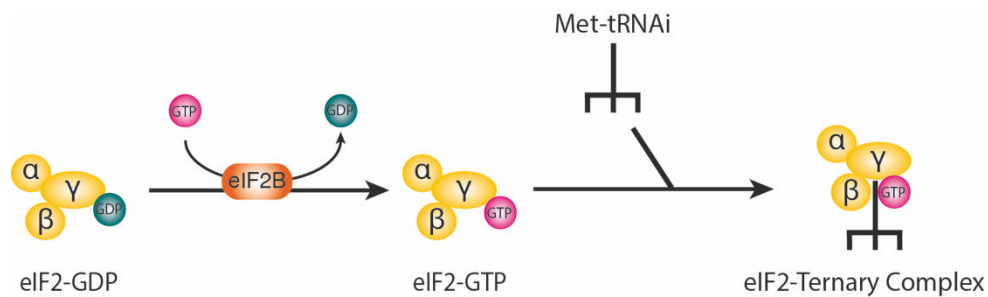


Figure 22 : Formation du complexe ternaire eIF2-TC. eIF2 inactif (constitué de trois sous-unités α , β et γ) lié à une molécule de GDP est recyclé par le facteur d'initiation eIF2B sous la forme eIF2-GTP. La forme active de eIF2 se lie ensuite à l'ARNt-Méthionine initiateur (Met-tRNAi) pour former le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNAi.

Une fois le complexe ternaire eIF2-TC formé, celui-ci s'associe avec la sous-unité 40S du ribosome et les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 pour former le complexe de pré-initiation 43S PIC (Hinnebusch 2014) (Figure 17). Deux modèles d'assemblage du complexe 43S PIC sont décrits : (i) un assemblage stochastique des différents facteurs, comme dans le modèle de la traduction procaryote, où chaque facteur d'initiation se lie individuellement à la sous-unité 40S. En accord avec ce modèle, il a été montré que chacun des facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 interagit directement avec la sous-unité 40S, mais pas le facteur eIF5 (Majumdar et al. 2003; Kolupaeva et al. 2005) ; (ii) un assemblage ordonné où les facteurs eIF1, eIF3 et eIF5 s'associent d'abord au complexe ternaire pour constituer un complexe multi-facteurs (MFC), celui-ci interagit ensuite avec la sous-unité 40S du ribosome *via* le facteur eIF1A (Asano 2000; Sokabe et al. 2012). Des études chez *S. cerevisiae* ont montré que eIF1, eIF2-TC, eIF3 et eIF5 peuvent former *in vitro* un complexe MFC stable (Aylett et al. 2015). Cependant, son existence dans les cellules de mammifères reste controversé car seules les interactions eIF1/eIF3 et eIF2 β /eIF5 ont été démontrées *in vitro* (Fletcher et al. 1999; Bieniossek et al. 2006). Dans les cellules de mammifères, le complexe MFC pourrait donc se former une fois la liaison avec la sous-unité 40S établie, afin de stabiliser les interactions du complexe 43S PIC.

c - Le balayage de la région 5' UTR de l'ARNm par le complexe 43S PIC

Le complexe 43S PIC est recruté sur l'ARNm grâce au complexe eIF4F qui interagit, d'une part avec la coiffe de l'ARNm *via* la protéine eIF4E, et d'autre part avec le facteur eIF3 du complexe 43S PIC *via* la protéine eIF4G (Kumar et al. 2016). Une fois ce complexe 48S formé, la sous-unité 40S du ribosome associée à certains facteurs d'initiation peut alors balayer la région 5' UTR de l'ARNm à la recherche du codon d'initiation (Hinnebusch 2014; Archer et al. 2016) (Figure 17).

La reconnaissance du codon d'initiation est une étape clé de la traduction chez les procaryotes et les eucaryotes. Chez les bactéries, la plupart des ARNm sont polycistroniques et par conséquent, chaque ARNm a plusieurs sites d'initiation de la traduction. La séquence Shine-Dalgarno (SD) située en amont de chaque codon d'initiation assure le recrutement de la sous-unité 30S du ribosome *via* son appariement avec une séquence complémentaire présente dans l'ARNr 16S (Shine and Dalgarno 1974; Calogero et al. 1988). En revanche, chez les eucaryotes, les ARNm sont majoritairement monocistroniques et le codon d'initiation est souvent le premier AUG situé en 5' de l'ARNm. Le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome sur la coiffe et le balayage de la région 5' UTR assure ainsi la reconnaissance et la sélection du codon d'initiation AUG.

L'étape de balayage (ou « scanning ») de la région 5' UTR par le complexe de pré-initiation nécessite que les structures secondaires de l'ARNm soient dénaturées. Une étude récente a montré que la vitesse de balayage du complexe PIC est comprise entre 6 à 8 bases par seconde, même en présence de motifs fortement structurés dans la région 5' UTR (Vassilenko et al. 2011). De plus, l'analyse de la traduction de plusieurs ARNm rapporteurs avec une taille variable de leur 5' UTR a démontré que la relation entre le temps de balayage du complexe PIC et la longueur de la 5' UTR est linéaire (Vassilenko et al. 2011). L'ensemble de ces résultats indiquent que le complexe PIC a une activité ARN hélicase intrinsèque.

Le facteur d'initiation eIF4A a longtemps été considéré comme l'ARN hélicase canonique du complexe PIC mais des hélicases supplémentaires ont récemment été caractérisées (Parsyan et al. 2011). Ainsi, il a été montré que l'ARN hélicase DHX29 facilite la traduction des ARNm dont la région 5' UTR est très structurée (Pisareva et al. 2008). La protéine DDX3 est également impliquée dans la traduction de certains ARNm, comme l'ARN génomique de HIV-1 qui présente la structure tige boucle TAR (*Trans-Activation Response element*) en 5' (Lee et al. 2008; Soto Rifo et al. 2012; 2013). De manière intéressante, des travaux chez la levure ont montré que l'ARN hélicase Ded1, l'homologue

de DDX3 s'associe à la fois aux complexes nucléaire CBC et cytoplasmique eIF4F de liaison de la coiffe, et que son activité enzymatique est stimulée par ces facteurs (Hilliker et al. 2011; Senissar et al. 2014). De ce fait, l'ARN hélicase Ded1 est un cofacteur important du complexe eIF4F qui est recruté sur les ARNm dans le noyau, et pourrait donc participer chez la levure au remodelage des mRNPs à différentes étapes de leur vie.

d - La reconnaissance du codon d'initiation et l'assemblage du ribosome

Les travaux pionniers de Marylin Kozak lui ont permis à la fin des années 1970 de proposer le modèle actuel d'initiation de la traduction par balayage de la région 5' UTR de l'ARNm jusqu'à la reconnaissance du premier codon d'initiation AUG (Kozak 1978) (Figure 17).

Une étude empirique de la séquence de la région 5' UTR de 699 ARNm a permis de définir un contexte nucléotidique optimal pour la reconnaissance de l'AUG initiateur : GCC(A/G)CCAUGG, où une purine en position -3 et une guanosine en position +4 sont les déterminants principaux (le +1 correspondant à l'adénosine du codon initiateur) (Kozak 1987; 1997). Ainsi, si le complexe de pré-initiation rencontre un codon AUG avec un contexte nucléotidique défavorable, il est ignoré, et on parle alors de « leaky scanning » (Kozak 1989; 2002). De plus, Marylin Kozak a également montré que la taille de la région 5' UTR a un rôle important dans la sélection du codon d'initiation. Ainsi, si le premier AUG se situe à une distance inférieure à 12 nucléotides de la coiffe de l'ARNm, celui-ci n'est pas reconnu et l'élongation de la traduction débute au second AUG (Kozak 1980; 1986a; 1986b). Le développement récent des outils de bioinformatique et de la technique de « ribosome profiling », permettant de déterminer la répartition et la quantité de ribosomes le long de l'ARNm par séquençage à haut débit, a permis d'actualiser le modèle proposé par Marylin Kozak (Ingolia et al. 2009; Ingolia 2014; Brar and Weissman 2015; Ingolia 2016). Il a été montré que certains ARNm contiennent des sites d'initiation de la traduction en amont du cadre de lecture (uORF, *upstream Open Reading Frame*), et des codons d'initiation non conventionnels (CUG, ACG, GUG) (Wegrzyn et al. 2008; Wethmar 2014).

Au cours du balayage de la région 5' UTR de l'ARNm, les facteurs d'initiation eIF1 et eIF1A jouent un rôle déterminant pour assurer la fidélité de l'initiation de la traduction. Ceux-ci permettent le maintien de la conformation « ouverte » de la sous-unité 40S du ribosome propice à l'étape de balayage (Pestova et al. 1998; Pestova and Kolupaeva 2002; Passmore et al. 2007). eIF1 permet au complexe de pré-initiation de distinguer les codons AUG présents dans un contexte nucléotidique favorable, de ceux présents dans un mauvais

contexte (Lind and Åqvist 2016). En effet, son interaction avec le facteur eIF5 empêche l'hydrolyse du GTP du complexe ternaire eIF2-TC (Reibarkh et al. 2008). Lorsque le codon d'initiation est reconnu, l'appariement du codon avec l'anticodon est accompagné de l'interaction du facteur eIF1A avec la sous-unité 40S et du déplacement du facteur eIF1 au niveau du site P du ribosome (Weisser et al. 2013). Le départ de la protéine eIF1 provoque alors le passage de la sous-unité 40S du ribosome à une conformation « fermée » (Maag et al. 2005; Hussain et al. 2014). En parallèle, le GTP du complexe ternaire est hydrolysé avec l'aide du facteur eIF5, et l'activité GTPase du facteur eIF5B permet l'association des sous-unités 40S et 60S pour former un ribosome 80S compétent pour l'élongation (Pestova et al. 2000; Acker et al. 2006; Fernández et al. 2013; Lomakin and Steitz 2013; Saini et al. 2014).

3. Les RBPs et le contrôle de la traduction

La traduction des ARNm peut être activée et/ou réprimée par différents acteurs, dont les principaux sont les miRNAs et les protéines de liaison à l'ARN (RBPs). Parmi les RBPs, il a été montré que le complexe EJC et certaines protéines SR peuvent moduler la traduction (Singh et al. 2015).

a - Le complexe EJC

Le complexe EJC (*Exon Junction Complex*) illustre parfaitement comment les RBPs assurent la communication entre les différentes étapes de la maturation des ARNm, et influencent à la fois leur export, leur localisation, leur dégradation et leur traduction dans le cytoplasme (Le Hir et al. 2016).

Au début des années 2000, des expériences de cross-link *in vitro* et de digestion à la RNase H ont permis de montrer que le complexe EJC est déposé sur l'ARNm par la machinerie d'épissage 20 à 24 nucléotides en amont des jonctions exon-exon (Le Hir et al. 2000a; 2000b). Bien que la composition de ce complexe soit très dynamique, il a été identifié un complexe « cœur » tétramérique qui lie l'ARNm de façon stable, et qui peut s'associer à des facteurs périphériques nucléaires et/ou cytoplasmiques.

Le cœur de l'EJC est composé de l'hétérodimère Magoh-Y14, de l'ARN hélicase à DEAD-box eIF4AIII et de la protéine MLN51 (appelée Barentz chez la drosophile) (Kataoka et al. 2000; 2001; Chan et al. 2004; Degot et al. 2004) (Figure 23). De façon remarquable, l'utilisation de protéines recombinantes et la structure cristallographique du cœur de l'EJC ont révélé que la protéine eIF4AIII agit comme une « pince » serrant

l'ARNm, et permet la fixation du complexe indépendamment de la séquence ARN (Ballut et al. 2005; Andersen et al. 2006; Bono et al. 2006). Plus récemment, il a été montré que le cœur de l'EJC est recruté sur l'ARNm grâce à la protéine CWC22, un composant du spliceosome qui interagit de façon directe avec l'ARN hélicase eIF4AIII (Barbosa et al. 2012; Steckelberg et al. 2012). Une fois dans le cytoplasme, le complexe EJC est dissocié au cours du « pioneer round of translation »¹ grâce à la protéine PYM (*Partner of Y14 and Magoh*), qui interagit à la fois avec le dimère Magoh-Y14 et la sous-unité 40S du ribosome (Gehring et al. 2009).

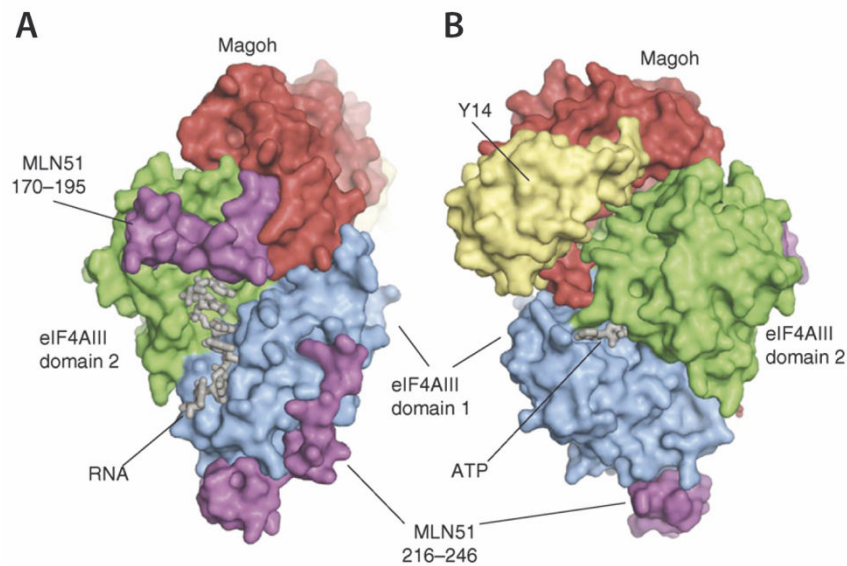


Figure 23 : Structure cristallographique du cœur du complexe EJC. Représentation du cœur du complexe EJC comprenant les protéines MLN51 (en magenta), Magoh (en rouge), Y14 (en jaune) et eIF4AIII (en bleu et en vert). Les protéines sont dans un complexe lié à un fragment d'ARN (en gris) et à une molécule d'ATP non-hydrolysable. Les représentations graphiques (A) et (B) montrent la disposition des différents éléments selon deux vues différentes. D'après (Le Hir and Andersen 2008).

Le complexe EJC, déposé sur les ARNm dans le noyau au cours de l'épissage, est capable de moduler leur traduction dans le cytoplasme (Le Hir and Séraphin 2008). Les premiers éléments démontrant un rôle de ce complexe dans la traduction ont été apportés peu de temps après sa caractérisation (Nott 2003; Nott et al. 2004). En effet, l'ajout d'un intron en 5' du gène rapporteur Renilla luciférase entraîne une augmentation significative

¹ Le « pioneer round of translation » est un modèle d'initiation de la traduction faisant intervenir le complexe CBC, avant que celui ne soit remplacé par le facteur canonique eIF4E (Maquat et al. 2010).

de l'activité luciférase ; cet effet est le résultat à la fois de l'augmentation de la quantité d'ARNm luciférase cytoplasmique et de son efficacité de traduction (Nott 2003). De plus, la présence d'un intron en 5' du gène rapporteur entraîne une délocalisation du transcrit dans les polysomes, dû à la présence de complexes EJC (Nott et al. 2004). Enfin, la stimulation de la traduction et la délocalisation des ARNm dans les fractions polysomales peuvent être reproduits artificiellement par des expériences de « tethering » des composants du complexe EJC sur un ARNm issu d'un gène sans intron (Nott et al. 2004).

Des travaux de plusieurs équipes ont caractérisé les mécanismes moléculaires permettant au complexe EJC de stimuler la traduction. En 2008, une étude a identifié la protéine SKAR (*S6K1 Aly/REF-like target*) comme un nouveau facteur périphérique du complexe EJC (Ma et al. 2008). SKAR est un substrat de la kinase S6K1, dont l'activité est régulée par la voie de signalisation mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), et interagit préférentiellement avec les ARNm épissés et coiffés avec le complexe CBC, mais pas avec le facteur eIF4E (Richardson et al. 2004; Holz et al. 2005; Ma et al. 2008). De plus, la déplétion par shRNA de SKAR, de la kinase S6K1 ou de eIF4AIII du cœur du complexe EJC diminue l'efficacité de traduction d'un ARNm issu d'un gène rapporteur avec intron (Ma et al. 2008). Ainsi, il a été proposé que le recrutement de la kinase S6K1 par la protéine SKAR du complexe EJC permettrait de stimuler, *via* la voie de signalisation mTOR, la traduction des ARNm ayant subi l'épissage (Ma et al. 2008).

Une autre étude a montré que la protéine MLN51 du complexe EJC interagit avec le facteur eIF3 et active la traduction (Chazal et al. 2013). En effet, des expériences de surexpression et de déplétion par siRNA de chaque composant du cœur du complexe EJC ont montré que seule la protéine eIF4AIII influence l'efficacité de traduction d'un ARNm rapporteur Firefly luciférase (Chazal et al. 2013). Ces résultats peuvent être reproduits *in vitro* car la déplétion de MLN51 dans du lysat de réticulocytes de lapin (RRL) diminue la traduction d'un ARNm Renilla luciférase, et l'ajout de protéine Flag-MLN51 dans du RRLΔMLN51 restaure la traduction de cet ARNm (Chazal et al. 2013). Des analyses par co-immunoprécipitation avec des extraits cellulaires et par interaction *in vitro* avec des facteurs purifiés ont montré que MLN51 interagit avec le facteur d'initiation eIF3. Étant donné que la protéine eIF3 joue un rôle central dans l'initiation de la traduction (Hinnebusch 2006), l'ensemble de ces résultats indiquent que la protéine MLN51 assure le lien entre le complexe EJC et la machinerie de traduction (Chazal et al. 2013).

Enfin, des travaux récents ont montré que la protéine eIF4AIII augmente la traduction des ARNm coiffés par le complexe CBC (Choe et al. 2014). En effet, eIF4AIII est recruté sur le complexe CBC *via* son interaction directe avec la protéine CTIF (*CBC-dependent*

Translation Initiation Factor), une protéine homologue à eIF4G impliquée dans le « pioneer round of translation » (Kim et al. 2009; Choe et al. 2014). Par ailleurs, le recrutement de eIF4AIII sur la coiffe des ARNm semble indépendant de la présence d'un intron (Choe et al. 2014). De plus, des expériences de déplétion par siRNA de eIF4AIII montrent que eIF4AIII favorise la traduction des ARNm avec une structure tige-boucle dans leur région 5' UTR (Choe et al. 2014). Ainsi, ces travaux démontrent un nouveau rôle de l'ARN hélicase eIF4AIII dans le « pioneer round of translation » des ARNm.

De façon remarquable, une étude réalisée avec des cellules de drosophile a montré pour la première fois que le dépôt du complexe EJC n'est pas constitutif mais différentiel, car celui-ci n'est pas associé à toutes les jonctions exon-exon des transcrits (Saulière et al. 2010). Plus récemment, deux études indépendantes ont identifié à l'échelle du génome les sites de fixation du complexe EJC dans des cellules HeLa et HEK293 (Saulière et al. 2012; Singh et al. 2012). Ces études ont montré avec des approches différentes, de CLIP-seq (*Cross-Linking and ImmunoPrecipitation coupled to high-throughput sequencing*) et de RIPiT (*RNA : protein ImmunoPrecipitation in Tandem*), que le complexe EJC est associé à 80 % des jonctions exoniques (Saulière et al. 2012; Singh et al. 2012). De plus, elles ont révélé des sites de fixation non-canoniques du complexe EJC, car seulement 50 à 60 % des sites de liaison identifiés sont 24 nucléotides en amont de jonctions exon-exon (Saulière et al. 2012; Singh et al. 2012). L'analyse de ces sites de fixation non-canoniques a montré qu'ils sont à proximité immédiate de sites de liaison de protéines SR, et en accord avec cette observation, l'analyse par spectrométrie de masse des protéines associées à EJC a révélé la présence de nombreuses protéines SR (Saulière et al. 2012; Singh et al. 2012). L'ensemble de ces résultats suggèrent une étroite collaboration du complexe EJC et des protéines SR, et pourrait expliquer leurs nombreux parallèles fonctionnels.

b - Les protéines SR

La famille des protéines SR (*Serine/αArginine-rich*) est composée de 12 membres phylogénétiquement et structurellement conservés, identifiés dans les années 1990 de par leur fonction dans l'épissage des pré-ARNm (Zahler et al. 1993; Neugebauer et al. 1995). Ces protéines ont initialement été nommées en fonction de leur poids moléculaire, mais il a été récemment proposé de les renommer selon la nomenclature SRSF (*SR Splicing Factor*) suivi d'un nombre de 1 à 12 (Manley and Krainer 2010) (Figure 24).

Structurellement, toutes les protéines SR ont dans leur région N-terminale un ou deux domaine(s) de reconnaissance de l'ARN de type RRM (*RNA Recognition Motif*), et dans leur région C-terminale un domaine RS appelé ainsi à cause de sa richesse en résidus serine

et arginine et impliqué à la fois dans les interactions avec des protéines et avec l'ARN (Zhong et al. 2009; Ankö 2014). L'abondance de résidus serine confère aux protéines SR une grande capacité de phosphorylation par de nombreuses kinases tels que les protéines de la famille SRPK (*SR Protein specific Kinase*) (Gui et al. 1994), Clk (*Cyclin-dependent like kinase*) (Colwill et al. 1996), l'ADN topoisomerase I (Rossi et al. 1996) ou AKT (Blaustein et al. 2005). L'état de phosphorylation des protéines SR joue un rôle important dans la régulation de leur activité, en contrôlant notamment leur interaction avec certains composants du spliceosome et leur localisation subcellulaire (Soret and Tazi 2003; Xiang et al. 2013; Zhou and Fu 2013).

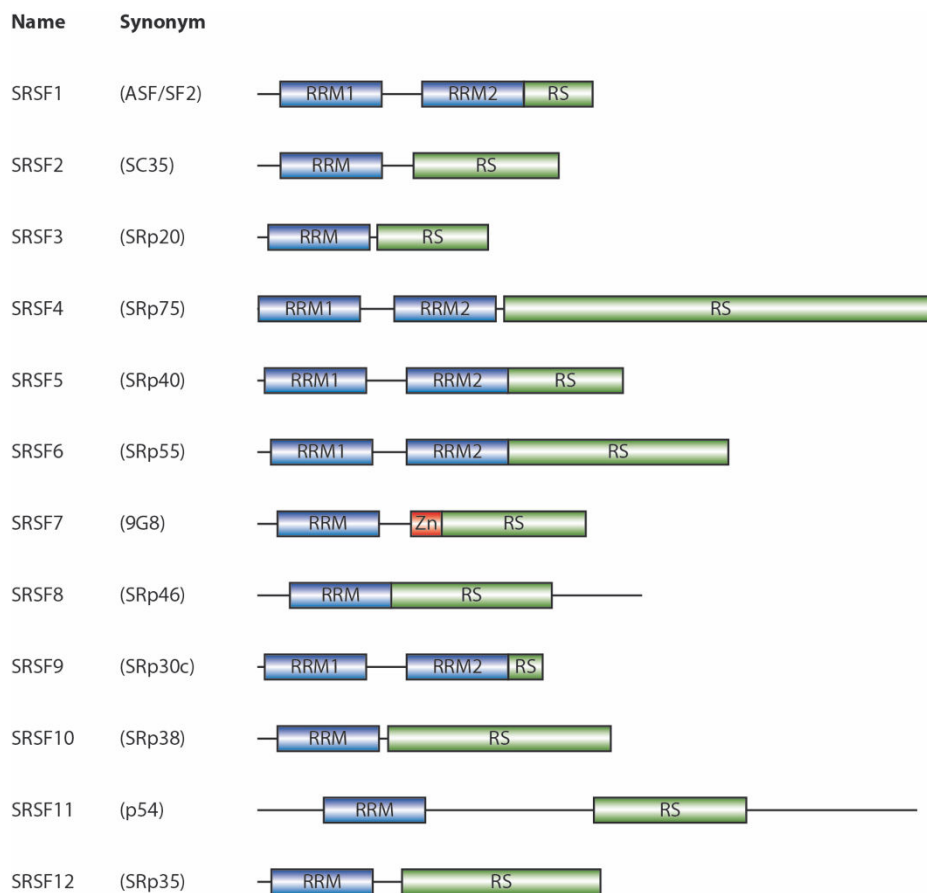


Figure 24 : Structure des protéines de la famille SR. Les protéines SR ont une structure semblable comprenant un ou deux domaine(s) RRM dans leur partie N-terminale, suivi d'un domaine RS dans leur partie C-terminale. SRSF7 contient un domaine supplémentaire à doigt de zinc (Zn).

Les protéines SR sont traditionnellement considérées comme (i) des protéines activatrices de l'épissage qui se fixent sur des séquences ESE (*Exonic Splicing Enhancer*) ; (ii) des protéines qui recrutent certains composants du spliceosome pour favoriser la

reconnaissance des sites d'épissage ; (iii) des protéines dont la fonction peut être antagonisée par les protéines hnRNP (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein*) ; et (iv) des protéines qui ont des sites préférentiels de fixation à l'ARN partiellement dégénérés, même si plusieurs protéines SR peuvent lier la même séquence ARN (Long and Cáceres 2009; Howard and Sanford 2014). L'étude par CLIP-seq des sites de fixation *in vivo* des protéines SR ont confirmé en partie ces observations (Sanford et al. 2009; Ankö et al. 2010; 2012; Pandit et al. 2013). En effet, il a été montré que les protéines SRSF1 (ASF/SF2) et SRSF2 (SC35) interagissent principalement avec des séquences exoniques (Sanford et al. 2009; Pandit et al. 2013). Par contre, les protéines SRSF3 (SRp20) et SRSF4 (SRp75) peuvent lier à la fois des séquences exoniques et introniques généralement proches des jonctions exon-intron, et de façon surprenante les ARNm d'histones issus de gènes sans intron et de nombreux ARNnc (Ankö et al. 2010; 2012).

Au cours de la dernière décennie, de nombreux travaux ont montré que la fonction des protéines SR ne se limite pas à celle de facteur d'épissage. Elles participent en particulier au couplage de l'épissage avec la transcription, car elles interagissent avec le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (La Mata and Kornblihtt 2006; Das et al. 2007). Cette interaction directe leur permet d'être recrutées co-transcriptionnellement sur le pré-ARNm naissant (Sapra et al. 2009). Réciproquement, l'interaction des protéines SR avec le CTD de l'ARN polymérase II régule la transcription. En effet, il a été montré que SRSF2 (SC35) interagit avec le facteur P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*) ce qui entraîne la phosphorylation des résidus Ser2 du CTD de l'ARN polymérase II, et par conséquent l'activation de l'élongation de la transcription (Lin et al. 2008; Ji et al. 2013).

En outre, les protéines SR ont aussi été décrites comme importantes dans le maintien de la stabilité génique (Li and Manley 2005). La déplétion de SRSF1 (ASF/SF2) dans des cellules entraîne l'apparition de cassures double-brin de l'ADN et la phosphorylation de l'histone H2AX (Li and Manley 2005). Dans le modèle proposé, SRSF1 empêcherait l'hybridation de l'ARNm nouvellement synthétisé avec le brin d'ADN complémentaire et l'apparition de structures « R-loop » mutagènes (Li and Manley 2005; Santos-Pereira and Aguilera 2015). En accord avec ce modèle, il a été montré que l'expression de la protéine SRSF1 est altérée dans de nombreux cancers (Das and Krainer 2014; Neelamraju et al. 2015).

Bien que les protéines SR soient nucléaires, certaines d'entre elles, SRSF1 (ASF/SF2), SRSF3 (SRp20) et SRSF7 (9G8), sont capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Cáceres et al. 1998). Ces trois protéines SR sont également capables d'interagir avec le facteur d'export TAP/NXF1 et de favoriser ainsi l'export nucléo-

cytoplasmique de certains ARNm, comme l'ARNm d'histone H2A issu d'un gène dépourvu d'intron (Huang and Steitz 2001; Huang et al. 2003; Huang and Steitz 2005; Müller-Mcnicoll et al. 2016).

Les protéines SRSF1 (ASF/SF2) et SRSF2 (SC35) stimulent aussi le processus de NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*) qui dégrade les ARNm contenant un codon de terminaison de traduction précoce (PTC) (Zhang and Krainer 2004). Dans le cas de SRSF1, cette propriété ne requiert pas la navette entre le noyau et le cytoplasme de la protéine, mais nécessite le domaine RS de SRSF1 (Zhang and Krainer 2004). Le rôle des protéines SR dans la voie NMD n'a pas été étudié davantage, mais on peut supposer qu'il est dû à leur association avec le complexe EJC.

Enfin, les protéines SR qui ont la capacité de faire la navette nucléo-cytoplasmique, SRSF1 (ASF/SF2), SRSF3 (SRp20) et SRSF7 (9G8), peuvent réguler la traduction de leurs ARNm cibles. En effet, SRSF1 est associée aux polysomes et stimule efficacement la traduction d'un ARNm rapporteur Firefly luciférase contenant une séquence ESE (Sanford et al. 2004). Plus récemment, il a été montré que SRSF1 interagit à la fois avec la kinase mTOR et la phosphatase PP2A, qui respectivement phosphoryle et dé-phosphoryle les protéines 4E-BP (Michlewski et al. 2008). Cette double interaction aboutit à l'hyperphosphorylation des protéines 4E-BP, et par conséquent stimule l'initiation de la traduction (Michlewski et al. 2008). Le mode d'action des protéines SRSF3 et SRSF7 sur la traduction de leurs ARNm cibles semble différents. La protéine SRSF3 est capable d'activer la traduction des ARNm viraux du poliovirus (PV) contenant une séquence IRES, en interagissant avec la protéine PCBP2 (*Poly(rC)-Binding Protein 2*) (Bedard et al. 2007). En accord avec ce modèle, il a été montré que SRSF3 est relocalisée du noyau vers le cytoplasme lors de l'infection par le poliovirus (Fitzgerald and Semler 2011). Par ailleurs, la protéine SRSF7 stimule la traduction des ARNm du rétrovirus MPMV (*Mason-Pfizer Monkey Virus*) qui contiennent un motif spécifique CTE (*Constitutive Transport Element*) (Swartz et al. 2007).

4. Régulation de la traduction par les virus

À l'exception des virus « géants » comme le Mimivirus¹, tous les virus utilisent les ribosomes et les facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison cellulaires pour traduire leurs ARNm en protéines. Au cours de l'évolution, les virus ont donc acquis diverses stratégies pour détourner à leur profit la machinerie cellulaire de traduction (Walsh et al. 2013; Glaunsinger 2015; Jan et al. 2016) : (i) certains virus à ADNdb (e.g. Herpèsvirus) codent pour une RBP qui lie les ARNm viraux et favorise leur traduction ; (ii) le virus Influenza code pour une polymérase capable de retirer la coiffe des ARNm cellulaires et de l'ajouter aux ARNm viraux (ce processus est connu sous le nom de « cap snatching ») ; (iii) certains virus (e.g. HPV) codent pour des protéines qui modifient la localisation subcellulaire ou l'état de phosphorylation de certains facteurs comme eIF2 α ou 4E-BP ; (iv) certains virus (e.g. PV, FMDV) codent pour une protéase qui clive certains facteurs d'initiation comme eIF4G ou PABP ; et (v) plusieurs virus à ARN (e.g. EMCV, HCV) ont dans leur région 5' UTR une structure de type IRES.

a - Les protéases virales

Les protéines eIF4G et PABP, impliquées dans l'initiation de la traduction coiffe-dépendante, peuvent être clivées par de nombreuses protéases virales (Lloyd 2006; Walsh and Mohr 2011; Mohr and Sonenberg 2012). Plus rarement, les facteurs d'initiation eIF4A et eIF5B peuvent aussi être clivés (Belsham et al. 2000; de Breyne et al. 2008).

Clivage de eIF4G

Certains picornavirus, comme PV (*PolioVirus*) et FMDV (*Foot-and-Mouth Disease Virus*), codent pour une protéase capable de cliver le facteur d'initiation eIF4G (Figure 25). Ainsi, lors de l'infection par PV, la protéase 2A (2Apro) clive eIF4G, libérant un fragment amino-terminal et un fragment carboxyl-terminal (Ventoso et al. 1998). Le fragment N-terminal contient les domaines de liaison à PABP et à eIF4E, et le fragment C-terminal (appelé p100) contient les domaines de liaison à eIF4A et eIF3. La protéase L (Lpro, *Leader protease*) de FMDV clive également eIF4G en deux fragments (Lamphear et al. 1995). Le site de clivage de 2Apro est situé entre les résidus d'acides aminés 681/682, alors

¹ Le génome du Mimivirus de 1.2 megabases contient 8 gènes codant pour des composants essentiels de l'appareil de traduction protéique : 4 aminoacyl tRNA synthetases, et 4 facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison (Raoult et al. 2004).

que Lpro clive entre les résidus d'acides aminés 674/675 (Glaser and Skern 2000). Dans les deux cas, le recrutement du complexe 43S PIC sur la coiffe des ARNm cellulaires est impossible et leur traduction est totalement inactivée. Par contre, le fragment C-terminal de eIF4G associé à eIF4A, eIF3 et au ribosome est suffisant pour la traduction des ARNm viraux (Ohlmann et al. 1996).

Les sites de clivage de la protéase (PR) de HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus-1*) sont différents de ceux des protéases des picornavirus (Ventoso et al. 2001; Prévôt et al. 2003a). Ce clivage en trois fragments de eIF4G entraîne alors l'inhibition du balayage du ribosome. Par ailleurs, la protéase PR clive uniquement eIF4GI, alors les protéases 2Apro et Lpro clivent indifféremment les facteurs eIF4GI et eIF4GII (Ohlmann et al. 2002; Perales et al. 2002).

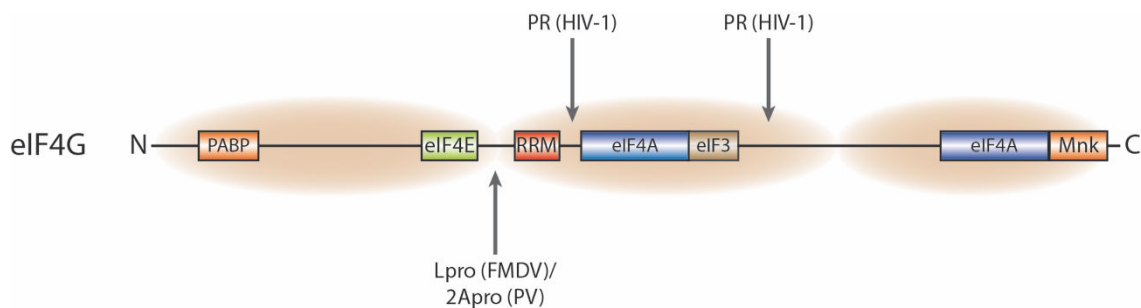


Figure 25 : Clivage de eIF4G par les protéases virales. La protéase 2A (2Apro) de PV et la protéase L (Lpro) de FMDV clivent eIF4G entre le domaine de liaison à eIF4E et le site de liaison à l'ARN (RRM). La protéase (PR) de HIV-1 a deux sites de clivage : le premier situé entre le domaine RRM et le domaine de liaison à eIF4A, et le second situé entre les domaines de liaison à eIF3 et eIF4A.

Clivage de PABP

La protéine PABP est une cible privilégiée au cours des infections virales (Smith and Gray 2010). De façon remarquable, la protéase 2Apro de PV, qui a comme substrat le facteur eIF4G, clive aussi PABP (Figure 26). Le site de clivage de 2Apro est situé dans le domaine « Linker » de PABP, ce qui dissocie la région N-terminale contenant les RRM de la région C-terminale impliquée dans les interactions protéine-protéine (Joachims et al. 1999). Cette activité de 2Apro de PV n'est pas conservée par la Lpro de FMDV, qui clive uniquement eIF4G. De plus, le poliovirus code pour la protéase 3C (3Cpro) qui a trois sites de clivage dans le domaine « Linker » (Kuyumcu-Martinez et al. 2002). Cette protéolyse de PABP par 2Apro et 3Cpro de PV ne modifie pas la stabilité des ARNm, mais inhibe la traduction des ARNm polyadénylés (Kuyumcu-Martinez et al. 2004). Enfin, la protéase

(PR) de HIV-1 clive la protéine PABP à la fois dans le RRM3 et dans son domaine « Linker » (Alvarez et al. 2006). Le clivage par PR de eIF4G et PABP inhibe l'initiation de la traduction coiffe- et poly(A)-dépendante, mais n'affecte pas la traduction de l'ARN génomique de HIV-1 (Castello et al. 2009).

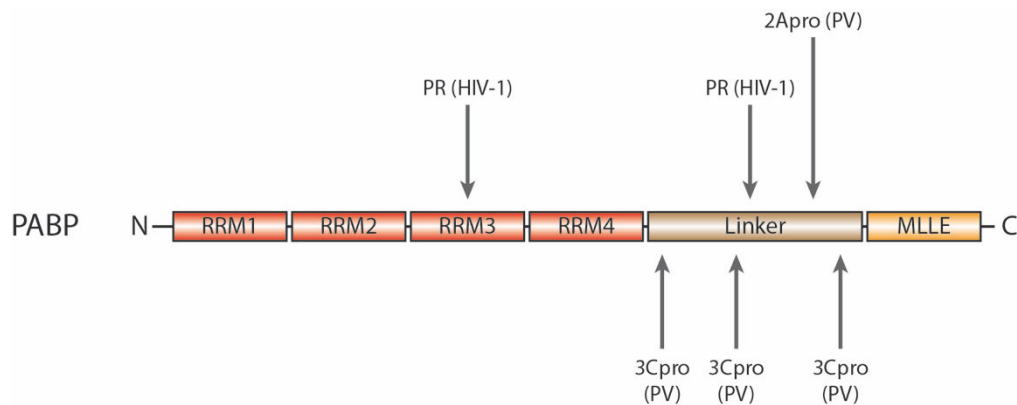


Figure 26 : Clivage de PABP par les protéases virales. Les protéases 2A (2Apro) et 3C (3Cpro) de PV clivent PABP respectivement une et trois fois dans son domaine « Linker ». La protéase (PR) de HIV-1 a deux sites de clivage dans la protéine PABP : un premier dans le RRM3 et un second dans le domaine « Linker ».

b - Les séquences IRES

En parallèle à la voie classique d'initiation de la traduction dépendante de la coiffe des ARNm, il existe au moins deux alternatives possibles. La première, caractérisée très récemment, est dépendante des modifications m(6)A (N6-méthyladenosine) des ARNm¹ (Meyer et al. 2015; Wang et al. 2015b; Zhou et al. 2015a). Ces travaux révèlent deux mécanismes possibles d'initiation de la traduction par les m(6)A : (i) la présence de m(6)A dans la région 5' UTR de l'ARNm permet le recrutement du complexe 43S PIC *via* une interaction directe avec le facteur d'initiation eIF3 (Meyer et al. 2015) ; (ii) la protéine YTHDF1, qui lie spécifiquement les m(6)A dans la région 3' UTR de l'ARNm, est associée avec certains facteurs d'initiation et le ribosome, et facilite ainsi leur recrutement grâce à la conformation « closed-loop » de l'ARNm (Wang et al. 2015b). Il est intéressant de noter que les méthylation m(6)A de l'ARNm ne modifient la traduction qu'en condition de stress cellulaire (Zhou et al. 2015a).

¹ La méthylation m(6)A est la modification interne la plus fréquente des ARNm (environ 20 % du transcriptome chez les mammifères) (Fu et al. 2014; Meyer and Jaffrey 2014; Gilbert et al. 2016).

La seconde alternative possible d'initiation de la traduction est dépendante des IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*). Ces séquences très structurées, localisées le plus souvent dans la région 5' UTR de l'ARNm¹, permettent un recrutement direct de la sous-unité 40S du ribosome à proximité du codon d'initiation (Hellen 2009; Thompson 2012). Les IRES ont été initialement caractérisés chez les virus, mais ils ont été depuis fonctionnellement identifiés dans plus de 80 ARNm cellulaires, dont l'ARNm codant pour le proto-oncogène *c-myc* (Jackson 2013).

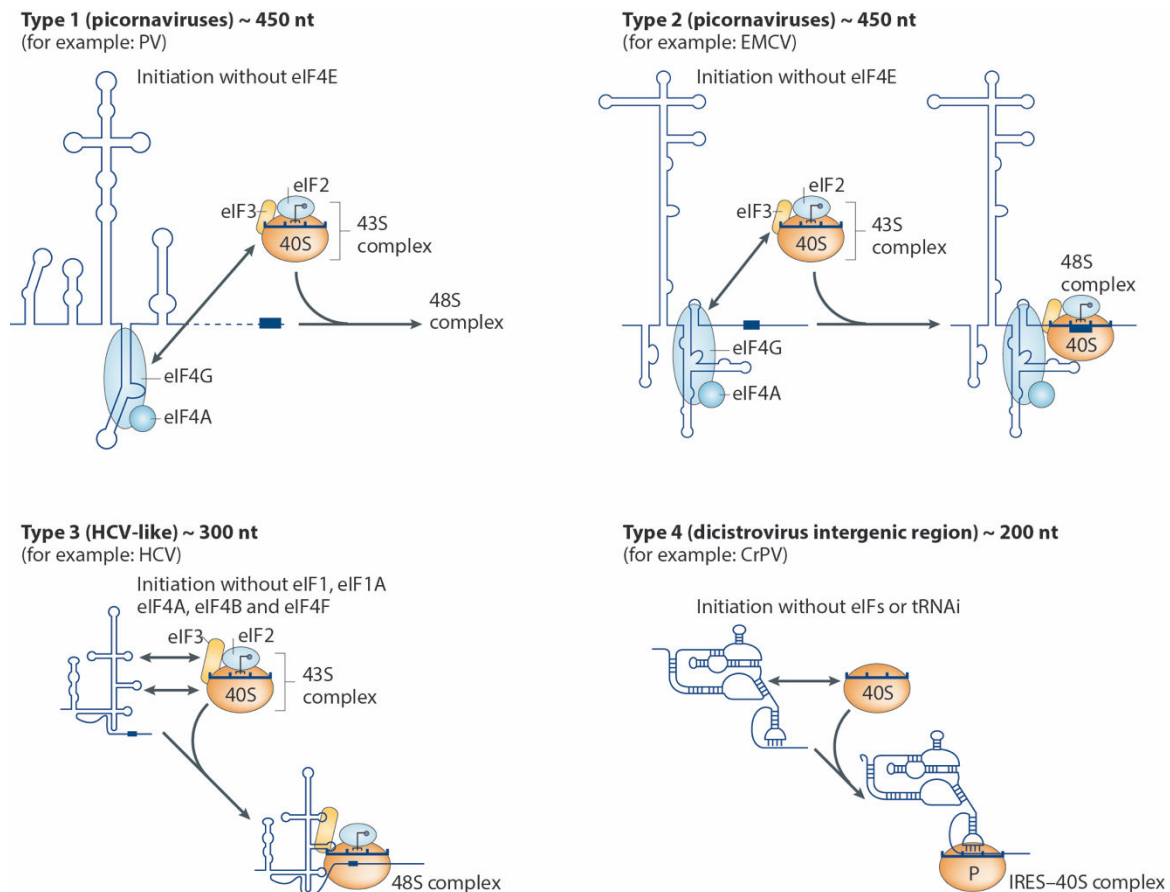


Figure 27 : L'initiation de la traduction dépendante des IRES. Les IRES viraux peuvent être classés en quatre types principaux. Pour chaque type de séquence IRES sont représentés la structure secondaire d'un prototype, ainsi que les facteurs d'initiation nécessaires au recrutement de la sous-unité 40S du ribosome (adapté de (Jackson et al. 2010a)).

¹ L'analyse à haut débit avec un gène rapporteur bicistronique de séquences d'ARNm de 174 nt, d'origine virale ou cellulaire, a démontré la présence de séquences IRES non seulement dans les régions 5' UTR, mais aussi de façon surprenante dans les séquences codantes et les régions 3' UTR de certains ARNm (Gebauer and Hentze 2016; Weingarten-Gabbay et al. 2016).

Les IRES viraux peuvent être classés en quatre types, en fonction de leur besoin en facteurs d'initiation, de leur structure secondaire et de leur localisation par rapport au codon d'initiation (Jackson et al. 2010a; Lozano and Martínez-Salas 2015) (Figure 27). Les IRES de type 1 et 2 de la famille des *Picornaviridae* ont une taille d'environ 450 nucléotides, et n'ont pas besoin du facteur d'initiation eIF4E. Les IRES de type 1 (e.g. PV, *PolioVirus*) sont séparés du codon d'initiation par une région de 100 à 150 nucléotides balayée par le complexe 43S PIC, alors que les IRES de type 2 (e.g. EMCV, *EncephaloMyoCarditis Virus*) recrute le 43S PIC directement sur le codon d'initiation (Yu et al. 2011; Sweeney et al. 2014). Les IRES de type III de la famille des *Flaviviridae* (e.g. HCV, *Hepatitis C Virus*) ont une longueur d'environ 300 nucléotides, et recrutent directement le 43S PIC grâce à une interaction avec le facteur eIF3 (Hashem et al. 2013). Enfin, les IRES de type IV de la famille des *Dicistroviridae* (e.g. CrPV, *Cricket Paralysis Virus*) ont une taille assez courte d'environ 200 nucléotides. De façon remarquable, ils n'ont pas besoin de facteur d'initiation et ils sont capables de recruter directement la sous-unité 40S du ribosome en absence de eIF2-TC et de Met-tRNA_i (Costantino et al. 2008; Fernández et al. 2014). La famille des *Retroviridae*, dont les ARNm contiennent à la fois une structure coiffe et IRES, ne fait pas partie de cette classification. Les IRES des *Retroviridae* sont plus proches fonctionnellement des IRES cellulaires, car la traduction de l'ARNm viral peut être initiée soit par la coiffe, soit par la séquence IRES (Balvay et al. 2007).

La traduction efficace initiée par les IRES cellulaires et certains IRES viraux nécessite également des protéines de liaison à l'ARN appelés ITAF (*IRES Trans-Acting Factors*). De nombreux ITAF ont été caractérisés comme les protéines PTB (*Polypyrimidine-Tract-Binding protein*) (Kafasla et al. 2010), PCBP2 (*Poly(rC)-Binding Protein 2*) (Blyn et al. 1997), ou La (*Lupus antigen*) (Meerovitch et al. 1989). Toutes ces RBPs interagissent avec les IRES mais ne sont pas responsables du recrutement de la sous-unité 40S du ribosome. Leur action serait comparable à des chaperonnes, en favorisant le repliement correct des structures secondaires de l'ARN (King et al. 2010). Ceci illustre à nouveau le rôle majeur des RBPs dans le contrôle de la traduction des ARNm.

CHAPITRE II

LA PROTÉINE EB2 : UNE RBP VIRALE MULTI-FONCTIONNELLE

I - Le Virus d'Epstein-Barr (EBV)

Le Virus d'Epstein-Barr (EBV), aussi appelé HHV-4 (*Human HerpesVirus-4*), fut au milieu des années 1960 le premier virus oncogène humain identifié (Epstein et al. 1964).

La découverte de ce virus en 1964 fut l'aboutissement de plusieurs années de recherche menées par Sir Anthony Epstein, Bert Achong et Yvonne Barr, en collaboration avec le chirurgien britannique Denis Burkitt. Ce dernier, qui exerça pendant près de vingt ans en Ouganda, fut le premier à décrire en 1958 la présence de tumeurs lymphoïdes localisées aux niveaux des maxillaires supérieures et de l'abdomen de jeunes enfants africains (Burkitt 1958). Ce lymphome, dit de Burkitt (BL), représentait alors la tumeur la plus fréquemment rencontrée chez les enfants en Afrique de l'Est. La distribution géographique des tumeurs, ainsi que les conditions climatiques associées, étaient selon Burkitt en faveur de l'hypothèse d'un agent infectieux (Burkitt 1962). Ces données épidémiologiques furent l'objet de nombreuses conférences au Royaume-Uni. Le virologue Anthony Epstein, qui assista à l'une d'entre elles, fut particulièrement intéressé par ces travaux et initia une collaboration avec Denis Burkitt afin de rechercher la présence éventuelle de particules virales au sein de biopsies issues de tumeurs congelées. Ainsi, Anthony Epstein et son étudiante Yvonne Barr rapportèrent en 1964 l'établissement des premières lignées cellulaires à partir de biopsie de BL (Epstein and Barr 1964). La même année, l'examen en microscopie électronique de ces lignées cellulaires permit à Epstein, Barr et Achong d'observer des particules virales ayant la morphologie des herpèsvirus mais n'ayant pas d'effet cytopathique sur des cellules permissives aux herpèsvirus connus à l'époque (Epstein et al. 1964) ; ce nouvel agent infectieux fut nommé Virus d'Epstein-Barr. En 1968, des études séro-épidémiologiques démontrèrent qu'EBV infecte plus de 90 % de la population adulte mondiale et qu'il constitue l'agent causal de la mononucléose infectieuse (MNI) (Henle et al. 1968). À la même époque, différentes équipes mirent en évidence l'une des propriétés fondamentales d'EBV : sa capacité d'immortaliser des lymphocytes B *in vitro* en lignée cellulaire lymphoblastoïde (LCL), soulignant ainsi les propriétés étiologiques de ce virus (Pope 1967; Henle et al. 1967; Gerper et al. 1969). Par la suite, les équipes de Harald zur Hausen et de George Klein montrèrent indépendamment dans les années 1970 la présence de génomes viraux d'EBV dans les cellules de BL et de carcinomes

de rhinopharynx (NPC) (Hausen et al. 1970; Gunvén et al. 1970; Kaschka-Dierich et al. 1976), ce qui constitua un argument supplémentaire d'un lien étiologique entre EBV et certains cancers. Depuis, il a été montré qu'EBV est impliqué dans de nombreuses pathologies humaines que nous précisons brièvement à la fin de cette partie, après avoir décrit successivement les principales caractéristiques et le cycle biologique de ce virus.

1. Généralités sur le virus EBV

a - Taxonomie

Le virus d'Epstein-Barr appartient à la famille des *Herpesviridae*, une famille de virus particulièrement répandue dans le règne animal¹ et dont huit de ses membres sont strictement humains. Tous les herpèsvirus partagent des propriétés communes structurales et physiologiques. Ce sont des virus enveloppés à ADN double brin qui persistent de façon définitive dans l'hôte infecté après la primo-infection. L'infection persiste sous une forme latente mais conduit selon une fréquence variable à des phases de réactivation du cycle productif qui correspondent à une reprise de la multiplication active du virus.

Les herpèsvirus humains sont répartis en trois sous-familles définies principalement selon leur tropisme cellulaire et la durée de leur cycle productif :

- les *Alphaherpesvirinae* regroupent les virus herpès simplex de type 1 et 2 (HSV-1 ou HHV-1 et HSV-2 ou HHV-2) et le virus de la varicelle et du zona (VZV ou HHV-3) ;
- les *Betaherpesvirinae* sont constitués du cytomégalovirus humain (HCMV ou HHV-5) et des herpèsvirus humains 6 et 7 (HHV-6 et HHV-7) ;
- les *Gammaherpesvirinae* comprennent le virus d'Epstein-Barr (EBV ou HHV-4) et l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV-8).

Les herpèsvirus humains ont tous un pouvoir pathogène (Tableau 3). Ils sont réactivés plus fréquemment chez les sujets immunodéprimés et, dans ce contexte, les manifestations cliniques associées à la primo-infection ou aux réactivations sont plus sévères. Ce comportement opportuniste des herpèsvirus humains explique la gravité de certaines maladies qui leur sont associées.

¹ La dernière classification officielle de l'ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) datant de Juillet 2016 dénombre au total 88 virus dans cette famille (Adams et al. 2016).

| Virus | Sous-famille | Tropisme cellulaire | Pathologies associées |
|--------------|------------------------|--|--|
| HSV-1 | <i>α-herpesvirinae</i> | ganglions nerveux, cellules épithéliales | Herpès orofacial et génital, encéphalites, kératites |
| HSV-2 | <i>α-herpesvirinae</i> | | |
| VZV | <i>α-herpesvirinae</i> | cellules épithéliales | varicelle, zona |
| CMV | <i>β-herpesvirinae</i> | monocytes, cellules épithéliales et musculaires | syndrome mononucléosique, hépatite, rétinite, pneumonie |
| HHV-6 | <i>β-herpesvirinae</i> | lymphocytes B et T, cellules épithéliales et nerveuses | roséole, encéphalite, myocardites |
| HHV-7 | <i>β-herpesvirinae</i> | lymphocytes T, cellules épithéliales | roséole |
| EBV | <i>γ-herpesvirinae</i> | lymphocytes B, cellules épithéliales | mononucléose infectieuse, lymphomes, carcinomes |
| KSHV | <i>γ-herpesvirinae</i> | lymphocytes B | lymphomes, sarcome de Kaposi |

Tableau 3 : Principales pathologies associées aux herpèsvirus humains.

b - Structure du virion

Le virion d'EBV mesure entre 100 et 200 nm de diamètre et présente une structure comparable à celle de tous les autres herpèsvirus (Figure 28). Les particules virales comportent :

- le nucléoïde, qui est constitué d'une molécule linéaire d'ADN bicaténaire de 172 Kpb enroulée autour d'une structure protéique fibrillaire appelée « core » ;
- une capsidie icosaédrique constituée de 162 sous-unités ou capsomères ;
- un tégument, constitué d'une couche fibreuse de phosphoprotéines, qui entourent la nucléocapsidie ;
- une enveloppe composée d'un double feuillet lipidique, dérivé des membranes plasmique ou cellulaire de la cellule hôte, et de glycoprotéines virales.

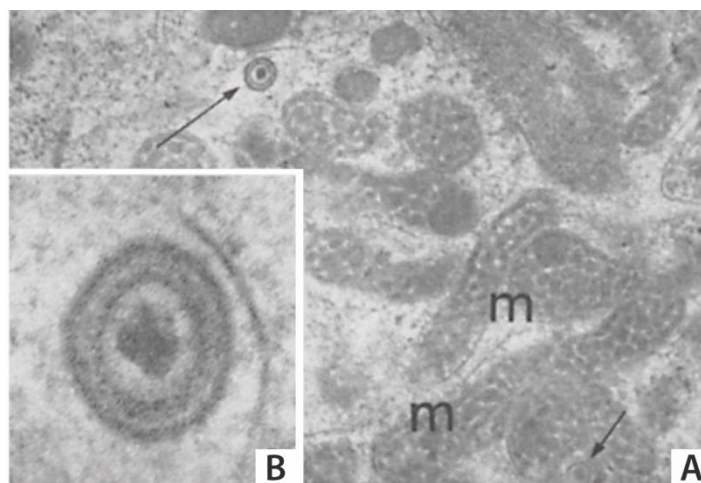


Figure 28 : Observation en microscopie électronique de particules virales d’EBV dans des coupes de lignées lymphoblastoïdes. (A) Une particule mature délimitée par deux membranes renfermant un nucléoïde dense est visible (désignée par une flèche longue) ainsi qu’une particule immature entourée d’une seule membrane (désignée par une flèche courte). La lettre « m » désigne les mitochondries (x 42 000). (B) Détail d’une particule virale mature ayant un diamètre de 115 nm (x 213 500). D’après (Epstein 1965).

c - Caractéristiques du génome viral

Le génome d’EBV a été entièrement séquencé et publié en 1984 (Baer et al. 1984), à partir de la souche virale de référence B95-8 issue de lymphocytes B de marmosets infectés par EBV. Ce séquençage a été réalisé à partir d’une banque de fragments d’ADN viral, générés après digestion par l’enzyme de restriction BamHI. Les fragments ainsi obtenus ont été clonés puis séquencés, ce qui a permis d’établir la nomenclature officielle des ORFs (*Open Reading Frames*) d’EBV. Ainsi, plus d’une centaine d’ORFs ont pu être mis en évidence et répertoriés selon : (i) le fragment de restriction BamHI dans laquelle elles démarrent (classé de A à Z, puis de a à h, en fonction de leur taille décroissante) ; (ii) leur sens de lecture, vers la gauche (L, *Leftward*) ou vers la droite (R, *Rightward*) ; et (iii) leur position dans ce fragment (e.g. BMLF1 pour BamHI M Leftward Frame 1 est la première ORF transcrite vers la gauche du fragment M de restriction BamHI).

La comparaison de la séquence de la souche virale B95-8 avec celle d’autres souches virales purifiées à partir de BL a révélé l’existence de deux variants d’EBV : EBV-1 et -2 (ou EBV de types A et B), présentant un polymorphisme dans la séquence de certains gènes de latence (Adldinger et al. 1985; Dambaugh et al. 1984). Des études épidémiologiques ont montré que le virus de type 1 est prédominant (mais pas exclusif) dans les pays occidentaux alors que les deux types viraux sont largement répandus en Afrique équatoriale et en

Nouvelle Guinée (Zimber et al. 1986). Toutefois, même si des études *in vitro* ont montré que le pouvoir transformant d'EBV-1 est supérieur à celui d'EBV-2 (Rickinson et al. 1987), aucune corrélation précise n'a pu être mise en évidence entre les variations génétiques de ces deux isolats et la fréquence de certaines maladies associées à EBV (Palser et al. 2015).

2. Cycle biologique d'EBV

Le fait que plus de 90 % de la population adulte mondiale soit chroniquement infectée par EBV reflète plusieurs propriétés remarquables de ce virus : (i) sa capacité à facilement se disséminer au sein de la population humaine, (ii) sa capacité à établir une infection latente et persistante chez son hôte et enfin, (iii) sa capacité à produire une grande quantité de virus après réactivation de son cycle productif.

a - Mode de transmission

L'infection par EBV s'effectue le plus souvent par la salive (Niederman et al. 1976), ce qui permet au virus de franchir la muqueuse de l'oropharynx. Le virus peut également se transmettre de la mère à l'enfant *in utero* ou au cours de l'allaitement (Meyohas et al. 1996; Junker et al. 1991). Ces modes de transmission expliquent en grande partie le caractère quasi-ubiquitaire et précoce de la primo-infection par EBV. Le virus peut aussi être détecté au niveau du col utérin et ainsi être retrouvé dans des ulcérations vulvaires (Andersson-Ellström et al. 1997; Portnoy et al. 1984). Cependant, la transmission par voie sexuelle reste très controversée car le virus est faiblement retrouvé dans les sécrétions génitales (Thomas et al. 2006). Des transmissions d'EBV par voie sanguine (Tattevin et al. 2002), par greffe de moelle osseuse ou par transplantation d'organe ont aussi été décrites (Gratama et al. 1988).

b - Infection et latence virale

Les organes cibles de la primo-infection par EBV sont majoritairement localisés dans la zone oropharyngée. Il a été montré que le virus pouvait infecter à la fois des lymphocytes B et des cellules épithéliales au niveau de cette zone (Kobayashi et al. 1998; Pegtel et al. 2004). Le modèle actuel d'infection suggère qu'EBV infecterait en premier les cellules épithéliales, dans lesquelles il établirait une réplication lytique, et les particules virales produites infecteraient ensuite leur cibles principales (i.e. les lymphocytes B) (Hadinoto et al. 2009; Thorley-Lawson et al. 2013).

Les lymphocytes B constituent le réservoir viral chez la majorité des individus infectés. En effet, il a été montré que 1 à 10 cellules B mémoires sur 500 000 sont infectées par EBV (Thorley-Lawson and Gross 2004). L'entrée du virus dans ces cellules nécessite une interaction entre les glycoprotéines virales gp350/220 et la molécule cellulaire CD21 (aussi appelée CR2, récepteur des fractions C3d et C3g du complément) (Tanner et al. 1987). Elle nécessite également une seconde interaction entre les glycoprotéines gH/gL/gp42 et la molécule de CMH de classe II (Haan et al. 2000; Mullen et al. 2002), permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique et la libération des nucléocapsides dans le cytosol (Shannon-Lowe and Rowe 2014; Möhl et al. 2016).

Le mécanisme d'infection des cellules épithéliales par EBV est différent de celui des lymphocytes B car le récepteur membranaire CD21 n'est pas exprimé par les cellules épithéliales. Une étude très récente a identifié le récepteur NRP1 (Neuropilin 1) comme facteur d'entrée d'EBV dans ces cellules (Wang et al. 2015a).

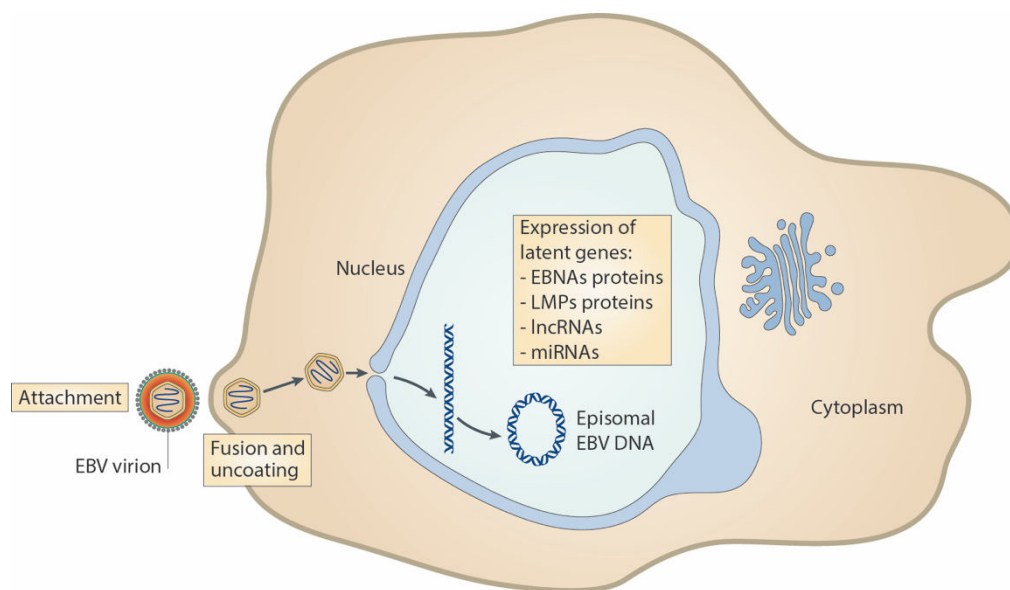


Figure 29 : Étapes précoces de l'infection par EBV aboutissant à la latence virale.

L'attachement à des récepteurs membranaires de la particule virale enveloppée permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, et la libération de la nucléocapside dans le cytosol. La capside est transportée grâce au réseau de microtubules puis l'ADN viral est éjecté dans le noyau où il se circularise. La phase de latence virale débute alors au cours de laquelle seul un nombre restreint de gènes viraux sont exprimés.

Très peu d'études se sont intéressées au transport des nucléocapsides dans le cytosol. Par analogie avec les travaux réalisés sur le virus HSV-1, on suppose qu'après libération

dans le cytosol, la nucléocapside d'EBV migre jusqu'au noyau le long des microtubules grâce aux protéines motrices dynéines (Sodeik et al. 1997; Dohner et al. 2002). L'interaction entre des protéines de la capsid virale et certains composants des pores nucléaires permet alors l'entrée du génome viral dans le noyau (Ojala et al. 2000; Shahin 2006). À ce stade, l'ADN viral se circularise grâce à ses régions terminales répétées et prend sa forme épisomique (Alfieri et al. 1991). *In vitro*, on retrouve ainsi de 1 à 100 copies de génome viraux dans le noyau de cellules B infectées (Figure 29).

La primo-infection des lymphocytes B est suivie par une entrée d'EBV en phase de latence, permettant au virus de persister toute la vie de l'individu infecté. Cette phase est caractérisée par deux éléments : d'une part, l'absence de production de particules virales, et d'autre part, l'expression de gènes viraux dits « de latence » (Kempkes and Robertson 2015; Lieberman 2016).

Les produits des gènes de latence regroupent six protéines nucléaires EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*) : EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP, trois protéines membranaires LMP (*Latent Membrane Protein*) : LMP-1, -2A et -2B, deux ARN non codant nucléaires EBER (*Epstein-Barr Encoded RNA*) : EBER-1 et -2, et 44 microARN produits à partir de deux régions de sens opposé du génome viral miR-BHRF1 et miR-BART¹. L'expression des gènes de latence permet, d'une part, d'induire la prolifération et la transformation des cellules infectées, et d'autre part, de contrôler le système immunitaire afin que ces cellules ne soient pas reconnues et éliminées (Rickinson and Kieff 2007; Lieberman 2013; 2014; Kang and Kieff 2014; Münz 2016).

c - Cycle viral productif

Le cycle productif du virus d'Epstein-Barr, comme celui de tous les herpèsvirus, se caractérise par l'expression séquentielle des gènes viraux aboutissant ainsi à la production de nouveaux virions (Kenney and Mertz 2014; Chiu and Sugden 2016). Une caractéristique structurale commune à tous les herpèsvirus est que la majorité des gènes viraux exprimés au cours du cycle productif sont dépourvus d'intron.

Les mécanismes à l'origine de l'activation du cycle productif *in vivo* sont peu caractérisés. Par contre, il est possible d'initier le cycle productif *in vitro* grâce à différents agents comme le TPA (12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate) associé au BA (acide butyrique) (Hausen et al. 1978), les anti-immunoglobulines (Takada and Ono 1989) ou

¹ Les premiers miRNA d'origine virales ont été identifiés chez le virus EBV (Pfeffer et al. 2004).

encore le TGF- β (Fahmi et al. 2000). Ces activateurs chimiques et biologiques vont modifier le degré d'acétylation des histones, rendant ainsi la chromatine au niveau de certains promoteurs viraux accessible à des facteurs de transcription.

Le cycle productif débute par l'expression des gènes immédiats précoces (IE, *Immediate Early*) *BZLF1* et *BRLF1* (Figure 30). Ces deux gènes codent pour deux facteurs de transcription, les protéines EB1 (Chevallier-Greco et al. 1986; Countryman et al. 1987) et R (Gruffat et al. 1990; Manet et al. 1991; Hardwick et al. 1988). Ainsi, il a été montré que l'expression ectopique de la protéine EB1 dans des cellules infectées par EBV est suffisante à l'induction du cycle viral productif. Les deux protéines EB1 et R interagissent directement et sous forme homodimérique avec certaines régions présentes dans les séquences promotrices des gènes viraux précoces (Kieff and Rickinson 2007).

Les gènes précoces (E, *Early*) sont définis comme les gènes viraux exprimés avant la réplication de l'ADN viral ; ils sont tous exprimés sous le contrôle d'un promoteur avec un ou plusieurs sites de fixation des protéines EB1 et R. Parmi les produits de ces gènes, on retrouve la protéine EB2, dont nous détaillerons la fonction dans la seconde partie de ce chapitre. On trouve également la protéine BcRF1 qui est une protéine TBP-like (*TATA box-Binding Protein-like*) indispensable à l'expression des gènes viraux tardifs (Gruffat et al. 2012). Nos travaux très récents montrent que cette protéine forme un complexe avec 5 autres protéines virales (BGLF3, BVLF1, BDLF3.5, BDLF4 et BFRF2), capable d'interagir avec l'ARN polymérase II et d'activer la transcription des gènes tardifs d'EBV (annexe IV - (Aubry et al. 2014)). Les autres produits des gènes précoces sont principalement des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral.

Le génome viral épisomique est ensuite répliqué dans le noyau selon le mécanisme uni-directionnel dit « de cercle roulant ». Cette réplication nécessite (i) une origine de réplication *OriLyt* (Hammerschmidt and Sugden 1988) et (ii) un complexe viral de réplication composé de l'ADN polymérase BALF5 associé à son facteur de processivité BMRF1, d'une protéine de liaison à l'ADN simple brin BALF2, d'une hélicase BBLF4, d'une primase BSLF1 et de son facteur associé BBLF2/3 (Fixman et al. 1992).

Après réplication de l'ADN viral, les gènes tardifs (L, *Late*) sont exprimés. De manière très intéressante, le promoteur de ces gènes contient une boîte TATT (Serio et al. 1998), dont la séquence diffère d'un seul nucléotide par rapport à celle de la boîte TATA canonique, capable d'interagir spécifiquement avec la protéine TBP-like virale BcRF1 (Gruffat et al. 2012; Aubry et al. 2014; Gruffat et al. 2016). Les produits des gènes tardifs sont essentiellement des protéines structurales du virus (protéines de capsid, du tégument et des glycoprotéines d'enveloppe) (Kieff and Rickinson 2007).

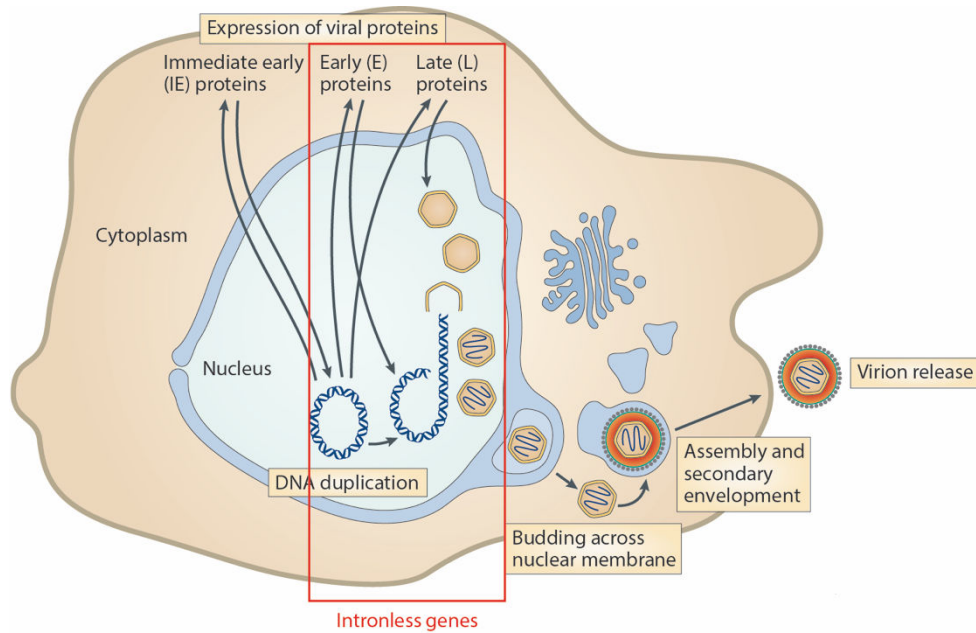


Figure 30 : Cycle productif du virus d'Epstein-Barr. Les gènes viraux immédiats précoces (IE) sont exprimés, puis les gènes précoces (E), et enfin les gènes tardifs (L) une fois que le génome viral a été répliqué. Après assemblage des protéines de capsidie et de l'ADN viral néosynthétisé, la nucléocapsidie bourgeonne au niveau de la membrane nucléaire interne pour former dans l'espace périnucléaire une particule enveloppée. Cette particule fusionne alors avec la membrane nucléaire externe et est libérée dans le cytosol. Dans le cytoplasme, la nucléocapsidie s'associe à l'appareil de Golgi et bourgeonne une seconde fois. Le virion d'EBV enveloppé est alors libéré par exocytose.

Comme pour les étapes entre l'entrée du virus et la circularisation du génome viral dans le noyau, peu d'études décrivent le trafic intracellulaire et la sortie des virions infectieux d'EBV. Par analogie avec les autres herpesvirus, on suppose que, une fois le génome viral linéaire empaqueté dans la capsidie, cette dernière bourgeonne au niveau de la membrane interne du noyau, s'entourant ainsi d'une première enveloppe. Ce virion primaire traverse l'espace périnucléaire et fusionne avec la membrane externe du noyau, permettant la libération de la nucléocapsidie dans le cytoplasme où celle-ci va s'entourer d'une matrice fibreuse constituée par les protéines du tégument (Bigalke et al. 2014; Bigalke and Heldwein 2015). La nucléocapsidie et son tégument s'associent alors aux glycoprotéines d'enveloppe maturées dans l'appareil de Golgi et bourgeonnent à l'intérieur des vésicules de sécrétion du réseau trans-Golgi (TGN). Enfin, ces vésicules contenant le virion fusionnent avec la membrane plasmique des cellules, libérant ainsi une particule virale enveloppée (Mettenleiter et al. 2009; Johnson and Baines 2011) (Figure 30).

3. Physiologie de l'infection *in vivo*

Les mécanismes d'infection par EBV, de persistance et de réplication du virus sont très mal caractérisés *in vivo*. Le modèle actuel résulte de deux observations : (i) les lymphocytes B mémoires sont le siège de l'infection latente *in vivo* du virus (Babcock et al. 1998), et (ii) le cycle viral productif se déroule exclusivement dans des cellules différenciées (Laichalk and Thorley-Lawson 2005).

Ainsi, le modèle de primo-infection par EBV postule que le virus provenant de la salive échangée lors d'un baiser avec un individu contaminé, infecte en premier les cellules épithéliales de l'oropharynx, ce qui lui permet de franchir la barrière naturelle de l'épithélium (Thorley-Lawson et al. 2008; Hislop 2015). Ce passage dans les cellules épithéliales est associé à une amplification des virions (Hadinoto et al. 2009; Temple et al. 2014). Le virus rejoint ensuite les tissus lymphatiques où il infecte les cellules B naïves (Babcock and Thorley-Lawson 2000).

L'expression du génome viral dans le lymphocyte B naïf infecté induit son activation et sa prolifération, selon un mécanisme qui mime celui induit par la reconnaissance d'un antigène (Thorley-Lawson 2005; Price and Luftig 2015). Cette induction est le résultat d'un profil d'expression dans lequel la totalité des gènes de latence (9 protéines + 2 ARNnc + 44 miRNA) sont exprimés (latence de type III) (Babcock et al. 2000; Joseph et al. 2000). Le lymphocyte B activé migre ensuite vers le follicule et initie un centre germinatif (Roughan and Thorley-Lawson 2009; Roughan et al. 2010). À ce stade, le profil d'expression des gènes de latence est modifié (latence de type II) car 6 protéines virales ne sont plus exprimées. Les produits des gènes de latence de type II permettent au lymphocyte B infecté à la fois d'échapper à l'apoptose et de se différencier en lymphocyte B mémoire (Hislop et al. 2007; Rickinson et al. 2014).

Une fois la cellule B différenciée en lymphocyte B mémoire, elle quitte le centre germinatif et se retrouve alors dans le sang périphérique (Laichalk et al. 2002; Tracy et al. 2012). À ce stade, plus aucune protéine virale n'est exprimée (latence de type 0)¹, ce qui permet au virus d'échapper complètement au système immunitaire et de rester indéfiniment dans l'organisme. Un dernier type de latence (latence de type I) est caractéristique des lymphocytes B mémoires en division (Hochberg et al. 2004). Ceux-ci expriment uniquement la protéine de latence EBNA-1 qui joue un rôle essentiel dans le maintien et la ségrégation du génome viral (Frappier 2012) (Figure 31).

¹ Les ARNnc EBERs et les miR-BART continuent d'être exprimés en latence 0 (Moss et al. 2013; Qiu et al. 2015).

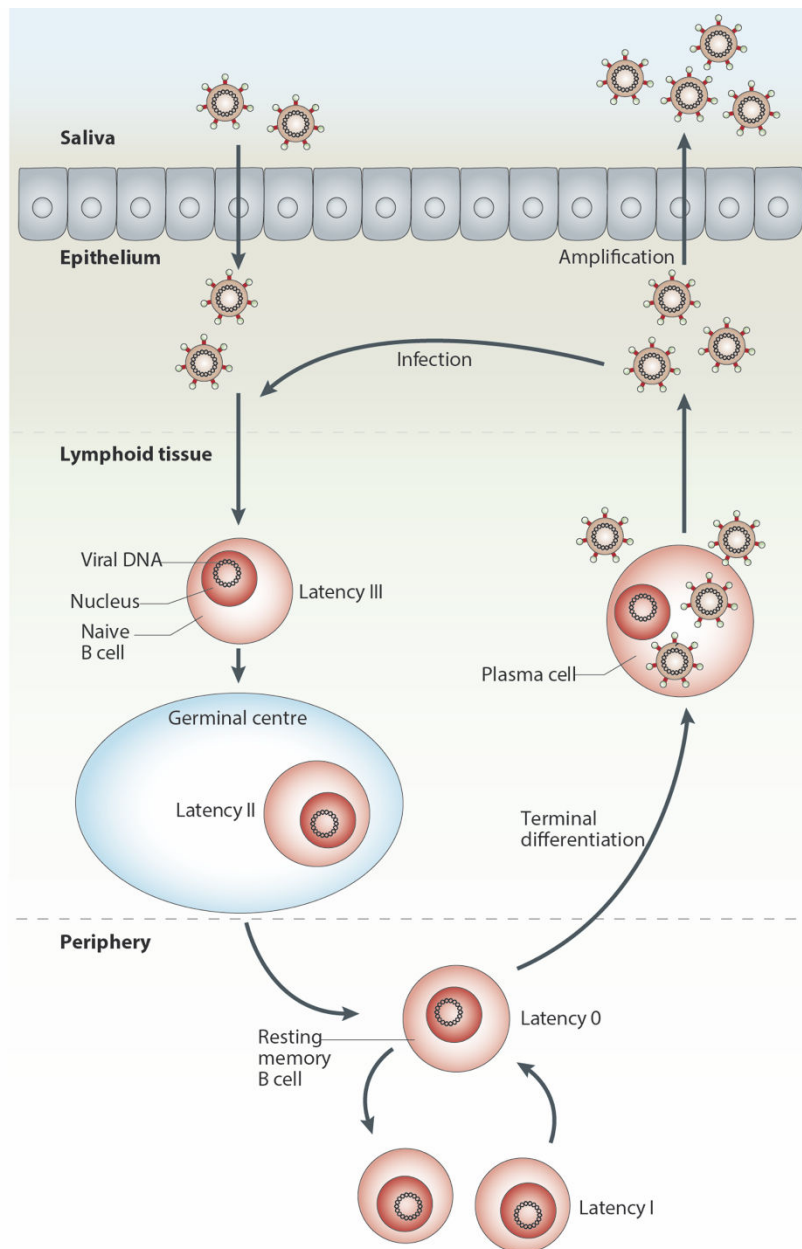


Figure 31 : Modèle de persistance et de réplication *in vivo* d'EBV. Le virus infecte les cellules de l'épithélium où il est probablement amplifié. Il infecte ensuite les lymphocytes B naïfs dans les tissus lymphoïdes. L'expression des gènes de latence III induit l'activation du lymphocyte B infecté qui initie un centre germinatif puis, l'expression des gènes de latence II induit la migration de ce lymphocyte dans le sang périphérique et sa différenciation en cellule B mémoire exprimant seulement les gènes de latence 0. Lors des rares divisions du lymphocyte B mémoire, les gènes de latence I sont exprimés, assurant ainsi la répartition équitable des génomes viraux dans les deux cellules filles. Après différenciation du lymphocyte B mémoire infecté en plasmocyte, le cycle viral productif est réactivé, ce qui aboutit à la libération de nouveaux virions capables d'infecter d'autres cellules cibles chez l'individu infecté ou chez un nouvel hôte (adapté de (Thorley-Lawson and Allday 2008)).

Les signaux d'activation du cycle viral productif *in vivo* sont totalement inconnus. On sait cependant que l'activation du cycle productif est associée à la différenciation des lymphocytes B mémoires en plasmocytes (Kraus et al. 2001; Laichalk and Thorley-Lawson 2005). Cette différenciation entraîne la migration des plasmocytes infectés à travers le tissu lymphoïde jusqu'aux cellules de la muqueuse épithéliale (Shannon-Lowe et al. 2006; Shannon-Lowe and Rowe 2011). Les particules virales sont ensuite libérées dans le milieu extracellulaire, provoquant la lyse des cellules infectées, c'est pourquoi le terme « cycle lytique » est parfois utilisé. Les nouvelles particules virales infectent alors les cellules épithéliales, dans lesquelles les virions sont amplifiés avant d'être relâchés notamment dans la salive de l'individu infecté (Shapiro et al. 2008; Huynh and Rong 2012).

4. Pathologies associées à EBV

Historiquement, le virus d'Epstein-Barr a été identifié de par son association avec le lymphome de Burkitt (Burkitt 1958). Depuis, il a été associé au développement de nombreux lymphomes et carcinomes humains avec une incidence plus ou moins forte selon le type de cancer (Tableau 4) (Kutok and Wang 2006; Sugden 2014; Taylor et al. 2015; Rochford et al. 2016). Le développement des cancers n'est jamais le résultat d'une cause unique ; il est la conséquence des interactions complexes entre des facteurs internes (prédispositions génétiques, vieillissement...) et des facteurs externes (rayonnements, agents infectieux, alimentation, pollution...) (Hanahan and Weinberg 2011; Mesri et al. 2014). Ainsi, le déclenchement des cancers liés à EBV nécessite des cofacteurs, comme une immunodépression due à une co-infection par le HIV ou à un traitement immunosuppresseur dans le cas de transplantation d'organes (Elgui de Oliveira et al. 2016; Jha et al. 2016). Le rôle précis d'EBV dans toutes ces pathologies reste cependant à être identifié.

Des études épidémiologiques sur la population adulte mondiale ont montré qu'EBV est associé chaque année à environ 200 000 nouveaux cas de cancers, soit plus de 10 % des cancers associés à un virus (Parkin 2006; Cohen et al. 2011).

En outre, une étude récente réalisée aux Etats-Unis sur des enfants âgés de 6 à 19 ans a montré que près de 40 % d'entre eux sont séro-négatifs pour EBV (Dowd et al. 2013). La primo-infection par EBV à l'adolescence est, dans environ deux tiers des cas, responsable de la mononucléose infectieuse. Bien que celle-ci soit considérée comme une maladie bénigne, 10 % des individus ont des symptômes qui persistent 6 mois ou plus, et 1 % ont de graves complications (encéphalite, myocardite et/ou thrombopénie).

| Tissus affectés et maladies | Rôle du virus EBV |
|--|--|
| <i>Lymphoïde</i> | |
| Lymphome de Burkitt (BL) endémique | Cofacteur, association clonale (100 % des cas) |
| Lymphome de Burkitt (BL) lié à infection HIV | Association clonale (15-85 % des cas) |
| Maladie de Hodgkin (HD) | Association clonale (50-60 % des cas) |
| Lymphomes cellules T et NK | Association clonale |
| Lymphomes PTLD | Causal |
| Maladie lymphoproliférative liée à X | Causal |
| <i>Épithéliale</i> | |
| Carcinome du rhinopharynx (NPC) | Facteur essentiel (100 % d'association) |
| Carcinome gastrique | Association clonale |
| Carcinome de la parotide | Association clonale |
| Leucoplasie chevelue de la langue | Causal |
| <i>Lymphoïde et épithéliale</i> | |
| Mononucléose infectieuse (MNI) | Causal |
| <i>Divers</i> | |
| Leiomyosarcome | Association clonale |

Tableau 4 : Liste des principales maladies associées à EBV.

L'ensemble de ces données épidémiologiques démontrent la nécessité de développer de nouveaux traitements antiviraux¹ et un vaccin thérapeutique pour soigner les maladies associées au virus d'Epstein-Barr (Cohen 2015). Le développement récent d'un modèle d'infection par EBV de souris humanisées contribuera certainement à atteindre ces objectifs (Gujer et al. 2015).

¹ Des cas de résistance sont décrits aux traitements anti-herpétiques actuels, comme l'acyclovir et le gancyclovir, basés sur des analogues de nucléosides (Price and Prichard 2011).

II - La protéine EB2 et ses analogues : des régulateurs post-transcriptionnels des gènes du cycle productif des herpèsvirus

Contrairement aux gènes cellulaires, la très grande majorité des gènes viraux des herpèsvirus exprimés au cours du cycle productif ne contient pas d'intron. L'accumulation cytoplasmique des ARNm viraux transcrits à partir de ces gènes ne devrait pas être problématique étant donné que de tels ARNm existent naturellement dans la cellule¹. Ces ARNm cellulaires, générés à partir de gènes sans intron, contiennent dans leur séquence codante une région consensus, appelée CAR (*Cytoplasmic Accumulation Region*) (Lei et al. 2011). Cette séquence leur permet de recruter directement certains composants du complexe d'export TREX indépendamment de la réaction d'épissage (Lei et al. 2011; 2013). Cependant, dans le cas des ARNm viraux des herpèsvirus, leur accumulation efficace dans le cytoplasme requiert obligatoirement l'expression d'une protéine virale. Cette protéine s'appelle EB2 chez EBV (*Epstein-Barr Virus*), ICP27 chez HSV-1 (*Herpes Simplex Virus type-1*), IE4 chez VZV (*Varicella Zoster Virus*), ORF57 chez KSHV (*Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus*) et UL69 chez CMV (*CytoMegalovirus*). Nous verrons dans cette partie, à travers l'exemple de la protéine EB2, que toutes ces protéines sont des régulateurs post-transcriptionnels multi-fonctionnels et indispensables à l'expression des gènes viraux sans intron.

1. EB2 est indispensable à la production de virions

La protéine EB2 (aussi appelée Mta ou SM) est codée par le gène *BSLF2/BMLF1* qui contient un intron et est exprimée précocement au cours du cycle productif d'EBV. Elle a initialement été identifiée comme un facteur nécessaire à la transcription des gènes viraux précoces et tardifs du virus (Chevallier-Greco et al. 1986; Buisson et al. 1989). Ce n'est que plus tard qu'il a été montré qu'EB2 n'agit pas au niveau de l'initiation de la transcription des gènes viraux, mais durant les étapes post-transcriptionnelles (Ruvolo et al. 1998; Buisson et al. 1999).

Afin d'étudier plus précisément le rôle de cette protéine dans le cycle viral productif, un virus recombinant amputé du gène codant pour la protéine EB2 a été généré (Gruffat

¹ 5 % des gènes humains codant pour des protéines sont sans intron (Shabalina et al. 2010). Parmi ces ARNm, certains codent pour des protéines jouant un rôle majeur telles les histones, la protéine de choc thermique HSPB3, le facteur c-Jun du complexe AP1 ou les protéines interférons.

et al. 2002). Ainsi, il a pu être montré que suite à l'induction du cycle viral productif, les cellules infectées par un EBV recombinant n'exprimant pas EB2 ne produisent pas de particules virales. Par contre, lorsque ce déficit est *trans*-complémenté par l'expression ectopique d'EB2, des virions sont de nouveau efficacement produits (Gruffat et al. 2002). De manière intéressante, les protéines analogues des autres herpesvirus (ICP27 de HSV-1, IE4 de VZV et ORF57 de KSHV) sont également indispensables à la production *de novo* de particules virales dans leur modèle d'infection respectif (Sacks et al. 1985; Sato et al. 2003; Han 2006). Seule la protéine UL69 du virus CMV ne semble pas indispensable à la production de virions, mais la cinétique de production est beaucoup plus lente qu'avec le virus sauvage (Hayashi et al. 2000). Cependant, si ces protéines semblent avoir des fonctions équivalentes, elles ne sont pas interchangeables. Ainsi, les protéines ICP27, ORF57 et UL69 ne restaurent pas la production de virions à partir de cellules infectées par un EBV recombinant amputé du gène codant la protéine EB2 (Gruffat et al. 2002). Réciproquement, EB2 est incapable de *trans*-complémenter un virus KSHV recombinant amputé du gène codant pour ORF57 (Han 2006).

La génération du virus recombinant EBV amputé du gène codant pour EB2 a permis de mieux comprendre le rôle d'EB2 dans la production de nouveaux virions et notamment de confirmer le rôle majeur de ce facteur dans l'accumulation cytoplasmique de certains ARNm viraux. Ces ARNm ont la particularité d'être produits à partir de gènes dépourvus d'intron. En absence de la protéine EB2, ils sont soit complètement absents, soit présents en quantité bien inférieure dans le cytoplasme de la cellule hôte (Gruffat et al. 2002; Batisse et al. 2005). Il faut cependant noter que tous les ARNm viraux ne requièrent pas nécessairement la présence de la protéine EB2 pour être efficacement exportés dans le cytoplasme. En effet, une étude transcriptomique par microarrays a montré qu'environ la moitié des ARNm du cycle productif d'EBV sont strictement dépendants d'EB2 pour leur accumulation cytoplasmique (Han et al. 2007). Ces résultats ont été confirmés par une étude très récente de RNA-seq (*RNA-sequencing*) combinée à des RT-PCR quantitatives de tous les transcrits viraux (Thompson et al. 2016). Par ailleurs, la protéine EB2 n'a pas d'effet significatif sur les quelques ARNm viraux issus de gènes avec introns.

Ainsi, la protéine EB2 est nécessaire à la production de nouveaux virions car elle permet l'accumulation cytoplasmique d'une proportion importante des ARNm viraux produits au cours du cycle productif.

2. Structure de la RBP virale EB2 et de ses analogues

La protéine EB2 est une phosphoprotéine nucléaire de 479 acides aminés (60 kDa). Sa structure n'a pour l'instant pas encore été élucidée mais certains domaines importants pour sa fonction ont néanmoins été mis en évidence : elle contient, dans sa partie N-terminale, un signal d'export nucléaire (NES) atypique et deux signaux de localisation nucléaire (NLS). En outre, elle renferme un domaine d'interaction avec l'ARN (RBD) dans sa partie centrale et interagit directement avec de nombreuses protéines cellulaires (Figure 32).

Comme EB2, les protéines ICP27, IE4, ORF57 et UL69 sont des phosphoprotéines issues de gènes précoces. Plusieurs motifs NLS, un NES ainsi qu'un domaine d'interaction avec l'ARN ont été caractérisés dans chacune de ces protéines et il a été montré qu'elles interagissent avec certains partenaires cellulaires communs, dont les facteurs d'export Aly/REF et TAP/NXF1 (Figure 32). Structuellement, ces protéines ont une homologie globale en acides aminés assez faible, comprise entre 20 % et 30 % ; en revanche, elles contiennent toutes dans leur partie C-terminale une région de forte homologie avec la protéine ICP27 (entre 40 % et 60 %).

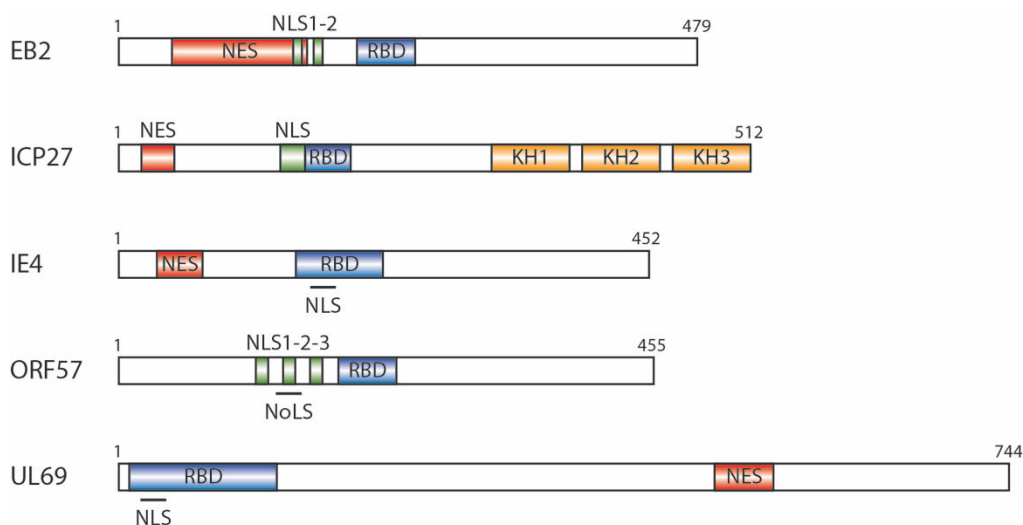


Figure 32 : Organisation fonctionnelle de la protéine EB2 et de ses analogues. NES : signal d'export nucléaire ; NLS : signal de localisation nucléaire ; NoLS : signal de localisation nucléolaire ; RBD : domaine de liaison à l'ARN ; KH : domaine présentant une forte homologie avec le domaine de liaison à l'ARN de la protéine hnRNP K.

L'analyse bio-informatique de la structure prédictive de la protéine EB2 indique que la partie C-terminale de la protéine serait très structurée, contrastant avec la partie N-

terminale peu structurée (données personnelles). De manière intéressante, la structure cristallographique à 2.0 Å du domaine C-terminal (CTD) de la protéine ICP27 (ICP27-CTD) a récemment été déterminée par deux laboratoires indépendants (Tunncliffe et al. 2015; Patel et al. 2015). La structure révèle que ICP27-CTD est capable de former des homo-dimères, ce qui est confirmé *in vivo* par des études d'ultracentrifugation analytique. Chaque monomère est constitué de 10 hélices α , séparées par 9 boucles de longueurs variées et un domaine unique à doigt de zinc de type-CCHC (Figure 33).

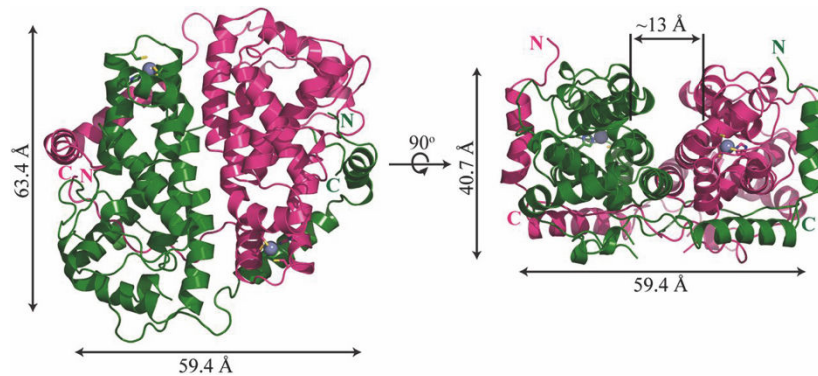


Figure 33 : Dimère du domaine C-terminal (CTD) de ICP27. Une représentation schématique de ICP27-CTD est présentée sous sa conformation dimère. Les deux monomères (en magenta et en vert) sont positionnés dans une orientation yin-yang. D'après (Patel et al. 2015).

3. EB2, comme ses analogues, a des propriétés de facteur d'export des ARNm issus de gènes sans intron

La protéine EB2 et ses analogues ont tous été initialement décrits comme des facteurs de transcription. Ainsi, ORF57 peut agir de manière directe sur l'efficacité de la transcription en interagissant avec ORF50, un facteur de transcription viral majeur du cycle productif de KSHV (Kirshner et al. 2000). Le même type de résultats a été obtenu avec IE4 qui interagit avec IE62, le facteur de transcription majeur du virus VZV (Spengler et al. 2000). Par ailleurs, une interaction de UL69 de CMV a été démontrée avec la protéine hSPT6, un facteur d'élongation de la transcription également impliqué dans le remodelage de la chromatine, ce qui suggère une fonction de UL69 très précocement dans la biogenèse des ARNm viraux (Winkler et al. 2000; Cygnar et al. 2012). Comme EB2, la protéine ICP27 de HSV-1 ne semble pas avoir d'effet significatif sur la transcription, bien qu'elle soit capable d'interagir directement avec le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II, ce qui permet probablement son recrutement co-transcriptionnel sur les ARNm (Dai-Ju et al. 2006).

Même si chacun de ces facteurs viraux a un effet plus ou moins important sur l'activation de la transcription, des résultats plus récents suggèrent qu'ils agissent principalement au niveau post-transcriptionnel. En effet, comme EB2, ils possèdent tous les principales caractéristiques des facteurs d'export des ARNm.

a - Navette nucléo-cytoplasmique

La première caractéristique de facteur d'export des ARNm d'EB2 est sa capacité à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme de la cellule grâce à deux séquences NLS et à un domaine NES (Farjot et al. 2000; Hiriart et al. 2003b; Juillard et al. 2009). L'analyse simple de la localisation cellulaire d'EB2 par immunofluorescence, révèle une présence d'EB2 dans le seul noyau des cellules. Sa propriété de navette n'a pu être démontrée que par l'utilisation de la technique des hétérocaryons inter-espèces (Farjot et al. 2000). Cette technique consiste à induire la fusion entre une cellule humaine exprimant la protéine EB2 et une cellule murine ne l'exprimant pas, en présence d'inhibiteur de la synthèse protéique. Si après la fusion, la protéine est retrouvée dans les deux noyaux de l'hétérocaryon, on peut alors conclure que la protéine, bien que nucléaire, peut sortir du noyau et y rentrer à nouveau. Il est intéressant de noter que le domaine NES d'EB2 ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres signaux NES classiques, comme celui de la protéine Rev de HIV-1 qui interagit avec l'exportine CRM1 (Fischer et al. 1995; Hiriart et al. 2003b).

Les analogues d'EB2 chez les autres herpèsvirus sont tous capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce à des séquences NLS et NES (Mears et al. 1995; Baudoux et al. 2000; Majerciak et al. 2006; Lischka et al. 2001). La protéine ORF57 de KSHV possède également un signal de localisation nucléolaire (NoLS) qui semble nécessaire à son effet sur les ARNm viraux bien que le rôle précis du passage dans le nucléole d'ORF57 reste à être déterminé (Boyne and Whitehouse 2009).

b - Liaison à l'ARN

Une deuxième caractéristique de facteur d'export des ARNm d'EB2 est sa capacité d'interagir directement avec l'ARNm *in vitro* et *in vivo*, grâce à un domaine RBD de type RRM (Hiriart et al. 2003a). Ce domaine RRM contient un motif TRKQAR qui ressemble aux domaines d'interaction avec l'ARN des protéines Rev et Tat de HIV-1. Cependant, la liaison d'EB2 avec l'ARN nécessite également les séquences riches en arginines en amont et en aval du motif TRKQAR (Hiriart et al. 2003a). La suppression de ce domaine d'interaction à l'ARN empêche la protéine EB2 d'assurer sa fonction dans l'accumulation

cytoplasmique de ses ARNm cibles mais n'empêche pas la protéine de sortir du noyau (Hiriart et al. 2003a). *In vitro*, des expériences de REMSA (*RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay*) ont montré que la protéine EB2 peut se fixer sur n'importe quelle séquence d'ARN (Hiriart et al. 2003a). Il semble qu'elle puisse couvrir complètement un ARN, à raison d'environ une molécule d'EB2 par 20 nucléotides (Hiriart et al. 2003a). Au contraire, une étude a montré *in vivo* qu'EB2 pourrait avoir une préférence pour certaines régions des ARN (Han et al. 2009). Dans cette étude, les complexes EB2-ARN ont été purifiés par immunoprécipitation avec un anticorps spécifique, puis la quantité relative des transcrits viraux a été analysé par RT-qPCR. Les résultats montrent qu'EB2 semble se fixer préférentiellement dans les régions non-traduites 5' UTR de ses ARNm cibles (Han et al. 2009). Étant donné que, (i) la taille des régions non-traduites des ARNm viraux est généralement assez courte, (ii) EB2 est capable d'augmenter post-transcriptionnellement le niveau d'expression de gènes rapporteurs artificiels sans intron (e.g. Renilla luciférase, ADNc β -globine), ces observations *in vivo* des sites de fixation d'EB2 semblent seulement partielles et nécessiteraient d'être approfondies par des expériences complémentaires.

Comme EB2, les protéines ICP27, IE4, ORF57 et UL69 interagissent directement avec l'ARN par l'intermédiaire de séquences riches en arginines (en particulier grâce à une boîte RGG pour ICP27) (Sandri-Goldin 1998; Ote et al. 2009; Taylor et al. 2011; Toth et al. 2006). Là encore, bien que ces facteurs viraux ne semblent pas reconnaître de séquence ARN spécifique, elles n'interagissent pas *in vivo* avec tous les ARNm et ont probablement besoin d'autres protéines cellulaires et/ou virales afin de cibler leur interaction avec l'ARN. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la protéine ORF57 de KSHV perd son interaction avec l'ARNm viral ORF59 en absence d'extrait cellulaire (Majerciak et al. 2006). De manière intéressante, une étude très récente a cartographié par HITS-CLIP (*High-Throughput Sequencing of RNA isolated by Cross-Linking ImmunoPrecipitation*) les sites de fixation à l'échelle du transcriptome de la protéine ORF57 (Sei et al. 2015). Le HITS-CLIP (ou CLIP-seq) a initialement été développé pour identifier de façon robuste les sites de fixation *in vivo* du facteur d'épissage Nova spécifique des neurones (Licatalosi et al. 2008). Cette technique combine à la fois les avantages du CLIP (*UV Cross-Linking ImmunoPrecipitation*) qui permet grâce à un pontage aux UV de stabiliser de façon covalente les interactions ARN-protéines (Ule et al. 2003; 2005), et les avantages du séquençage à haut-débit (Figure 34).

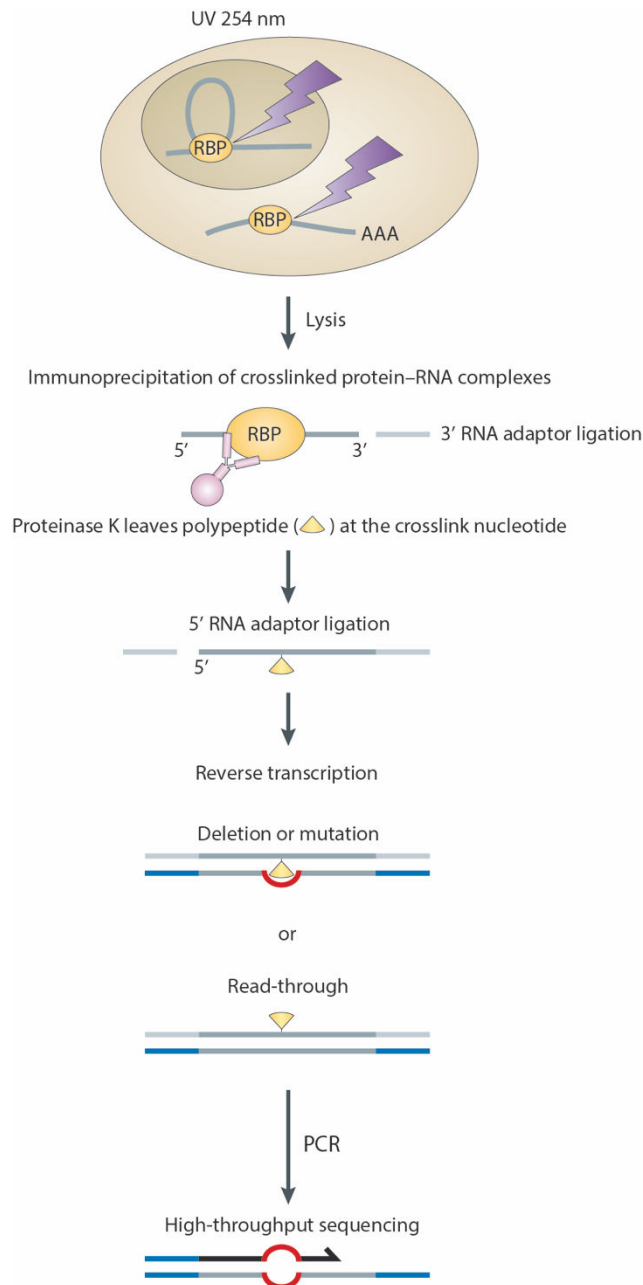


Figure 34 : Représentation schématique de la technique de HITS-CLIP. Les échantillons de tissus ou les cellules en culture sont irradiés aux UV à une longueur d'onde de 254 nm. Ce traitement provoque la formation de liaisons covalentes entre les protéines et les ARN, uniquement aux sites de fixation directes. Les cellules sont lysées et l'ARN partiellement digéré en fragments de 30-50 nucléotides. Les complexes ARN-protéines sont immunoprécipités et purifiés dans des conditions stringentes. Des adaptateurs sont ensuite fixés à l'extrémité 3' de l'ARN. Grâce à une séparation sur gel et transfert sur membrane de nitrocellulose, les ARN non liés à la protéine sont exclus. Une digestion à la Protéinase K dégrade la protéine à l'exception d'un peptide au niveau de la liaison covalente. Un adaptateur est ajouté à l'extrémité 5' de l'ARN, avant sa transcription inverse. L'ADNc obtenu est amplifié par PCR avec des amorces complémentaires des adaptateurs. La banque d'ADNc est ensuite séquencée (adapté de (König et al. 2012)).

Les résultats du HITS-CLIP réalisé avec la protéine ORF57 de KSHV ont identifié 2448 sites de fixation d'ORF57 dans des transcrits, à la fois viraux (219) et cellulaires (2229) (Sei et al. 2015). Cette étude n'a pas identifié de séquences ARN consensus fixant ORF57 mais confirme les résultats antérieurs obtenus *in vitro* définissant dans certains ARNm viraux une séquence de 30 nt appelée ORE (*ORF57-Response Element*) capable de lier ORF57 (Sei and Conrad 2011). De plus, elle montre pour la première fois qu'ORF57 se lie préférentiellement dans la région 5' de certains pré-ARNm cellulaires, à proximité immédiate de la première jonction exon-intron (Sei et al. 2015). Ces résultats suggèrent une nouvelle fonction de la protéine ORF57 dans la biogenèse de certains ARNm cellulaires, probablement dans le contrôle de l'épissage et/ou la stabilité de ces pré-ARNm.

c - Accumulation cytoplasmique de ses ARNm cibles

La dernière caractéristique faisant d'EB2 un facteur d'export est sa capacité à favoriser l'accumulation dans le cytoplasme d'ARNm issus de gènes dépourvus d'intron (Gruffat et al. 2002; Batisse et al. 2005), ainsi que de certains ARNm issus de gènes contenant des sites d'épissage non canoniques. Ce dernier effet a été démontré grâce à l'analyse d'une construction issue du gène de la β -globine humaine portant la mutation responsable de l'apparition de la β -thalassémie (β -thal.) chez les individus homozygotes (Buisson et al. 1999). La mutation touche le site 5' d'épissage (5' SS) du premier intron du gène avec pour conséquence l'inhibition de l'épissage de ce site et l'utilisation de l'un ou l'autre de trois sites cryptiques d'épissage présents dans le premier exon du gène (Figure 35A). En absence de la protéine EB2, les trois formes d'ARNm épissés sont produites et s'accumulent dans le cytoplasme. Par contre, lorsqu'EB2 est exprimée, elle favorise fortement l'accumulation dans le cytoplasme de la forme non épissée de l'ARNm β -thal. (Buisson et al. 1999).

Ce résultat a ensuite été confirmé par l'utilisation d'un autre système rapporteur basé sur la construction pDM128 (Farjot et al. 2000). Cette construction contient un gène constitué de deux exons et d'un intron bordé de sites d'épissages faibles, avec dans l'intron la séquence codante pour la protéine rapportrice CAT (*Chloramphenicol Acetyl Transferase*) (Figure 35B). La protéine CAT, dont la quantité est mesurée par test ELISA, ne s'exprime donc que si l'ARNm est exporté sans être épissé. En absence de la protéine EB2, l'ARNm issu de pDM128 est épissé et exporté dans presque 100 % des cas et la protéine CAT est exprimée à un niveau basal très faible. Au contraire, en présence d'EB2, la protéine CAT est détectée en plus grande quantité, ce qui montre à nouveau la capacité d'EB2 à favoriser l'accumulation cytoplasmique d'ARNm non épissés (Farjot et al. 2000).

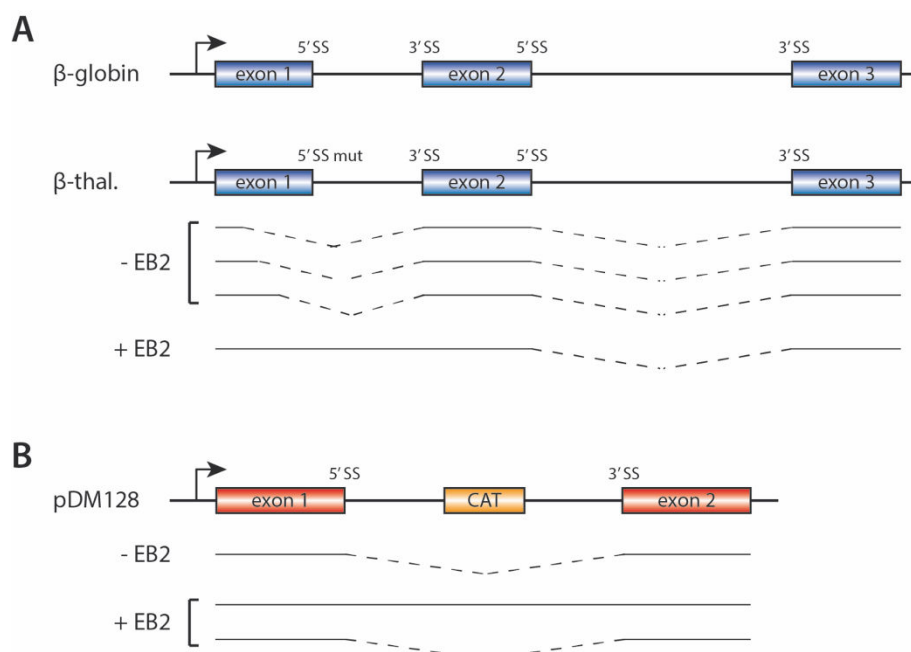


Figure 35 : Représentations schématiques des systèmes rapporteurs utilisés. (A) Les vecteurs contiennent le gène de la β -globine et l'allèle de la β -thalassémie dans lequel le site 5' d'épissage (5' SS) du premier exon est muté laissant apparaître trois sites cryptiques d'épissage. (B) Le vecteur pDM128 contient deux exons, séparés par un intron contenant les séquences codantes pour la protéine rapportrice CAT.

De même que la protéine EB2, tous ses analogues favorisent l'accumulation cytoplasmique des ARNm issus de gènes sans intron (Koffa et al. 2001; Ote et al. 2009; Kirshner et al. 2000; Lischka et al. 2006). Cette capacité nécessite l'interaction avec l'ARNm sauf dans le cas de la protéine UL69 de CMV. En effet, un mutant de cette protéine incapable d'interagir avec l'ARN, mais qui interagit toujours avec le facteur cellulaire UAP56, favorise l'accumulation cytoplasmique d'un ARNm rapporteur non épissé avec la même efficacité que la protéine sauvage (Toth et al. 2006). Cette observation peut apparaître paradoxale pour une RBP dont la fonction principale est de favoriser l'accumulation dans le cytoplasme de ses ARNm cibles. Étant donné que les domaines d'interaction de UL69 avec l'ARN et UAP56 se chevauchent et que l'interaction entre UL69 et UAP56 est indépendante de l'ARN (Lischka et al. 2006; Toth et al. 2006; Zielke et al. 2012), on peut supposer que le domaine d'interaction avec l'ARN de UL69 serait nécessaire pour une autre fonction de UL69. Comme (i) la protéine UL69 est retrouvée dans le tégument des particules virales de CMV (Winkler and Stamminger 1996; Kronemann et al. 2010), et (ii) les virions CMV incorporent certains transcrits cellulaires et viraux (Bresnahan and Shenk 2000), une hypothèse séduisante serait que le domaine

d'interaction avec l'ARN de UL69 pourrait être impliqué dans l'emballage de tels ARN dans les particules virales¹.

4. Interactions d'EB2 et ses analogues avec des protéines cellulaires

Dans la cellule, l'import et l'export des protéines nucléaires nécessitent différentes protéines appelées respectivement importines et exportines. Ces karyophérines, seules ou en association avec des partenaires, servent de transporteurs de protéines à travers le pore nucléaire. Les premiers travaux visant à comprendre comment EB2 ou ses analogues pouvaient sortir du noyau ont suspecté l'implication de CRM1, une exportine connue notamment pour son rôle dans l'export de la protéine Rev de HIV-1 (Fischer et al. 1995). Cependant, la capacité à faire la navette d'EB2 et de ses analogues n'est pas affectée par l'utilisation de la Leptomycine B, un inhibiteur spécifique de CRM1, démontrant ainsi que ces protéines utilisent un autre transporteur (Farjot et al. 2000; Koffa et al. 2001; Ote et al. 2009; Malik et al. 2004; Lischka et al. 2001). Des résultats plus récents montrent que l'export d'EB2 et de ses analogues est dépendant du facteur cellulaire TAP/NXF1, qui a été largement caractérisé pour son rôle primordial dans l'export des ARNm cellulaires du noyau vers le cytoplasme. EB2 interagit directement, par l'intermédiaire de son domaine NES, avec TAP et cette interaction permet l'export d'EB2 indépendamment de l'interaction avec l'ARN (Hiriart et al. 2003b; Juillard et al. 2009). Ceci suggère qu'en plus de son rôle d'export des ARNm, TAP pourrait favoriser l'export de protéines qui ne sont pas directement liées à l'ARNm. De même, ICP27, IE4 et ORF57 interagissent directement avec le facteur TAP qui est indispensable à l'export de chacune d'elles (Koffa et al. 2001; Ote et al. 2009; Malik et al. 2004). UL69 est le seul analogue d'EB2 pour lequel une interaction avec TAP n'a pas été mise en évidence.

La protéine TAP/NXF1 est le facteur clé d'export des ARNm chez les eucaryotes. Elle forme un hétérodimère avec la protéine p15/NXT1, capable d'interagir à la fois avec l'ARNm et certaines nucléoporines du pore nucléaire (Guzik et al. 2001; Wiegand et al. 2002). Cependant, TAP ne présente que peu d'affinité intrinsèque pour les ARN, sauf s'ils contiennent un motif spécifique (motif CTE : *Constitutive Transport Element*) décrit chez certains ARNm du rétrovirus MPMV (*Mason-Pfizer Monkey Virus*) (Grüter et al. 1998). Le recrutement de TAP se fait donc par l'intermédiaire de protéines dites « adaptatrices »

¹ Une étude récente a également démontré la présence de certains transcrits et miRNA viraux dans les virions d'EBV (Jochum et al. 2012).

qui vont permettre l'interaction entre TAP et l'ARNm. Plusieurs protéines jouant ce rôle ont été caractérisées, parmi lesquelles deux protéines SR SRSF3 (SRp20) et SRSF7 (9G8), et les facteurs Aly/REF, UIF, RBM15 et OTT3/RBM15B (Huang and Steitz 2001; Huang et al. 2003; Zhou et al. 2000; Hautbergue et al. 2009; Lindtner et al. 2006; Uranishi et al. 2009). Il est intéressant de noter que chacune de ces protéines a été impliqué dans l'accumulation cytoplasmique de certains ARNm issus de gènes sans intron par EB2 et/ou ses analogues.

De façon remarquable, la protéine ICP27 est capable d'interagir avec SRSF3 ainsi qu'avec d'autres membres de la famille SR, et dans des cellules infectées par HSV-1, la déplétion par siRNA de SRSF3 ou SRSF7 entraîne une accumulation dans le noyau des ARNm viraux polyadénylés, ainsi qu'une diminution de la production de virions (Sciabica et al. 2003; Escudero-Paunetto et al. 2010). EB2 et IE4 interagissent aussi directement avec SRSF1, SRSF3 et SRSF7 (Juillard et al. 2012; Verma et al. 2010; Ote et al. 2009). De manière intéressante, nos résultats récents montrent que la déplétion par siRNA de SRSF3 ou SRSF7 diminue fortement la quantité des ARNm cibles d'EB2 présents dans le cytoplasme, indiquant que ces deux protéines SR sont nécessaires à la fonction de facteur d'export des ARNm d'EB2 (annexe I - (Juillard et al. 2012)). Par ailleurs, en absence d'EB2, la déplétion de SRSF3 augmente l'accumulation cytoplasmique des ARNm cibles d'EB2, suggérant que le facteur d'épissage SRSF3 aurait un effet délétère sur certains ARNm et que cet effet serait contrecarré par la protéine EB2.

La protéine Aly/REF appartient au complexe TREX (*TR*anscription/*EX*port complex). Ce complexe a initialement été caractérisé chez la levure, où il permet le couplage des étapes de transcription et d'export des ARNm (Strässer et al. 2002). Chez les métazoaires, ce complexe est recruté au cours de la réaction d'épissage (Masuda et al. 2005), et spécifiquement en 5' de l'ARNm ce qui permet de polariser l'export nucléaire des ARNm matures (Cheng et al. 2006). Le complexe TREX humain est composé des protéines Aly/REF et UAP56 associées au complexe THO (qui comprend les protéines hHrp1/THOC1, hTho2/THOC2, hTex1/THOC3, fSAP79/THOC5, fSAP35/THOC6 et fSAP24/THOC7) (Chávez et al. 2000; Luo et al. 2001; Strässer et al. 2002). Plus récemment, l'analyse protéomique des composants du complexe TREX humain a permis l'identification de nouvelles protéines : UIF (Hautbergue et al. 2009), hTho1/CIP29 (Dufu et al. 2010), PDIP3 et ZC11A (Folco et al. 2012), et le facteur CHTOP (Chang et al. 2013). Le complexe se forme en deux étapes : les protéines Aly/REF et UAP56 sont d'abord recrutées grâce à une interaction directe entre CBP80 et Aly/REF, puis le complexe THO est recruté par Aly/REF et l'ARN hélicase UAP56 de façon ATP-dépendante (Cheng et al. 2006; Dufu et al. 2010; Chi et al. 2013) (Figure 36).

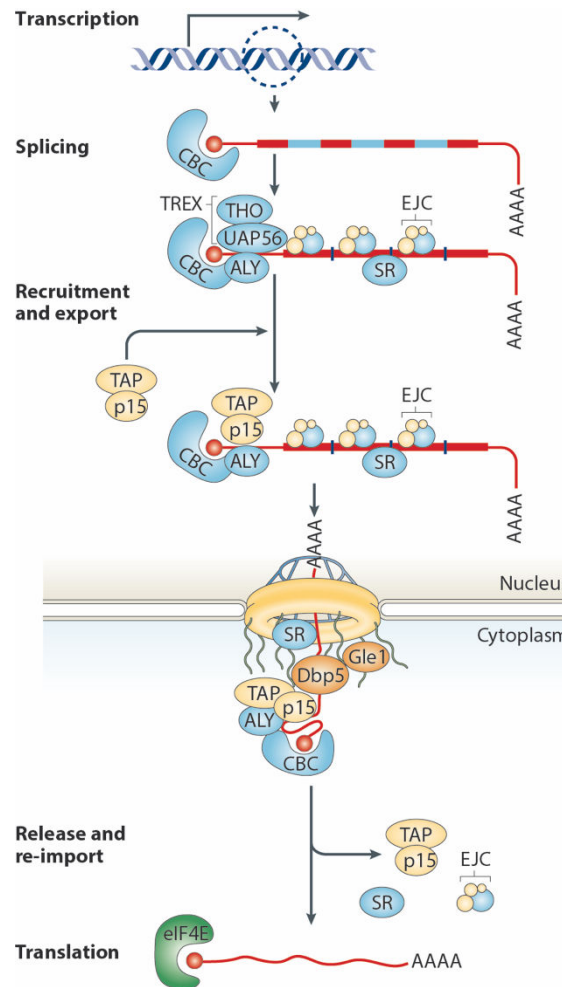


Figure 36 : Modèle d'export des ARNm générés à partir de gènes avec introns. Le complexe TREX est recruté en 5' de l'ARNm par le CBC, de façon dépendante de l'épissage (Masuda et al. 2005; Cheng et al. 2006). Il permet ensuite le recrutement de l'hétérodimère TAP-p15 et le franchissement polarisé du pore nucléaire grâce à l'ARN hélicase Dbp5 et son cofacteur Gle1 lié à l'hexakisphosphate inositol (InsP₆), qui participent au remodelage cytoplasmique de la mRNP (Alcázar-Román et al. 2006; Weirich et al. 2006; Tran et al. 2007).

La protéine EB2 interagit directement avec la protéine Aly/REF (Hiriart et al. 2003b). Des interactions ont également été démontrées entre Aly/REF et ICP27 (Chen et al. 2002), IE4 (Ote et al. 2009), ORF57 (Malik et al. 2004) et des complexes protéiques comprenant UL69, UAP56 et Aly/REF ont été identifiés dans des cellules infectées par CMV (Lischka et al. 2006). Cette interaction semble importante pour l'action d'EB2 et de ses analogues sur l'export nucléaire des ARNm. En effet, un mutant de délétion du domaine d'interaction avec Aly/REF d'EB2 n'est plus capable de favoriser l'accumulation cytoplasmique d'ARNm issus d'un gène rapporteur sans intron (Hiriart et al. 2003b). De même, la mutation ponctuelle en Alanine des résidus W105, R107 et L108 d'ICP27, qui abroge son interaction

avec Aly/REF, diminue l'export dans le cytoplasme des ARNm de HSV-1 cibles d'ICP27 (Tian et al. 2013). Cependant, ces observations sont à nuancer. En effet, le domaine d'interaction identifié d'EB2 avec Aly/REF est aussi la zone d'interaction d'EB2 avec d'autres protéines cellulaires comme SRSF3. Dans le cas de la protéine ORF57 de KSHV, un mutant n'interagissant plus avec Aly/REF a toujours un effet sur l'expression de la protéine virale ORF59 issue d'un gène dépourvu d'intron, et la déplétion partielle par siRNA de Aly/REF n'a aucun effet sur l'export de l'ARNm ORF59 (Li and Verma 2012). L'interaction entre Aly/REF et ORF57 n'aurait donc qu'un rôle limité pour l'accumulation cytoplasmique de ses ARNm cibles. Par contre, des travaux récents ont montré que la protéine ORF57 interagit directement avec d'autres protéines adaptatrices de TAP : le facteur UIF (Jackson et al. 2011) et les protéines CHTOP et CIP29 (Schumann et al. 2016). Ces interactions permettent le recrutement du complexe TREX et de TAP sur les ARNm de KSHV indépendamment de la protéine Aly/REF (Jackson et al. 2011; Schumann et al. 2016).

En outre, l'ARN hélicase UAP56 interagit directement avec les protéines ICP27, ORF57 et UL69 (Koffa et al. 2001; Boyne et al. 2008; Lischka et al. 2006). Cette interaction semble particulièrement importante pour l'export de leurs ARNm cibles respectifs, notamment dans le cas d'UL69. Ainsi, un mutant de cette protéine qui n'interagit plus avec UAP56 est toujours capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme mais n'est plus capable de favoriser l'accumulation cytoplasmique de ses ARNm cibles au cours de l'infection virale (Lischka et al. 2006; Kronemann et al. 2010). De plus, une protéine chimérique pM69 du CMV murin, avec le domaine d'interaction avec UAP56 d'UL69, substitue parfaitement la protéine UL69 au cours de la réplication du CMV humain (Zielke et al. 2012).

Enfin, EB2 et tous ses analogues interagissent avec les protéines RBM15 et OTT3/RBM15B, deux protéines apparentées impliquées dans l'export des ARNm et la régulation de l'épissage (Hiriart et al. 2005; Majerciak et al. 2010; 2011). RBM15 semble jouer un rôle dans l'export des ARNm cellulaires au moment de leur translocation à travers le pore nucléaire, en interagissant à la fois avec TAP/NXF1 et l'ARN hélicase à DEAD-box Dbp5 (DDX19B) (Lindtner et al. 2006; Zolotukhin et al. 2009) ; de même, OTT3/RBM15B s'associe à TAP/NXF1 et Dbp5, quoique moins efficacement que RBM15 et peut promouvoir l'export des ARNm (Uranishi et al. 2009). Par ailleurs, il a été montré que la protéine OTT3/RBM15B est capable d'inhiber l'épissage en agissant comme compétiteur fonctionnel des protéines SR (Loyer et al. 2011). Le rôle exact de l'interaction entre ces deux facteurs cellulaires et les protéines virales est loin d'être compris. Dans le cas d'ORF57 de KSHV, il a été montré qu'ORF57 inhibe l'interaction de RBM15 avec l'ARNm viral

ORF59, empêchant ainsi la rétention nucléaire de ce transcrit sous sa forme hyperpolyadénylée induite par RBM15 (Majerciak et al. 2011; Massimelli et al. 2015).

Ainsi, la protéine EB2 et ses analogues chez les autres herpèsvirus interagissent avec de nombreuses protéines cellulaires afin de contrôler le devenir de leurs ARNm cibles. Parmi ces protéines, il est intéressant de noter que plusieurs appartiennent au complexe TREX (Aly/REF, UAP56, UIF...), démontrant que ces facteurs viraux miment la réaction d'épissage en recrutant directement des facteurs d'export sur leurs ARNm cibles. Une autre fonction moins bien caractérisée d'EB2 et de ses analogues serait de moduler l'activité de certains de ces partenaires cellulaires (SRSF3, RBM15...).

5. Les RBPs des herpèsvirus agissent à différentes étapes du métabolisme des ARNm

a - L'épissage des pré-ARNm

Différents résultats laissent penser qu'EB2 et ses analogues pourraient interférer dans la réaction d'épissage de leurs ARNm cibles respectifs. Ainsi, il a été montré que des ARNm non épissés, exprimés à partir de la construction β -thal. contenant des sites cryptiques d'épissage, sont retrouvés dans le cytoplasme en présence d'EB2 (Buisson et al. 1999). Plus récemment, un rôle direct de la protéine EB2 sur l'épissage d'un pré-ARNm cellulaire a été clairement décrit dans le cas d'une construction contenant les exons 23 et 24 du gène cellulaire *STAT1* ainsi que l'intron séparant ces deux exons (Figure 37). En absence d'EB2, la forme parfaitement épissée de cet ARNm s'accumule dans le cytoplasme de la cellule, mais en présence d'EB2, on retrouve dans le cytoplasme une nouvelle forme d'ARNm épissée à partir d'un site 5' alternatif présent dans l'intron (Verma 2008). EB2 est donc capable de réguler l'épissage alternatif du pré-ARNm *STAT1*, en favorisant la reconnaissance d'un autre site 5' d'épissage. Cet effet d'EB2 semble dépendant de la protéine SRSF3, car la déplétion par siRNA de cette protéine SR inhibe l'effet d'EB2 sur l'épissage alternatif du pré-ARNm *STAT1* (Verma et al. 2010). De manière intéressante, une étude récente a montré que la protéine ORF57 de KSHV module l'épissage alternatif du pré-ARNm viral K8 en interagissant aussi avec la protéine SRSF3 (Majerciak et al. 2014). Étant donné qu'EB2 interagit également avec les protéines SRSF1, SRSF3 et SRSF7 (Juillard et al. 2012), une hypothèse séduisante mais non démontrée est qu'EB2 pourrait modifier le profil d'expression d'autres pré-ARNm cellulaires *via* ces protéines SR.

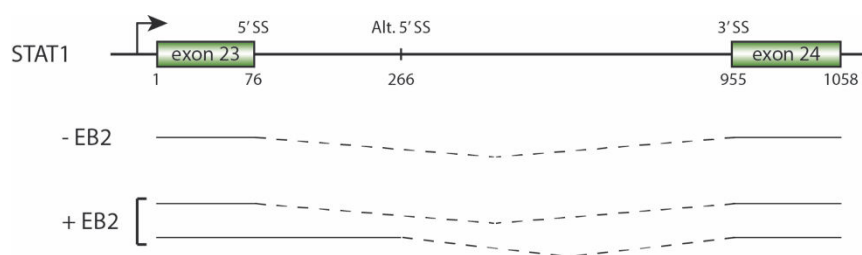


Figure 37 : Représentation schématique de la construction STAT1. La construction STAT1 comprend les exons 23 et 24 du gène cellulaire *STAT1* séparés par leur intron. En absence d'EB2, on observe dans la cellule le transcrit épissé à partir des sites d'épissage 5' en position 76 et 3' en position 955. En présence d'EB2, on observe également cet ARNm et une seconde forme d'ARNm épissé, produite à partir de l'utilisation d'un site 5' alternatif localisé dans l'intron en position 266.

L'effet sur l'épissage le mieux décrit est celui de la protéine ICP27 de HSV-1. En effet, l'infection par HSV-1 s'accompagne d'une chute globale de l'expression des ARNm cellulaires, qui n'est pas observée lorsque les cellules sont infectées par un virus mutant n'exprimant pas la protéine ICP27 (Hardy and Sandri-Goldin 1994). Cette répression cible les gènes cellulaires possédant des introns et son mécanisme a été en partie élucidé (Bryant et al. 2001; Sciabica et al. 2003). ICP27 est capable de bloquer l'assemblage du spliceosome en influant sur l'état de phosphorylation de certaines protéines SR. En présence d'ICP27, les protéines SR sont hypophosphorylées car ICP27 délocalise du cytoplasme vers le noyau la kinase SRPK1 responsable de la phosphorylation des protéines SR (Sciabica et al. 2003). L'interaction directe entre ICP27 et SRPK1 empêche donc la phosphorylation des substrats de SRPK1, et par conséquent leur import nucléaire et la formation du spliceosome. Par ailleurs, il a également été rapporté qu'ICP27 module l'épissage alternatif de certains pré-ARNm viraux par un mécanisme de rétention d'intron. Ainsi, en présence d'ICP27, deux variants de la glycoprotéine gC de HSV-1 sont exprimés : une forme sécrétée issue d'un ARNm parfaitement épissé, et une seconde forme transmembranaire issue d'un ARNm dans lequel un intron n'a pas été excisé (Sedlackova et al. 2008).

b - La stabilité des ARNm

La capacité d'EB2 et de ses analogues à favoriser l'accumulation cytoplasmique des ARNm issus de gènes sans intron peut être le résultat (i) d'un effet direct de ces facteurs viraux sur l'export nucléaire de leurs ARNm cibles, (ii) d'une stabilisation de ces ARNm leur permettant d'échapper dans le noyau à la machinerie de dégradation des ARNm. Étant donné que toutes les étapes de la biogenèse des ARNm sont liées, il est très difficile de

répondre à cette question et très peu d'études se sont intéressées au rôle d'EB2 et de ses analogues sur la stabilité des ARN.

Des éléments de réponse ont pu être apportés récemment à propos de la protéine ORF57 grâce à l'étude de l'ARN PAN de KSHV, un long ARNnc polyadénylé et strictement nucléaire. La fonction de cet ARN n'a pas encore été identifiée mais il s'accumule très efficacement dans le noyau des cellules infectées par KSHV (on peut retrouver jusqu'à 5×10^5 copies/cellules de cet ARNnc) (Sun et al. 1996). De façon tout à fait remarquable, la stabilité de cet ARN dépend d'un élément *cis*-régulateur : une séquence de 79 nucléotides appelée ENE et située à l'extrémité 3' (Conrad and Steitz 2005; Conrad et al. 2006; 2007). L'analyse cristallographique de cet élément a révélé une structure en triple hélice, formée par une tige interrompue par une boucle riche en U capable d'interagir avec la queue poly(A) de l'ARN¹, le protégeant ainsi de l'action des exoribonucléases (Mitton-Fry et al. 2010) (Figure 38). Par ailleurs, la stabilité de l'ARN PAN est aussi régulée par des facteurs *trans*-régulateurs. Ainsi, il a été montré que la protéine ORF57 stabilise l'ARN PAN en se fixant sur une séquence MRE située en 5' de l'ARN (Sahin et al. 2010; Sei and Conrad 2011). Le mécanisme par lequel la protéine ORF57 stabilise l'ARNnc PAN reste encore flou mais des études ont montré que les protéines PABPC1 et Aly/REF seraient impliquées. En effet, l'infection par KSHV induit une relocalisation partielle de PABPC1 dans le noyau et PABPC1 est co-purifié avec l'ARN PAN à partir d'extraits cellulaires (Borah et al. 2011). De plus, la protéine ORF57 interagit *in vitro* avec PABPC1 et la déplétion de PABPC1 par siRNA augmente la quantité de l'ARN PAN (Massimelli et al. 2011; 2013), suggérant qu'ORF57 et PABPC1 auraient un effet antagoniste sur la stabilité de cet ARN. Enfin, la protéine Aly/REF jouerait aussi un rôle car elle lie l'ARN PAN et des expériences de « tethering » artificiel de Aly/REF sur l'ARN PAN ont montré qu'elle est suffisante pour stabiliser cet ARNnc dans le noyau (Stubbs et al. 2012).

¹ Il a été montré que deux ARNnc cellulaires, MALAT1 et MEN β , ont aussi une structure en triple hélice leur permettant d'être stabilisés dans le noyau (Brown et al. 2012; Wilusz et al. 2012).

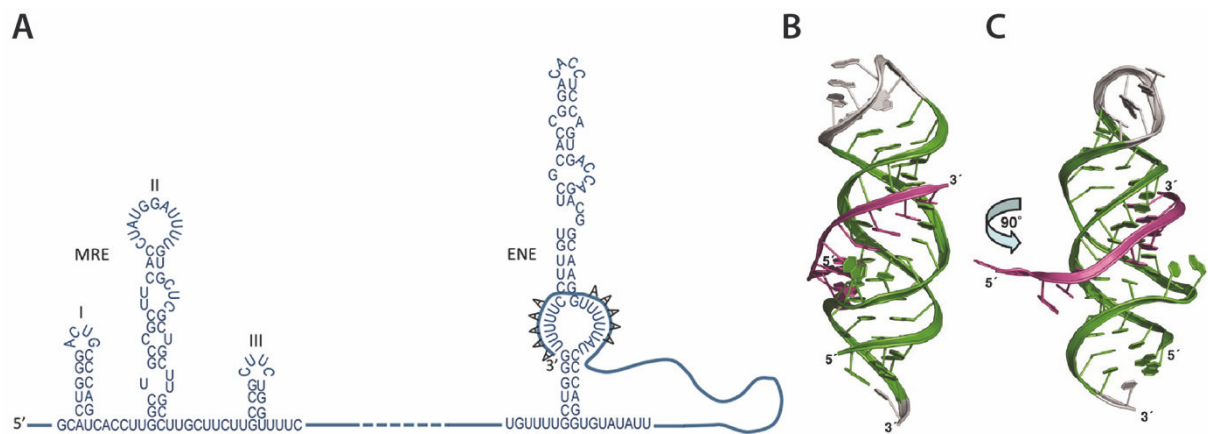


Figure 38 : Structures secondaire et cristallographique de l'ARNnc PAN. (A) Les séquences MRE en 5' et ENE en 3' contrôlent la stabilité de l'ARNnc PAN de KSHV, respectivement en interagissant avec des facteurs régulateurs et en adoptant une structure en triple hélice. (B) Représentation en ruban de la structure cristalline de l'ARNnc PAN, avec en vert la séquence ENE, en gris la séquence non-native, et en magenta la séquence (A)_n de la queue poly(A). (C) Rotation de 90° de l'image représentée en (B) (adapté de (Mitton-Fry et al. 2010) et (Rossetto and Pari 2014)).

c - L'export nucléo-cytoplasmique des ARNm

Comme nous l'avons vu précédemment en détail, EB2 et ses analogues ont tous des propriétés de facteur d'export des ARNm. Cependant, un rôle de ces protéines dans l'export *stricto sensu* des ARNm est difficile à démontrer et fortement controversé dans le cas de la protéine ORF57 de KSHV. Ainsi, une étude récente a montré qu'en présence d'ORF57, la quantité des ARNm viraux ORF47 et ORF56 est augmentée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Pilkington et al. 2012). Dans cette même étude, il a aussi été montré par des expériences de « tethering » artificiel d'ORF57 sur un ARNm rapporteur qu'ORF57 n'augmente pas la quantité cytoplasmique de cet ARNm, contrairement à la protéine Rev de HIV-1 (Pilkington et al. 2012). De plus, ORF57 stabilise efficacement l'ARNnc PAN dans le noyau (Sahin et al. 2010; Sei and Conrad 2011). Au vu de tous ces résultats, il apparaît donc que l'effet d'ORF57 sur l'export nucléo-cytoplasmique de ses ARNm cibles serait probablement indirect, en stabilisant ces ARNm dans le noyau et/ou en recrutant sur ces ARNm certains facteurs d'export comme la protéine TAP/NXF1.

d - La traduction des ARNm

La protéine EB2 favorise l'accumulation cytoplasmique de ses ARNm cibles et il est maintenant clair qu'elle reste associée à ceux-ci dans le cytoplasme et favorise leur traduction. En effet, nos travaux montrent d'une part, qu'EB2 est associée aux polysomes

et d'autre part, qu'elle augmente significativement l'efficacité de traduction des ARNm auxquels elle est liée (annexe II - (Ricci et al. 2009)). De façon remarquable, cet effet d'EB2 n'est visible que si l'ARNm ne subit pas au préalable de réaction d'épissage. En effet, si un intron est introduit artificiellement dans le gène rapporteur *Renilla luciferase*, alors l'ARNm correspondant est traduit aussi efficacement en présence d'EB2. Par ailleurs, la protéine EB2 n'a aucun effet sur la synthèse protéique globale des ARNm cellulaires (Ricci et al. 2009).

Suite à la publication de nos travaux, il a été montré que la protéine ORF57 de KSHV stimule aussi la traduction de ses ARNm cibles en interagissant avec la protéine cellulaire PYM (Boyne et al. 2010). La protéine PYM (*Partner of Y14 and Magoh*) interagit avec le dimère Magoh-Y14 du complexe EJC par son domaine N-terminal *in vitro* et *in vivo* dans le cytoplasme, et avec la sous-unité 40S du ribosome dans les complexes 48S par sa partie C-terminale (Bono et al. 2004; Diem et al. 2007). Ainsi, il a été initialement proposé que la protéine cytoplasmique PYM stimule la traduction des ARNm qui ont été épissés dans le noyau (Diem et al. 2007). Plus récemment, il a été montré *in vitro* que l'interaction de PYM avec Magoh-Y14 entraîne la dissociation des complexes EJC dans des extraits d'épissage (Gehring et al. 2009). *In vivo*, la surexpression de PYM entraîne aussi la dissociation de l'EJC de ses ARNm cibles et de manière corrélée, la déplétion de PYM par siRNA provoque l'accumulation d'EJC liés aux ARNm dans les fractions cytoplasmiques (Gehring et al. 2009). Par conséquent, la protéine PYM serait responsable de la dissociation de l'ARNm du complexe EJC lors du « pioneer round of translation ». Dans le cas de la protéine ORF57 de KSHV, il a été montré qu'ORF57 est retrouvée associée avec PYM dans des complexes 48S d'initiation de la traduction, et que la déplétion par siRNA de PYM supprime la stimulation de la traduction des ARNm viraux induite par ORF57 (Boyne et al. 2010).

Les protéines ICP27 et UL69 stimulent aussi la traduction de leurs ARNm cibles respectifs, mais avec des modes d'action différents. En effet, des analyses protéomiques ont montré qu'ICP27 interagit avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G, eIF3 et PABP (Fontaine-Rodriguez et al. 2004; Dobrikova et al. 2010). De plus, des études indépendantes ont montré que la quantité de certaines protéines de HSV-1, comme VP16, ICP5 et gD, n'est pas corrélée à la quantité cytoplasmique de ces ARNm et est fortement diminuée avec un virus mutant HSV-1 Δ ICP27, suggérant qu'ICP27 augmente la traduction de ces ARNm tardifs (Ellison et al. 2005; Larralde et al. 2006; Fontaine-Rodriguez and Knipe 2008). Le mode d'action par lequel la protéine UL69 de CMV stimule la traduction est un peu mieux caractérisé. La réalisation d'un crible deux-hybrides dans la levure a identifié eIF4A et PABPC1 comme nouveaux partenaires cellulaires d'UL69 (Aoyagi et al.

2010). Dans cette même étude, l'interaction entre UL69 et ces facteurs d'initiation de la traduction a été confirmée par co-immunoprécipitation avec des extraits cellulaires. De manière intéressante, il a aussi été montré par des expériences de m7GTP pull-down qu'UL69 est associé au complexe de liaison de la coiffe des ARNm, et que la protéine 4E-BP1 est exclu de ce complexe¹ (Aoyagi et al. 2010).

6. Régulations post-traductionnelles de la protéine EB2 et de ses analogues

L'activité des protéines virales EB2, ICP27, IE4, ORF57 et UL69 peut être régulée par des modifications post-traductionnelles, et en particulier par phosphorylation. Ces phosphorylations peuvent être le fait soit de protéines kinases cellulaires, soit de protéines kinases d'origine virales. Ainsi, la protéine EB2 est un substrat de la protéine kinase CK2 (anciennement appelée « Caséine Kinase 2 ») (annexe III - (Medina-Palazon et al. 2007)). La CK2 est une sérine/thréonine kinase hautement pléiotrope dont la liste des substrats est supérieure à 300 protéines, lesquelles sont impliquées dans un large éventail de fonctions cellulaires. Les sous-unités catalytiques de CK2 ($-\alpha$ et/ou $-\alpha'$) sont constitutivement actives soit seules, soit en combinaison avec les deux sous-unités régulatrices $-\beta$ pour former une protéine hétérotétramérique (holoenzyme) (Filhol and Cochet 2009). Nos travaux ont montré que la CK2 interagit *in vivo* avec EB2 grâce à ses sous-unités $-\alpha$ et $-\beta$ et qu'elle phosphoryle plusieurs résidus sérine dans la région N-terminale d'EB2 (Ser-55, -56 et -57) (Medina-Palazon et al. 2007). La mutation simultanée de ces trois sérines en alanines diminue significativement la production de particules virales. Cependant, ces mutations ne semblent pas affecter la capacité d'EB2 à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, et l'accumulation de ses ARNm cibles dans le cytoplasme n'est que très faiblement affectée, suggérant ainsi que la phosphorylation d'EB2 par la CK2 aurait une autre fonction.

Comme EB2, la protéine ICP27 de HSV-1 est phosphorylée par la protéine kinase CK2 sur les résidus Ser-16 et -18 (Wadd et al. 1999), et par la protéine kinase A (PKA) sur le résidu Ser-114 (Zhi and Sandri-Goldin 1999). Comme la mutation S114A entraîne une relocalisation partielle d'ICP27 dans le cytoplasme, il a été suggéré que la PKA régulerait l'import nucléaire d'ICP27 (Zhi and Sandri-Goldin 1999). En outre, l'utilisation du DRB,

¹ La protéine 4E-BP1 hypophosphorylée lie eIF4E pour former un hétérodimère réprimant l'association d'eIF4E avec eIF4G et par conséquent l'initiation de la traduction (Pause et al. 1994; Gingras et al. 1999).

un inhibiteur chimique spécifique de la CK2, a révélé que la phosphorylation des résidus Ser-16 et -18 est nécessaire pour l'interaction d'ICP27 avec la protéine hnRNP K (Wadd et al. 1999). Plus récemment, il a été montré que la mutation des sites de phosphorylation d'ICP27 diminue fortement la production de virions HSV-1, et que ce mutant d'ICP27 lie toujours l'ARNm mais ne co-localise plus avec l'ARN polymérase II et la protéine Aly/REF (Corbin-Lickfett et al. 2010; Rojas et al. 2010). L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) a montré que ce mutant de phosphorylation d'ICP27 ne présente pas la même conformation que la protéine ICP27 sauvage (Corbin-Lickfett et al. 2010). La partie N-terminale est flexible mais celle du mutant semble encore plus flexible, ce qui pourrait expliquer les différences observées. La protéine ORF57 de KSHV est également phosphorylée *in vitro* par la CK2 (Malik and Clements 2004). Une étude récente a montré que la phosphorylation d'ORF57 joue un rôle important dans le contrôle de la stabilité de la protéine car elle prévient son clivage par la caspase-7 (Majerciak et al. 2015).

Enfin, la protéine UL69 de CMV peut être phosphorylée à la fois par la sérine/thréonine kinase virale UL97 (Thomas et al. 2009), et par son orthologue cellulaire CDK1 (*Cyclin-Dependent Kinase 1*) (Rechter et al. 2009). Il est intéressant de noter que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la kinase UL97 induit l'agrégation d'UL69 dans des structures nucléaires (« nuclear speckles¹ ») et diminue en partie son action sur l'export des ARNm viraux issus de gènes dépourvus d'intron (Thomas et al. 2009).

La phosphorylation n'est cependant pas le seul mécanisme de régulation de l'activité de ces protéines virales. Ainsi, la protéine ICP27 peut être méthylée dans son domaine RGG par l'enzyme PRMT1 (*Protein arginine Methyltransferase 1*) (Souki et al. 2009; Souki and Sandri-Goldin 2009; Yu et al. 2010). La mutation des résidus arginine méthylés empêche l'interaction *in vitro* d'ICP27 avec l'ARN (Yu et al. 2010), et la délétion du domaine RGG d'ICP27 augmente fortement la rapidité d'export nucléaire de la protéine (Souki et al. 2009). De plus, un défaut de méthylation d'ICP27 inhibe la réplication du génome viral ainsi que l'interaction entre ICP27 et la protéine kinase SRPK1 et le facteur Aly/REF (Souki et al. 2009; Souki and Sandri-Goldin 2009). Au vu de ses résultats, il a été émis l'hypothèse que la méthylation d'ICP27 pourrait ralentir son export nucléaire, lui permettant ainsi d'interagir correctement avec l'ARNm et ses partenaires cellulaires. La méthylation des analogues d'ICP27 n'a jamais été décrite, exceptée pour la protéine UL69 de CMV. En effet, une étude très récente a montré que l'enzyme PRMT6 interagit et

¹ Les « nuclear speckles » sont des structures nucléaires de 20-25 nm, de forme irrégulière, enrichies notamment en facteurs d'épissage et localisés dans le nucléoplasme en dehors de la chromatine.

méthyle plusieurs résidus arginine dans la région N-terminale d'UL69 (Thomas et al. 2015). De façon remarquable, cette région est aussi le domaine d'interaction d'UL69 avec la protéine UAP56 (Lischka et al. 2006), et la substitution de ces résidus arginine en alanine abolit la capacité d'UL69 à favoriser l'accumulation cytoplasmique d'un ARNm issu d'un gène rapporteur sans intron (Thomas et al. 2015). La méthylation est donc cruciale dans la fonction d'UL69 de facteur d'export des ARNm.

Comme la protéine EB2 et ses analogues ont de multiples fonctions dans le métabolisme des ARNm, on peut supposer malgré l'absence de données que d'autres modifications post-traductionnelles (telles que l'ubiquitination, la sumoylation...) réguleraient la spécificité d'interaction de ces RBPs virales avec l'ARNm et/ou des protéines cellulaires. Des travaux récents chez *S. cerevisiae* démontrent en effet que ces modifications jouent un rôle important dans la dynamique d'assemblage des mRNPs (Babour et al. 2012; Bretes et al. 2014; Oeffinger and Montpetit 2015).

7. Les RBPs virales comme cibles thérapeutiques

Les antiviraux actuels pour le traitement des pathologies associées aux herpèsvirus sont tous basés sur des analogues de nucléosides. Ces molécules, comme l'acyclovir et le gancyclovir, s'incorporent dans l'ADN viral et bloquent l'ADN polymérase virale ce qui inhibe spécifiquement la réplication du virus (Price and Prichard 2011; Jordheim et al. 2013). Cependant, l'utilisation récurrente de ces agents conduit souvent à l'apparition de virus résistants. Le développement d'autres stratégies est donc nécessaire.

Une stratégie séduisante consisterait à cibler directement la protéine EB2 et ses analogues, puisqu'elles sont indispensables à la production de virions infectieux. Une telle stratégie a été développée pour inhiber l'expression de la protéine ICP27 avec des PPMO (*Peptide-conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers*) dans le cas d'infection oculaire par HSV-1 (Moerdyk-Schauwecker et al. 2009). L'utilisation de ces morpholinos aux propriétés pharmacologiques améliorées inhibe la réplication virale à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin. Ces résultats sont très encourageants et confirment le fort potentiel thérapeutique des oligomères anti-sens de type morpholino conjugués à des peptides comme traitements anti-herpétiques.

Une autre stratégie possible consisterait à cibler les protéines indispensables au fonctionnement des RBPs virales, et notamment celles impliquées dans leurs modifications post-traductionnelles. Ainsi, le maribavir, un inhibiteur spécifique de la protéine kinase virale UL97 qui phosphoryle la protéine UL69, a été testé pour traiter les

infections à CMV (Biron et al. 2002; Kern et al. 2004). Le mode d'action du maribavir est le blocage de l'incorporation de l'ATP dans le site catalytique de la kinase. Son activité antivirale *in vitro* et *in vivo* dans un modèle animal a été démontrée mais le maribavir n'a pas dépassé la phase d'essais clinique III (Marty et al. 2011).

L'idée de bloquer par des inhibiteurs chimiques les RBPs virales, ou des protéines impliquées dans leurs modes d'action, reste cependant une stratégie intéressante à développer. En effet, une étude très récente a démontré que cette stratégie est efficace dans le cas de HIV, et a identifié la molécule ABX464 comme un inhibiteur de la protéine Rev (Campos et al. 2015). Alors que les thérapies actuelles consistent à empêcher l'infection par HIV de nouvelles cellules du système immunitaire, la petite molécule ABX464 interfère avec la biogenèse des ARN viraux. ABX464 inhibe la réplication virale en interagissant avec le complexe CBC, et empêche ainsi l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm viraux par Rev sans affecter celui des ARNm cellulaires (Campos et al. 2015). Les études de toxicité et de pharmacocinétique de cette nouvelle molécule sont très encourageantes, et des essais cliniques de phase II sont actuellement en cours. Dans le cas de la protéine EB2, une étude très récente a montré que la spironolactone, un composé organo-sulfuré de la classe des stéroïdes, bloque dans un modèle cellulaire la production de particules virales d'EBV en inhibant l'expression des gènes viraux dépendants d'EB2 (Verma et al. 2016). Le mode d'action par lequel cette molécule inhibe la fonction d'EB2 n'a pas été caractérisé, mais ces nouveaux résultats ouvrent la voie pour le développement de nouveaux traitements anti-herpétiques.

Par ailleurs, la détermination de la structure cristallographique de la protéine EB2 et de celle de ses analogues sera certainement une aide précieuse pour rechercher des inhibiteurs spécifiques de ces facteurs viraux.

8. Problématique du sujet de thèse

Les travaux menés au cours de mon doctorat ont tenté de décrypter plus précisément le rôle de la protéine EB2 dans le métabolisme des ARNm. Des travaux antérieurs au laboratoire ont montré qu'EB2 favorise l'accumulation cytoplasmique de la majorité des ARNm viraux, dont la principale caractéristique est d'être issus de gènes sans intron (Gruffat et al. 2002; Batisse et al. 2005; Juillard et al. 2009). Cependant, il semble que la fonction d'EB2 soit plus complexe que celle de facteur d'export des ARNm car celle-ci stimule aussi la traduction de ses ARNm cibles (annexe II - (Ricci et al. 2009)), et aucune étude ne s'est intéressée au devenir des ARNm viraux dans le noyau en absence d'EB2. Dans la partie qui suit, je présenterai nos résultats récents sous forme de trois publications

scientifiques (articles I, II et III). Le lecteur pourra également se référer pour une meilleure compréhension de ces résultats aux autres publications scientifiques auxquelles je suis associé (annexes I, II, III et IV).

RÉSULTATS

I - The splicing factor SRSF3 is functionally connected to the nuclear RNA exosome for intronless mRNA decay

Fabrice Mure, Nour El Houda Benbahouche, Edouard Bertrand, Evelyne Manet and Henri Gruffat

L'exosome à ARN joue un rôle important dans la maturation et la dégradation de plusieurs classes d'ARN. Cependant, la reconnaissance et le recrutement de l'exosome sur ses substrats nucléaires sont mal compris. Dans ce travail, en utilisant comme modèle le virus d'Epstein-Barr, nous décrivons une nouvelle fonction du facteur d'épissage SRSF3 dans le contrôle-qualité des ARNm nucléaires. Nous montrons que certains ARNm viraux, générés à partir de gènes sans intron, contiennent des sites cryptiques d'épissage qui entraînent un épissage aberrant, et par conséquent la dégradation de ces ARNm par l'exosome nucléaire. Cet effet est contrecarré par la protéine virale EB2 qui stabilise ces ARNm viraux et stimule leur export nucléo-cytoplasmique puis leur traduction. En absence d'EB2, la protéine SRSF3 interagit à la fois avec l'exosome et son cofacteur nucléaire NEXT, et déstabilise fortement ces ARNm. L'ensemble de nos résultats démontre un lien direct entre les machineries cellulaires d'épissage et de dégradation des ARNm. Nous proposons que la protéine SRSF3 assiste l'exosome et le complexe nucléaire NEXT dans la reconnaissance et la dégradation de certains ARNm aberrants.

II - *In vitro* translation of mRNAs that are in their native ribonucleoprotein complexes

Fabrice Mure*, Baptiste Panthu*, Henri Gruffat and Théophile Ohlmann

*co-premier auteur

L'ARNm interagit avec un réseau de plusieurs centaines de protéines qui lient l'ARN ou RBPs (*RNA-Binding Proteins*) pour former une particule ribonucléoprotéique ou mRNP. L'assemblage des RBPs débute dans le noyau de façon co-transcriptionnelle et certaines de ces protéines restent associées à l'ARNm dans le cytoplasme où elles participent à sa traduction. Cependant, à cause de sa taille, de sa complexité et de sa grande variabilité, il est difficile d'évaluer l'influence de la composition de la mRNP sur sa traduction. Dans ce travail, la mise au point d'un nouveau système de traduction *in vitro* nous a permis de comparer l'efficacité traductionnelle d'ARNm rapporteurs qui sont associés, ou non, à leurs RBPs endogènes. Nos résultats montrent un fort impact des RBPs sur l'efficacité de traduction d'un ARNm, et révèlent des variations intrinsèques de cette efficacité dues à la fois à la structure et aux étapes de maturation nucléaire de l'ARNm. Par exemple, l'utilisation d'un gène rapporteur avec un intron confirme que l'épissage stimule efficacement la traduction. L'ensemble de nos résultats démontre *in vitro* que les étapes nucléaires et cytoplasmiques de régulation de l'expression des gènes sont couplées chez les eucaryotes, et que ceci est la conséquence de l'interaction avec l'ARNm d'un réseau complexe et dynamique de RBPs.

III - Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates translation initiation of mRNAs through direct interactions with both PABP and eIF4G

Fabrice Mure, Baptiste Panthu, Isabelle Zanella-Cléon, Frédéric Delolme, Evelyne Manet, Théophile Ohlmann and Henri Gruffat

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) exprime de nombreux ARNm à partir de gènes dépourvus d'intron. Comme la réaction d'épissage stimule la traduction, ces ARNm viraux sont traduits défavorablement par rapport aux ARNm cellulaires, générés à partir de gènes avec introns. Afin de pallier ce défaut d'épissage, le virus code pour une protéine de liaison à l'ARN (RBP) appelée EB2 qui a déjà été décrite comme favorisant à la fois l'export nucléocytoplasmique et la traduction des ARNm viraux. Dans ce travail, nous montrons qu'EB2 interagit avec les deux complexes nucléaire et cytoplasmique qui lient la coiffe des ARNm (respectivement les complexes CBC et eIF4F), ainsi qu'avec la protéine PABP liant leur queue poly(A), pour favoriser l'initiation de la traduction de ses ARNm cibles. De manière intéressante, cet effet traductionnel d'EB2 est observé *in vitro* uniquement si EB2 est initialement liée à son ARNm cible dans le noyau. Nous démontrons également que l'association eIF4G-EB2-PABP diminue la sensibilité des ARNm cibles d'EB2 à des inhibiteurs de l'initiation de la traduction. L'ensemble de nos résultats suggère qu'EB2 lie et stabilise le complexe de liaison de la coiffe des ARNm pour augmenter la traduction de ses ARNm cibles, et démontre l'importance des étapes nucléaires de maturation des ARNm sur l'efficacité de leur traduction dans le cytoplasme.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les cancers associés à EBV (lymphome de Burkitt, carcinome du rhinopharynx, maladie de Hodgkin, ...) constituent plus de 10 % des cancers humains associés à une infection virale et sont un problème de santé publique majeur dans de nombreux pays d'Asie du Sud-Est et d'Afrique équatoriale. Dans les pays occidentaux, le développement de lymphomes et de maladies lymphoprolifératives induits par EBV est un risque important chez les individus immunodéprimés à la suite de transplantations d'organes ou d'une infection par le HIV (Parkin 2006; Taylor et al. 2015; Elgui de Oliveira et al. 2016). Il est donc primordial de mieux comprendre la biologie de ce virus dans l'optique de la mise au point de nouvelles stratégies diagnostiques, pronostiques et/ou thérapeutiques.

EBV est répandu de manière quasi-ubiquitaire dans la population humaine adulte. La primo-infection est généralement asymptomatique, mais peut dans certains cas déclencher la mononucléose infectieuse. Suite à cette infection, le virus persiste sous forme latente dans les lymphocytes B mémoires des individus infectés, avec par intermittence production *de novo* de virions au niveau des cellules épithéliales de l'oropharynx. Des travaux de recherche suggèrent que ces phases de réactivation virale joueraient un rôle important dans le développement de certains cancers (Hong et al. 2005; Yu et al. 2012; Yasuda et al. 2013; Sugden 2014).

Dans ce contexte, les principaux travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse ont porté sur l'étude du rôle de la protéine EB2 du virus d'Epstein-Barr dans le métabolisme des ARNm. Cette RBP a une fonction majeure au cours du cycle viral productif car elle est indispensable à la production de virions (Gruffat et al. 2002). Des travaux antérieurs au laboratoire ont permis de montrer que : (i) EB2 favorise l'accumulation cytoplasmique de la majorité des ARNm viraux, dont la principale caractéristique est d'être issus de gènes sans intron (Gruffat et al. 2002; Batisse et al. 2005; Juillard et al. 2009) ; et (ii) EB2 stimule efficacement la traduction de ses ARNm cibles (annexe II - (Ricci et al. 2009)). Mes travaux de thèse ont donc visé à mieux caractériser les fonctions de cette RBP virale.

I - Les protéines EB2 et SRSF3 : à l'interface entre le contrôle-qualité et l'export des ARNm

SRSF3 permet l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm cibles d'EB2

Afin de déchiffrer les mécanismes impliqués dans les diverses fonctions d'EB2 dans le métabolisme des ARNm, nous avons tenté d'identifier les partenaires cellulaires d'EB2 grâce à deux approches complémentaires : un crible deux-hybrides en levure (annexe I - (Juillard et al. 2012)), et la purification suivie de l'analyse par spectrométrie de masse des complexes protéiques contenant EB2 à partir de cellules HEK293^{EBV Δ BMLF1} (article III). Parmi les partenaires d'EB2, nous avons identifié de nombreuses RBPs cellulaires, et en particulier plusieurs membres de la famille des protéines SR, dont SRSF1 (ASF/SF2), SRSF3 (SRp20) et SRSF7 (9G8). À l'aide d'un siRNA ciblant la protéine SRSF3, nous avons montré qu'en absence de cette protéine, EB2 n'est plus capable d'exporter dans le cytoplasme certains ARNm issus de gènes sans intron (e.g. Renilla luciférase, ADNc β -globine). De plus, des expériences de RIP ont révélé que l'interaction de SRSF3 avec ces ARNm est augmentée en présence d'EB2 (annexe I - (Juillard et al. 2012)). L'ensemble de ces données démontrent que l'association EB2-SRSF3 est nécessaire à la fonction de facteur d'export des ARNm d'EB2. Étant donné que (i) EB2 interagit également avec les protéines SRSF1 et SRSF7, (ii) chacune des protéines SR lie individuellement des ARNm distincts (Ankō et al. 2010), et (iii) les protéines SRSF3 et SRSF7 sont capables de recruter le facteur TAP/NXF1 (Huang and Steitz 2001; Huang et al. 2003), il est probable que l'export par EB2 de certains ARNm viraux générés à partir de gènes dépourvus d'intron soit dépendant d'autres protéines SR. Il serait donc intéressant de dépléter par siRNA chacune des protéines SR indépendamment, puis de quantifier par RNA-seq les ARNm cytoplasmiques et totaux pour déterminer leur effet sur l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm cibles d'EB2.

De façon remarquable, des travaux très récents ont montré par iCLIP que les sept protéines SRSF1-7 lient à la fois les ARNm non épissés et les ARNm épissés, ce qui indique que celles-ci restent associées aux ARNm une fois la réaction d'épissage terminée (Müller-Mcnicoll et al. 2016). Cette même étude a montré que les protéines SRSF1-7 interagissent toutes avec le facteur TAP/NXF1 mais avec une affinité différente, et que l'interaction prédominante est celle de SRSF3. Ceci est consolidé par les résultats de iCLIP démontrant que SRSF3 et TAP/NXF1 ont des sites de fixation identiques, en particulier dans le dernier exon et la région 3' UTR de certains ARNm. Enfin, il a été montré que les protéines SRSF3 et SRSF7 régulent de façon opposée la longueur de la région 3' UTR de certains ARNm en

modulant l'épissage alternatif ou le site de clivage/polyadénylation (Müller-Mcnicoll et al. 2016). Ainsi, il apparaît de plus en plus évident que les protéines SR jouent un rôle central dans le couplage entre l'épissage, la polyadénylation et l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm, et que celles-ci influencent leur devenir en recrutant le facteur d'export TAP/NXF1 sur les ARNm matures (Müller-Mcnicoll et al. 2016; Elbarbary and Maquat 2016).

EB2 protège les ARNm issus de gènes sans intron de la dégradation par l'exosome

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la fonction de facteur d'export des ARNm d'EB2 ont été bien caractérisés au cours de la dernière décennie. Paradoxalement, aucune étude ne s'est intéressée au devenir des ARNm viraux en absence de la protéine EB2. En effet, la principale caractéristique d'un facteur d'export des ARNm est l'accumulation nucléaire des ARNm polyadénylés lorsque ce facteur est muté. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la lignée cellulaire HEK293_{EBV Δ BMLF1} contenant un génome viral recombinant amputé du gène codant pour EB2. Il a été montré précédemment que l'expression ectopique de la protéine EB2 dans ces cellules induit l'accumulation cytoplasmique de la majorité des ARNm viraux exprimés au cours du cycle productif (Batisse et al. 2005). Nos résultats récents montrent que les ARNm tardifs d'EBV ne sont pas (ou peu) présents dans le noyau en absence d'EB2 suggérant que ceux-ci sont rapidement dégradés (article I). L'utilisation d'un système d'expression inductible (système Tet-off) nous a permis de confirmer cette hypothèse en démontrant que la protéine EB2 stabilise efficacement les ARNm viraux dans le noyau. À l'aide de siRNA ciblant les ribonucléases responsables de la dégradation nucléaire des ARNm, nous avons ensuite montré que les ARNm générés à partir de gènes sans intron sont principalement dégradés par la voie 3'-5' impliquant l'exosome.

SRSF3 marque les ARNm pour leur dégradation par l'exosome et son cofacteur nucléaire NEXT

De façon surprenante, nos résultats antérieurs ont montré qu'en absence d'EB2, la déplétion par siRNA de SRSF3 augmente l'accumulation cytoplasmique des ARNm cibles d'EB2, suggérant que SRSF3 aurait un effet délétère sur certains ARNm (annexe I - (Juillard et al. 2012)). Nous avons donc étudié de façon plus approfondie le rôle éventuel de SRSF3 dans le contrôle-qualité des ARNm (article I). Nos résultats indiquent que les protéines EB2 et SRSF3 ont un effet antagoniste sur la stabilité des ARNm issus de gènes sans intron car la déplétion par siRNA de SRSF3 stabilise significativement ces ARNm

dans le noyau. En outre, nous montrons par des expériences de co-immunoprécipitation que la protéine SRSF3 est associée à l'exosome et à la protéine RBM7 du complexe NEXT, mais n'interagit pas avec le complexe hTRAMP. Nous avons ensuite cherché à déterminer le rôle fonctionnel de ces interactions protéiques. Nous montrons d'une part, que la déplétion par siRNA de l'exosome (ou de son cofacteur NEXT) a un effet similaire sur la quantité des ARNm nucléaires issus de gènes sans intron que la déplétion de SRSF3, et d'autre part, que la déplétion de SRSF3 déstabilise certains composants du complexe NEXT, et en particulier l'ARN hélicase hMTR4. En accord avec cette observation, il a été montré que la déplétion d'une protéine du complexe NEXT déstabilise de façon conjointe les autres composants de ce complexe (Lubas et al. 2011), ce qui reflète les interactions entre toutes ces protéines.

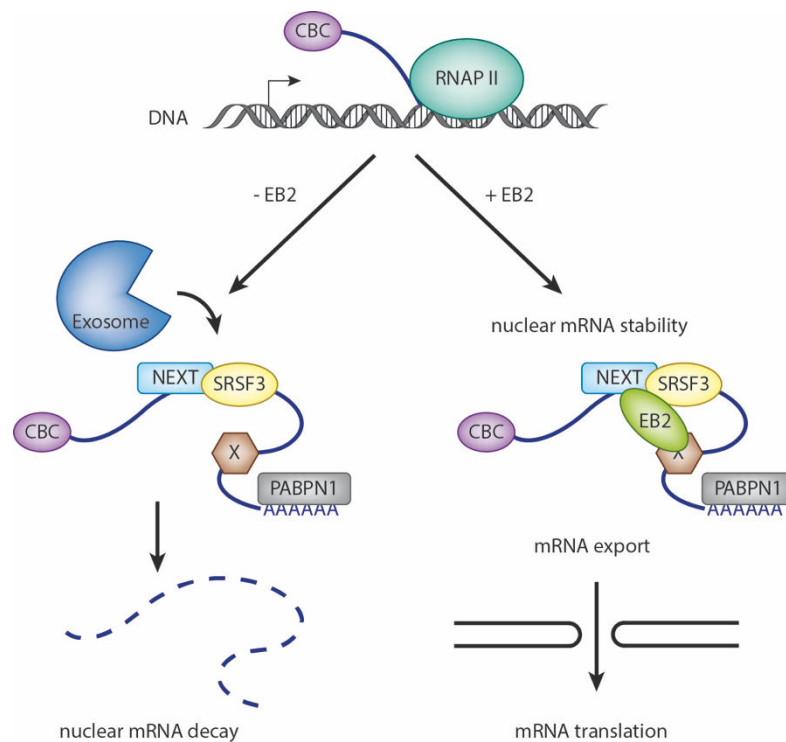


Figure 39 : Modèle du contrôle de la dégradation des ARNm nucléaires par les protéines EB2 et SRSF3. Au cours de la transcription, de nombreuses RBPs s'associent au (pré-)ARNm naissant dont le complexe CBC, la protéine PABPN1 et des protéines SR comme SRSF3. En absence d'EB2, la liaison de SRSF3 aux ARNm générés à partir de gènes dépourvus d'intron conduit au recrutement de l'exosome *via* le complexe NEXT, et par conséquent à la dégradation de ces ARNm dans le noyau. En revanche, en présence d'EB2, celle-ci stabilise ses ARNm cibles et favorise ainsi leur export nucléaire puis leur traduction.

Ainsi, nos résultats démontrent un lien étroit entre les machineries cellulaires d'épissage et de dégradation des (pré-)ARNm. Des analyses protéomiques ont déjà rapporté des interactions entre le spliceosome et les protéines RBM7 et hMTR4 (Hegele et al. 2012; Nag and Steitz 2012), et certaines sous-unités de l'exosome (Rappsilber et al. 2002). Sur la base de nos résultats, nous proposons donc qu'en absence de la protéine EB2, le facteur d'épissage SRSF3 associé aux ARNm naissants recrute l'exosome et son cofacteur nucléaire NEXT, ce qui aboutit à la dégradation rapide de ces ARNm dans le noyau (Figure 39). Par contre, lorsque la protéine EB2 est exprimée, celle-ci interagit avec la protéine SRSF3 (annexe I - (Juillard et al. 2012)), ce qui (i) protège les ARNm viraux de la dégradation par l'exosome, et (ii) permet le recrutement du facteur TAP/NXF1 pour exporter ces ARNm dans le cytoplasme.

De toute évidence, il semble que la reconnaissance des ARNm viraux par l'exosome soit plus complexe que celle décrite dans ce modèle. En effet, la protéine EB2 n'interfère pas dans l'interaction entre les protéines SRSF3 et RBM7 comme le démontre nos résultats de co-immunoprécipitation (données non présentées). Il serait intéressant de cartographier précisément le(s) domaine(s) d'interaction entre toutes ces protéines car il est probable que la zone d'interaction entre SRSF3 et EB2 soit distincte de celle entre SRSF3 et RBM7. De plus, des travaux récents d'une autre équipe indique que la protéine RBM7 s'associe précocement aux pré-ARNm, et s'accumule en particulier à l'extrémité 3' des introns (Lubas et al. 2015). Tout ceci suggère que ces trois RBPs pourraient s'associer simultanément aux mêmes ARNm, et que la fonction d'une RBP est affectée par la présence d'autres RBPs, indiquant que le devenir des ARNm est déterminé par un code de RBPs. En d'autres termes, dans le cas des ARNm issus de gènes sans intron, la liaison seule de SRSF3 induit la dégradation de ces ARNm, alors que la liaison de SRSF3 et EB2 permet leur export nucléo-cytoplasmique.

Un degré de complexité supplémentaire est de déterminer la spécificité des ARNm cibles d'EB2. En effet, des travaux de plusieurs équipes ont montré que (i) tous les ARNm viraux issus de gènes sans intron ne sont pas sensibles à EB2 (Batisse et al. 2005; Han et al. 2007; Thompson et al. 2016) ; et (ii) EB2 est capable d'augmenter post-transcriptionnellement le niveau d'expression de gènes rapporteurs artificiels sans intron (e.g. Renilla luciférase, ADNc β -globine) (Buisson et al. 1999; Ricci et al. 2009). Pour répondre à cette question, on pourrait envisager l'approche de CLIP-seq, comme ceci a été récemment réalisé avec la protéine ORF57 de KSHV (Sei et al. 2015), et déterminer si les sites de fixation d'EB2 sont adjacents de ceux des protéines SRSF3 et/ou RBM7.

Les ARNm cibles d'EB2 contiennent des sites cryptiques d'épissage

En lien avec nos travaux décrivant un rôle du facteur d'épissage SRSF3 dans le contrôle-qualité des ARNm, nous avons montré récemment au laboratoire que certains ARNm viraux contiennent des sites 5' et/ou 3' cryptiques d'épissage, et que la mutation de ces sites augmente la stabilité de ces ARNm dans le noyau (article I). C'est le cas en particulier de l'ARNm tardif BDLF1 dont la stabilité est contrôlée par la protéine EB2. De plus, la mutation de ces sites favorise l'export dans le cytoplasme de ces ARNm en absence d'EB2 (données non présentées). Ces résultats sont particulièrement intéressants car (i) ils pourraient expliquer la raison pour laquelle les ARNm viraux sont instables en absence d'EB2, et (ii) ils indiquent que les acteurs moléculaires de la surveillance des ARNm pourraient distinguer un site cryptique d'un site normal d'épissage. Toutefois, nos résultats ne permettent pas actuellement de démontrer clairement cette hypothèse. Pour cela, nous cherchons maintenant à déterminer si la protéine SRSF3 est impliquée dans l'épissage cryptique des ARNm viraux en analysant le profil d'épissage de ces transcrits dans des cellules déplétées par siRNA de SRSF3.

Ces nouveaux résultats sont en accord avec le modèle, basé sur des travaux chez la levure *S. cerevisiae*, suggérant qu'il existerait une compétition entre l'épissage et la surveillance nucléaire des pré-ARNm par l'exosome permettant de détecter les transcrits aberrants (Bousquet-Antonelli et al. 2000; Gudipati et al. 2012; Niemela et al. 2014; Kilchert et al. 2016). Dans ce modèle, il est proposé qu'un épissage lent des pré-ARNm aboutirait à une forte proportion de dégradation des transcrits par l'exosome et donc à peu d'ARNm, alors qu'un épissage rapide aboutirait au contraire à un niveau élevé d'ARNm. Ainsi, dans le cas des ARNm viraux, la présence de sites cryptiques d'épissage aboutirait au recrutement du spliceosome, et notamment de la protéine SRSF3, puis à l'épissage aberrant et/ou abortif de ces transcrits conduisant à leur dégradation par l'exosome et son cofacteur nucléaire NEXT. Le recrutement de la protéine EB2 sur les ARNm viraux pourrait alors masquer ces sites cryptiques d'épissage, et par conséquent stabiliser ces ARNm dans le noyau. On sait en effet qu'EB2 interfère dans la réaction d'épissage de certains ARNm, notamment dans l'épissage alternatif du pré-ARNm STAT1 en favorisant la reconnaissance d'un second site 5' d'épissage présent dans un intron (Verma 2008). Toutefois, le mécanisme permettant à EB2 de réguler l'épissage de ses ARNm cibles reste mal compris.

Une partie de mon travail de thèse a permis de démontrer un nouveau rôle du facteur d'épissage SRSF3 dans le contrôle-qualité des ARNm nucléaires (article I). Au cours de la

réalisation de ces travaux, il a été montré chez *S. cerevisiae* que les protéines SR-like Gbp2 (*G-strand binding protein 2*) et Hrb1 (*Hypothetical RNA-binding protein 1*) sont également des facteurs clés de la surveillance nucléaire des ARNm (Hackmann et al. 2014). Un rôle d'autres RBPs, comme le complexe CBC-ARS2 et la protéine PABPN1, a aussi été décrit récemment dans le contrôle-qualité de certains ARN (Andersen et al. 2013; Bresson and Conrad 2013). Étant donné que le complexe CBC interagit avec les snRNPs U4/U6.U5 du spliceosome (Pabis et al. 2013) et avec le complexe NEXT (Andersen et al. 2013), il apparaît donc que le devenir des ARNm est contrôlé par un réseau complexe de RBPs. Un défi majeur pour le futur est de comprendre comment ces RBPs recrutées co-transcriptionnellement distinguent les ARNm qui doivent être dégradés de ceux qui doivent être exportés dans le cytoplasme.

Dans le domaine de la virologie, il est intéressant de noter que l'exosome et les protéines hMTR4 et ZCCHC7 du complexe hTRAMP ont été décrits très récemment comme des facteurs antiviraux (Molleston et al. 2016). Dans cette étude, il a été montré dans des cellules d'insectes et des cellules humaines que l'infection par plusieurs virus à ARN induit la translocation de hMTR4 et ZCCHC7 dans le cytoplasme, formant un complexe ciblant spécifiquement les ARNm viraux pour leur dégradation (Molleston et al. 2016). Ces nouveaux résultats suggèrent que la machinerie de dégradation des ARNm joue un rôle très important dans le contrôle des infections virales.

II - Rôle de la protéine EB2 dans la traduction des ARNm

EB2 stimule la traduction des ARNm issus de gènes sans intron

Les mécanismes régulant la traduction des ARNm générés à partir de gènes avec introns ont commencé à être élucidés au cours de ces dernières années. En particulier, il est maintenant clair que le complexe EJC, déposé sur les ARNm dans le noyau au cours de l'épissage, stimule leur traduction dans le cytoplasme (Le Hir et al. 2016).

En utilisant comme modèle la RBP virale EB2, nos résultats antérieurs ont montré que cette protéine est associée aux polysomes et augmente significativement l'efficacité de traduction de ses ARNm cibles (annexe II - (Ricci et al. 2009)). De façon remarquable, cet effet d'EB2 n'est visible que si l'ARNm ne subit pas au préalable de réaction d'épissage. En effet, si un intron est introduit artificiellement dans le gène rapporteur Renilla luciférase, alors l'ARNm correspondant est traduit aussi efficacement qu'en absence d'EB2.

Le système hybride permet l'étude *in vitro* de la traduction des mRNPs

Afin de déterminer le mécanisme par lequel la protéine EB2 stimule la traduction de ses ARNm cibles, nous avons cherché à récapituler son effet traductionnel dans un système *in vitro*. Contrairement à la protéine ORF57 de KSHV (Boyne et al. 2010), nos résultats montrent qu'EB2 n'est pas capable de stimuler *in vitro* dans du lysat de réticulocytes de lapin (RRL) la traduction d'un ARNm viral ou de l'ARNm Renilla luciférase (données non présentées). Ceci suggère que l'effet de la protéine EB2 sur la traduction nécessite un recrutement nucléaire de cette RBP sur ses ARNm cibles.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc mis au point, en collaboration avec l'équipe du Dr Ohlmann, un système hybride de traduction *in vitro* des mRNPs (article II). Ce système est basé sur la purification de la fraction ribosomale à partir de cellules transfectées au préalable avec un gène rapporteur. Cette fraction ribosomale, contenant l'ARNm rapporteur associé à ses RBPs endogènes, est ensuite complétée avec du RRL appauvri de ses ribosomes et traduite *in vitro*. Ainsi, nos résultats montrent un fort impact des RBPs sur l'efficacité de traduction d'un ARNm, et révèlent des variations intrinsèques de cette efficacité dues à la fois à la structure et aux étapes de maturation nucléaire de l'ARNm. Par exemple, l'utilisation d'un gène rapporteur avec un intron confirme que l'épissage stimule efficacement la traduction. L'ensemble de nos résultats démontrent *in vitro* que les étapes nucléaires et cytoplasmiques de régulation de l'expression des gènes

sont couplées chez les eucaryotes, et que ceci est la conséquence de l'interaction avec l'ARNm d'un réseau complexe et dynamique de RBPs.

L'interaction eIF4G-EB2-PABP favorise l'initiation de la traduction des ARNm issus de gènes sans intron

Grâce à ce nouveau système hybride de traduction, nous avons pu évaluer *in vitro* l'impact de la RBP virale EB2 sur la traduction de ses ARNm cibles (article III). Nous montrons par des expériences biochimiques qu'EB2 interagit avec les deux complexes nucléaire et cytoplasmique qui lient la coiffe (respectivement les complexes CBC et eIF4F), ainsi qu'avec la protéine PABP qui lie la queue poly(A), afin de favoriser l'initiation de la traduction de ses ARNm cibles. Plus précisément, nos résultats indiquent que la région C-terminale d'EB2 lie indépendamment de l'ARN à la fois le domaine N-terminal d'eIF4G et la protéine PABP. Étant donné que le domaine d'interaction d'eIF4G avec PABP est aussi localisé dans sa région N-terminale (Imataka et al. 1998), il est donc probable que les régions d'interaction d'eIF4G avec PABP et EB2 soient adjacentes permettant la formation d'un complexe hétérotrimérique eIF4G-EB2-PABP. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant de cartographier en détail les domaines d'interaction entre toutes ces protéines. De plus, comme nos résultats indiquent que l'interaction entre EB2 et le domaine N-terminal d'eIF4G est faible, on ne peut pas exclure que celle-ci soit médiée par PABP car cette protéine est présente en quantité abondante dans le RRL. Pour exclure cette possibilité, on pourrait tester l'interaction *in vitro* entre les protéines recombinantes EB2 étiquetée avec un tag GST et le domaine N-terminal d'eIF4G étiqueté avec un tag His.

De manière intéressante, l'effet traductionnel d'EB2 ne peut être obtenu que si la protéine EB2 est au préalable liée aux ARNm dans le noyau. Nous démontrons également, grâce au système hybride de traduction *in vitro*, que l'association eIF4G-EB2-PABP diminue la sensibilité des ARNm cibles d'EB2 à des inhibiteurs de l'initiation de la traduction. Par ailleurs, nous avons vérifié que la stabilité de l'ARNm Renilla luciférase n'est pas affectée par la protéine EB2 dans le système hybride de traduction *in vitro* au cours de sa période d'incubation (données non présentées). L'ensemble de nos résultats suggèrent qu'EB2 lie et stabilise le complexe de liaison de la coiffe pour augmenter la traduction de ses ARNm cibles, et démontrent l'importance des étapes nucléaires de maturation des ARNm sur l'efficacité de leur traduction dans le cytoplasme (Figure 40). En outre, l'analyse de tous les analogues fonctionnels de la protéine EB2 chez les autres herpèsvirus a révélé que seule la protéine UL69 de CMV a un effet similaire à celui d'EB2 dans le système hybride de traduction *in vitro* (données non présentées). Ceci est en accord

avec les résultats d'une autre équipe démontrant qu'UL69 stimule la traduction grâce à son association avec l'ARN hélicase eIF4A et la protéine PABP (Aoyagi et al. 2010).

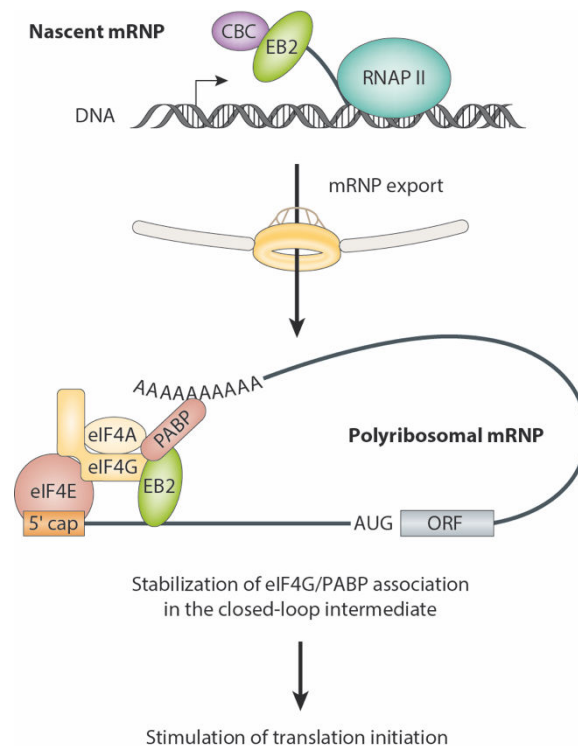


Figure 40 : Modèle de stimulation de la traduction des ARNm associés à EB2. La protéine EB2 est recrutée dans le noyau sur ses ARNm cibles grâce à son interaction avec le complexe CBC. Dans le cytoplasme, EB2 interagit avec les facteurs d'initiation eIF4G et PABP *via* son domaine C-terminal, et stabilise ainsi ses ARNm cibles sous une conformation « closed-loop » favorable à leur traduction.

Plusieurs questions restent cependant en suspens. Nous avons montré que la protéine EB2 stimule la traduction de l'ARNm rapporteur Renilla luciferase et de l'ARNm viral BDLF1 (généré à partir d'un vecteur d'expression). Il serait intéressant maintenant de déterminer l'ensemble des ARNm viraux dont la traduction est modulée par EB2. Pour répondre à cette question, on pourrait envisager l'approche de « ribosome profiling » combinée à celle de RNA-seq, en comparant les résultats dans les lignées cellulaires HEK293_{EBV} contenant le génome d'EBV et HEK293_{EBVΔBMLF1} contenant un génome viral recombinant amputé du gène codant pour EB2. Ceci nous permettrait également de déterminer si la protéine EB2 affecte la traduction de certains ARNm cellulaires.

Le développement récent de la technique de « ribosome profiling » est un outil puissant pour étudier de façon globale la traduction au cours des infections virales, et annoter l'ensemble des ORFs dans les génomes viraux (Stern-Ginossar and Ingolia 2015;

Stern-Ginossar 2015). Cette technique a été appliquée récemment à deux herpèsvirus : le cytomégalovirus humain (CMV) (Stern-Ginossar et al. 2012), et l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV) (Arias et al. 2014). De façon remarquable, ces travaux ont caractérisé dans le cas de CMV plus de 700 ORFs, dont plus de la moitié sont des petites ORFs¹ codant pour des peptides de moins de 80 acides aminés (Stern-Ginossar et al. 2012). La synthèse de ces micropeptides a été confirmée par spectrométrie de masse, mais leur fonction est à l'heure actuelle totalement inconnue. Cette même étude a montré que de nombreuses régions codantes se chevauchent soit dans la même ORF, produisant alors des isoformes tronquées de la même protéine, soit dans des ORFs différentes et donc produisent des protéines distinctes (Stern-Ginossar et al. 2012). Ces résultats démontrent à quel point les mécanismes d'expression des génomes des herpèsvirus peuvent être complexes et particulièrement originaux.

Cependant, le « ribosome profiling » fournit des informations temporelles limitées sur la traduction et masque l'hétérogénéité potentielle de la traduction entre les différentes cellules ou entre les différentes molécules d'ARNm au sein de la même cellule. Afin de remédier à ce problème, plusieurs équipes ont développé récemment de nouvelles approches d'imagerie en temps réel pour suivre *in vivo* la dynamique de la traduction de molécules d'ARNm uniques (Morisaki et al. 2016; Wang et al. 2016; Wu et al. 2015; 2016; Yan et al. 2016). Ces nouvelles technologies sont toutes basées sur le système de marquage de fluorescence SunTag². Plus précisément, l'ARNm d'intérêt et les polypeptides associés naissants sont marqués simultanément avec deux molécules fluorescentes différentes, permettant ainsi de visualiser dans des cellules vivantes la traduction de molécules d'ARNm isolées. L'application de ces techniques à la protéine EB2 permettrait d'étudier à la fois la localisation et la dynamique de la traduction des ARNm cibles de cette RBP.

Enfin, une question intéressante serait de déterminer si d'autres facteurs que la protéine EB2 favorise la traduction des ARNm viraux vis-à-vis des ARNm cellulaires au cours de l'infection. Un domaine de recherche émergent qui pourrait apporter des éléments de réponse à cette question est la mise en évidence de ribosomes spécialisés (Xue and Barna 2012; Shi and Barna 2015; Preiss 2016). En effet, il a été montré une

¹ Les sORFs (*short Open Reading Frames*) sont une caractéristique de tous les génomes dont la capacité à coder pour des peptides a été longtemps négligé. La compréhension de la fonction biologique de ces micropeptides représente un défi majeur pour le futur (Andrews and Rothnagel 2014).

² Le système SunTag permet en imagerie l'amplification du signal de fluorescence grâce à deux composants : un peptide contenant jusqu'à 24 copies d'un court épitope, et un anticorps qui reconnaît cet épitope conjugué à une protéine fluorescente (Tanenbaum et al. 2014).

hétérogénéité de la composition du ribosome résultant de modifications post-traductionnelles des protéines ribosomales et/ou de méthylation des ARNr. De manière intéressante, il a été montré récemment que la traduction coiffe-dépendante de certains ARNm du virus VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) requiert des ribosomes spécialisés (Lee et al. 2013a). Décrypter comment cette plasticité fonctionnelle du ribosome est utilisée par la cellule dans le cadre de son arsenal de défense antiviral, et par les virus afin de favoriser la traduction de leurs ARNm est un défi passionnant pour l'avenir.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'ensemble des travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse a permis de mieux caractériser le rôle de la protéine EB2 dans le métabolisme des ARNm du virus d'Epstein-Barr (Figure 41). En utilisant comme modèle une RBP virale, nos résultats démontrent une nouvelle fois l'importance des RBPs dans le contrôle de l'expression génique en couplant chacune des étapes nucléaires et cytoplasmiques du métabolisme des ARNm.

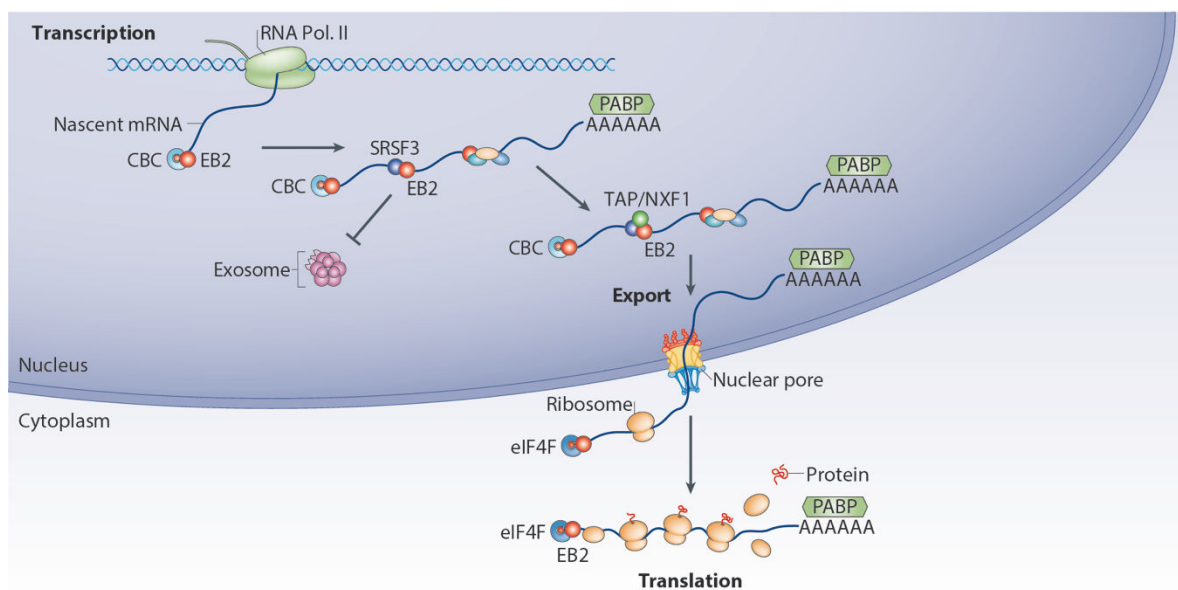


Figure 41 : Modèle du contrôle de l'expression des gènes viraux par la protéine EB2. La RBP virale EB2 est recrutée co-transcriptionnellement sur les ARNm issus de gènes sans intron et interagit avec de nombreuses RBPs cellulaires telles que CBC, Aly/REF, SRSF1, SRSF3, SRSF7, RBM15 et OTT3/RBM15B. Cette liaison d'EB2 stabilise d'une part les ARNm viraux en les protégeant de la dégradation par l'exosome et son cofacteur nucléaire NEXT, et d'autre part permet le recrutement du facteur TAP/NXF1 pour exporter ces ARNm. Une fois dans le cytoplasme, l'interaction d'EB2 avec eIF4G et PABP stabilise le complexe de liaison de la coiffe et favorise ainsi l'initiation de la traduction de ses ARNm cibles.

Plus généralement, les progrès récents des techniques de protéomique ont permis d'identifier le répertoire complet des RBPs qui lient les ARNm dans plusieurs lignées cellulaires (Baltz et al. 2012; Castello et al. 2012). À l'heure actuelle, un défi majeur est donc de développer de nouvelles méthodologies afin de répondre à plusieurs questions importantes. (i) Il est nécessaire de déterminer la fonction biologique des nouvelles RBPs identifiées. (ii) De nombreuses RBPs, telles que le complexe EJC et les protéines SR, sont

impliquées dans toutes les étapes de la biogenèse des ARNm. Il est donc primordial de comprendre le rôle précis de ces RBPs au cours de chaque étape. (iii) La détermination des sites de fixation des RBPs à l'échelle du transcriptome a permis d'identifier un grand nombre de sites d'interaction. Parmi ceux-ci, il est indispensable de déterminer ceux qui sont fonctionnels. (iv) Les ARNm et certaines classes d'ARN (e.g. longs ARNnc, PROMPTs) sont transcrits par l'ARN polymérase II, coiffés et polyadénylés. Il est donc nécessaire de comprendre plus précisément ce qui différencie ces ARN. (v) Enfin, il est important de caractériser la dynamique d'assemblage et de dissociation des RBPs avec les ARNm, ce qui définit certainement un code afin de déterminer le devenir des mRNPs.

BIBLIOGRAPHIE

- Abernathy E, Gilbertson S, Alla R, Glaunsinger B. 2015. Viral nucleases induce an mRNA degradation-transcription feedback loop in mammalian cells. *Cell Host Microbe* **18**: 243–253.
- Acker MG, Shin B-S, Dever TE, Lorsch JR. 2006. Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *J Biol Chem* **281**: 8469–8475.
- Adam SA, Nakagawa T, Swanson MS, Woodruff TK, Dreyfuss G. 1986. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Molecular and Cellular Biology* **6**: 2932–2943.
- Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, et al. 2016. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Arch Virol* **161**: 2921–2949.
- Adldinger HK, Delius H, Freese UK, Clarke J, Bornkamm GW. 1985. A putative transforming gene of jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology* **141**: 221–234.
- Afonina E, Stauber R, Pavlakis GN. 1998. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* **273**: 13015–13021.
- Alcázar-Román AR, Tran EJ, Guo S, Wente SR. 2006. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nat Cell Biol* **8**: 711–716.
- Alfieri C, Birkenbach M, Kieff E. 1991. Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* **181**: 595–608.
- Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D, Mitchell P. 1999. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes & Development* **13**: 2148–2158.
- Almada AE, Wu X, Kriz AJ, Burge CB, Sharp PA. 2013. Promoter directionality is controlled by U1 snRNP and polyadenylation signals. *Nature* **499**: 360–363.
- Alonso CR. 2012. A complex “mRNA degradation code” controls gene expression during animal development. *Trends in Genetics* **28**: 78–88.
- Alvarez E, Castello A, Menéndez-Arias L, Carrasco L. 2006. HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J* **396**: 219–226.
- Amberg DC, Goldstein AL, Cole CN. 1992. Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes & Development* **6**: 1173–1189.
- Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA. 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**: 112–118.
- Amrani N, Ghosh S, Mangus DA, Jacobson A. 2008. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* **453**: 1276–1280.

- Andersen CBF, Ballut L, Johansen JS, Chamieh H, Nielsen KH, Oliveira CLP, Pedersen JS, Séraphin B, Le Hir H, Andersen GR. 2006. Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science* **313**: 1968–1972.
- Andersen PR, Domanski M, Kristiansen MS, Storvall H, Ntini E, Verheggen C, Schein A, Bunkenborg J, Poser I, Hallais M, et al. 2013. The human cap-binding complex is functionally connected to the nuclear RNA exosome. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 1367–1376.
- Anderson JS, Parker RP. 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* **17**: 1497–1506.
- Anderson P, Kedersha N. 2009. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 430–436.
- Andersson R, Refsing Andersen P, Valen E, Core LJ, Bornholdt J, Boyd M, Heick Jensen T, Sandelin A. 2014. Nuclear stability and transcriptional directionality separate functionally distinct RNA species. *Nature Communications* **5**: 5336.
- Andersson-Ellström A, Bergström T, Svennerholm B, Milsom I. 1997. Epstein-Barr virus DNA in the uterine cervix of teenage girls. *Acta Obstet Gynecol Scand* **76**: 779–783.
- Andrews SJ, Rothnagel JA. 2014. Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nat Rev Genet* **15**: 193–204.
- Anger AM, Armache J-P, Berninghausen O, Habeck M, Subklewe M, Wilson DN, Beckmann R. 2013. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature* **497**: 80–85.
- Ankö M-L. 2014. Regulation of gene expression programmes by serine-arginine rich splicing factors. *Semin Cell Dev Biol* **32**: 11–21.
- Ankö M-L, Morales L, Henry I, Beyer A, Neugebauer KM. 2010. Global analysis reveals SRp20- and SRp75-specific mRNPs in cycling and neural cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**: 962–970.
- Ankö M-L, Müller-Mcnicoll M, Brandl H, Curk T, Gorup C, Henry I, Ule J, Neugebauer KM. 2012. The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biol* **13**: R17.
- Ankö M-L, Neugebauer KM. 2012. RNA-protein interactions in vivo: global gets specific. *Trends Biochem Sci* **37**: 255–262.
- Aoyagi M, Gaspar M, Shenk TE. 2010. Human cytomegalovirus UL69 protein facilitates translation by associating with the mRNA cap-binding complex and excluding 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2640–2645.
- Archer SK, Shirokikh NE, Beilharz TH, Preiss T. 2016. Dynamics of ribosome scanning and recycling revealed by translation complex profiling. *Nature* **535**: 570–574.
- Arias C, Weisburd B, Stern-Ginossar N, Mercier A, Madrid AS, Bellare P, Holdorf M, Weissman JS, Ganem D. 2014. KSHV 2.0: a comprehensive annotation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome using next-generation sequencing reveals novel genomic and functional features. *PLoS Pathog* **10**: e1003847.

- Asano K. 2000. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA^{Met} is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes & Development* **14**: 2534–2546.
- Asano K, Krishnamoorthy T, Phan L, Pavitt GD, Hinnebusch AG. 1999. Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2Bepsilon, GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2. *EMBO J* **18**: 1673–1688.
- Assenholt J, Mouaikel J, Andersen KR, Brodersen DE, Libri D, Jensen TH. 2008. Exonucleolysis is required for nuclear mRNA quality control in yeast THO mutants. *RNA* **14**: 2305–2313.
- Aubry V, Mure F, Mariamé B, Deschamps T, Wyrwicz LS, Manet E, Gruffat H. 2014. Epstein-Barr virus late gene transcription depends on the assembly of a virus-specific preinitiation complex. *J Virol* **88**: 12825–12838.
- Aylett CHS, Boehringer D, Erzberger JP, Schaefer T, Ban N. 2015. Structure of a yeast 40S-eIF1-eIF1A-eIF3-eIF3j initiation complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**: 269–271.
- Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. 1998. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**: 395–404.
- Babcock GJ, Hochberg D, Thorley-Lawson DA. 2000. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* **13**: 497–506.
- Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. 2000. Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12250–12255.
- Babour A, Dargemont C, Stutz F. 2012. Ubiquitin and assembly of export competent mRNP. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 521–530.
- Baer BW, Kornberg RD. 1980. Repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1890–1892.
- Baer BW, Kornberg RD. 1983. The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* **96**: 717–721.
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**: 207–211.
- Bahar Halpern K, Caspi I, Lemze D, Levy M, Landen S, Elinav E, Ulitsky I, Itzkovitz S. 2015. Nuclear retention of mRNA in mammalian tissues. *Cell Reports* **13**: 2653–2662.
- Balagopal V, Parker R. 2009. Polysomes, P-bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 403–408.
- Balatsos NAA, Nilsson P, Mazza C, Cusack S, Virtanen A. 2006. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap-binding complex (CBC). *J Biol Chem* **281**: 4517–4522.

- Ballut L, Marchadier B, Baguet A, Tomasetto C, Séraphin B, Le Hir H. 2005. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**: 861–869.
- Baltz AG, Munschauer M, Schwanhäusser B, Vasile A, Murakawa Y, Schueler M, Youngs N, Penfold-Brown D, Drew K, Milek M, et al. 2012. The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts. *Mol Cell* **46**: 674–690.
- Balvay L, Lastra ML, Sargueil B, Darlix J-L, Ohlmann T. 2007. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**: 128–140.
- Barbosa I, Haque N, Fiorini F, Barrandon C, Tomasetto C, Blanchette M, Le Hir H. 2012. Human CWC22 escorts the helicase eIF4AIII to spliceosomes and promotes exon junction complex assembly. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 983–990.
- Barnes T, Kim W-C, Mantha AK, Kim S-E, Izumi T, Mitra S, Lee CH. 2009. Identification of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) as the endoribonuclease that cleaves c-myc mRNA. *Nucleic Acids Research* **37**: 3946–3958.
- Bartlam M, Yamamoto T. 2010. The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. *Protein Cell* **1**: 443–452.
- Bashkirov VI. 1997. A Mouse Cytoplasmic Exoribonuclease (mXRN1p) with Preference for G4 Tetraplex Substrates. *J Cell Biol* **136**: 761–773.
- Batisse J, Manet E, Middeldorp J, Sergeant A, Gruffat H. 2005. Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for intranuclear capsid assembly and production of gp350. *J Virol* **79**: 14102–14111.
- Baudoux L, Defechereux P, Rentier B, Piette J. 2000. Gene activation by Varicella-Zoster virus IE4 protein requires its dimerization and involves both the arginine-rich sequence, the central part, and the carboxyl-terminal cysteine-rich region. *J Biol Chem* **275**: 32822–32831.
- Beaulieu YB, Kleinman CL, Landry-Voyer A-M, Majewski J, Bachand F. 2012. Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet* **8**: e1003078.
- Beckmann BM, Horos R, Fischer B, Castello A, Eichelbaum K, Alleaume A-M, Schwarzl T, Curk T, Foehr S, Huber W, et al. 2015. The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nature Communications* **6**: 10127.
- Bedard KM, Daijogo S, Semler BL. 2007. A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *EMBO J* **26**: 459–467.
- Beelman CA, Stevens A, Caponigro G, LaGrandeur TE, Hatfield L, Fortner DM, Parker R. 1996. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* **382**: 642–646.
- Belsham GJ, McInerney GM, Ross-Smith N. 2000. Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Induces Cleavage of Translation Initiation Factors eIF4A and eIF4G within Infected Cells. *J Virol* **74**: 272–280.

- Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. 2011. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**: 1524–1529.
- Berget SM, Moore C, Sharp PA. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 3171–3175.
- Bianchin C, Mauxion F, Sentis S, Séraphin B, Corbo L. 2005. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA* **11**: 487–494.
- Bieniossek C, Schütz P, Bumann M, Limacher A, Uson I, Baumann U. 2006. The crystal structure of the carboxy-terminal domain of human translation initiation factor eIF5. *Journal of Molecular Biology* **360**: 457–465.
- Bigalke JM, Heldwein EE. 2015. The Great (Nuclear) Escape: New Insights into the Role of the Nuclear Egress Complex of Herpesviruses. *J Virol* **89**: 9150–9153.
- Bigalke JM, Heuser T, Nicastro D, Heldwein EE. 2014. Membrane deformation and scission by the HSV-1 nuclear egress complex. *Nature Communications* **5**: 4131.
- Biron KK, Harvey RJ, Chamberlain SC, Good SS, Smith AA, Davis MG, Talarico CL, Miller WH, Ferris R, Dornsife RE, et al. 2002. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2365–2372.
- Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Cáceres JF, et al. 2005. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**: 1037–1044.
- Blobel G. 1973. A Protein of Molecular Weight 78,000 Bound to the Polyadenylate Region of Eukaryotic Messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 924–928.
- Blyn LB, Towner JS, Semler BL, Ehrenfeld E. 1997. Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol* **71**: 6243–6246.
- Boeck R, Tarun S, Rieger M, Deardorff JA, MullerAuer S, Sachs AB. 1996. The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J Biol Chem* **271**: 432–438.
- Boehm V, Haberman N, Ottens F, Ule J, Gehring NH. 2014. 3' UTR length and messenger ribonucleoprotein composition determine endocleavage efficiencies at termination codons. *Cell Reports* **9**: 555–568.
- Bonneau F, Basquin J, Ebert J, Lorentzen E, Conti E. 2009. The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell* **139**: 547–559.
- Bono F, Ebert J, Lorentzen E, Conti E. 2006. The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell* **126**: 713–725.
- Bono F, Ebert J, Unterholzner L, Güttler T, Izaurralde E, Conti E. 2004. Molecular insights into the interaction of PYM with the Mago-Y14 core of the exon junction complex. *EMBO Rep* **5**: 304–310.

- Borah S, Darricarrère N, Darnell A, Myoung J, Steitz JA. 2011. A viral nuclear noncoding RNA binds re-localized poly(A) binding protein and is required for late KSHV gene expression. *PLoS Pathog* **7**: e1002300.
- Bordeleau M-E, Cencic R, Lindqvist L, Oberer M, Northcote P, Wagner G, Pelletier J. 2006a. RNA-mediated sequestration of the RNA helicase eIF4A by pateamine A inhibits translation initiation. *Chemistry & Biology* **13**: 1287–1295.
- Bordeleau M-E, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, Belsham GJ, Wagner G, Tanaka J, Pelletier J. 2006b. Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol* **2**: 213–220.
- Boulon S, Verheggen C, Jady BE, Girard C, Pescia C, Paul C, Ospina JK, Kiss T, Matera AG, Bordonné R, et al. 2004. PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol Cell* **16**: 777–787.
- Bourgeois CF, Mortreux F, Auboeuf D. 2016. The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**: 426–438.
- Bousquet-Antonelli C, Presutti C, Tollervey D. 2000. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**: 765–775.
- Bouveret E, Rigaut G, Shevchenko A, Wilm M, Séraphin B. 2000. A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J* **19**: 1661–1671.
- Boyne JR, Colgan KJ, Whitehouse A. 2008. Recruitment of the complete hTREX complex is required for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus intronless mRNA nuclear export and virus replication. *PLoS Pathog* **4**: e1000194.
- Boyne JR, Jackson BR, Taylor A, Macnab SA, Whitehouse A. 2010. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with PYM to enhance translation of viral intronless mRNAs. *EMBO J* **29**: 1851–1864.
- Boyne JR, Whitehouse A. 2009. Nucleolar disruption impairs Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57-mediated nuclear export of intronless viral mRNAs. *FEBS Lett* **583**: 3549–3556.
- 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.
- Brar GA, Weissman JS. 2015. Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 651–664.
- Braun JE, Truffault V, Boland A, Huntzinger E, Chang C-T, Haas G, Weichenrieder O, Coles M, Izaurralde E. 2012. A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 1324–1331.
- Brenner S, Jacob F, Meselson M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* **190**: 576–581.
- Bresnahan WA, Shenk T. 2000. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* **288**: 2373–2376.

- Bresson SM, Conrad NK. 2013. The human nuclear poly(A)-binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLoS Genet* **9**: e1003893.
- Bresson SM, Hunter OV, Hunter AC, Conrad NK. 2015. Canonical poly(A) polymerase activity promotes the decay of a wide variety of mammalian nuclear RNAs. *PLoS Genet* **11**: e1005610.
- Bretes H, Rouviere JO, Leger T, Oeffinger M, Devaux F, Doye V, Palancade B. 2014. Sumoylation of the THO complex regulates the biogenesis of a subset of mRNPs. *Nucleic Acids Research* **42**: 5043–5058.
- Briggs MW, Burkard KTD, Butler JS. 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.
- Brockmann C, Soucek S, Kuhlmann SI, Mills-Lujan K, Kelly SM, Yang J-C, Iglesias N, Stutz F, Corbett AH, Neuhaus D, et al. 2012. Structural basis for polyadenosine-RNA binding by Nab2 Zn fingers and its function in mRNA nuclear export. *Structure* **20**: 1007–1018.
- Brogna S, McLeod T, Petric M. 2016. The Meaning of NMD: Translate or Perish. *Trends in Genetics* **32**: 395–407.
- Brouwer R, Allmang C, Raijmakers R, van Aarssen Y, Egberts WV, Petfalski E, van Venrooij WJ, Tollervy D, Pruijn GJM. 2001. Three novel components of the human exosome. *J Biol Chem* **276**: 6177–6184.
- Brown CE, Sachs AB. 1998. Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 6548–6559.
- Brown CE, Tarun SZ, Boeck R, Sachs AB. 1996. PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 5744–5753.
- Brown JA, Valenstein ML, Yario TA, Tycowski KT, Steitz JA. 2012. Formation of triple-helical structures by the 3'-end sequences of MALAT1 and MEN β noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 19202–19207.
- Brown JT, Bai X, Johnson AW. 2000. The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA* **6**: 449–457.
- Bryant HE, Wadd SE, Lamond AI, Silverstein SJ, Clements JB. 2001. Herpes simplex virus IE63 (ICP27) protein interacts with spliceosome-associated protein 145 and inhibits splicing prior to the first catalytic step. *J Virol* **75**: 4376–4385.
- Buchan JR. 2014. mRNP granules: assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol* **11**: 1019–1030.
- Buisson M, Hans F, Kusters I, Duran N, Sergeant A. 1999. The C-terminal region but not the Arg-X-Pro repeat of Epstein-Barr virus protein EB2 is required for its effect on RNA splicing and transport. *J Virol* **73**: 4090–4100.
- Buisson M, Manet E, Trescol-Biemont MC, Gruffat H, Durand B, Sergeant A. 1989. The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R. *J Virol* **63**: 5276–5284.

- Burd CG, Matunis EL, Dreyfuss G. 1991. The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 3419–3424.
- Burkitt D. 1962. A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* **194**: 232–234.
- Burkitt D. 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* **46**: 218–223.
- Busch A, Hertel KJ. 2012. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**: 1–12.
- Bushell M, Wood W, Carpenter G, Pain VM, Morley SJ, Clemens MJ. 2001. Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages. *J Biol Chem* **276**: 23922–23928.
- Callahan KP, Butler JS. 2010. TRAMP complex enhances RNA degradation by the nuclear exosome component Rrp6. *J Biol Chem* **285**: 3540–3547.
- Calogero RA, Pon CL, Canonaco MA, Gualerzi CO. 1988. Selection of the mRNA translation initiation region by Escherichia coli ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6427–6431.
- Campos N, Myburgh R, Garcel A, Vautrin A, Lapasset L, Nadal ES, Mahuteau-Betzer F, Najman R, Fornarelli P, Tantale K, et al. 2015. Long lasting control of viral rebound with a new drug ABX464 targeting Rev - mediated viral RNA biogenesis. *Retrovirology* **12**: 30.
- Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, Strein C, Davey NE, Humphreys DT, Preiss T, Steinmetz LM, et al. 2012. Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* **149**: 1393–1406.
- Castello A, Fischer B, Frese CK, Horos R, Alleaume A-M, Foehr S, Curk T, Krijgsveld J, Hentze MW. 2016. Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Mol Cell* **63**: 696–710.
- Castello A, Franco D, Moral-López P, Berlanga JJ, Alvarez E, Wimmer E, Carrasco L. 2009. HIV-1 protease inhibits cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PLoS One* **4**: e7997.
- Castello A, Hentze MW, Preiss T. 2015. Metabolic Enzymes Enjoying New Partnerships as RNA-Binding Proteins. *Trends Endocrinol Metab* **26**: 746–757.
- Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZ, Earnest TN, Noller HF. 1999. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* **285**: 2095–2104.
- Cáceres JF, Sreaton GR, Krainer AR. 1998. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes & Development* **12**: 55–66.
- Chan CC, Dostie J, Diem MD, Feng WQ, Mann M, Rappsilber J, Dreyfuss G. 2004. eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* **10**: 200–209.

- Chang C-T, Hautbergue GM, Walsh MJ, Viphakone N, van Dijk TB, Philipsen S, Wilson SA. 2013. Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex. *EMBO J* **32**: 473–486.
- Chang H, Lim J, Ha M, Kim VN. 2014. TAIL-seq: genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol Cell* **53**: 1044–1052.
- Chang JH, Jiao X, Chiba K, Oh C, Martin CE, Kiledjian M, Tong L. 2012. Dxo1 is a new type of eukaryotic enzyme with both decapping and 5'-3' exoribonuclease activity. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 1011–1017.
- Chang JH, Xiang S, Xiang K, Manley JL, Tong L. 2011. Structural and biochemical studies of the 5'→3' exoribonuclease Xrn1. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**: 270–276.
- Chazal P-E, Dagueuet E, Wendling C, Ulryck N, Tomasetto C, Sargueil B, Le Hir H. 2013. EJC core component MLN51 interacts with eIF3 and activates translation. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 5903–5908.
- Chávez S, Beilharz T, Rondón AG, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ, Lithgow T, Aguilera A. 2000. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**: 5824–5834.
- Chen C-YA, Shyu A-B. 2011. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**: 167–183.
- Chen I-HB, Sciabica KS, Sandri-Goldin RM. 2002. ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *J Virol* **76**: 12877–12889.
- Chen W, Moore MJ. 2014. The spliceosome: disorder and dynamics defined. *Curr Opin Struct Biol* **24**: 141–149.
- Cheng H, Dufu K, Lee C-S, Hsu JL, Dias A, Reed R. 2006. Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127**: 1389–1400.
- Chevallier-Greco A, Manet E, Chavrier P, Mosnier C, Daillie J, Sergeant A. 1986. Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J* **5**: 3243–3249.
- Chi B, Wang Q, Wu G, Tan M, Wang L, Shi M, Chang X, Cheng H. 2013. Aly and THO are required for assembly of the human TREX complex and association of TREX components with the spliced mRNA. *Nucleic Acids Research* **41**: 1294–1306.
- Chiba Y, Johnson MA, Lidder P, Vogel JT, van Erp H, Green PJ. 2004. AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*. *Gene* **328**: 95–102.
- Chiu Y-F, Sugden B. 2016. Epstein-Barr Virus: The Path from Latent to Productive Infection. *Annual Review of Virology* **3**: 359–372.
- Chlebowski A, Lubas M, Jensen TH, Dziembowski A. 2013. RNA decay machines: the exosome. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 552–560.

- Choe J, Ryu I, Park OH, Park J, Cho H, Yoo JS, Chi SW, Kim MK, Song HK, Kim YK. 2014. eIF4AIII enhances translation of nuclear cap-binding complex-bound mRNAs by promoting disruption of secondary structures in 5'UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: E4577–86.
- Chowdhury A, Kalurupalle S, Tharun S. 2014. Pat1 contributes to the RNA binding activity of the Lsm1-7-Pat1 complex. *RNA* **20**: 1465–1475.
- Chowdhury A, Mukhopadhyay J, 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.
- Chu D, Kazana E, Bellanger N, Singh T, Tuite MF, Haar Von Der T. 2014. Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs. *EMBO J* **33**: 21–34.
- Cohen JI. 2015. Epstein-Barr virus vaccines. *Clin Transl Immunology* **4**: e32.
- Cohen JI, Fauci AS, Varmus H, Nabel GJ. 2011. Epstein-Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. *Sci Transl Med* **3**: 1–3.
- Coller J, Parker R. 2004. Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem* **73**: 861–890.
- Coller J, Parker R. 2005. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**: 875–886.
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI. 1996. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J* **15**: 265–275.
- Conrad NK, Mili S, Marshall EL, Shu M-D, Steitz JA. 2006. Identification of a rapid mammalian deadenylation-dependent decay pathway and its inhibition by a viral RNA element. *Mol Cell* **24**: 943–953.
- Conrad NK, Shu M-D, Uyhazi KE, Steitz JA. 2007. Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 10412–10417.
- Conrad NK, Steitz JA. 2005. A Kaposi's sarcoma virus RNA element that increases the nuclear abundance of intronless transcripts. *EMBO J* **24**: 1831–1841.
- Corbin-Lickfett KA, Rojas S, Li L, Cocco MJ, Sandri-Goldin RM. 2010. ICP27 phosphorylation site mutants display altered functional interactions with cellular export factors Aly/REF and TAP/NXF1 but are able to bind herpes simplex virus 1 RNA. *J Virol* **84**: 2212–2222.
- Costantino DA, Pfingsten JS, Rambo RP, Kieft JS. 2008. tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**: 57–64.
- Countryman J, Jenson H, Seibl R, Wolf H, Miller G. 1987. Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J Virol* **61**: 3672–3679.

- Covarrubias S, Gaglia MM, Kumar GR, Wong W, Jackson AO, Glaunsinger BA. 2011. Coordinated destruction of cellular messages in translation complexes by the gammaherpesvirus host shutoff factor and the mammalian exonuclease Xrn1. *PLoS Pathog* **7**: e1002339.
- Covarrubias S, Richner JM, Clyde K, Lee YJ, Glaunsinger BA. 2009. Host shutoff is a conserved phenotype of gammaherpesvirus infection and is orchestrated exclusively from the cytoplasm. *J Virol* **83**: 9554–9566.
- Craig AW, Haghghat A, Yu AT, Sonenberg N. 1998. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**: 520–523.
- Crick FHC. 1958. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* **12**: 138–163.
- Custódio N, Carmo-Fonseca M, Geraghty F, Pereira HS, Grosveld F, Antoniou M. 1999. Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription. *EMBO J* **18**: 2855–2866.
- Cygnar D, Hagemeyer S, Kronemann D, Bresnahan WA. 2012. The cellular protein SPT6 is required for efficient replication of human cytomegalovirus. *J Virol* **86**: 2011–2020.
- Dai-Ju JQ, Li L, Johnson LA, Sandri-Goldin RM. 2006. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. *J Virol* **80**: 3567–3581.
- Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E. 1984. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7632–7636.
- Das R, Dufu K, Romney B, Feldt M, Elenko M, Reed R. 2006. Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly. *Genes & Development* **20**: 1100–1109.
- Das R, Yu J, Zhang Z, Gygi MP, Krainer AR, Gygi SP, Reed R. 2007. SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **26**: 867–881.
- Das S, Krainer AR. 2014. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Mol Cancer Res* **12**: 1195–1204.
- Daugeron MC, Mauxion F, Séraphin B. 2001. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Research* **29**: 2448–2455.
- Davidson L, Kerr A, West S. 2012. Co-transcriptional degradation of aberrant pre-mRNA by Xrn2. *EMBO J* **31**: 2566–2578.
- de Almeida SF, García-Sacristán A, Custódio N, Carmo-Fonseca M. 2010. A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination. *Nucleic Acids Research* **38**: 8015–8026.
- de Breyne S, Bonderoff JM, Chumakov KM, Lloyd RE, Hellen CUT. 2008. Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF5B by enterovirus 3C proteases. *Virology* **378**: 118–122.
- Decker CJ, Parker R. 2012. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**: a012286.

- Decroly E, Ferron F, Lescar J, Canard B. 2012. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol* **10**: 51–65.
- Degot S, Le Hir H, Alpy F, Kedinger V, Stoll I, Wendling C, Séraphin B, Rio M-C, Tomasetto C. 2004. Association of the breast cancer protein MLN51 with the exon junction complex via its speckle localizer and RNA binding module. *J Biol Chem* **279**: 33702–33715.
- Dehlin E, Wormington M, Korner CG, Wahle E. 2000. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J* **19**: 1079–1086.
- Deo RC, Bonanno JB, Sonenberg N, Burley SK. 1999. Recognition of polyadenylate RNA by the Poly(A)-Binding Protein. *Cell* **98**: 835–845.
- Derry MC, Yanagiya A, Martineau Y, Sonenberg N. 2006. Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **71**: 537–543.
- Deshmukh MV, Jones BN, Quang-Dang D-U, Flinders J, Floor SN, Kim C, Jemielity J, Kalek M, Darzynkiewicz E, Gross JD. 2008. mRNA decapping is promoted by an RNA-binding channel in Dcp2. *Mol Cell* **29**: 324–336.
- Dever TE. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**: 545–556.
- Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG. 1992. Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**: 585–596.
- Dever TE, Green R. 2012. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**: a013706.
- Diem MD, Chan CC, Younis I, Dreyfuss G. 2007. PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**: 1173–1179.
- Dobrikova E, Shveygert M, Walters R, Gromeier M. 2010. Herpes simplex virus proteins ICP27 and UL47 associate with polyadenylate-binding protein and control its subcellular distribution. *J Virol* **84**: 270–279.
- Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, Sodeik B. 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* **13**: 2795–2809.
- Doma MK, Parker R. 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**: 561–564.
- Doma MK, Parker R. 2007. RNA quality control in eukaryotes. *Cell* **131**: 660–668.
- Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. 2013. The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci* **70**: 3493–3511.
- Dowd JB, Palermo T, Brite J, McDade TW, Aiello A. 2013. Seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in U.S. children ages 6-19, 2003-2010. *PLoS One* **8**: e64921.

- Drazkowska K, Tomecki R, Stodus K, Kowalska K, Czarnocki-Cieciura M, Dziembowski A. 2013. The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Research* **41**: 3845–3858.
- Dreyfuss G, Choi YD, Adam SA. 1984. Characterization of heterogeneous nuclear RNA-protein complexes in vivo with monoclonal antibodies. *Molecular and Cellular Biology* **4**: 1104–1114.
- Dufu K, Livingstone MJ, Seebacher J, Gygi SP, Wilson SA, Reed R. 2010. ATP is required for interactions between UAP56 and two conserved mRNA export proteins, Aly and CIP29, to assemble the TREX complex. *Genes & Development* **24**: 2043–2053.
- Dunckley T, 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.
- Durand S, Franks TM, Lykke-Andersen J. 2016. Hyperphosphorylation amplifies UPF1 activity to resolve stalls in nonsense-mediated mRNA decay. *Nature Communications* **7**: 12434.
- Durand S, Lykke-Andersen J. 2013. Nonsense-mediated mRNA decay occurs during eIF4F-dependent translation in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 702–709.
- Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Séraphin B. 2006. A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**: 15–22.
- Eberle AB, Hesse V, Helbig R, Dantoft W, Gimber N, Visa N. 2010. Splice-site mutations cause Rrp6-mediated nuclear retention of the unspliced RNAs and transcriptional down-regulation of the splicing-defective genes. *PLoS One* **5**: e11540.
- Eberle AB, Lykke-Andersen S, Mühlemann O, Jensen TH. 2009. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**: 49–55.
- Eberle AB, Visa N. 2014. Quality control of mRNP biogenesis: networking at the transcription site. *Semin Cell Dev Biol* **32**: 37–46.
- Egan ED, Braun CR, Gygi SP, Moazed D. 2014. Post-transcriptional regulation of meiotic genes by a nuclear RNA silencing complex. *RNA* **20**: 867–881.
- Egecioglu DE, Henras AK, Chanfreau GF. 2006. Contributions of Trf4p- and Trf5p-dependent polyadenylation to the processing and degradative functions of the yeast nuclear exosome. *RNA* **12**: 26–32.
- Elbarbary RA, Maquat LE. 2016. Coupling pre-mRNA splicing and 3' end formation to mRNA export: alternative ways to punch the nuclear export clock. *Genes & Development* **30**: 487–488.
- Elgadi MM, Hayes CE, Smiley JR. 1999. The herpes simplex virus vhs protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts. *J Virol* **73**: 7153–7164.

- Elgui de Oliveira D, Müller-Coan BG, Pagano JS. 2016. Viral carcinogenesis beyond malignant transformation: EBV in the progression of human cancers. *Trends Microbiol* **24**: 649–664.
- Eliseeva IA, Lyabin DN, Ovchinnikov LP. 2013. Poly(A)-binding proteins: Structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry Moscow* **78**: 1377–1391.
- Elkon R, Ugalde AP, Agami R. 2013. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* **14**: 496–506.
- Ellison KS, Maranchuk RA, Mottet KL, Smiley JR. 2005. Control of VP16 translation by the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27. *J Virol* **79**: 4120–4131.
- Epstein MA. 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med* **121**: 761–770.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM. 1964. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* **1**: 702–703.
- Epstein MA, Barr YM. 1964. Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* **1**: 252–253.
- Erickson FL, Hannig EM. 1996. Ligand interactions with eukaryotic translation initiation factor 2: Role of the gamma-subunit. *EMBO J* **15**: 6311–6320.
- Escudero-Paunetto L, Li L, Hernandez FP, Sandri-Goldin RM. 2010. SR proteins SRp20 and 9G8 contribute to efficient export of herpes simplex virus 1 mRNAs. *Virology* **401**: 155–164.
- Fahmi H, Cochet C, Hmama Z, Opolon P, Joab I. 2000. Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J Virol* **74**: 5810–5818.
- Falk S, Weir JR, Hentschel J, Reichelt P, Bonneau F, Conti E. 2014. The molecular architecture of the TRAMP complex reveals the organization and interplay of its two catalytic activities. *Mol Cell* **55**: 856–867.
- Farjot G, Buisson M, Duc Dodon M, Gazzolo L, Sergeant A, Mikaelian I. 2000. Epstein-Barr virus EB2 protein exports unspliced RNA via a CRM-1 independent pathway. *J Virol* **74**: 6068–6076.
- Fasken MB, Corbett AH. 2009. Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biol* **6**: 237–241.
- Fasken MB, Leung SW, Banerjee A, Kodani MO, Chavez R, Bowman EA, Purohit MK, Rubinson ME, Rubinson EH, Corbett AH. 2011. Air1 zinc knuckles 4 and 5 and a conserved IWRXY motif are critical for the function and integrity of the Trf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) RNA quality control complex. *J Biol Chem* **286**: 37429–37445.
- Fasken MB, Stewart M, Corbett AH. 2008. Functional significance of the interaction between the mRNA-binding protein, Nab2, and the nuclear pore-associated protein, Mlp1, in mRNA export. *J Biol Chem* **283**: 27130–27143.

- Fernández IS, Bai X-C, Hussain T, Kelley AC, Lorsch JR, Ramakrishnan V, Scheres SHW. 2013. Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex. *Science* **342**: 1240585.
- Fernández IS, Bai X-C, Murshudov G, Scheres SHW, Ramakrishnan V. 2014. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell* **157**: 823–831.
- Filhol O, Cochet C. 2009. Cellular functions of protein kinase CK2 - a dynamic affair. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1830–1839.
- Fiorini F, Bagchi D, Le Hir H, Croquette V. 2015. Human Upf1 is a highly processive RNA helicase and translocase with RNP remodelling activities. *Nature Communications* **6**: 7581.
- Fiorini F, Boudvillain M, Le Hir H. 2013. Tight intramolecular regulation of the human Upf1 helicase by its N- and C-terminal domains. *Nucleic Acids Research* **41**: 2404–2415.
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R. 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475–483.
- Fitzgerald KD, Semler BL. 2011. Re-localization of cellular protein SRp20 during poliovirus infection: bridging a viral IRES to the host cell translation apparatus. *PLoS Pathog* **7**: e1002127.
- Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD. 1992. Trans-Acting Requirements for Replication of Epstein-Barr-Virus Ori-Lyt. *J Virol* **66**: 5030–5039.
- Flaherty SM, Fortes P, Izaurralde E, Mattaj IW, Gilmartin GM. 1997. Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11893–11898.
- Fletcher CM, Pestova TV, Hellen CU, Wagner G. 1999. Structure and interactions of the translation initiation factor eIF1. *EMBO J* **18**: 2631–2637.
- Folco EG, Lee C-S, Dufu K, Yamazaki T, Reed R. 2012. The proteins PDIP3 and ZC11A associate with the human TREX complex in an ATP-dependent manner and function in mRNA export. *PLoS One* **7**: e43804.
- Fong YW, Zhou Q. 2001. Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* **414**: 929–933.
- Fontaine-Rodriguez EC, Knipe DM. 2008. Herpes simplex virus ICP27 increases translation of a subset of viral late mRNAs. *J Virol* **82**: 3538–3545.
- Fontaine-Rodriguez EC, Taylor TJ, Olesky M, Knipe DM. 2004. Proteomics of herpes simplex virus infected cell protein 27: association with translation initiation factors. *Virology* **330**: 487–492.
- Franks TM, Singh G, Lykke-Andersen J. 2010. Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **143**: 938–950.

- Frappier L. 2012. Contributions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) to cell immortalization and survival. *Viruses* **4**: 1537–1547.
- Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrerío AL, Parker R, Dietz HC. 2002. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**: 2258–2261.
- Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. 2014. Gene expression regulation mediated through reversible m(6)A RNA methylation. *Nat Rev Genet* **15**: 293–306.
- Gaglia MM, Covarrubias S, Wong W, Glaunsinger BA. 2012. A common strategy for host RNA degradation by divergent viruses. *J Virol* **86**: 9527–9530.
- Galy V, Gadad O, Fromont-Racine M, Romano A, Jacquier A, Nehrbass U. 2004. Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* **116**: 63–73.
- Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J. 2000. Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol Cell* **5**: 479–488.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 113–126.
- Gebauer F, Hentze MW. 2016. IRES unplugged. *Science* **351**: 228.
- Geerlings TH, Vos JC, Raué HA. 2000. The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'-3' exonucleases. *RNA* **6**: 1698–1703.
- Gehring NH, Lamprinaki S, Kulozik AE, Hentze MW. 2009. Disassembly of Exon Junction Complexes by PYM. *Cell* **137**: 536–548.
- Gelinas RE, Roberts RJ. 1977. One predominant 5'-undecanucleotide in adenovirus 2 late messenger RNAs. *Cell* **11**: 533–544.
- Gerper P, Whang-Peng J, Monroe JH. 1969. Transformation and chromosome changes induced by Epstein-Barr virus in normal human leukocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **63**: 740–747.
- Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. 2014. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* **15**: 829–845.
- Gilbert W. 1978. Why genes in pieces? *Nature* **271**: 501.
- Gilbert WV, Bell TA, Schaening C. 2016. Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function. *Science* **352**: 1408–1412.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N. 1999. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & Development* **13**: 1422–1437.
- Glaser W, Skern T. 2000. Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A in vitro. *FEBS Lett* **480**: 151–155.
- Glaunsinger B, Ganem D. 2004. Lytic KSHV infection inhibits host gene expression by accelerating global mRNA turnover. *Mol Cell* **13**: 713–723.

- Glaunsinger BA. 2015. Modulation of the Translational Landscape During Herpesvirus Infection. *Annual Review of Virology* **2**: 311–333.
- Glaunsinger BA, Ganem DE. 2006. Messenger RNA turnover and its regulation in herpesviral infection. *Advances in Virus Research* **66**: 337–394.
- Glickman JN, Howe JG, Steitz JA. 1988. Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* **62**: 902–911.
- Godwin AR, Kojima S, Green CB, Wilusz J. 2013. Kiss your tail goodbye: The role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 571–579.
- Goldstrohm AC, Wickens M. 2008. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 337–344.
- Goodfellow IG, Roberts LO. 2008. Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 2675–2680.
- Gordiyenko Y, Schmidt C, Jennings MD, Matak-Vinkovic D, Pavitt GD, Robinson CV. 2014. eIF2B is a decameric guanine nucleotide exchange factor with a $\gamma\epsilon 2$ tetrameric core. *Nature Communications* **5**: 3902.
- Goss DJ, Kleiman FE. 2013. Poly(A)-Binding Proteins: are they all created equal? *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**: 167–179.
- Graille M, Chaillet M, van Tilbeurgh H. 2008. Structure of yeast Dom34: a protein related to translation termination factor eRF1 and involved in No-Go decay. *J Biol Chem* **283**: 7145–7154.
- Graille M, Séraphin B. 2012. Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 727–735.
- Gratama JW, Oosterveer MA, Zwaan FE, Lepoutre J, Klein G, Ernberg I. 1988. Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8693–8696.
- Grifo JA, Tahara SM, Leis JP, Morgan MA, Shatkin AJ, Merrick WC. 1982. Characterization of eukaryotic initiation factor 4A, a protein involved in ATP-dependent binding of globin mRNA. *J Biol Chem* **257**: 5246–5252.
- Grifo JA, Tahara SM, Morgan MA, Shatkin AJ, Merrick WC. 1983. New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J Biol Chem* **258**: 5804–5810.
- Gros F, Hiatt H, Gilbert W, Kurland CG, Risebrough RW, Watson JD. 1961. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of Escherichia coli. *Nature* **190**: 581–585.
- Gruber JJ, Olejniczak SH, Yong J, La Rocca G, Dreyfuss G, Thompson CB. 2012. Ars2 promotes proper replication-dependent histone mRNA 3' end formation. *Mol Cell* **45**: 87–98.
- Gruber JJ, Zatechka DS, Sabin LR, Yong J, Lum JJ, Kong M, Zong W-X, Zhang Z, Lau C-K, Rawlings J, et al. 2009. Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell* **138**: 328–339.

- Gruffat H, Batische J, Pich D, Neuhielr B, Manet E, Hammerschmidt W, Sergeant A. 2002. Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J Virol* **76**: 9635–9644.
- Gruffat H, Kadjouf F, Mariamé B, Manet E. 2012. The Epstein-Barr virus BcRF1 gene product is a TBP-like protein with an essential role in late gene expression. *J Virol* **86**: 6023–6032.
- Gruffat H, Manet E, Rigolet A, Sergeant A. 1990. The enhancer factor R of Epstein-Barr virus (EBV) is a sequence-specific DNA binding protein. *Nucleic Acids Research* **18**: 6835–6843.
- Gruffat H, Marchione R, Manet E. 2016. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Front Microbio* **7**: 869.
- Grüter P, Tabernero C, Kobbe von C, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber BK, Izaurralde E. 1998. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* **1**: 649–659.
- Grzechnik P, Kufel J. 2008. Polyadenylation linked to transcription termination directs the processing of snoRNA precursors in yeast. *Mol Cell* **32**: 247–258.
- Gudipati RK, Xu Z, Lebreton A, Séraphin B, Steinmetz LM, Jacquier A, Libri D. 2012. Extensive degradation of RNA precursors by the exosome in wild-type cells. *Mol Cell* **48**: 409–421.
- Gui JF, Lane WS, Fu XD. 1994. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* **369**: 678–682.
- Gujer C, Chatterjee B, Landtwing V, Raykova A, McHugh D, Münz C. 2015. Animal models of Epstein-Barr virus infection. *Current Opinion in Virology* **13**: 6–10.
- Gunvén P, Klein G, Henle G, Henle W, Clifford P. 1970. Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Nature* **228**: 1053–1056.
- Guo TB, Boros LG, Chan KC, Hikim APS, Hudson AP, Swerdloff RS, Mitchell AP, Salameh WA. 2003. Spermatogenic expression of RNA-binding motif protein 7, a protein that interacts with splicing factors. *J Androl* **24**: 204–214.
- Gustafson MP, Welcker M, Hwang HC, Clurman BE. 2005. ZCCHC8 is a glycogen synthase kinase-3 substrate that interacts with RNA-binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**: 1359–1367.
- Guzik BW, Levesque L, Prasad S, Bor YC, Black BE, Paschal BM, Rekosh D, Hammarskjöld ML. 2001. NXT1/p15 is a crucial cellular cofactor in TAP-dependent export of intron-containing RNA in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 2545–2554.
- Haan KM, Kwok WW, Longnecker R, Speck P. 2000. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol* **74**: 2451–2454.
- Haar von Der T, Ball PD, McCarthy JE. 2000. Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-cap by domains of eIF4G. *J Biol Chem* **275**: 30551–30555.

- Hackmann A, Wu H, Schneider U-M, Meyer K, Jung K, Krebber H. 2014. Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1. *Nature Communications* **5**: 3123.
- Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. 2009. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog* **5**: e1000496.
- Halbach F, Reichelt P, Rode M, Conti E. 2013. The yeast Ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* **154**: 814–826.
- Halbach F, Rode M, Conti E. 2012. The crystal structure of *S. cerevisiae* Ski2, a DExH helicase associated with the cytoplasmic functions of the exosome. *RNA* **18**: 124–134.
- Hallais M, Pontvianne F, Andersen PR, Clerici M, Lener D, Benbahouche NEH, Gostan T, Vandermoere F, Robert M-C, Cusack S, et al. 2013. CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 1358–1366.
- Hamill S, Wolin SL, Reinisch KM. 2010. Structure and function of the polymerase core of TRAMP, a RNA surveillance complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 15045–15050.
- Hammerschmidt W, Sugden B. 1988. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**: 427–433.
- Han J, van Hoof A. 2016. The RNA exosome channeling and direct access conformations have distinct in vivo functions. *Cell Reports* **16**: 3348–3358.
- Han TW, Kato M, Xie S, Wu LC, Mirzaei H, Pei J, Chen M, Xie Y, Allen J, Xiao G, et al. 2012. Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell* **149**: 768–779.
- Han Z. 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic gene ORF57 is essential for infectious virion production. *J Virol* **80**: 5251–5260.
- Han Z, Marendy E, Wang Y-D, Yuan J, Sample JT. 2007. Multiple roles of Epstein-Barr virus SM protein in lytic replication. *J Virol* **81**: 4058–4069.
- Han Z, Verma D, Hilscher C, Dittmer DP. 2009. General and target-specific RNA binding properties of Epstein-Barr virus SM posttranscriptional regulatory protein. *J Virol* **83**: 11635–11644.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–674.
- Hardwick JM, Lieberman PM, Hayward SD. 1988. A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J Virol* **62**: 2274–2284.
- Hardy WR, Sandri-Goldin RM. 1994. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J Virol* **68**: 7790–7799.
- Harigaya Y, Parker R. 2010. No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**: 132–141.

- Haruki H, Nishikawa J, Laemmli UK. 2008. The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Mol Cell* **31**: 925–932.
- Hashem Y, Georges des A, Dhote V, Langlois R, Liao HY, Grassucci RA, Pestova TV, Hellen CUT, Frank J. 2013. Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature* **503**: 539–543.
- Hausen zur H, O'Neill FJ, Freese UK, Hecker E. 1978. Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature* **272**: 373–375.
- Hausen zur H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L. 1970. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* **228**: 1056–1058.
- Hautbergue GM, Hung M-L, Walsh MJ, Snijders APL, Chang C-T, Jones R, Ponting CP, Dickman MJ, Wilson SA. 2009. UIF, a new mRNA export adaptor that works together with REF/ALY, requires FACT for recruitment to mRNA. *Curr Biol* **19**: 1918–1924.
- Hayashi ML, Blankenship C, Shenk T. 2000. Human cytomegalovirus UL69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the G1 phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2692–2696.
- He F, Jacobson A. 2015a. Control of mRNA decapping by positive and negative regulatory elements in the Dcp2 C-terminal domain. *RNA* **21**: 1633–1647.
- He F, Jacobson A. 2015b. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu Rev Genet* **49**: 339–366.
- Hector RE, Nykamp KR, Dheur S, Anderson JT, Non PJ, Urbinati CR, Wilson SM, Minvielle-Sebastia L, Swanson MS. 2002. Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *EMBO J* **21**: 1800–1810.
- Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Sourlis C, Wowro S, Weimann M, Will CL, Pena V, Lührmann R, Stelzl U. 2012. Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Mol Cell* **45**: 567–580.
- Hellen CUT. 2009. IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta* **1789**: 558–570.
- Henle G, Henle W, Diehl V. 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **59**: 94–101.
- Henle W, Diehl V, Kohn G, Hausen zur H, Henle G. 1967. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* **157**: 1064–1065.
- Henry Y, Wood H, Morrissey JP, Petfalski E, Kearsey S, Tollervey D. 1994. The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J* **13**: 2452–2463.
- Hershey JWB, Sonenberg N, Mathews MB. 2012. Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**: a011528.

- Hilleren P, McCarthy T, Rosbash M, Parker R, Jensen TH. 2001. Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**: 538–542.
- Hilliker A, Gao Z, Jankowsky E, Parker R. 2011. The DEAD-box protein Ded1 modulates translation by the formation and resolution of an eIF4F-mRNA complex. *Mol Cell* **43**: 962–972.
- Hinnebusch AG. 2006. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* **31**: 553–562.
- Hinnebusch AG. 2014. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem* **83**: 779–812.
- Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. 2016. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* **352**: 1413–1416.
- Hinnebusch AG, Lorsch JR. 2012. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**: a011544.
- Hiriart E, Bardouillet L, Manet E, Gruffat H, Penin F, Montserret R, Farjot G, Sergeant A. 2003a. A region of the Epstein-Barr virus (EBV) mRNA export factor EB2 containing an arginine-rich motif mediates direct binding to RNA. *J Biol Chem* **278**: 37790–37798.
- Hiriart E, Farjot G, Gruffat H, Nguyen MVC, Sergeant A, Manet E. 2003b. A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein. *J Biol Chem* **278**: 335–342.
- Hiriart E, Gruffat H, Buisson M, Mikaelian I, Keppler S, Meresse P, Mercher T, Bernard OA, Sergeant A, Manet E. 2005. Interaction of the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 with human Spen proteins SHARP, OTT1, and a novel member of the family, OTT3, links Spen proteins with splicing regulation and mRNA export. *J Biol Chem* **280**: 36935–36945.
- Hislop AD. 2015. Early virological and immunological events in Epstein-Barr virus infection. *Current Opinion in Virology* **15**: 75–79.
- Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. 2007. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* **25**: 587–617.
- Hochberg D, Middeldorp JM, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. 2004. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 239–244.
- Hoefig KP, Rath N, Heinz GA, Wolf C, Dameris J, Schepers A, Kremmer E, Ansel KM, Heissmeyer V. 2013. Eri1 degrades the stem-loop of oligouridylated histone mRNAs to induce replication-dependent decay. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 73–81.
- Hogg JR. 2016. Viral evasion and manipulation of host RNA quality control pathways. *J Virol* **90**: 7010–7018.
- Hogg JR, Goff SP. 2010. Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell* **143**: 379–389.

- Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. 2009. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol* **186**: 323–331.
- Holub P, Lalakova J, Cerna H, Pasulka J, Sarazova M, Hrazdilova K, Arce MS, Hobor F, Stefl R, Vanacova S. 2012. Air2p is critical for the assembly and RNA-binding of the TRAMP complex and the KOW domain of Mtr4p is crucial for exosome activation. *Nucleic Acids Research* **40**: 5679–5693.
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**: 569–580.
- Hong GK, Gulley ML, Feng W-H, Delecluse H-J, Holley-Guthrie E, Kenney SC. 2005. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol* **79**: 13993–14003.
- Houseley J, LaCava J, Tollervey D. 2006. RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 529–539.
- Houseley J, Tollervey D. 2009. The many pathways of RNA degradation. *Cell* **136**: 763–776.
- Houseley J, Tollervey D. 2006. Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase. *EMBO Rep* **7**: 205–211.
- Howard JM, Sanford JR. 2014. The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**: 93–110.
- Hrossova D, Sikorsky T, Potesil D, Bartosovic M, Pasulka J, Zdrahal Z, Stefl R, Vanacova S. 2015. RBM7 subunit of the NEXT complex binds U-rich sequences and targets 3'-end extended forms of snRNAs. *Nucleic Acids Research* **43**: 4236–4248.
- Hsin J-P, Manley JL. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes & Development* **26**: 2119–2137.
- Hu W, Sweet TJ, Chamnongpol S, Baker KE, Collier J. 2009. Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **461**: 225–229.
- Huang Y, Gattoni R, Stévenin J, Steitz JA. 2003. SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell* **11**: 837–843.
- Huang Y, Steitz JA. 2001. Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell* **7**: 899–905.
- Huang Y, Steitz JA. 2005. SRprises along a messenger's journey. *Mol Cell* **17**: 613–615.
- Hug N, Cáceres JF. 2014. The RNA helicase DHX34 activates NMD by promoting a transition from the surveillance to the decay-inducing complex. *Cell Reports* **8**: 1845–1856.
- Hug N, Longman D, Cáceres JF. 2016. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Research* **44**: 1483–1495.
- Hui MP, Foley PL, Belasco JG. 2014. Messenger RNA Degradation in Bacterial Cells. *Annu Rev Genet* **48**: 537–559.

- Hussain T, Ll acer JL, Fern andez IS, Munoz A, Martin-Marcos P, Savva CG, Lorsch JR, Hinnebusch AG, Ramakrishnan V. 2014. Structural changes enable start codon recognition by the eukaryotic translation initiation complex. *Cell* **159**: 597–607.
- Huynh GT, Rong L. 2012. Modeling the dynamics of virus shedding into the saliva of Epstein-Barr virus positive individuals. *J Theor Biol* **310**: 105–114.
- Iglesias N, Tutucci E, Gwizdek C, Vinciguerra P, Dach Von E, Corbett AH, Dargemont C, Stutz F. 2010. Ubiquitin-mediated mRNP dynamics and surveillance prior to budding yeast mRNA export. *Genes & Development* **24**: 1927–1938.
- Imataka H, Gradi A, Sonenberg N. 1998. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* **17**: 7480–7489.
- Imataka H, Sonenberg N. 1997. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 6940–6947.
- Inada T, Aiba H. 2005. Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J* **24**: 1584–1595.
- Ingolia NT. 2016. Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome. *Cell* **165**: 22–33.
- Ingolia NT. 2014. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat Rev Genet* **15**: 205–213.
- Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**: 218–223.
- Isken O, Kim YK, Hosoda N, Mayeur GL, Hershey JWB, Maquat LE. 2008. Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **133**: 314–327.
- Isken O, Maquat LE. 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes & Development* **21**: 1833–1856.
- Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW. 1995. A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376**: 709–712.
- Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, Jankowska M, Darzynkiewicz E, Mattaj IW. 1994. A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **78**: 657–668.
- Jackowiak P, Nowacka M, Strozycki PM, Figlerowicz M. 2011. RNA degradome - its biogenesis and functions. *Nucleic Acids Research* **39**: 7361–7370.
- Jackson BR, Boyne JR, Noerenberg M, Taylor A, Hautbergue GM, Walsh MJ, Wheat R, Blackbourn DJ, Wilson SA, Whitehouse A. 2011. An interaction between KSHV ORF57 and UIF provides mRNA-adaptor redundancy in herpesvirus intronless mRNA export. *PLoS Pathog* **7**: e1002138.

- Jackson RJ. 2013. The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**: a011569.
- Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. 2010a. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 113–127.
- Jackson RN, Klauer AA, Hintze BJ, Robinson H, van Hoof A, Johnson SJ. 2010b. The crystal structure of Mtr4 reveals a novel arch domain required for rRNA processing. *EMBO J* **29**: 2205–2216.
- Jan E, Mohr I, Walsh D. 2016. A Cap-to-Tail Guide to mRNA Translation Strategies in Virus-Infected Cells. *Annual Review of Virology* **3**: 283–307.
- Jang SK, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* **62**: 2636–2643.
- Jankowsky E, Harris ME. 2015. Specificity and nonspecificity in RNA-protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 533–544.
- Januszyk K, Lima CD. 2014. The eukaryotic RNA exosome. *Curr Opin Struct Biol* **24**: 132–140.
- Jensen TH, Dower K, Libri D, Rosbash M. 2003. Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Mol Cell* **11**: 1129–1138.
- Jensen TH, Jacquier A, Libri D. 2013. Dealing with Pervasive Transcription. *Mol Cell* **52**: 473–484.
- Jensen TH, Moore C. 2005. Reviving the exosome. *Cell* **121**: 660–662.
- Jensen TH, Patricio K, McCarthy T, Rosbash M. 2001. A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription. *Mol Cell* **7**: 887–898.
- Jha HC, Banerjee S, Robertson ES. 2016. The Role of Gammaherpesviruses in Cancer Pathogenesis. *Pathogens* **5**: E18.
- Ji X, Zhou Y, Pandit S, Huang J, Li H, Lin CY, Xiao R, Burge CB, Fu X-D. 2013. SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase. *Cell* **153**: 855–868.
- Jia H, Wang X, Anderson JT, Jankowsky E. 2012. RNA unwinding by the Trf4/Air2/Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 7292–7297.
- Jia H, Wang X, Liu F, Guenther U-P, Srinivasan S, Anderson JT, Jankowsky E. 2011. The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex. *Cell* **145**: 890–901.
- Jiao X, Chang JH, Kilic T, Tong L, Kiledjian M. 2013. A mammalian pre-mRNA 5' end capping quality control mechanism and an unexpected link of capping to pre-mRNA processing. *Mol Cell* **50**: 104–115.
- Jiao X, Xiang S, Oh C, Martin CE, Tong L, Kiledjian M. 2010. Identification of a quality-control mechanism for mRNA 5'-end capping. *Nature* **467**: 608–611.

- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.
- Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd RE. 1999. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virol* **73**: 718–727.
- Jochum S, Ruiss R, Moosmann A, Hammerschmidt W, Zeidler R. 2012. RNAs in Epstein-Barr virions control early steps of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: E1396–404.
- Johnson AW. 1997. Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 6122–6130.
- Johnson DC, Baines JD. 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* **9**: 382–394.
- Jonas S, Izaurralde E. 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* **16**: 421–433.
- Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. 2013. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 447–464.
- Joseph AM, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. 2000. EBV persistence involves strict selection of latently infected B cells. *J Immunol* **165**: 2975–2981.
- Juillard F, Bazot Q, Mure F, Tafforeau L, Macri C, Rabourdin-Combe C, Lotteau V, Manet E, Gruffat H. 2012. Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs. *Nucleic Acids Research* **40**: 6834–6849.
- Juillard F, Hiriart E, Sergeant N, Vingtdeux-Didier V, Drobecq H, Sergeant A, Manet E, Gruffat H. 2009. Epstein-Barr virus protein EB2 contains an N-terminal transferable nuclear export signal that promotes nucleocytoplasmic export by directly binding TAP/NXF1. *J Virol* **83**: 12759–12768.
- Junker AK, Thomas EE, Radcliffe A, Forsyth RB, Davidson AG, Rymo L. 1991. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci* **302**: 220–223.
- Kadaba S, Krueger A, Trice T, Krecic AM, Hinnebusch AG, Anderson J. 2004. Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in *S. cerevisiae*. *Genes & Development* **18**: 1227–1240.
- Kafasla P, Morgner N, Robinson CV, Jackson RJ. 2010. Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding. *EMBO J* **29**: 3710–3722.
- Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou M-N, Sonenberg N. 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & Development* **19**: 104–113.
- Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, Nojima T, Hagiwara M, Ishigami K, Watanabe H, Kitahara T, Yoshida T, Nakajima H, et al. 2007. Spliceostatin A targets SF3b and

- inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol* **3**: 576–583.
- Kallehaug TB, Robert M-C, Bertrand E, Jensen TH. 2012. Nuclear retention prevents premature cytoplasmic appearance of mRNA. *Mol Cell* **48**: 145–152.
- Kaneko S, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Manley JL. 2007. The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes & Development* **21**: 1779–1789.
- Kang M-S, Kieff E. 2014. Epstein-Barr virus latent genes. *Experimental Molecular Medicine* **47**: e131–16.
- Kapp LD, Lorsch JR. 2004. GTP-dependent Recognition of the Methionine Moiety on Initiator tRNA by Translation Factor eIF2. *Journal of Molecular Biology* **335**: 923–936.
- Kaschka-Dierich C, Adams A, Lindahl T, Bornkamm GW, Bjursell G, Klein G, Giovanella BC, Singh S. 1976. Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumour cells in vivo. *Nature* **260**: 302–306.
- Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, Ohno M, Dreyfuss G, Ohno S. 2006. Binding of a novel SMG1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development* **20**: 355–367.
- Kastenmayer JP, Green PJ. 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 USA* **97**: 13985–13990.
- Katahira J. 2015. Nuclear export of messenger RNA. *Genes* **6**: 163–184.
- Kataoka N, Diem MD, Kim VN, Yong J, Dreyfuss G. 2001. Magoh, a human homolog of *Drosophila mago nashi* protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex. *EMBO J* **20**: 6424–6433.
- Kataoka N, Yong J, Kim VN, Velazquez F. 2000. Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol Cell* **6**: 673–682.
- Kato M, Han TW, Xie S, Shi K, Du X, Wu LC, Mirzaei H, Goldsmith EJ, Longgood J, Pei J, et al. 2012. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* **149**: 753–767.
- Kempkes B, Robertson ES. 2015. Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Current Opinion in Virology* **14**: 138–144.
- Kenney SC, Mertz JE. 2014. Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol* **26**: 60–68.
- Kern ER, Hartline CB, Rybak RJ, Drach JC, Townsend LB, Biron KK, Bidanset DJ. 2004. Activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides in animal models of cytomegalovirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1749–1755.
- Kervestin S, Jacobson A. 2012. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 700–712.

- Kessler SH, Sachs AB. 1998. RNA Recognition Motif 2 of Yeast Pab1p Is Required for Its Functional Interaction with Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 51–57.
- Khaleghpour K, Svitkin YV, Craig AW, DeMaria CT, Deo RC, Burley SK, Sonenberg N. 2001. Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol Cell* **7**: 205–216.
- Khanam T, Muddashetty RS, Kahvejian A, Sonenberg N, Brosius J. 2006. Poly(A)-Binding Protein Binds to A-Rich Sequences via RNA-Binding Domains 1+2 and 3+4. *RNA Biol* **3**: 170–177.
- Khatter H, Myasnikov AG, Natchiar SK, Klaholz BP. 2015. Structure of the human 80S ribosome. *Nature* **520**: 640–645.
- Kieff E, Rickinson AB. 2007. *Epstein-Barr virus and its replication, p 2603–2654*. 5 ed. eds. K. DM and H. PM. Fields virology.
- Kilchert C, Vasiljeva L. 2013. mRNA quality control goes transcriptional. *Biochem Soc Trans* **41**: 1666–1672.
- Kilchert C, Wittmann S, Vasiljeva L. 2016. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**: 227–239.
- Kim KM, Cho H, Choi K, Kim J, Kim B-W, Ko Y-G, Jang SK, Kim YK. 2009. A new MIF4G domain-containing protein, CTIF, directs nuclear cap-binding protein CBP80/20-dependent translation. *Genes & Development* **23**: 2033–2045.
- Kim M, Krogan NJ, Vasiljeva L, Rando OJ, Nedeia E. 2004. The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* **432**: 517–522.
- Kim VN, Kataoka N, Dreyfuss G. 2001. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* **293**: 1832–1836.
- King HA, Cobbold LC, Willis AE. 2010. The role of IRES trans-acting factors in regulating translation initiation. *Biochem Soc Trans* **38**: 1581–1586.
- Kirshner JR, Lukac DM, Chang J, Ganem D. 2000. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 57 encodes a posttranscriptional regulator with multiple distinct activities. *J Virol* **74**: 3586–3597.
- Klauer AA, van Hoof A. 2012. Degradation of mRNAs that lack a stop codon: a decade of nonstop progress. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**: 649–660.
- Klauer AA, van Hoof A. 2013. Genetic interactions suggest multiple distinct roles of the arch and core helicase domains of Mtr4 in Rrp6 and exosome function. *Nucleic Acids Research* **41**: 533–541.
- Kobayashi R, Takeuchi H, Sasaki M, Hasegawa M, Hirai K. 1998. Detection of Epstein-Barr virus infection in the epithelial cells and lymphocytes of non-neoplastic tonsils by in situ hybridization and in situ PCR. *Arch Virol* **143**: 803–813.
- Koffa MD, Clements JB, Izaurralde E, Wadd S, Wilson SA, Mattaj IW, Kuersten S. 2001. Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway. *EMBO J* **20**: 5769–5778.

- Kolupaeva VG, Unbehaun A, Lomakin IB, Hellen CUT, Pestova TV. 2005. Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* **11**: 470–486.
- Kong K-YE, Tang H-MV, Pan K, Huang Z, Lee T-HJ, Hinnebusch AG, Jin D-Y, Wong C-M. 2014. Cotranscriptional recruitment of yeast TRAMP complex to intronic sequences promotes optimal pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Research* **42**: 643–660.
- Kopeina GS, Afonina ZA, Gromova KV, Shirokov VA, Vasiliev VD, Spirin AS. 2008. Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic Acids Research* **36**: 2476–2488.
- Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Merrick WC, Rhoads RE. 2001. Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1. *J Biol Chem* **276**: 2872–2879.
- Korner CG, Wahle E. 1997. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J Biol Chem* **272**: 10448–10456.
- Korner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E, Wahle E. 1998. The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **17**: 5427–5437.
- Kowalinski E, Kögel A, Ebert J, Reichelt P, Stegmann E, Habermann B, Conti E. 2016. Structure of a cytoplasmic 11-subunit RNA exosome complex. *Mol Cell* **63**: 125–134.
- Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research* **15**: 8125–8148.
- Kozak M. 1978. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* **15**: 1109–1123.
- Kozak M. 1980. Influence of mRNA secondary structure on binding and migration of 40S ribosomal subunits. *Cell* **19**: 79–90.
- Kozak M. 1986a. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2850–2854.
- Kozak M. 1986b. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283–292.
- Kozak M. 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**: 1–34.
- Kozak M. 1997. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J* **16**: 2482–2492.
- Kozak M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**: 229–241.
- Kozlov G, Trempe JF, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I, Gehring K. 2001. Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4409–4413.

- König J, Zarnack K, Luscombe NM, Ule J. 2012. Protein–RNA interactions: new genomic technologies and perspectives. *Nat Rev Genet* **13**: 77–83.
- Kraus RJ, Mirocha SJ, Stephany HM, Puchalski JR, Mertz JE. 2001. Identification of a novel element involved in regulation of the lytic switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol* **75**: 867–877.
- Kronemann D, Hagemeyer SR, Cygnar D, Phillips S, Bresnahan WA. 2010. Binding of the human cytomegalovirus (HCMV) tegument protein UL69 to UAP56/URH49 is not required for efficient replication of HCMV. *J Virol* **84**: 9649–9654.
- Kronstad LM, Glaunsinger BA. 2012. Diverse virus-host interactions influence RNA-based regulation during γ -herpesvirus infection. *Current Opinion in Microbiology* **15**: 506–511.
- Kufel J, Bousquet-Antonelli C, Beggs JD, Tollervey D. 2004. Nuclear pre-mRNA decapping and 5' degradation in yeast require the Lsm2-8p complex. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 9646–9657.
- Kumar P, Hellen CUT, Pestova TV. 2016. Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes & Development* **30**: 1573–1588.
- Kurosaki T, Li W, Hoque M, Popp MWL, Ermolenko DN, Tian B, Maquat LE. 2014. A post-translational regulatory switch on UPF1 controls targeted mRNA degradation. *Genes & Development* **28**: 1900–1916.
- Kutok JL, Wang F. 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* **1**: 375–404.
- Kuyumcu-Martinez NM, Joachims M, Lloyd RE. 2002. Efficient Cleavage of Ribosome-Associated Poly(A)-Binding Protein by Enterovirus 3C Protease. *J Virol* **76**: 2062–2074.
- Kuyumcu-Martinez NM, Van Eden ME, Younan P, Lloyd RE. 2004. Cleavage of Poly(A)-Binding Protein by Poliovirus 3C Protease Inhibits Host Cell Translation: a Novel Mechanism for Host Translation Shutoff. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 1779–1790.
- Kwon SC, Yi H, Eichelbaum K, Föhr S, Fischer B, You KT, Castello A, Krijgsveld J, Hentze MW, Kim VN. 2013. The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 1122–1130.
- la Cruz de J, Kressler D, Tollervey D, Linder P. 1998. Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**: 1128–1140.
- La Mata De M, Kornblihtt AR. 2006. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**: 973–980.
- LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, Tollervey D. 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**: 713–724.

- LaGrandeur TE, Parker R. 1998. Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J* **17**: 1487–1496.
- Laichalk LL, Hochberg D, Babcock GJ, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. 2002. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity* **16**: 745–754.
- Laichalk LL, Thorley-Lawson DA. 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* **79**: 1296–1307.
- Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE. 1995. Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. *J Biol Chem* **270**: 21975–21983.
- Larimer FW, Stevens A. 1990. Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'→3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. *Gene* **95**: 85–90.
- Larralde O, Smith RWP, Wilkie GS, Malik P, Gray NK, Clements JB. 2006. Direct stimulation of translation by the multifunctional herpesvirus ICP27 protein. *J Virol* **80**: 1588–1591.
- Le Hir H, Andersen GR. 2008. Structural insights into the exon junction complex. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 112–119.
- Le Hir H, Gatfield D, Izaurralde E, Moore MJ. 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* **20**: 4987–4997.
- Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. 2000a. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* **19**: 6860–6869.
- Le Hir H, Moore MJ, Maquat LE. 2000b. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes & Development* **14**: 1098–1108.
- Le Hir H, Saulière J, Wang Z. 2016. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**: 41–54.
- Le Hir H, Séraphin B. 2008. EJCs at the heart of translational control. *Cell* **133**: 213–216.
- Lebreton A, Tomecki R, Dziembowski A, Séraphin B. 2008. Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**: 993–996.
- Lee AS-Y, Burdeinick-Kerr R, Whelan SPJ. 2013a. A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 324–329.
- Lee C-S, Dias AP, Jedrychowski M, Patel AH, Hsu JL, Reed R. 2008. Human DDX3 functions in translation and interacts with the translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Research* **36**: 4708–4718.
- Lee M, Kim B, Kim VN. 2014. Emerging roles of RNA modification: m(6)A and U-tail. *Cell* **158**: 980–987.

- Lee NN, Chalamcharla VR, Reyes-Turcu F, Mehta S, Zofall M, Balachandran V, Dhakshnamoorthy J, Taneja N, Yamanaka S, Zhou M, et al. 2013b. Mtr4-like protein coordinates nuclear RNA processing for heterochromatin assembly and for telomere maintenance. *Cell* **155**: 1061–1074.
- LeFebvre AK, Korneeva NL, Trutschl M, Cvek U, Duzan RD, Bradley CA, Hershey JWB, Rhoads RE. 2006. Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J Biol Chem* **281**: 22917–22932.
- Lei H, Dias AP, Reed R. 2011. Export and stability of naturally intronless mRNAs require specific coding region sequences and the TREX mRNA export complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 17985–17990.
- Lei H, Zhai B, Yin S, Gygi S, Reed R. 2013. Evidence that a consensus element found in naturally intronless mRNAs promotes mRNA export. *Nucleic Acids Research* **41**: 2517–2525.
- Lemay J-F, D'Amours A, Lemieux C, Lackner DH, St-Sauveur VG, Bähler J, Bachand F. 2010a. The nuclear poly(A)-binding protein interacts with the exosome to promote synthesis of noncoding small nucleolar RNAs. *Mol Cell* **37**: 34–45.
- Lemay J-F, Lemieux C, St-André O, Bachand F. 2010b. Crossing the borders: Poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biol* **7**: 291–295.
- Lemieux C, Marguerat S, Lafontaine J, Barbezier N, Bähler J, Bachand F. 2011. A pre-mRNA degradation pathway that selectively targets intron-containing genes requires the nuclear poly(A)-binding protein. *Mol Cell* **44**: 108–119.
- Lenasi T, Peterlin BM, Barboric M. 2011. Cap-binding protein complex links pre-mRNA capping to transcription elongation and alternative splicing through positive transcription elongation factor b (P-TEFb). *J Biol Chem* **286**: 22758–22768.
- Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA. 1981. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 805–809.
- Li D-J, Verma D. 2012. Binding of cellular export factor REF/Aly by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) ORF57 protein is not required for efficient KSHV lytic replication. *J Virol* **86**: 9866–9874.
- Li X, Manley JL. 2005. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* **122**: 365–378.
- Libri D, Dower K, Boulay J, Thomsen R, Rosbash M, Jensen TH. 2002. Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 8254–8266.
- Licatalosi DD, Mele A, Fak JJ, Ule J, Kayikci M, Chi SW, Clark TA, Schweitzer AC, Blume JE, Wang X, et al. 2008. HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* **456**: 464–469.
- Lieberman PM. 2016. Epigenetics and Genetics of Viral Latency. *Cell Host Microbe* **19**: 619–628.
- Lieberman PM. 2014. Epstein-Barr virus turns 50. *Science* **343**: 1323–1325.

- Lieberman PM. 2013. Keeping it quiet: chromatin control of gammaherpesvirus latency. *Nat Rev Microbiol* **11**: 863–875.
- Lim J, Ha M, Chang H, Kwon SC, Simanshu DK, Patel DJ, Kim VN. 2014. Uridylation by TUT4 and TUT7 marks mRNA for degradation. *Cell* **159**: 1365–1376.
- Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, Fu X-D. 2008. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**: 819–826.
- Lind C, Åqvist J. 2016. Principles of start codon recognition in eukaryotic translation initiation. *Nucleic Acids Research* **44**: 8425–8432.
- Linder P, Jankowsky E. 2011. From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 505–516.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP. 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **337**: 121–122.
- Lindtner S, Zolotukhin AS, Uranishi H, Bear J, Kulkarni V, Smulevitch S, Samiotaki M, Panayotou G, Felber BK, Pavlakis GN. 2006. RNA-binding motif protein 15 binds to the RNA transport element RTE and provides a direct link to the NXF1 export pathway. *J Biol Chem* **281**: 36915–36928.
- Lischka P, Rosorius O, Trommer E, Stamminger T. 2001. A novel transferable nuclear export signal mediates CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69. *EMBO J* **20**: 7271–7283.
- Lischka P, Toth Z, Thomas M, Mueller R, Stamminger T. 2006. The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 1631–1643.
- Listerman I, Sapra AK, Neugebauer KM. 2006. Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**: 815–822.
- Liu H, Rodgers ND, Jiao X, Kiledjian M. 2002. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J* **21**: 4699–4708.
- Liu J-J, Bratkowski MA, Liu X, Niu C-Y, Ke A, Wang H-W. 2014. Visualization of distinct substrate-recruitment pathways in the yeast exosome by EM. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**: 95–102.
- Liu Q, Greimann JC, Lima CD. 2006. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* **127**: 1223–1237.
- Liu S-W, Jiao X, Liu H, Gu M, Lima CD, Kiledjian M. 2004. Functional analysis of mRNA scavenger decapping enzymes. *RNA* **10**: 1412–1422.
- Lloyd RE. 2006. Translational control by viral proteinases. *Virus Res* **119**: 76–88.
- Loh B, Jonas S, Izaurralde E. 2013. The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. *Genes & Development* **27**: 2125–2138.

- Lomakin IB, Steitz TA. 2013. The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism. *Nature* **500**: 307–311.
- Long JC, Caceres JF. 2009. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* **417**: 15–27.
- Losh JS, van Hoof A. 2015. Gateway arch to the RNA exosome. *Cell* **162**: 940–941.
- Loyer P, Busson A, Trembley JH, Hyle J, Grenet J, Zhao W, Ribault C, Montier T, Kidd VJ, Lahti JM. 2011. The RNA binding motif protein 15B (RBM15B/OTT3) is a functional competitor of serine-arginine (SR) proteins and antagonizes the positive effect of the CDK11p110-cyclin L2 α complex on splicing. *J Biol Chem* **286**: 147–159.
- Lozano G, Martínez-Salas E. 2015. Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Current Opinion in Virology* **12**: 113–120.
- Lubas M, Andersen PR, Schein A, Dziembowski A, Kudla G, Jensen TH. 2015. The human nuclear exosome targeting complex is loaded onto newly synthesized RNA to direct early ribonucleolysis. *Cell Reports* **10**: 178–192.
- Lubas M, Chlebowski A, Dziembowski A, Jensen TH. 2012. Biochemistry and Function of RNA Exosomes. In *Eukaryotic RNases and their Partners in RNA Degradation and Biogenesis, Part A*, Vol. 31 of *The Enzymes*, pp. 1–30, Elsevier.
- Lubas M, Christensen MS, Kristiansen MS, Domanski M, Falkenby LG, Lykke-Andersen S, Andersen JS, Dziembowski A, Jensen TH. 2011. Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting complex. *Mol Cell* **43**: 624–637.
- Lubas M, Damgaard CK, Tomecki R, Cysewski D, Jensen TH, Dziembowski A. 2013. Exonuclease hDIS3L2 specifies an exosome-independent 3'-5' degradation pathway of human cytoplasmic mRNA. *EMBO J* **32**: 1855–1868.
- Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J. 2008. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **32**: 465–477.
- Lunde BM, Moore C, Varani G. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 479–490.
- Luo ML, Zhou Z, Magni K, Christoforides C, Rappsilber J, Mann M, Reed R. 2001. Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* **413**: 644–647.
- Luo W, Johnson AW, Bentley DL. 2006. The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes & Development* **20**: 954–965.
- Lykke-Andersen J, Bennett EJ. 2014. Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways. *J Cell Biol* **204**: 467–476.
- Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA. 2001. Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* **293**: 1836–1839.

- Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA. 2000. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* **103**: 1121–1131.
- Lykke-Andersen S, Brodersen DE, Jensen TH. 2009. Origins and activities of the eukaryotic exosome. *Journal of Cell Science* **122**: 1487–1494.
- Lykke-Andersen S, Jensen TH. 2015. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 665–677.
- Ma XM, Blenis J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 307–318.
- Ma XM, Yoon S-O, Richardson CJ, Jülich K, Blenis J. 2008. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* **133**: 303–313.
- Maag D, Fekete CA, Gryczynski Z, Lorsch JR. 2005. A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol Cell* **17**: 265–275.
- Mackereth CD, Sattler M. 2012. Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. *Curr Opin Struct Biol* **22**: 287–296.
- Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N. 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 4990–4997.
- Majerciak V, Deng M, Zheng Z-M. 2010. Requirement of UAP56, URH49, RBM15, and OTT3 in the expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus ORF57. *Virology* **407**: 206–212.
- Majerciak V, Lu M, Li X, Zheng ZM. 2014. Attenuation of the suppressive activity of cellular splicing factor SRSF3 by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein is required for RNA splicing. *RNA* **20**: 1747–1758.
- Majerciak V, Pripuzova N, Chan C, Temkin N, Specht SI, Zheng Z-M. 2015. Stability of structured Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein is regulated by protein phosphorylation and homodimerization. *J Virol* **89**: 3256–3274.
- Majerciak V, Uranishi H, Kruhlak M, Pilkington GR, Massimelli MJ, Bear J, Pavlakis GN, Felber BK, Zheng Z-M. 2011. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 interacts with cellular RNA export cofactors RBM15 and OTT3 to promote expression of viral ORF59. *J Virol* **85**: 1528–1540.
- Majerciak V, Yamanegi K, Nie SH, Zheng Z-M. 2006. Structural and functional analyses of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus ORF57 nuclear localization signals in living cells. *J Biol Chem* **281**: 28365–28378.
- Majumdar R, Bandyopadhyay A, Maitra U. 2003. Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40S preinitiation complex. *J Biol Chem* **278**: 6580–6587.
- Makino DL, Baumgärtner M, Conti E. 2013a. Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature* **495**: 70–75.

- Makino DL, Halbach F, Conti E. 2013b. The RNA exosome and proteasome: common principles of degradation control. *Nat Rev Cancer* **13**: 654–660.
- Makino DL, Schuch B, Stegmann E, Baumgärtner M, Basquin C, Conti E. 2015. RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* **524**: 54–58.
- Malecki M, Viegas SC, Carneiro T, Golik P, Dressaire C, Ferreira MG, Arraiano CM. 2013. The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. *EMBO J* **32**: 1842–1854.
- Malik P, Blackbourn DJ, Clements JB. 2004. The evolutionarily conserved Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with REF protein and acts as an RNA export factor. *J Biol Chem* **279**: 33001–33011.
- Malik P, Clements JB. 2004. Protein kinase CK2 phosphorylation regulates the interaction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus regulatory protein ORF57 with its multifunctional partner hnRNP K. *Nucleic Acids Research* **32**: 5553–5569.
- Malim MH, Hauber J, Fenrick R, Cullen BR. 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**: 181–183.
- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**: 254–257.
- Manet E, Rigolet A, Gruffat H, Giot JF, Sergeant A. 1991. Domains of the Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucleic Acids Research* **19**: 2661–2667.
- Manley JL, Krainer AR. 2010. A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes & Development* **24**: 1073–1074.
- Maquat LE, Tarn W-Y, Isken O. 2010. The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* **142**: 368–374.
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. 1997. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**: 951–961.
- Marcotrigiano J, Lomakin IB, Sonenberg N, Pestova TV, Hellen CU, Burley SK. 2001. A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. *Mol Cell* **7**: 193–203.
- Martin G, Keller W. 2007. RNA-specific ribonucleotidyl transferases. *RNA* **13**: 1834–1849.
- Marty FM, Ljungman P, Papanicolaou GA, Winston DJ, Chemaly RF, Strasfeld L, Young J-AH, Rodriguez T, Maertens J, Schmitt M, et al. 2011. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect Dis* **11**: 284–292.
- Marzluff WF, Wagner EJ, Duronio RJ. 2008. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* **9**: 843–854.

- Massimelli M, Majerciak V, Kang J-G, Liewehr D, Steinberg S, Zheng Z-M. 2015. Multiple Regions of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF59 RNA are Required for Its Expression Mediated by Viral ORF57 and Cellular RBM15. *Viruses* **7**: 496–510.
- Massimelli MJ, Kang J-G, Majerciak V, Le S-Y, Liewehr DJ, Steinberg SM, Zheng Z-M. 2011. Stability of a long noncoding viral RNA depends on a 9-nt core element at the RNA 5' end to interact with viral ORF57 and cellular PABPC1. *Int J Biol Sci* **7**: 1145–1160.
- Massimelli MJ, Majerciak V, Kruhlak M, Zheng Z-M. 2013. Interplay between polyadenylate-binding protein 1 and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 in accumulation of polyadenylated nuclear RNA, a viral long noncoding RNA. *J Virol* **87**: 243–256.
- Masuda S, Das R, Cheng H, Hurt E, Dorman N, Reed R. 2005. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes & Development* **19**: 1512–1517.
- Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, et al. 2009. ZC3H12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* **458**: 1185–1190.
- Mauxion F, Prève B, Séraphin B. 2013. C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex. *RNA Biol* **10**: 267–276.
- Mazza C, Ohno M, Segref A, Mattaj JW, Cusack S. 2001. Crystal structure of the human nuclear cap-binding complex. *Mol Cell* **8**: 383–396.
- McCloskey A, Taniguchi I, Shinmyozu K, Ohno M. 2012. hnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export. *Science* **335**: 1643–1646.
- McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G, Greenblatt J, Patterson SD, Wickens M, Bentley DL. 1997. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**: 357–361.
- Mears WE, Lam V, Rice SA. 1995. Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J Virol* **69**: 935–947.
- Medina-Palazon C, Gruffat H, Mure F, Filhol O, Vingtdoux-Didier V, Drobecq H, Cochet C, Sergeant N, Sergeant A, Manet E. 2007. Protein kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles. *J Virol* **81**: 11850–11860.
- Meerovitch K, Pelletier J, Sonenberg N. 1989. A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Genes & Development* **3**: 1026–1034.
- Meinhart A, Cramer P. 2004. Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3' RNA-processing factors. *Nature* **430**: 223–226.
- Melo EO, Dhalia R, Martins de Sa C, Standart N, de Melo Neto OP. 2003. Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly(A) and efficient cap distal translational repression. *J Biol Chem* **278**: 46357–46368.
- Merrick WC. 2015. eIF4F: a retrospective. *J Biol Chem* **290**: 24091–24099.

- Merz C, Urlaub H, Will CL, Luehrmann R. 2007. Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein recruitment. *RNA* **13**: 116–128.
- Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. 2014. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* **15**: 266–282.
- Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* **143**: 222–234.
- Meyer KD, Jaffrey SR. 2014. The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 313–326.
- Meyer KD, Patil DP, Zhou J, Zinoviev A, Skabkin MA, Elemento O, Pestova TV, Qian S-B, Jaffrey SR. 2015. 5' UTR m(6)A promotes cap-independent translation. *Cell* **163**: 999–1010.
- Meyohas MC, Maréchal V, Desire N, Bouillie J, Frottier J, Nicolas JC. 1996. Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs. *J Virol* **70**: 6816–6819.
- Michlewski G, Sanford JR, Cáceres JF. 2008. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell* **30**: 179–189.
- Miki TS, Großhans H. 2013. The multifunctional RNase XRN2. *Biochem Soc Trans* **41**: 825–830.
- Milligan L, Torchet C, Allmang C, Shipman T, Tollervey D. 2005. A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 9996–10004.
- Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M. 1997. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**: 457–466.
- Mitchell P, Petfalski E, Tollervey D. 1996. The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes & Development* **10**: 502–513.
- Mitchell SF, Jain S, She M, Parker R. 2013. Global analysis of yeast mRNPs. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 127–133.
- Mitchell SF, Parker R. 2014. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol Cell* **54**: 547–558.
- Mitton-Fry RM, DeGregorio SJ, Wang J, Steitz TA, Steitz JA. 2010. Poly(A) tail recognition by a viral RNA element through assembly of a triple helix. *Science* **330**: 1244–1247.
- Moerdyk-Schauwecker M, Stein DA, Eide K, Blouch RE, Bildfell R, Iversen P, Jin L. 2009. Inhibition of HSV-1 ocular infection with morpholino oligomers targeting ICPO and ICP27. *Antiviral Res* **84**: 131–141.
- Mohanty BK, Kushner SR. 2016. Regulation of mRNA Decay in Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **70**: 25–44.

- Mohr I, Sonenberg N. 2012. Host translation at the nexus of infection and immunity. *Cell Host Microbe* **12**: 470–483.
- Molleston JM, Sabin LR, Moy RH, Menghani SV, Rausch K, Gordesky-Gold B, Hopkins KC, Zhou R, Jensen TH, Wilusz JE, et al. 2016. A conserved virus-induced cytoplasmic TRAMP-like complex recruits the exosome to target viral RNA for degradation. *Genes & Development* **30**: 1658–1670.
- Moore MJ. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**: 1514–1518.
- Moore MJ. 2002. Nuclear RNA turnover. *Cell* **108**: 431–434.
- Moore MJ, Proudfoot NJ. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **136**: 688–700.
- Morino S, Imataka H, Svitkin YV, Pestova TV, Sonenberg N. 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 468–477.
- Morisaki T, Lyon K, DeLuca KF, DeLuca JG, English BP, Zhang Z, Lavis LD, Grimm JB, Viswanathan S, Looger LL, et al. 2016. Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science* **352**: 1425–1429.
- Moss WN, Lee N, Pimienta G, Steitz JA. 2013. RNA families in Epstein-Barr virus. *RNA Biol* **11**: 10–17.
- Möhl BS, Chen J, Sathiyamoorthy K, Jardetzky TS, Longnecker R. 2016. Structural and Mechanistic Insights into the Tropism of Epstein-Barr Virus. *Molecules and Cells* **39**: 286–291.
- Muhlrad D, Decker CJ, Parker R. 1994. Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-3' digestion of the transcript. *Genes & Development* **8**: 855–866.
- Mullen MM, Haan KM, Longnecker R, Jardetzky TS. 2002. Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Mol Cell* **9**: 375–385.
- Mullen TE, Marzluff WF. 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.
- Muniz L, Davidson L, West S. 2015. Poly(A) polymerase and the nuclear poly(A)-binding protein, PABPN1, coordinate the splicing and degradation of a subset of human pre-mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* **35**: 2218–2230.
- Mühlemann O, Jensen TH. 2012. mRNP quality control goes regulatory. *Trends in Genetics* **28**: 70–77.
- Müller-Mcnicoll M, Botti V, de Jesus Domingues AM, Brandl H, Schwich OD, Steiner MC, Curk T, Poser I, Zarnack K, Neugebauer KM. 2016. SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export. *Genes & Development* **30**: 553–566.

- Müller-Mcnicoll M, Neugebauer KM. 2014. Good cap/bad cap: how the cap-binding complex determines RNA fate. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**: 9–12.
- Müller-Mcnicoll M, Neugebauer KM. 2013. How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat Rev Genet* **14**: 275–287.
- Münz C. 2016. Epstein Barr virus - a tumor virus that needs cytotoxic lymphocytes to persist asymptotically. *Current Opinion in Virology* **20**: 34–39.
- Nag A, Steitz JA. 2012. Tri-snRNP-associated proteins interact with subunits of the TRAMP and nuclear exosome complexes, linking RNA decay and pre-mRNA splicing. *RNA Biol* **9**: 334–342.
- Nagarajan VK, Jones CI, Newbury SF, Green PJ. 2013. XRN 5'→3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 590–603.
- Naveau M, Lazennec-Schurdevin C, Panvert M, Dubiez E, Mechulam Y, Schmitt E. 2013. Roles of yeast eIF2 α and eIF2 β subunits in the binding of the initiator methionyl-tRNA. *Nucleic Acids Research* **41**: 1047–1057.
- Neelamraju Y, Hashemikhabir S, Janga SC. 2015. The human RBPome: From genes and proteins to human disease. *J Proteomics* **127**: 61–70.
- Neugebauer KM, Stolk JA, Roth MB. 1995. A conserved epitope on a subset of SR proteins defines a larger family of pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol* **129**: 899–908.
- Niederman JC, Miller G, Pearson HA, Pagano JS, Dowaliby JM. 1976. Infectious mononucleosis: Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med* **294**: 1355–1359.
- Niemela EH, Oghabian A, Staals RHJ, Greco D, Pruijn GJM, Frilander MJ. 2014. Global analysis of the nuclear processing of transcripts with unspliced U12-type introns by the exosome. *Nucleic Acids Research* **42**: 7358–7369.
- Nissan T, Rajyaguru P, She M, Song H, Parker R. 2010. Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Mol Cell* **39**: 773–783.
- Norbury CJ. 2013. Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog. *Nat Rev Cancer* **13**: 643–653.
- Norbury CJ. 2011. Regional specialization: the NEXT big thing in nuclear RNA turnover. *Mol Cell* **43**: 502–504.
- Nott A. 2003. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA* **9**: 607–617.
- Nott A, Le Hir H, Moore MJ. 2004. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes & Development* **18**: 210–222.
- Ntini E, Järvelin AI, Bornholdt J, Chen Y, Boyd M, Jørgensen M, Andersson R, Hoof I, Schein A, Andersen PR, et al. 2013. Polyadenylation site-induced decay of upstream transcripts enforces promoter directionality. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 923–928.

- Oeffinger M, Montpetit B. 2015. Emerging properties of nuclear RNP biogenesis and export. *Curr Opin Cell Biol* **34**: 46–53.
- Ohlmann T, Prévôt D, Decimo D, Roux F, Garin J, Morley SJ, Darlix J-L. 2002. In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *Journal of Molecular Biology* **318**: 9–20.
- Ohlmann T, Rau M, Pain VM, Morley SJ. 1996. The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J* **15**: 1371–1382.
- Ohnishi T, Yamashita A, Kashima I, Schell T, Anders KR, Grimson A, Hachiya T, Hentze MW, Anderson P, Ohno S. 2003. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell* **12**: 1187–1200.
- Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj JW. 2000. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**: 187–198.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: Reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 4922–4931.
- Okada-Katsuhata Y, Yamashita A, Kutsuzawa K, Izumi N, Hirahara F, Ohno S. 2012. N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Research* **40**: 1251–1266.
- Osman BAH, Kawashima A, Tamba M, Satoh E, Kato Y, Iki A, Konishi K, Matsuda M, Okamura N. 2011. Localization of a novel RNA-binding protein, SKIV2L2, to the nucleus in the round spermatids of mice. *J Reprod Dev* **57**: 457–467.
- Ote I, Lebrun M, Vandevenne P, Bontems S, Medina-Palazon C, Manet E, Piette J, Sadzot-Delvaux C. 2009. Varicella-zoster virus IE4 protein interacts with SR proteins and exports mRNAs through the TAP/NXF1 pathway. *PLoS One* **4**: e7882.
- Pabis M, Neufeld N, Steiner MC, Bojic T, Shav-Tal Y, Neugebauer KM. 2013. The nuclear cap-binding complex interacts with the U4/U6·U5 tri-snRNP and promotes spliceosome assembly in mammalian cells. *RNA* **19**: 1054–1063.
- Palser AL, Grayson NE, White RE, Corton C, Correia S, Ba abdullah MM, Watson SJ, Cotten M, Arrand JR, Murray PG, et al. 2015. Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J Virol* **89**: 5222–5237.
- Pandit S, Zhou Y, Shiue L, Coutinho-Mansfield G, Li H, Qiu J, Huang J, Yeo GW, Ares M, Fu X-D. 2013. Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Mol Cell* **50**: 223–235.
- Papasaikas P, Valcárcel J. 2016. The Spliceosome: The Ultimate RNA Chaperone and Sculptor. *Trends Biochem Sci* **41**: 33–45.
- Parker R. 2012. RNA Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 671–702.
- Parker R, Song H. 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**: 121–127.

- Parkin DM. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* **118**: 3030–3044.
- Parsyan A, Svitkin Y, Shahbazian D, Gkogkas C, Lasko P, Merrick WC, Sonenberg N. 2011. mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 235–245.
- Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG, Algire MA, Lorsch JR, Ramakrishnan V. 2007. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* **26**: 41–50.
- Patel V, Dahlroth S-L, Rajakannan V, Ho HT, Cornvik T, Nordlund P. 2015. Structure of the C-terminal domain of the multifunctional ICP27 protein from herpes simplex virus 1. *J Virol* **89**: 8828–8839.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Sonenberg N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein-synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**: 762–767.
- Pegtel DM, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA. 2004. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol* **78**: 12613–12624.
- Pelletier J, Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**: 320–325.
- Perales C, Carrasco L, Ventoso I. 2002. Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Lett* **533**: 89–94.
- Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU. 1998. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**: 854–859.
- Pestova TV, Kolupaeva VG. 2002. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes & Development* **16**: 2906–2922.
- Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU. 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **403**: 332–335.
- Peter D, Igreja C, Weber R, Wohlbold L, Weiler C, Ebertsch L, Weichenrieder O, Izaurralde E. 2015. Molecular architecture of 4E-BP translational inhibitors bound to eIF4E. *Mol Cell* **57**: 1074–1087.
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, et al. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**: 734–736.
- Pilkington GR, Majerciak V, Bear J, Uranishi H, Zheng Z-M, Felber BK. 2012. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 is not a bona fide export factor. *J Virol* **86**: 13089–13094.
- Piñol-Roma S, Choi YD, Matunis MJ, Dreyfuss G. 1988. Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes & Development* **2**: 215–227.

- Pisareva VP, Pisarev AV, Komar AA, Hellen CUT, Pestova TV. 2008. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* **135**: 1237–1250.
- Pisareva VP, Skabkin MA, Hellen CUT, Pestova TV, Pisarev AV. 2011. Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J* **30**: 1804–1817.
- Pope JH. 1967. Establishment of cell lines from peripheral leucocytes in infectious mononucleosis. *Nature* **216**: 810–811.
- Popp MW, Maquat LE. 2016. Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell* **165**: 1319–1322.
- Popp MW-L, Maquat LE. 2013. Organizing Principles of Mammalian Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Annu Rev Genet* **47**: 139–165.
- Porrúa O, Libri D. 2013. RNA quality control in the nucleus: the Angels' share of RNA. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 604–611.
- Porrúa O, Libri D. 2015. Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 190–202.
- Portnoy J, Ahronheim GA, Ghibu F, Clecner B, Joncas JH. 1984. Recovery of Epstein-Barr virus from genital ulcers. *N Engl J Med* **311**: 966–968.
- Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL. 2005. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* **123**: 249–263.
- Preiss T. 2016. All Ribosomes Are Created Equal. Really? *Trends Biochem Sci* **41**: 121–123.
- Preker P, Nielsen J, Kammler S, Lykke-Andersen S, Christensen MS, Mapendano CK, Schierup MH, Jensen TH. 2008. RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science* **322**: 1851–1854.
- Prévôt D, Darlix J-L, Ohlmann T. 2003a. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* **95**: 141–156.
- Prévôt D, Decimo D, Herbreteau CH, Roux F, Garin J, Darlix J-L, Ohlmann T. 2003b. Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *EMBO J* **22**: 1909–1921.
- Price AM, Luftig MA. 2015. To be or not IIb: a multi-step process for Epstein-Barr virus latency establishment and consequences for B cell tumorigenesis. *PLoS Pathog* **11**: e1004656.
- Price NB, Prichard MN. 2011. Progress in the development of new therapies for herpesvirus infections. *Current Opinion in Virology* **1**: 548–554.
- Protter DSW, Parker R. 2016. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol* **26**: 668–679.
- Qiu J, Smith P, Leahy L, Thorley-Lawson DA. 2015. The Epstein-Barr virus encoded BART miRNAs potentiate tumor growth in vivo. *PLoS Pathog* **11**: e1004561.

- Rammelt C, Bilen B, Zavolan M, Keller W. 2011. PAPD5, a noncanonical poly(A) polymerase with an unusual RNA-binding motif. *RNA* **17**: 1737–1746.
- Raoult D, Audic S, Robert C, Abergel C, Renesto P, Ogata H, La Scola B, Suzan M, Claverie J-M. 2004. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* **306**: 1344–1350.
- Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. 2002. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research* **12**: 1231–1245.
- Ray BK, Lawson TG, Kramer JC, Cladaras MH, Grifo JA, Abramson RD, Merrick WC, Thach RE. 1985. ATP-dependent unwinding of messenger RNA structure by eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem* **260**: 7651–7658.
- Ray D, Kazan H, Cook KB, Weirauch MT, Najafabadi HS, Li X, Gueroussov S, Albu M, Zheng H, Yang A, et al. 2013. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* **499**: 172–177.
- Rechter S, Scott GM, Eickhoff J, Zielke K, Auerochs S, Müller R, Stamminger T, Rawlinson WD, Marschall M. 2009. Cyclin-dependent kinases phosphorylate the cytomegalovirus RNA export protein pUL69 and modulate its nuclear localization and activity. *J Biol Chem* **284**: 8605–8613.
- Reibarkh M, Yamamoto Y, Singh CR, del Rio F, Fahmy A, Lee B, Luna RE, Ii M, Wagner G, Asano K. 2008. Eukaryotic initiation factor (eIF) 1 carries two distinct eIF5-binding faces important for multifactor assembly and AUG selection. *J Biol Chem* **283**: 1094–1103.
- Ricci EP, Mure F, Gruffat H, Decimo D, Medina-Palazon C, Ohlmann T, Manet E. 2009. Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2. *Nucleic Acids Research* **37**: 4932–4943.
- Richardson CJ, Bröenstrup M, Fingar DC, Jülich K, Ballif BA, Gygi S, Blenis J. 2004. SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr Biol* **14**: 1540–1549.
- Rickinson AB, Kieff E. 2007. *Epstein-Barr virus, p 2655–2700*. 5 ed. eds. K. DM and H. PM. Fields virology.
- Rickinson AB, Long HM, Palendira U, Münz C, Hislop AD. 2014. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol* **35**: 159–169.
- Rickinson AB, Young LS, Rowe M. 1987. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* **61**: 1310–1317.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**: 1030–1032.
- Rissland OS, Mikulasova A, Norbury CJ. 2007. Efficient RNA polyuridylation by noncanonical poly(A) polymerases. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 3612–3624.

- Rissland OS, Norbury CJ. 2009. Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**: 616–623.
- Rochford R, Korir A, Newton R. 2016. Viral-associated malignancies in Africa: are viruses 'infectious traces' or 'dominant drivers'? *Current Opinion in Virology* **20**: 28–33.
- Rogers GW, Richter NJ, Lima WF, Merrick WC. 2001. Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* **276**: 30914–30922.
- Rojas S, Corbin-Lickfett KA, Escudero-Paunetto L, Sandri-Goldin RM. 2010. ICP27 phosphorylation site mutants are defective in herpes simplex virus 1 replication and gene expression. *J Virol* **84**: 2200–2211.
- Rossetto C, Pari G. 2014. PAN's Labyrinth: Molecular Biology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) PAN RNA, a Multifunctional Long Noncoding RNA. *Viruses* **6**: 4212–4226.
- Rossi F, Labourier E, Forné T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J. 1996. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**: 80–82.
- Rougemaille M, Dieppois G, Kisseleva-Romanova E, Gudipati RK, Lemoine S, Blugeon C, Boulay J, Jensen TH, Stutz F, Devaux F, et al. 2008. THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association. *Cell* **135**: 308–321.
- Rougemaille M, Gudipati RK, Olesen JR, Thomsen R, Séraphin B, Libri D, Jensen TH. 2007. Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *EMBO J* **26**: 2317–2326.
- Roughan JE, Thorley-Lawson DA. 2009. The intersection of Epstein-Barr virus with the germinal center. *J Virol* **83**: 3968–3976.
- Roughan JE, Torgbor C, Thorley-Lawson DA. 2010. Germinal center B cells latently infected with Epstein-Barr virus proliferate extensively but do not increase in number. *J Virol* **84**: 1158–1168.
- Rowe M, Glaunsinger B, van Leeuwen D, Zuo J, Sweetman D, Ganem D, Middeldorp J, Wiertz EJHJ, Rensing ME. 2007. Host shutoff during productive Epstein-Barr virus infection is mediated by BGLF5 and may contribute to immune evasion. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 3366–3371.
- Rowlands AG, Panniers R, Henshaw EC. 1988. The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic Initiation Factor 2. *J Biol Chem* **263**: 5526–5533.
- Roybal GA, Jurica MS. 2010. Spliceostatin A inhibits spliceosome assembly subsequent to prespliceosome formation. *Nucleic Acids Research* **38**: 6664–6672.
- Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N. 1990. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 1134–1144.

- Rufener SC, Mühlemann O. 2013. eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 710–717.
- Ruvolo V, Wang E, Boyle S, Swaminathan S. 1998. The Epstein-Barr virus nuclear protein SM is both a post-transcriptional inhibitor and activator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8852–8857.
- Sachs AB, Davis RW, Kornberg RD. 1987. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Molecular and Cellular Biology* **7**: 3268–3276.
- Sacks WR, Greene CC, Aschman DP, Schaffer PA. 1985. Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J Virol* **55**: 796–805.
- Saguez C, Jensen TH. 2009. Assembly of export-competent mRNP: it's all about being connected. *Mol Cell* **33**: 139–140.
- Saguez C, Olesen JR, Jensen TH. 2005. Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 287–293.
- Saguez C, Schmid M, Olesen JR, Ghazy MAE-H, Qu X, Poulsen MB, Nasser T, Moore C, Jensen TH. 2008. Nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 mutants is triggered by inefficient polyadenylation. *Mol Cell* **31**: 91–103.
- Sahin BB, Patel D, Conrad NK. 2010. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein binds and protects a nuclear noncoding RNA from cellular RNA decay pathways. *PLoS Pathog* **6**: e1000799.
- Saini AK, Nanda JS, Martin-Marcos P, Dong J, Zhang F, Bhardwaj M, Lorsch JR, Hinnebusch AG. 2014. Eukaryotic translation initiation factor eIF5 promotes the accuracy of start codon recognition by regulating Pi release and conformational transitions of the preinitiation complex. *Nucleic Acids Research* **42**: 9623–9640.
- Saito S, Hosoda N, Hoshino S-I. 2013. The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay in mammalian cells. *J Biol Chem* **288**: 17832–17843.
- San Paolo S, Vanacova S, Schenk L, Scherrer T, Blank D, Keller W, Gerber AP. 2009. Distinct roles of non-canonical poly(A) polymerases in RNA metabolism. *PLoS Genet* **5**: e1000555.
- Sandri-Goldin RM. 1998. ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes & Development* **12**: 868–879.
- Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Cáceres JF. 2004. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes & Development* **18**: 755–768.
- Sanford JR, Wang X, Mort M, Vanduy N, Cooper DN, Mooney SD, Edenberg HJ, Liu Y. 2009. Splicing factor SFRS1 recognizes a functionally diverse landscape of RNA transcripts. *Genome Research* **19**: 381–394.
- Santos-Pereira JM, Aguilera A. 2015. R-loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nat Rev Genet* **16**: 583–597.

- Sapra AK, Ankö M-L, Grishina I, Lorenz M, Pabis M, Poser I, Rollins J, Weiland E-M, Neugebauer KM. 2009. SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo. *Mol Cell* **34**: 179–190.
- Sato B, Sommer M, Ito H, Arvin AM. 2003. Requirement of Varicella-Zoster Virus Immediate-Early 4 Protein for Viral Replication. *J Virol* **77**: 12369–12372.
- Saulière J, Haque N, Harms S, Barbosa I, Blanchette M, Le Hir H. 2010. The exon junction complex differentially marks spliced junctions. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**: 1269–1271.
- Saulière J, Murigneux V, Wang Z, Marquet E, Barbosa I, Le Tonquèze O, Audic Y, Paillard L, Roest Crollius H, Le Hir H. 2012. CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 1124–1131.
- Scheer H, Zuber H, De Almeida C, Gagliardi D. 2016. Uridylation Earmarks mRNAs for Degradation... and More. *Trends in Genetics* **32**: 607–619.
- Schmid M, Jensen TH. 2010. Nuclear quality control of RNA polymerase II transcripts. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**: 474–485.
- Schmid M, Jensen TH. 2013. Transcription-associated quality control of mRNP. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 158–168.
- Schmid M, Olszewski P, Pelechano V, Gupta I, Steinmetz LM, Jensen TH. 2015. The nuclear poly(A)-binding protein Nab2p is essential for mRNA production. *Cell Reports* **12**: 128–139.
- Schmid M, Poulsen MB, Olszewski P, Pelechano V, Saguez C, Gupta I, Steinmetz LM, Moore C, Jensen TH. 2012. Rrp6p controls mRNA poly(A) tail length and its decoration with poly(A)-binding proteins. *Mol Cell* **47**: 267–280.
- Schmidt K, Butler JS. 2013. Nuclear RNA surveillance: role of TRAMP in controlling exosome specificity. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**: 217–231.
- Schmidt K, Xu Z, Mathews DH, Butler JS. 2012. Air proteins control differential TRAMP substrate specificity for nuclear RNA surveillance. *RNA* **18**: 1934–1945.
- Schmidt MJ, West S, Norbury CJ. 2010. The human cytoplasmic RNA terminal U-transferase ZCCHC11 targets histone mRNAs for degradation. *RNA* **17**: 39–44.
- Schneider C, Kudla G, Wlotzka W, Tuck A, Tollervey D. 2012. Transcriptome-wide analysis of exosome targets. *Mol Cell* **48**: 422–433.
- Schneider C, Tollervey D. 2013. Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem Sci* **38**: 485–493.
- Schoenberg DR. 2011. Mechanisms of endonuclease-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**: 582–600.
- Schoenberg DR, Maquat LE. 2012. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* **13**: 246–259.

- Schumann S, Baquero-Perez B, Whitehouse A. 2016. Interactions between KSHV ORF57 and the novel human TREX proteins, CHTOP and CIP29. *Journal of General Virology* **97**: 1904–1910.
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**: 337–342.
- Schwartz D, Decker CJ, 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.
- Schweingruber C, Rufener SC, Zünd D, Yamashita A, Mühlemann O. 2013. Nonsense-mediated mRNA decay - Mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 612–623.
- Sciabica KS, Dai QJ, Sandri-Goldin RM. 2003. ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *EMBO J* **22**: 1608–1619.
- Scott DD, Norbury CJ. 2013. RNA decay via 3' uridylation. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 654–665.
- Sedlackova L, Perkins KD, Lengyel J, Strain AK, van Santen VL, Rice SA. 2008. Herpes simplex virus type 1 ICP27 regulates expression of a variant, secreted form of glycoprotein C by an intron retention mechanism. *J Virol* **82**: 7443–7455.
- Sei E, Conrad NK. 2011. Delineation of a core RNA element required for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 binding and activity. *Virology* **419**: 107–116.
- Sei E, Wang T, Hunter OV, Xie Y, Conrad NK. 2015. HITS-CLIP analysis uncovers a link between the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein and host pre-mRNA metabolism. *PLoS Pathog* **11**: e1004652.
- Senissar M, Le Saux A, Belgareh-Touzé N, Adam C, Banroques J, Tanner NK. 2014. The DEAD-box helicase Ded1 from yeast is an mRNP cap-associated protein that shuttles between the cytoplasm and nucleus. *Nucleic Acids Research* **42**: 10005–10022.
- Serio TR, Cahill N, Prout ME, Miller G. 1998. A functionally distinct TATA box required for late progression through the Epstein-Barr virus life cycle. *J Virol* **72**: 8338–8343.
- Séraphin B. 1992. The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes, yeast and mammals. *DNA Seq* **3**: 177–179.
- Shabalina SA, Ogurtsov AY, Spiridonov AN, Novichkov PS, Spiridonov NA, Koonin EV. 2010. Distinct patterns of expression and evolution of intronless and intron-containing mammalian genes. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 1745–1749.
- Shah P, Ding Y, Niemczyk M, Kudla G, Plotkin JB. 2013. Rate-limiting steps in yeast protein translation. *Cell* **153**: 1589–1601.
- Shahin V. 2006. The genome of HSV-1 translocates through the nuclear pore as a condensed rod-like structure. *Journal of Cell Science* **119**: 23–30.
- Shannon-Lowe C, Rowe M. 2014. Epstein-Barr virus entry, kissing and conjugation. *Current Opinion in Virology* **4**: 78–84.

- Shannon-Lowe C, Rowe M. 2011. Epstein-Barr virus infection of polarized epithelial cells via the basolateral surface by memory B cell-mediated transfer infection. *PLoS Pathog* **7**: e1001338.
- Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse H-J. 2006. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 7065–7070.
- Shapiro M, Duca KA, Lee K, Delgado-Eckert E, Hawkins J, Jarrah AS, Laubenbacher R, Polys NF, Hadinoto V, Thorley-Lawson DA. 2008. A virtual look at Epstein-Barr virus infection: simulation mechanism. *J Theor Biol* **252**: 633–648.
- Shatkin AJ. 1976. Capping of Eucaryotic mRNAs. *Cell* **9**: 645–653.
- She M, Decker CJ, Sundramurthy K, Liu Y, Chen N, Parker R, Song H. 2004. Crystal structure of Dcp1p and its functional implications in mRNA decapping. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**: 249–256.
- She M, Decker CJ, Svergun DI, Round A, Chen N, Muhlrud D, Parker R, Song H. 2008. Structural basis of Dcp2 recognition and activation by Dcp1. *Mol Cell* **29**: 337–349.
- Shen B, Goodman HM. 2004. Uridine addition after microRNA-directed cleavage. *Science* **306**: 997–997.
- Shi Y, Manley JL. 2015. The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes & Development* **29**: 889–897.
- Shi Z, Barna M. 2015. Translating the Genome in Time and Space: Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**: 31–54.
- Shine J, Dalgarno L. 1974. The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 1342–1346.
- Shoemaker CJ, Eyler DE, Green R. 2010. Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* **330**: 369–372.
- Shoemaker CJ, Green R. 2011. Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: E1392–8.
- Shoemaker CJ, Green R. 2012. Translation drives mRNA quality control. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 594–601.
- Siddiqui N, Mangus DA, Chang T-C, Palermينو J-M, Shyu A-B, Gehring K. 2007. Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* **282**: 25067–25075.
- Singh G, Kucukural A, Cenik C, Leszyk JD, Shaffer SA, Weng Z, Moore MJ. 2012. The Cellular EJC Interactome Reveals Higher-Order mRNP Structure and an EJC-SR Protein Nexus. *Cell* **151**: 750–764.
- Singh G, Pratt G, Yeo GW, Moore MJ. 2015. The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. *Annu Rev Biochem* **84**: 325–354.
- Slevin MK, Meaux S, Welch JD, Bigler R, Miliani de Marval PL, Su W, Rhoads RE, Prins

- JF, Marzluff WF. 2014. Deep sequencing shows multiple oligouridylations are required for 3' to 5' degradation of histone mRNAs on polyribosomes. *Mol Cell* **53**: 1020–1030.
- Smith RWP, Blee TKP, Gray NK. 2014. An integrated model for the nucleo-cytoplasmic transport of cytoplasmic poly(A)-binding proteins. *Biochem Soc Trans* **42**: 1229–1237.
- Smith RWP, Gray NK. 2010. Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochem J* **426**: 1–12.
- Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. 1997. Microtubule-mediated transport of incoming Herpes Simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**: 1007–1021.
- Sofos N, Winkler MBL, Brodersen DE. 2016. RRM domain of human RBM7: purification, crystallization and structure determination. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **72**: 397–402.
- Sokabe M, Fraser CS, Hershey JWB. 2012. The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNA_i binding to the 40S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research* **40**: 905–913.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**: 731–745.
- Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC, Shatkin AJ. 1978. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4843–4847.
- Sonenberg N, Rupprecht KM, Hecht SM, Shatkin AJ. 1979. Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4345–4349.
- Song M-G, Bail S, Kiledjian M. 2013. Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. *RNA* **19**: 390–399.
- Song M-G, Li Y, Kiledjian M. 2010. Multiple mRNA decapping enzymes in mammalian cells. *Mol Cell* **40**: 423–432.
- Soret J, Tazi J. 2003. Phosphorylation-dependent control of the pre-mRNA splicing machinery. *Prog Mol Subcell Biol* **31**: 89–126.
- Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Moncorgé O, Ohlmann T. 2007. Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Research* **35**: e121.
- Soto Rifo R, Rubilar PS, Limousin T, de Breyne S, Decimo D, Ohlmann T. 2012. DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J* **31**: 3745–3756.
- Soto Rifo R, Rubilar PS, Ohlmann T. 2013. The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA. *Nucleic Acids Research* **41**: 6286–6299.

- Souki SK, Gershon PD, Sandri-Goldin RM. 2009. Arginine methylation of the ICP27 RGG box regulates ICP27 export and is required for efficient herpes simplex virus 1 replication. *J Virol* **83**: 5309–5320.
- Souki SK, Sandri-Goldin RM. 2009. Arginine methylation of the ICP27 RGG box regulates the functional interactions of ICP27 with SRPK1 and Aly/REF during herpes simplex virus 1 infection. *J Virol* **83**: 8970–8975.
- Spengler ML, Ruyechan WT, Hay J. 2000. Physical Interaction between Two Varicella Zoster Virus Gene Regulatory Proteins, IE4 and IE62. *Virology* **272**: 375–381.
- Staals RHJ, Bronkhorst AW, Schilders G, Slomovic S, Schuster G, Heck AJR, Raijmakers R, Pruijn GJM. 2010. Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome. *EMBO J* **29**: 2358–2367.
- Staals RHJ, Pruijn GJM. 2010. The human exosome and disease. *Adv Exp Med Biol* **702**: 132–142.
- Steckelberg A-L, Boehm V, Gromadzka AM, Gehring NH. 2012. CWC22 connects pre-mRNA splicing and exon junction complex assembly. *Cell Reports* **2**: 454–461.
- Steiger M, Carr-Schmid A, Schwartz DC, Kiledjian M, Parker R. 2003. Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA* **9**: 231–238.
- Stern-Ginossar N. 2015. Decoding viral infection by ribosome profiling. *J Virol* **89**: 6164–6166.
- Stern-Ginossar N, Ingolia NT. 2015. Ribosome Profiling as a Tool to Decipher Viral Complexity. *Annual Review of Virology* **2**: 335–349.
- Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VTK, Hein MY, Huang S-X, Ma M, Shen B, Qian S-B, Hengel H, et al. 2012. Decoding human cytomegalovirus. *Science* **338**: 1088–1093.
- Strässer K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodríguez-Navarro S, Rondón AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R, et al. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**: 304–308.
- Stubbs SH, Hunter OV, Hoover A, Conrad NK. 2012. Viral factors reveal a role for REF/Aly in nuclear RNA stability. *Molecular and Cellular Biology* **32**: 1260–1270.
- Stuparevic I, Mosrin-Huaman C, Hervouet-Coste N, Remenaric M, Rahmouni AR. 2013. Cotranscriptional recruitment of RNA exosome cofactors Rrp47p and Mpp6p and two distinct Trf-Air-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complexes assists the exonuclease Rrp6p in the targeting and degradation of an aberrant messenger ribonucleoprotein particle (mRNP) in yeast. *J Biol Chem* **288**: 31816–31829.
- Sudo H, Nozaki A, Uno H, Ishida Y-I, Nagahama M. 2016. Interaction properties of human TRAMP-like proteins and their role in pre-rRNA 5'ETS turnover. *FEBS Lett* **590**: 2963–2972.
- Sugden B. 2014. Epstein-Barr virus: the path from association to causality for a ubiquitous human pathogen. *PLoS Biol* **12**: e1001939.

- Sun R, Lin SF, Gradoville L, Miller G. 1996. Polyadenylated nuclear RNA encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11883–11888.
- Svitkin YV, Pause A, Haghighat A, Pyronnet S. 2001. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* **7**: 382–394.
- Swartz JE, Bor Y-C, Misawa Y, Rekosh D, Hammarskjold M-L. 2007. The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element. *J Biol Chem* **282**: 19844–19853.
- Sweeney TR, Abaeva IS, Pestova TV, Hellen CUT. 2014. The mechanism of translation initiation on type 1 picornavirus IRESs. *EMBO J* **33**: 76–92.
- Tahara SM, Morgan MA, Shatkin AJ. 1981. Two forms of purified m7G-cap binding protein with different effects on capped mRNA translation in extracts of uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J Biol Chem* **256**: 7691–7694.
- Takada K, Ono Y. 1989. Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J Virol* **63**: 445–449.
- Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD. 2014. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell* **159**: 635–646.
- Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E. 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**: 203–213.
- Tattevin P, Crémieux A-C, Descamps D, Carbon C. 2002. Transfusion-related infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis* **34**: 777–778.
- Taverniti V, Séraphin B. 2015. Elimination of cap structures generated by mRNA decay involves the new scavenger mRNA decapping enzyme Aph1/FHIT together with DcpS. *Nucleic Acids Research* **43**: 482–492.
- Taylor A, Jackson BR, Noerenberg M, Hughes DJ, Boyne JR, Verow M, Harris M, Whitehouse A. 2011. Mutation of a C-terminal motif affects Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 RNA binding, nuclear trafficking, and multimerization. *J Virol* **85**: 7881–7891.
- Taylor GS, Long HM, Brooks JM, Rickinson AB, Hislop AD. 2015. The Immunology of Epstein-Barr Virus-Induced Disease. *Annu Rev Immunol* **33**: 787–821.
- Taylor LL, Jackson RN, Rexhepaj M, King AK, Lott LK, van Hoof A, Johnson SJ. 2014. The Mtr4 ratchet helix and arch domain both function to promote RNA unwinding. *Nucleic Acids Research* **42**: 13861–13872.
- Temme C, Zaessinger S, Meyer S, Simonelig M, Wahle E. 2004. A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *EMBO J* **23**: 2862–2871.
- Temple RM, Zhu J, Budgeon L, Christensen ND, Meyers C, Sample CE. 2014. Efficient replication of Epstein-Barr virus in stratified epithelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 16544–16549.

- Tharun S, He W, Mayes AE, Lennertz P, Beggs JD, Parker R. 2000. Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **404**: 515–518.
- Thomas M, Rechter S, Milbradt J, Auerochs S, Mueller R, Stamminger T, Marschall M. 2009. Cytomegaloviral protein kinase pUL97 interacts with the nuclear mRNA export factor pUL69 to modulate its intranuclear localization and activity. *J Gen Virol* **90**: 567–578.
- Thomas M, Sonntag E, Müller R, Schmidt S, Zielke B, Fossen T, Stamminger T. 2015. pUL69 of human cytomegalovirus recruits the cellular protein arginine methyltransferase 6 via a domain that is crucial for mRNA export and efficient viral replication. *J Virol* **89**: 9601–9615.
- Thomas R, Macsween KF, McAulay K, Clutterbuck D, Anderson R, Reid S, Higgins CD, Swerdlow AJ, Harrison N, Williams H, et al. 2006. Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual partners, and low level EBV in genital secretions. *J Med Virol* **78**: 1204–1209.
- Thompson J, Verma D, Li D, Mosbrugger T. 2016. Identification and characterization of the physiological gene targets of the essential lytic replicative Epstein-Barr virus SM protein. *J Virol* **90**: 1206–1221.
- Thompson SR. 2012. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol* **20**: 558–566.
- Thoms M, Thomson E, Baßler J, Gnädig M, Griesel S, Hurt E. 2015. The exosome is recruited to RNA substrates through specific adaptor proteins. *Cell* **162**: 1029–1038.
- Thomsen R, Libri D, Boulay J, Rosbash M, Jensen TH. 2003. Localization of nuclear retained mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **9**: 1049–1057.
- Thorley-Lawson DA. 2005. EBV the prototypical human tumor virus - just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* **116**: 251–261.
- Thorley-Lawson DA, Allday MJ. 2008. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* **6**: 913–924.
- Thorley-Lawson DA, Duca KA, Shapiro M. 2008. Epstein-Barr virus: a paradigm for persistent infection - for real and in virtual reality. *Trends Immunol* **29**: 195–201.
- Thorley-Lawson DA, Gross A. 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* **350**: 1328–1337.
- Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, Shapiro M. 2013. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Current Opinion in Virology* **3**: 227–232.
- Tian X, Devi-Rao G, Golovanov AP, Sandri-Goldin RM. 2013. The interaction of the cellular export adaptor protein Aly/REF with ICP27 contributes to the efficiency of herpes simplex virus 1 mRNA export. *J Virol* **87**: 7210–7217.
- Till DD, Linz B, Seago JE, Elgar SJ, Marujo PE. 1998. Identification and developmental expression of a 5'-3' exoribonuclease from *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development* **79**: 51–55.

- Toma KG, Rebbapragada I, Durand S, Lykke-Andersen J. 2015. Identification of elements in human long 3' UTRs that inhibit nonsense-mediated decay. *RNA* **21**: 887–897.
- Tomecki R, Dziembowski A. 2010. Novel endoribonucleases as central players in various pathways of eukaryotic RNA metabolism. *RNA* **16**: 1692–1724.
- Tomecki R, Kristiansen MS, Lykke-Andersen S, Chlebowski A, Larsen KM, Szczesny RJ, Drazkowska K, Pastula A, Andersen JS, Stepień PP, et al. 2010. The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J* **29**: 2342–2357.
- Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N, Shatkin AJ. 2011. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**: 277–298.
- Toth Z, Lischka P, Stamminger T. 2006. RNA-binding of the human cytomegalovirus transactivator protein UL69, mediated by arginine-rich motifs, is not required for nuclear export of unspliced RNA. *Nucleic Acids Research* **34**: 1237–1249.
- Tracy SI, Kakalacheva K, Lünemann JD, Luzuriaga K, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA. 2012. Persistence of Epstein-Barr virus in self-reactive memory B cells. *J Virol* **86**: 12330–12340.
- Tran EJ, Zhou Y, Corbett AH, Wenthe SR. 2007. The DEAD-box protein Dbp5 controls mRNA export by triggering specific RNA:protein remodeling events. *Mol Cell* **28**: 850–859.
- Tritschler F, Braun JE, Motz C, Igreja C, Haas G, Truffault V, Izaurralde E, Weichenrieder O. 2009. DCP1 forms asymmetric trimers to assemble into active mRNA decapping complexes in metazoa. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 21591–21596.
- Tsuboi T, Kuroha K, Kudo K, Makino S, Inoue E, Kashima I, Inada T. 2012. Dom34:Hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol Cell* **46**: 518–529.
- Tuck AC, Tollervey D. 2013. A transcriptome-wide atlas of RNP composition reveals diverse classes of mRNAs and lncRNAs. *Cell* **154**: 996–1009.
- Tucker M, Staples RR, Valencia-Sanchez MA, Muhlrud D, 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 MA, Staples RR, Chen J, Denis CL, 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.
- Tunnicliffe RB, Schacht M, Levy C, Jowitt TA, Sandri-Goldin RM, Golovanov AP. 2015. The structure of the folded domain from the signature multifunctional protein ICP27 from herpes simplex virus-1 reveals an intertwined dimer. *Scientific Reports* **5**: 11234.
- Tutucci E, Stutz F. 2011. Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 377–384.
- Uchida N, Hoshino S-I, Katada T. 2004. Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* **279**: 1383–1391.

- Ule J, Jensen K, Mele A, Darnell RB. 2005. CLIP: A method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* **37**: 376–386.
- Ule J, Jensen KB, Ruggiu M, Mele A, Ule A, Darnell RB. 2003. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**: 1212–1215.
- Uranishi H, Zolotukhin AS, Lindtner S, Warming S, Zhang G-M, Bear J, Copeland NG, Jenkins NA, Pavlakis GN, Felber BK. 2009. The RNA-binding motif protein 15B (RBM15B/OTT3) acts as cofactor of the nuclear export receptor NXF1. *J Biol Chem* **284**: 26106–26116.
- Valkov E, Muthukumar S, Chang C-T, Jonas S, Weichenrieder O, Izaurralde E. 2016. Structure of the Dcp2-Dcp1 mRNA-decapping complex in the activated conformation. *Nature Structural & Molecular Biology* **23**: 574–579.
- van den Elzen AMG, Henri J, Lazar N, Gas M-E, Durand D, Lacroute F, Nicaise M, van Tilbeurgh H, Séraphin B, Graille M. 2010. Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**: 1446–1452.
- van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Séraphin B. 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J* **21**: 6915–6924.
- van Dijk E, Le Hir H, Séraphin B. 2003. DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12081–12086.
- van Dijk EL, Schilders G, Pruijn GJM. 2007. Human cell growth requires a functional cytoplasmic exosome, which is involved in various mRNA decay pathways. *RNA* **13**: 1027–1035.
- van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R. 2002. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**: 2262–2264.
- Vanacova S, Stefl R. 2007. The exosome and RNA quality control in the nucleus. *EMBO Rep* **8**: 651–657.
- Vanacova S, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S, Friedlein A, Langen H, Keith G, Keller W. 2005. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol* **3**: e189.
- Vassilenko KS, Alekhina OM, Dmitriev SE, Shatsky IN, Spirin AS. 2011. Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation. *Nucleic Acids Research* **39**: 5555–5567.
- Ventoso I, Blanco R, Perales C, Carrasco L. 2001. HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12966–12971.
- Ventoso I, MacMillan SE, Hershey J, Carrasco L. 1998. Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex. *FEBS Lett* **435**: 79–83.
- Verma D. 2008. Epstein-Barr virus SM protein functions as an alternative splicing factor. *J Virol* **82**: 7180–7188.

- Verma D, Bais S, Gaillard M. 2010. Epstein-Barr virus SM protein utilizes cellular splicing factor SRp20 to mediate alternative splicing. *J Virol* **84**: 11781–11789.
- Verma D, Thompson J, Swaminathan S. 2016. Spironolactone blocks Epstein-Barr virus production by inhibiting EBV SM protein function. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 3609–3614.
- Wadd S, Bryant H, Filhol O, Scott JE, Hsieh TY, Everett RD, Clements JB. 1999. The multifunctional herpes simplex virus IE63 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein K and with casein kinase 2. *J Biol Chem* **274**: 28991–28998.
- Wahl MC, Will CL, Lührmann R. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**: 701–718.
- Walsh D, Mathews MB, Mohr I. 2013. Tinkering with translation: protein synthesis in virus-infected cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**: a012351.
- Walsh D, Mohr I. 2011. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol* **9**: 860–875.
- Wang C, Han B, Zhou R, Zhuang X. 2016. Real-time imaging of translation on single mRNA transcripts in live cells. *Cell* **165**: 990–1001.
- Wang H-B, Zhang H, Zhang J-P, Li Y, Zhao B, Feng G-K, Du Y, Xiong D, Zhong Q, Liu W-L, et al. 2015a. Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Nature Communications* **6**: 6240.
- Wang M, Pestov DG. 2011. 5'-end surveillance by Xrn2 acts as a shared mechanism for mammalian pre-rRNA maturation and decay. *Nucleic Acids Research* **39**: 1811–1822.
- Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, Weng X, Chen K, Shi H, He C. 2015b. N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell* **161**: 1388–1399.
- Wang YL, Liu CL, Storey JD, Tibshirani RJ, Herschlag D, Brown PO. 2002a. Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5860–5865.
- Wang Z, Kiledjian M. 2001. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* **107**: 751–762.
- Wang ZR, Jiao XF, Carr-Schmid A, Kiledjian M. 2002b. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12663–12668.
- Wasmuth EV, Januszyk K, Lima CD. 2014. Structure of an Rrp6-RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. *Nature* **511**: 435–439.
- Wasmuth EV, Lima CD. 2012. Exo- and endoribonucleolytic activities of yeast cytoplasmic and nuclear RNA exosomes are dependent on the noncatalytic core and central channel. *Mol Cell* **48**: 133–144.
- Wegrzyn JL, Drudge TM, Valafar F, Hook V. 2008. Bioinformatic analyses of mammalian 5'-UTR sequence properties of mRNAs predicts alternative translation initiation sites. *BMC Bioinformatics* **9**: 232.

- Weingarten-Gabbay S, Elias-Kirma S, Nir R, Gritsenko AA, Stern-Ginossar N, Yakhini Z, Weinberger A, Segal E. 2016. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **351**: 240.
- Weir JR, Bonneau F, Hentschel J, Conti E. 2010. Structural analysis reveals the characteristic features of Mtr4, a DExH helicase involved in nuclear RNA processing and surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 12139–12144.
- Weirich CS, Erzberger JP, Flick JS, Berger JM, Thorner J, Weis K. 2006. Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nat Cell Biol* **8**: 668–676.
- Weisser M, Voigts-Hoffmann F, Rabl J, Leibundgut M, Ban N. 2013. The crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with eIF1 and eIF1A. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 1015–1017.
- Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**: 135–140.
- West S, Gromak N, Proudfoot NJ. 2004. Human 5'→3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* **432**: 522–525.
- Wethmar K. 2014. The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**: 765–778.
- Wiederhold K, Passmore LA. 2010. Cytoplasmic deadenylation: regulation of mRNA fate. *Biochem Soc Trans* **38**: 1531–1536.
- Wiegand HL, Coburn GA, Zeng Y, Kang Y, Bogerd HP, Cullen BR. 2002. Formation of Tap/NXT1 Heterodimers Activates Tap-Dependent Nuclear mRNA Export by Enhancing Recruitment to Nuclear Pore Complexes. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 245–256.
- Will CL, Lührmann R. 2011. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**: a003707.
- Wilusz JE, JnBaptiste CK, Lu LY, Kuhn C-D, Joshua-Tor L, Sharp PA. 2012. A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes & Development* **26**: 2392–2407.
- Winkler GS, Balacco DL. 2013. Heterogeneity and complexity within the nuclease module of the Ccr4-Not complex. *Front Gene* **4**: 296.
- Winkler M, aus Dem Siepen T, Stamminger T. 2000. Functional interaction between pleiotropic transactivator pUL69 of human cytomegalovirus and the human homolog of yeast chromatin regulatory protein SPT6. *J Virol* **74**: 8053–8064.
- Winkler M, Stamminger T. 1996. A specific subform of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69 is contained within the tegument of virus particles. *J Virol* **70**: 8984–8987.
- Wlotzka W, Kudla G, Granneman S, Tollervey D. 2011. The nuclear RNA polymerase II surveillance system targets polymerase III transcripts. *EMBO J* **30**: 1790–1803.

- Wolf J, Valkov E, Allen MD, Meineke B, Gordiyenko Y, McLaughlin SH, Olsen TM, Robinson CV, Bycroft M, Stewart M, et al. 2014. Structural basis for Pan3 binding to Pan2 and its function in mRNA recruitment and deadenylation. *EMBO J* **33**: 1514–1526.
- Wu B, Buxbaum AR, Katz ZB, Yoon YJ, Singer RH. 2015. Quantifying protein-mRNA interactions in single live cells. *Cell* **162**: 211–220.
- Wu B, Eliscovich C, Yoon YJ, Singer RH. 2016. Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science* **352**: 1430–1435.
- Wu M, Nilsson P, Henriksson N, Niedzwiecka A, Lim MK, Cheng Z, Kokkoris K, Virtanen A, Song H. 2009. Structural basis of m(7)GpppG binding to poly(A)-specific ribonuclease. *Structure* **17**: 276–286.
- 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.
- Xiang S, Cooper-Morgan A, Jiao X, Kiledjian M, Manley JL, Tong L. 2009. Structure and function of the 5'-3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature* **458**: 784–788.
- Xiang S, Gapsys V, Kim H-Y, Bessonov S, Hsiao H-H, Möhlmann S, Klaukien V, Ficner R, Becker S, Urlaub H, et al. 2013. Phosphorylation drives a dynamic switch in serine/arginine-rich proteins. *Structure* **21**: 2162–2174.
- Xue S, Barna M. 2012. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 355–369.
- Yamashita A, Chang T-C, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen C-YA, Shyu A-B. 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**: 1054–1063.
- Yamashita A, Izumi N, Kashima I, Ohnishi T, Saari B, Katsuhata Y, Muramatsu R, Morita T, Iwamatsu A, Hachiya T, et al. 2009. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development* **23**: 1091–1105.
- Yan X, Hoek TA, Vale RD, Tanenbaum ME. 2016. Dynamics of translation of single mRNA molecules in vivo. *Cell* **165**: 976–989.
- Yanagiya A, Svitkin YV, Shibata S, Mikami S, Imataka H, Sonenberg N. 2009. Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 1661–1669.
- Yang F, Schoenberg DR. 2004. Endonuclease-mediated mRNA decay involves the selective targeting of PMR1 to polyribosome-bound substrate mRNA. *Mol Cell* **14**: 435–445.
- Yasuda T, Wirtz T, Zhang B, Wunderlich T, Schmidt-Supprian M, Sommermann T, Rajewsky K. 2013. Studying Epstein-Barr virus pathologies and immune surveillance by reconstructing EBV infection in mice. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **78**: 259–263.

- Yu C-H, Dang Y, Zhou Z, Wu C, Zhao F, Sachs MS, Liu Y. 2015. Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding. *Mol Cell* **59**: 744–754.
- Yu J, Shin B, Park E-S, Yang S, Choi S, Kang M, Rho J. 2010. Protein arginine methyltransferase 1 regulates herpes simplex virus replication through ICP27 RGG-box methylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **391**: 322–328.
- Yu X, McCarthy PJ, Wang Z, Gorlen DA, Mertz JE. 2012. Shutoff of BZLF1 gene expression is necessary for immortalization of primary B cells by Epstein-Barr virus. *J Virol* **86**: 8086–8096.
- Yu Y, Abaeva IS, Marintchev A, Pestova TV, Hellen CUT. 2011. Common conformational changes induced in type 2 picornavirus IRESs by cognate trans-acting factors. *Nucleic Acids Research* **39**: 4851–4865.
- Yusupova G, Yusupov M. 2014. High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. *Annu Rev Biochem* **83**: 467–486.
- Zaborowska J, Egloff S, Murphy S. 2016. The pol II CTD: new twists in the tail. *Nature Structural & Molecular Biology* **23**: 771–777.
- Zahler AM, Neugebauer KM, Lane WS, Roth MB. 1993. Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* **260**: 219–222.
- Zhang Z, Krainer AR. 2004. Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol Cell* **16**: 597–607.
- Zhi Y, Sandri-Goldin RM. 1999. Analysis of the phosphorylation sites of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27. *J Virol* **73**: 3246–3257.
- Zhong X-Y, Wang P, Han J, Rosenfeld MG, Fu X-D. 2009. SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Mol Cell* **35**: 1–10.
- Zhou J, Wan J, Gao X, Zhang X, Jaffrey SR, Qian S-B. 2015a. Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature* **526**: 591–594.
- Zhou Y, Zhu J, Schermann G, Ohle C, Bendrin K, Sugioka-Sugiyama R, Sugiyama T, Fischer T. 2015b. The fission yeast MTREC complex targets CUTs and unspliced pre-mRNAs to the nuclear exosome. *Nature Communications* **6**: 7050.
- Zhou Z, Fu X-D. 2013. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma* **122**: 191–207.
- Zhou Z, Luo MJ, Straesser K, Katahira J, Hurt E, Reed R. 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**: 401–405.
- Zielke B, Wagenknecht N, Pfeifer C, Zielke K, Thomas M, Stamminger T. 2012. Transfer of the UAP56 interaction motif of human cytomegalovirus pUL69 to its murine cytomegalovirus homolog converts the protein into a functional mRNA export factor that can substitute for pUL69 during viral infection. *J Virol* **86**: 7448–7453.

- Zimber U, Adldinger HK, Lenoir GM, Vuillaume M, Knebel-Doeberitz MV, Laux G, Desgranges C, Wittmann P, Freese UK, Schneider U. 1986. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* **154**: 56–66.
- Zolotukhin AS, Uranishi H, Lindtner S, Bear J, Pavlakis GN, Felber BK. 2009. Nuclear export factor RBM15 facilitates the access of DBP5 to mRNA. *Nucleic Acids Research* **37**: 7151–7162.
- Zuo Y, Deutscher MP. 2001. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Research* **29**: 1017–1026.

ANNEXES

I - Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs

Fabrice Mure*, Franceline Juillard*, Quentin Bazot*, Lionel Tafforeau, Christophe Macri, Chantal Rabourdin-Combe, Vincent Lotteau, Evelyne Manet and Henri Gruffat

*co-premier auteur

La protéine EB2 (aussi appelée Mta, SM et BMLF1) est une protéine indispensable exprimée au cours du cycle productif du virus d'Epstein-Barr (EBV). EB2 est nécessaire à l'accumulation cytoplasmique des ARNm viraux générés à partir de gènes sans intron. EB2 est une protéine qui lie l'ARN, dont l'expression a été montrée capable d'influencer à la fois la stabilité, l'épissage, l'export nucléo-cytoplasmique et la traduction des ARNm. À la suite d'un crible deux-hybrides chez la levure, nous avons identifié trois protéines SR, ASF/SF2 (SRSF1), SRp20 (SRSF3) et 9G8 (SRSF7), comme partenaires cellulaires d'EB2. Par la suite, en utilisant des siRNAs spécifiques de chacune de ces protéines, nous avons montré que SRp20 joue un rôle majeur dans le métabolisme de plusieurs ARNm transcrits à partir de gènes dépourvus d'intron : l'ARNm rapporteur Renilla luciférase, l'ADNc β -globine et deux ARNm viraux tardifs. L'export nucléo-cytoplasmique de ces ARNm non épissés a précédemment été montré comme dépendant de la protéine EB2. Dans ce travail, nous montrons que la déplétion de SRp20 diminue l'effet d'EB2 sur l'accumulation de ses ARNm cibles dans le cytoplasme. De plus, la déplétion de SRp20 en absence d'EB2 augmente significativement la quantité de ces ARNm, suggérant qu'une fonction d'EB2 est d'antagoniser l'effet délétère de SRp20. Enfin, par des expériences d'immunoprécipitation d'ARN, nous montrons qu'EB2 augmente l'association de SRp20 avec l'ARN, suggérant qu'une autre fonction d'EB2 est de stabiliser cette association nécessaire à sa fonction d'export des ARNm non épissés.

II - Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2

Fabrice Mure*, Emiliano P. Ricci*, Henri Gruffat, Didier Decimo, Cahora Medina-Palazon, Théophile Ohlmann and Evelyne Manet

*co-premier auteur

La protéine EB2 du virus d'Epstein-Barr (EBV) permet l'export nucléo-cytoplasmique de la majorité des ARNm viraux précoces et tardifs issus de gènes sans intron. Il existe des analogues fonctionnels d'EB2 chez tous les herpèsvirus et cette protéine est indispensable à la production de nouveaux virions infectieux. Dans ce travail, nous montrons, qu'en plus de son rôle de facteur d'export des ARNm, EB2 stimule efficacement la traduction des ARNm non épissés, sans affecter la synthèse protéique globale. De manière intéressante, cet effet peut être supprimé par l'ajout d'un intron chimérique dans le gène rapporteur cible d'EB2. L'ARNm épissé est alors efficacement exporté et traduit même en absence d'EB2. De plus, nous montrons que la protéine EB2 est associée aux polysomes et augmente significativement la proportion de ses ARNm cibles dans la fraction polysomale. Enfin, le test des analogues fonctionnels d'EB2 chez les autres herpèsvirus révèle que, même si ces protéines jouent des rôles similaires au cours du cycle viral productif, leurs mécanismes d'action sont différents.

III - Protein Kinase CK2 Phosphorylation of EB2 Regulates Its Function in the Production of Epstein-Barr Virus Infectious Viral Particles

Cahora Medina-Palazon, Henri Gruffat, Fabrice Mure, Odile Filhol, Valérie Vingtdeux-Didier, Hervé Drobecq, Claude Cochet, Nicolas Sergeant, Alain Sergeant and Evelyne Manet

La protéine EB2 (aussi appelée BMLF1, Mta ou SM) favorise l'export nucléocytoplasmique de la majorité des ARNm précoces et tardifs du virus d'Epstein-Barr (EBV), et est essentielle à la production de nouveaux virions infectieux. Dans ce travail, nous montrons *in vitro* que les sous-unités $-\alpha$ et $-\beta$ de la protéine kinase cellulaire CK2 interagissent, à la fois individuellement et sous forme d'holoenzyme plus efficacement, avec la région N-terminale d'EB2, et que la sous-unité régulatrice $-\beta$ interagit également avec la région C-terminale d'EB2. De plus, nous montrons que la protéine kinase CK2 immunoprécipitée avec EB2 phosphorylent plusieurs résidus dans le domaine N-terminal d'EB2, dont les résidus Ser-55, -56 et -57 situés à proximité du signal d'export nucléaire (NES). Le mutant EB2S3E, mimant la phosphorylation de ces trois résidus, mais pas le mutant EB2S3A, est capable de restaurer la production de virions dans des cellules HEK293_{BMLF1-KO} contenant le génome d'EBV amputé du gène codant pour la protéine EB2. Ce défaut de *trans*-complémentation du mutant EB2S3A dans les cellules HEK293_{BMLF1-KO} n'est pas dû à sa capacité à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, mais est le résultat d'une diminution de la quantité cytoplasmique de certains ARNm viraux tardifs. L'ensemble de nos résultats indique que la production de particules virales d'EBV induite par la protéine EB2 est régulée par la phosphorylation d'EB2 sur ses résidus Ser-55, -56 et -57 par la protéine kinase CK2.

IV - Epstein-Barr Virus Late Gene Transcription Depends on the Assembly of a Virus-Specific Preinitiation Complex

Valentin Aubry, Fabrice Mure, Bernard Mariamé, Thibaut Deschamps, Lucjan S. Wyrwicz, Evelyne Manet and Henri Gruffat

Le cycle productif des herpèsvirus est caractérisé par une expression successive et régulée des gènes immédiats précoces (IE), précoces (E) puis tardifs (L). La structure des promoteurs entre les différentes classes de gènes diffère profondément. Les promoteurs de gènes IE et E possèdent des régions *cis*-régulatrices en amont d'une boîte TATA, tandis que les promoteurs de gènes L contiennent une seule et unique séquence *cis*-régulatrice. Dans le cas des gamma-herpèsvirus, cette séquence est le plus souvent une boîte TATT en lieu et place de la boîte TATA canonique. Le génome d'EBV code pour une protéine, BcRF1, qui est l'homologue structural de la TBP (*TATA-Binding Protein*) et interagit spécifiquement avec les régions TATT. BcRF1 est nécessaire mais n'est pas suffisante à l'expression des gènes tardifs d'EBV, suggérant que d'autres protéines virales sont aussi impliquées. Dans ce travail, nous avons identifié et caractérisé un complexe de protéines virales nécessaire et suffisant pour l'expression des gènes viraux tardifs. Ce complexe se compose de 5 protéines différentes en plus de BcRF1 interagissant avec l'ARN polymérase II. Au cours du cycle productif, ce complexe que nous avons nommé vPIC (*viral Pre-Initiation Complex*), fonctionne en parallèle de la machinerie de réplication de l'ADN viral afin d'activer l'expression des gènes tardifs. Les protéines du vPIC d'EBV possèdent des homologues chez les bêta- et gamma-herpèsvirus mais pas chez les alpha-herpèsvirus. Nos résultats indiquent que les bêta- et gamma-herpèsvirus codent pour leur propre complexe de pré-initiation de la transcription responsable de l'expression des gènes viraux tardifs, et mettent ainsi en évidence la convergence évolutive de ces virus.

RÉSUMÉ : La régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique est basée sur un réseau complexe et dynamique d'interactions ARN-protéines. Un défi important est de comprendre les mécanismes par lesquels ces protéines de liaison à l'ARN (RBPs) influencent chaque étape du métabolisme des ARNm. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de caractériser de nouvelles fonctions de la RBP virale EB2 qui est indispensable à la production du virus d'Epstein-Barr (EBV). Des travaux antérieurs ont montré qu'EB2 favorise l'accumulation cytoplasmique de la majorité des ARNm viraux, dont la caractéristique est d'être transcrit à partir de gènes sans intron. Nous montrons que le rôle d'EB2 ne se limite pas à celui de facteur d'export des ARNm car cette RBP stabilise aussi ses ARNm cibles dans le noyau en les protégeant de la dégradation par l'exosome. Nos résultats indiquent qu'en absence d'EB2 : (i) certains ARNm viraux sont instables car ils contiennent des sites cryptiques d'épissage ; (ii) le facteur d'épissage SRSF3 déstabilise ces ARNm en interagissant à la fois avec l'exosome et le complexe NEXT, un des cofacteurs nucléaires de l'exosome. Par ailleurs, nous montrons également qu'EB2 est associée aux polysomes et stimule efficacement la traduction de ses ARNm cibles, en interagissant avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G et PABP. Le développement d'un nouveau système de traduction *in vitro* nous a permis de montrer que l'effet d'EB2 sur la traduction nécessite le passage nucléaire de ses ARNm cibles. Ainsi, l'ensemble de nos travaux démontre le rôle clé d'une RBP virale dans le couplage entre les étapes nucléaires et cytoplasmiques de la biogenèse des ARNm.

MOTS-CLÉS : protéines de liaison à l'ARN / herpèsvirus / dégradation des ARNm / traduction

ABSTRACT : Post-transcriptional regulation of gene expression is based on a complex and dynamic network of RNA-proteins interactions. A major challenge is to understand the precise contribution of these RNA-binding proteins (RBPs) to each step of mRNA metabolism. During this thesis, we have characterized new functions of the EB2 viral RBP which is essential for the production of the Epstein-Barr virus (EBV). Previous works have shown that EB2 promotes cytoplasmic accumulation of most intronless viral mRNAs. Here, we show that EB2 is not just an mRNA export factor because this RBP also stabilizes its target mRNAs in the nucleus by protecting them from RNA exosome degradation. Our results indicate that in the absence of EB2 : (i) some viral mRNAs are unstable because they contain cryptic splice sites ; (ii) the splicing factor SRSF3 destabilizes these mRNAs by interacting with both the RNA exosome and the Nuclear EXosome Targeting (NEXT) complex. Moreover, we also show that EB2 is associated with polysomes and it strongly stimulates translation of its target mRNAs through interactions with the eIF4G and PABP initiation factors. Interestingly, the development of a new *in vitro* translational assay allowed us to show that EB2's translation stimulation requires that EB2 binds its target mRNAs in the nucleus. Taken together, our works demonstrate the key function of a viral RBP in the coordination of the nuclear and cytoplasmic steps of mRNA biogenesis.

KEYWORDS : RNA-binding proteins / herpesvirus / mRNA decay / translation