



**HAL**  
open science

# Caractérisation fonctionnelle de la protéine ECT2 comme lecteur de la modification N6-méthyladénosine des ARN messagers chez la plante *Arabidopsis thaliana*

Jérémy Scutenaire

► **To cite this version:**

Jérémy Scutenaire. Caractérisation fonctionnelle de la protéine ECT2 comme lecteur de la modification N6-méthyladénosine des ARN messagers chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Autre [q-bio.OT]. Université de Perpignan, 2017. Français. NNT : 2017PERP0033 . tel-02410927

**HAL Id: tel-02410927**

**<https://theses.hal.science/tel-02410927>**

Submitted on 14 Dec 2019

**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.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par  
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale

« Énergie et Environnement » ED305

Et de l'unité de recherche

Laboratoire Génome et Développement des Plantes  
UMR5096

Spécialité : **Biologie**

Présentée par  
Jérémy Scutenaire

**Caractérisation fonctionnelle de la protéine ECT2  
comme lecteur de la modification N<sup>6</sup>-méthyladénosine  
des ARN messagers chez la plante *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 14 décembre 2017 devant le jury composé de

Dr Philippe GIEGÉ, DR CNRS, UPR 2357, Strasbourg	Rapporteur
Dr André VERDEL, CR CNRS, UMR 5309, Grenoble	Rapporteur
Dr Thierry LAGRANGE, DR CNRS, UMR 5096, Perpignan	Examineur
Dr Antoine MARTIN, CR CNRS, UMR 5004, Montpellier	Examineur
Dr Bertrand SÉRAPHIN, DR CNRS, UMR 7104, Strasbourg	Examineur
Dr Cécile BOUSQUET-ANTONELLI, DR CNRS, UMR 5096, Perpignan	Directrice de thèse
Pr Jean-Marc DERAGON, PR IUF-UPVD, UMR 5096, Perpignan	Co-Directeur de thèse
Dr Rémy MERRET, CR CNRS, UMR 5096, Perpignan	Co-Directeur de thèse







# Remerciements

Ça y est c'est fait ! Après de longs mois de gestation, ce manuscrit est enfin naît non sans mal ! Il n'aurait néanmoins pas vu le jour sans un certain nombre de personnes que j'aimerais remercier. Je n'ai jamais été très doué pour extérioriser mes pensées mais essayons ☺

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger ces travaux. Merci à **André VERDEL** et **Philippe GIEGÉ** pour leur investissement en tant que rapporteurs et merci à **Antoine MARTIN**, **Bertrand SÉRAPHIN** et **Thierry LAGRANGE** d'apporter leur expertise en tant qu'examineurs.

Je remercie également **Dominique GAGLIARDI**, **Gordon SIMPSON**, **Jean-Philippe REICHHELD** et **Taline ELMAYAN** pour avoir participé à mes comités de thèse annuels et pour avoir vaillamment lu mes rapports afin de m'apporter de précieux conseils.

J'adresse ensuite mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse **Cécile BOUSQUET-ANTONELLI**, **Jean-Marc DERAGON** et **Rémy MERRET**. Merci pour votre encadrement scientifique hors-pair, votre implication et pour m'avoir accordé votre confiance là où j'en ai parfois (ou souvent) manqué. **Cécile**, je te remercie d'avoir toujours pris le temps pour moi. Malgré ton emploi du temps chargé, je sais que ta porte était toujours ouverte à mes questions. Merci de ne pas m'avoir (physiquement) secoué les fois où j'étais en retard sur mes rapports et surtout merci de m'avoir donné l'opportunité de partir en Ecosse pour une expérience ~~touristique~~ professionnelle sans précédents (~~châteaux, haggis et whisky~~ Co-IP et mass spec). Je sais que j'étais « le petit » de l'équipe mais il va falloir se faire à l'idée que tous tes futur(e)s étudiant(e)s vont être de plus en plus jeunes ☺ **Jean-Marc**, merci pour tes conseils avisés et pour la passion que tu retransmets depuis mes cours de biologie moléculaire en L2 qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Désolé malgré moi de t'avoir spoilé une intrigue de *Game of Thrones* même si j'assume que tu devais être au courant avec la version roman, j'espère que tu n'en tiendras pas rigueur dans ta décision du fameux 14 décembre ! **Rémy**, je n'aurais pas assez de mots ici pour t'exprimer toute ma reconnaissance et mon respect. Un énorme merci pour tout ce que tu as fait pour moi : ton encadrement technique et scientifique quasiment quotidien (même depuis l'autre bout du monde), ton aide inestimable dans toutes mes épreuves et ton soutien irrévocable depuis mes débuts en tant que petit stagiaire de master I tout timide. Tu as toujours su trouver les mots pour m'expliquer et me convaincre de faire les choix les plus justes. Tu vas devoir te trouver un nouveau poulain mais je sais déjà qu'il sera entre de bonnes mains. Au-delà d'un directeur, je vois en toi un modèle que je chercherai à atteindre si mes épaules le permettent (j'y travaille au moins sur le plan physique). Désolé par contre si je ne t'ai pas donné beaucoup d'occasion de me voir perdre mon calme même si j'ai failli craquer avec ces ~~foutus~~ grand gels d'ARN ! Nos blagues pourries et vannes fusantes des jeudis soir me manqueront ;) En dehors du labo, je garde en mémoire plein de souvenirs culinaires incluant Les Grands Buffets sous une météo capricieuse, la fameuse pigouille et les nombreuses sorties BK où j'adresse mes prières à tous les bœufs qui ont fini en double Steakhouse.

Merci également aux membres de l'équipe. **Jean-Jacques**, j'ai toujours été étonné de voir avec quelle minutie tu travailles tout en ayant une paillasse si encombrée (mais ordonnée) ! **Soizik**

ou l'éternelle frileuse ☺, bon courage pour tes derniers mois ! **Viviane**, merci d'avoir gérée toutes ces plantes, récoltée toutes ces graines et surtout d'avoir fait tous ces croisements. Si *Arabido* n'avait pas de système d'auto-fécondation, tu aurais pu assurer à toi toute seule la survie de l'espèce en ouvrant une agence matrimoniale pour plantes (pas sûr que ça rapporte). Evidemment, merci aussi pour ton talent pâtissier. Merci aux anciens qui sont partis : **Elodie**, j'ai hâte de rejouer « à la loyale » à un jeu de société avec toi et n'oublie pas que si tu as besoin d'un verre d'eau sucré tu peux toujours me demander ;) **Yann** et **Théo** merci de m'avoir fait rigoler avec vos joutes verbales, bonne continuation à vous avec un peu moins de fractures osseuses.

Je voudrais ensuite remercier **Marie-Christine** aussi connue comme la parfaite compagne de goûter, la pro des créneaux dans les lignes ou encore « l'écorchée des Pyrénées » ☺ Ces dernières années auraient été bien tristes sans toi et tous ces moments de fous rires. Tu arriveras toujours à me faire sourire avec ta bonne humeur et ta joie de vivre imperturbable ! Merci pour toutes les pauses cafés / parlote qui vont horriblement me manquer et qui m'ont permis de souffler durant ces derniers mois. Merci de contribuer prochainement à l'accomplissement d'une épreuve de ma wish-list, je sais d'avance que ça risque de piquer mais après tout on s'entraîne bien comme des bonhommes non ?!

**Laura**, je me dois de te remercier pour avoir été présente comme confidente dans mes bons et mauvais moments. J'ai su apprécier la façon que tu as de toujours voir le bon côté de choses. Je sais que ta « meilleure amie » va te manquer et qu'il va te falloir trouver quelqu'un d'autre pour te vendre du rêve au quotidien mais tu y arriveras :P Merci d'avoir égayé la porte du bureau avec tes photos montages très réalistes ☺ Je te souhaite de la réussite pour ta dernière année, tu vas sûrement en baver (pas autant que sur Jon Snow) mais ça te fera une raison supplémentaire pour te défouler et me raconter tout ça lors d'une session confession.

**Sophie**, merci d'avoir été la meilleure coloc de bureau depuis nos débuts de petits thésards. Les mascottes y sont forcément pour quelque chose ! Finalement, au bout de ces 3 ans, je ne suis pas sûr d'avoir diminué ma consommation de thon en boîte surtout avec l'apport protéique considérable que ça apporte mais je fais quand même plus attention aux marques ☺

Merci aux « piliers » **Christophe** et **Jean-René** (Père Castor) d'avoir animé les fameux jeudis soirs avec d'autres. Vos petites et longues (surtout JR) histoires respectives vont me manquer.

De façon plus générale, je remercie tous les membres du labo qui m'ont apporté au moins un sourire dans ces dernières années (rassurez-vous, vous y êtes tous !). Merci d'avoir tous contribué à ce que ma thèse se passe dans la bonne ambiance et dans des conditions de travail optimales. Bon courage aux thésards encore en lice !

Finalement, je remercie ma famille pour m'avoir toujours soutenu. Maman et Papa je vous suis éternellement reconnaissant de m'avoir donné les moyens d'arriver jusqu'ici et d'avoir cru en moi. (Papi et mamie)<sup>2</sup> merci de m'avoir écouté avec autant de passion dès que je vous parlais de mes travaux. Il y a souvent cette habitude de remercier en tout dernier la personne qui partage votre quotidien, c'est pourquoi je remercie ma chère et tendre : *<Error 404 Not Found !>* (Un hamster russe ça compte ou pas ?! Ok c'était la dernière blague pourrie ☺).

# TABLE DES MATIÈRES

---

Liste des abréviations .....	6
Liste des figures et des tableaux .....	7
Avant-propos .....	9
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>PARTIE I – Les ARN messagers au cœur d’un équilibre entre traduction et dégradation .....</b>	<b>15</b>
I – La voie d’initiation de la traduction dépendante de la coiffe .....	15
II – Mécanismes généraux des voies principales de dégradation cytoplasmique .....	17
II.1 – La demi-vie des ARN messagers.....	18
II.2 – Le mécanisme de déadénylation.....	18
II.2 – L’inhibition de traduction, le decapping et la dégradation 5’-3.....	19
III – Régulation de la traduction et de la stabilité des ARN messagers en situation de stress .....	24
III.1 – Régulation des facteurs d’initiation de traduction .....	24
III.2 – Rôles des p-bodies et des granules de stress.....	25
III.3 – Régulation de la stabilité des transcrits en réponse au stress .....	30
III.4 – Implication des acteurs de la stabilité dans les réponses au stress.....	31
<b>PARTIE II – Le rôle de la protéine LARP1 dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des ARN messagers .....</b>	<b>35</b>
I – Phylogénie, domaines et structures des protéines à motif La .....	35
II – Fonction de la protéine LARP1 .....	37
II.1 – Rôle de LARP1 chez le nématode et la levure.....	38
II.2 – Rôle de la protéine LARP1 dans la régulation des ARNm 5’TOP chez les mammifères .....	39
II.3 – Rôle fonctionnel de la protéine LARP1 chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
<b>PARTIE III – Le rôle de la modification N<sup>6</sup>-méthyladénosine dans le contrôle du devenir des ARN messagers .....</b>	<b>47</b>
I – Les modifications post-transcriptionnelles chez les eucaryotes.....	47
II – Caractéristiques conservées de la N <sup>6</sup> -méthyladénosine .....	49
III – La machinerie d’installation dynamique de la méthylation .....	51
III.1 – Le complexe de m <sup>6</sup> A-méthyltransférase .....	51
III.2 – Les facteurs m <sup>6</sup> A-déméthylases .....	55
IV – Rôles biologiques de la méthylation m <sup>6</sup> A .....	59
IV.1 – Les rôles cellulaires .....	59
IV.2 – Les rôles physiologiques .....	61
IV.3 – Les rôles moléculaires.....	63
V – Les protéines de liaison à la méthylation m <sup>6</sup> A.....	64

V.1 – Les protéines à domaine YTH.....	65
V.1.1 – Structure des protéines à domaine YTH .....	65
V.1.2 – Rôle des protéines à domaine YTH chez les mammifères .....	68
V.1.3 – Rôle des protéines à domaine YTH en dehors des mammifères .....	73
V.2 – Les autres types de lecteurs sans domaine YTH .....	75
VI – Rôle de la méthylation m <sup>6</sup> A en situation de stress .....	76
VI.1 – Distribution modifiée et rôle dans la traduction .....	76
VI.2 – Régulation du lecteur YTHDF2 .....	77
VII – La N <sup>6</sup> -méthyladénosine chez la plante <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	77
VII.1 – Profil de distribution sur les ARNm.....	77
VII.2 – Les facteurs du complexe de méthylation .....	78
VII.3 – Les facteurs m <sup>6</sup> A déméthylases .....	81
VII.4 – Les potentiels lecteurs de méthylation.....	83
<b>RÉSULTATS PRÉALABLES ET OBJECTIFS.....</b>	<b>85</b>
I – Identification des partenaires protéiques de LARP1.....	87
II – Identification de protéines de liaison à la méthylation m <sup>6</sup> A.....	87
III – Objectifs.....	89
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>93</b>
<b>Chapitre I – Caractérisation d’ECT2 comme lecteur de méthylation et étude de son rôle dans le développement.....</b>	<b>94</b>
I – ARTICLE : The YTH domain protein AtYTHDF2A ( <i>/ECT2</i> ) from <i>Arabidopsis thaliana</i> is an m6A reader required for normal trichome branching.....	97
II- Résultats complémentaires : Existe-t-il une redondance fonctionnelle entre les protéines ECT ?..	99
II.1 – Comparaison des profils d’expression des transcrits.....	99
II.2 – Analyse des trichomes dans des mutants pour ECT4, ECT5 et ECT8 .....	101
<b>Chapitre II – Identification des partenaires protéiques d’ECT2.....</b>	<b>105</b>
I – Approche de protéomique quantitative .....	105
II – Comparaison avec les données des protéines à domaine YTH de mammifères.....	115
III – Validation de certaines interactions.....	117
<b>Chapitre III – Quel est le lien fonctionnel entre la protéine ECT2 et ses partenaires LARP1 et DCP5 dans le contrôle de la traduction ?.....</b>	<b>121</b>
I – Caractérisation des interactions entre ECT2, LARP1 et DCP5 .....	121
I.1 – Nature de l’interaction entre ECT2 et LARP1 .....	121
I.2 – Nature de l’interaction entre ECT2 et DCP5.....	122
II.3 – Nature de l’interaction entre LARP1 et DCP5 .....	125
II- Étude d’un lien développemental entre ECT2, LARP1 et DCP5 .....	125
II.1 – Analyse du phénotype des trichomes .....	125
II.2 – Comparaison développementale des mutants multiples .....	131

III – Impact moléculaire sur le translatome .....	132
III.1 – Stratégie de séquençage et qualité des données .....	133
III.2 – Identification des transcrits réprimés en traduction potentiellement cibles d’ECT2 .....	135
III.3 – Identification des transcrits traductionnellement réprimés et potentiellement co-régulés par ECT2, LARP1 et DCP5.....	139
III.4 – Identification des transcrits spécifiquement réprimés par LARP1 et DCP5 .....	141
<b>Chapitre IV – Fonction et régulation de la protéine ECT2 en situation de stress thermique ..</b>	<b>145</b>
I – Quel est le rôle d’ECT2 dans la réponse au stress thermique ? .....	145
I.1 – ECT2 ne semble pas requise pour la thermotolérance des plantes.....	147
I.2 – ECT2 ne semble pas impliquée dans la dégradation des ARNm en réponse au stress thermique .....	147
II – Influence du stress thermique sur l’interaction d’ECT2 avec les ARN méthylés.....	151
III – Modification chimique de la protéine ECT2 .....	152
III.1 – Le profil dynamique de la protéine ECT2 au cours d’un stress thermique .....	152
III.2 – Nature des modifications post-traductionnelles d’ECT2 .....	155
III.3 – Recherche des positions phosphorylées par spectrométrie de masse.....	157
IV – Comment la phosphorylation d’ECT2 est-elle régulée ?.....	161
IV.1 – Recherche de facteurs impliqués dans la phosphorylation d’ECT2.....	161
IV.2 – Conditions d’installation de la phosphorylation .....	165
V – Impact de la phosphorylation sur la localisation subcellulaire d’ECT2 .....	167
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>171</b>
I – ECT2, un lecteur de m <sup>6</sup> A impliqué dans la répression de la traduction des ARNm ?.....	172
I.1 – La protéine ECT2 est-elle un lecteur de méthylation m <sup>6</sup> A ? .....	172
I.2 – Les partenaires protéiques d’ECT2 sont majoritairement différents de ceux des protéines YTHDF de mammifères.....	173
I.3 – Le rôle d’ECT2 comme répresseur de traduction par une coopération avec LARP1 et DCP5 .....	174
I.4 – Perspectives .....	179
II – Quel est le rôle de la phosphorylation d’ECT2 ? .....	182
II.1 – Vers une inactivation des fonctions en situation de stress ?.....	183
II.1.1 – Régulation de la capacité d’ECT2 à lier les ARN méthylés .....	183
II.1.2 – La localisation dans les granules de stress et la régulation des complexes protéiques .....	185
II.2 – Perspectives et utilisation de versions phosphorésistantes d’ECT2 .....	187
II.3 – Quels sont les acteurs impliqués dans la phosphorylation d’ECT2 ? .....	191
III – Le rôle d’ECT2 dans le trichome : un indicateur d’un défaut de cycle cellulaire ?.....	192
II.1 – Lien entre la méthylation et le cycle cellulaire.....	193
II.2 – Le rôle d’ECT2 dans le développement du trichome et le lien avec LARP1 et DCP5 .....	195
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>199</b>
I – Matériels biologiques .....	201
I.1 – Souches bactériennes.....	201

I.2 – Lignées végétales d’ <i>Arabidopsis thaliana</i> et mutants d’insertion ADN-T .....	201
II – Méthodes relatives à la culture végétale .....	201
II.1 – Stérilisation de graines et culture <i>in vitro</i> .....	201
II.2 – Culture en terre .....	202
II.3 – Transformation de plantes par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	202
II.4 – Établissement de lignées transgéniques stables.....	203
III – Techniques courantes de biologie moléculaire.....	203
III.1 – Méthodes relatives à l’ADN.....	203
III.1.1 – Extraction d’ADN génomique végétal .....	203
III.1.2 – Amplification d’ADN par PCR .....	206
III.1.3 – Électrophorèse sur gel et purification d’ADN en agarose.....	206
III.1.4 – Séquençage .....	206
III.2 – Méthodes relatives au clonage .....	207
III.2.1 – Digestion d’ADN par enzyme de restriction.....	207
III.2.2 – Ligation d’ADN.....	209
III.2.3 - Réaction de recombinaison par système Gateway.....	209
III.2.4 – Transformation bactérienne et culture de sélection .....	209
III.2.5 – Vérification des colonies positives et culture « minipreps » .....	210
III.2.6 – Culture « midipreps » et purification d’ADN plasmidique .....	211
III.3 – Méthodes relatives à l’ARN .....	211
III.3.1 – Extraction d’ARN total et analyse sur gel d’électrophorèse .....	211
III.3.2 – Traitement DNase.....	212
III.3.3 – Transcription inverse en ADNc et PCR (RT-PCR) .....	212
III.4 – Méthodes relatives aux protéines.....	212
III.4.1 – Extraction de protéines totales en conditions dénaturantes .....	212
III.4.2 – Western Blot .....	213
III.4.3 – Anticorps .....	215
IV – Techniques de biochimie .....	215
IV.1 – Immunoprécipitation d’ARN en complexe avec une protéine étiquetée.....	215
IV.2 – Séparation des polysomes par gradient de sucrose .....	216
IV.2.1 – Préparation des gradients de sucrose .....	216
IV.2.2 – Séparation des polysomes et analyse des fractions .....	216
IV.3 – Immunoprécipitation de protéines étiquetées avec ou sans traitement RNase et analyse des ARN.....	217
IV.4 – Traitement phosphatase <i>in vitro</i> .....	218
V – Analyses omiques.....	219
V.1- Identification de partenaires protéiques par spectrométrie de masse.....	219
IV.1.1 – Stress et fixation des tissus par un crosslink au formaldéhyde .....	219
IV.1.2 – Expériences de co-immunoprécipitation pour la spectrométrie de masse.....	220
IV.1.3 – Analyse de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) .....	221

IV.1.4 – Traitement des données .....	221
V.2 – Analyse de transcriptomique .....	223
V.2.1 – Extraction des d’ARN et séquençage .....	225
V.2.2 – Traitement des données .....	225
VI – Techniques d’imagerie .....	226
VI.1 – Microscopie confocale .....	226
VI.2 – Observation de trichomes à la loupe binoculaire .....	226
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>229</b>



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

**4E-BP** : eIF4E-Binding Protein

**5'TOP** : 5'Terminal Oligopyrimidine

**ADN-T** : ADN de Transfert

**ALKBH** : Alkylation repair Homolog

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ARNr** : ARN ribosomique

**ARNt** : ARN de transfert

**ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>** : ARNt Initiateur pour la méthionine

**CIPK1** : Calcineurin B-Like Interacting Protein Kinase I

**Col0** : Colombia-0 (écotype de référence)

**DCP5** : Decapping Protein 5

**ECT** : Evolutionarily conserved C-Terminal region

**eIF** : eukaryotic Initiation Factor

**FTO** : Fat mass and Obesity-associated protein

**GFP** : Green Fluorescent Protein

**GO** : Gene Ontology

**KH** : hnRNP K Homology (domain)

**LaM** : Motif La

**LARP** : LA-Related Protein

**m<sup>1</sup>A** : N<sup>1</sup>-méthyladénosine

**m<sup>5</sup>C** : 5-méthylcytosine

**m<sup>6</sup>A** : N<sup>6</sup>-méthyladénosine

**m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>** : N<sup>6</sup>,2'-O-diméthyladénosine

**m<sup>7</sup>Gppp** : N<sup>7</sup>-méthylguanosine triphosphate

**METTL** : Methyltransferase like protein

**mRNP** : messenger Ribonucleoprotein particle

**mTORC1** : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

**PABP ou PAB** : Poly(A)-Binding Protein

**p-body** : processing body

**RBP** : RNA Binding Protein

**RIP** : RNA Immunoprecipitation

**rpk<sub>m</sub>** : read per kilobase per million mapped reads

**RRM** : RNA Recognition Domain

**TIA-1** : T-cell Intracellular Antigen 1

**TIAR** : TIA-1 Related

**UTR** : Untranslated Region

**WTAP** : Wilms' Tumor 1-Associated Protein

**YFP** : Yellow Fluorescent Protein

**YTH** : YT251-B Homology

**YTHDC** : YTH Domain Containing protein

**YTHDF** : YTH Domain Family protein

**XRN4** : 5'-3' exoribonuclease

# LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

---

## **Figures**

**Figure 1** : L'équilibre dynamique entre traduction, stockage et dégradation des ARNm dans le cytoplasme

**Figure 2** : Modèle de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes

**Figure 3** : Modèle des voies majeures de la dégradation cytoplasmique

**Figure 4** : Phénotypes associés à la mutation ou la réduction d'expression des acteurs du decapping chez *Arabidopsis thaliana*

**Figure 5** : Modèle de relocalisation cytoplasmique des ARNm au cours d'un stress

**Figure 6** : Phylogénie et structure primaire des sous-familles de protéines à motif La

**Figure 7** : Structure tridimensionnelle du module La de la protéine La et du motif DM15 de LARP1

**Figure 8** : Modèle d'action de la protéine LARP1 humaine sur le contrôle de la traduction des ARNm 5'TOP

**Figure 9** : La diversité des modifications post-transcriptionnelles des ARN messagers

**Figure 10** : Historique des découvertes sur la modification m6A des ARNm

**Figure 11** : Structure des complexes METTL3-METTL14 impliqués dans l'installation du m6A

**Figure 12** : Différence fonctionnelle et structurale des facteurs FTO et ALKBH5

**Figure 13** : Impacts physiologiques de la méthylation m6A des ARNm

**Figure 14** : Modalité d'interaction des protéines à domaine YTH avec les ARNm méthylés

**Figure 15** : Rôle des lecteurs de m6A dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm méthylés

**Figure 16** : Aperçu des phénotypes liés à la réduction du m6A des ARNm chez la plante *Arabidopsis thaliana*

**Figure 17** : Structure primaire des 13 protéines à domaine YTH chez *Arabidopsis thaliana*

**Figure 18** : Identification de protéines de liaison à la méthylation m6A des ARN

**Figure 19** : Profils d'expression des gènes codant les ECT à domaine YTH de type F chez *Arabidopsis thaliana*

**Figure 20** : Caractérisation des lignées mutantes d'insertion ADN-T pour ECT4, ECT5 et ECT8

**Figure 21** : Observation des trichomes dans les mutants *ect4*, *ect5* et *ect8*

**Figure 22** : Identification des partenaires protéiques d'ECT2 en condition normale et en situation de stress thermique

**Figure 23** : Interaction *in vivo* entre ECT2 et certains candidats par co-immunoprécipitation

**Figure 24** : Nature de l'interaction entre ECT2, LARP1 et les protéines PAB

**Figure 25** : Caractérisation de l'interaction entre ECT2 et DCP5 par co-immunoprécipitation

**Figure 26** : Observation des trichomes sur des plantes mutantes pour ECT2 et/ou LARP1

**Figure 27 :** Observation des trichomes dans des plantes mutantes impliquant ECT2 et/ou LARP1 et/ou DCP5

**Figure 28 :** Comparaison développementale de lignées mutantes multiples concernant ECT2, LARP1 et DCP5

**Figure 29 :** Fiabilité des réplicats des données de transcriptomique

**Figure 30 :** Identification des transcrits plus abondants dans les polysomes en l'absence d'ECT2

**Figure 31 :** Identification des transcrits co-régulés par ECT2, LARP1 et DCP5 et impact respectif sur leur accumulation

**Figure 32 :** Analyse GO des catégories de processus biologiques parmi les cibles définies pour LARP1 et/ou DCP5

**Figure 33 :** Les mutants *ect2* ne semblent pas avoir de défaut de thermotolérance

**Figure 34 :** Analyse des données transcriptomiques en condition de stress pour déterminer l'implication d'ECT2 dans le mécanisme de dégradation des ARNm

**Figure 35 :** L'interaction d'ECT2 avec des ARN méthylés est modifiée en situation de stress thermique

**Figure 36 :** ECT2 est dynamiquement modifiée en réponse à un stress thermique

**Figure 37 :** Les formes modifiées d'ECT2 sont le résultat d'évènements de phosphorylation

**Figure 38 :** Identification des résidus phosphorylés de la protéine ECT2

**Figure 39 :** Profil d'ECT2 en condition normale et après un stress thermique dans différentes lignées mutantes

**Figure 40 :** La phosphorylation d'ECT2 semble être influencée par la présence d'ARN méthylés et l'état général de la traduction

**Figure 41 :** La phosphorylation n'enclenche pas directement la formation des agrégats cytoplasmiques d'ECT2

**Figure 42 :** Modèles d'inhibition de traduction impliquant DCP5, LARP1 et DCP5 ou ECT2, LARP1 et DCP5

**Figure 43 :** Visualisation de la position de la tyrosine 461 dans le domaine YTH d'ECT2

**Figure 44 :** Modèle de la régulation d'ECT2 en situation de stress thermique

**Figure 45 :** Modèle du rôle d'ECT2, LARP1 et DCP5 dans le contrôle du cycle cellulaire

**Figure 46 :** Gels d'électrophorèse obtenus des expériences de co-immunoprécipitations pour l'identification des partenaires d'ECT2

**Figure 47 :** Présentation de la série d'analyses bio-informatiques pour l'approche de transcriptomique

## **Tableaux**

**Tableau 1** : Listes des principaux acteurs du complexe de m6A méthyltransférase et des déméthylases chez des espèces modèles eucaryotes

**Tableau 2** : Comparaison des partenaires protéiques d'ECT2 en condition normale et en situation de stress

**Tableau 3** : Classification des partenaires d'ECT2 suivant leur rôle moléculaire prédit ou décrit

**Tableau 4** : Comparaison des partenaires définis par protéomique pour YTHDF1, YTHDF3 et ECT2

**Tableau 5** : Variation de la quantité à l'équilibre des cibles connues de DCP5 dans notre analyse

**Tableau 6** : Listes des différentes modifications post-traductionnelles identifiées sur YFP-ECT2

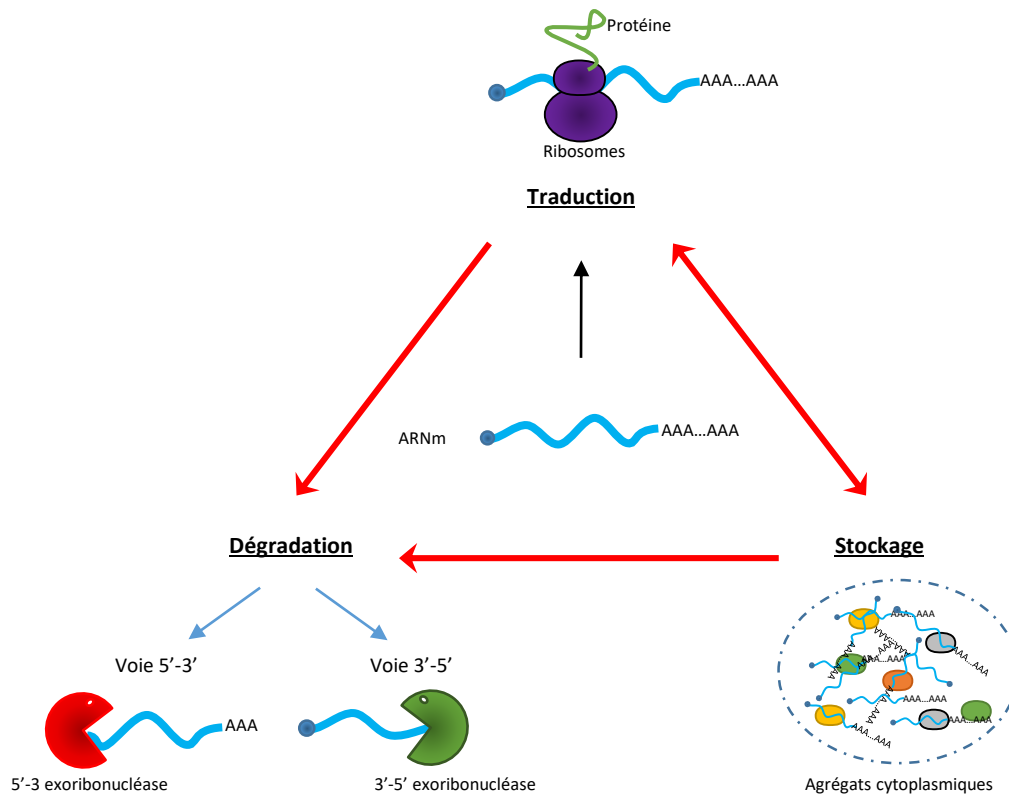
**Tableau 7** : Récapitulatif des lignées mutantes caractérisées et utilisées

**Tableau 8** : Récapitulatif des lignées transgéniques construites et utilisées

**Tableau 9** : Liste des amorces utilisées

**Tableau 10** : Liste des vecteurs plasmidiques construits

**Tableau 11** : Liste des anticorps utilisés



**Figure 1 : L'équilibre dynamique entre traduction, stockage et dégradation des ARNm dans le cytoplasme**

Une fois exporté dans le cytoplasme, l'ARNm mature peut d'abord entrer dans les processus de traduction, permettant la synthèse de protéines par l'action des ribosomes. Il peut également être stocké dans certains types de corpuscules cytoplasmiques dépourvus de membrane pour repartir en traduction dans un second temps. Finalement, après un certain temps spécifique à chaque transcrit, les ARNm sont adressés vers les mécanismes de dégradation impliquant deux voies principales. Un équilibre dynamique s'installe entre ces trois états (traduction, stockage et dégradation) permettant de réguler la quantité de protéines produites pour chaque ARNm.

## AVANT-PROPOS

---

L'expression des gènes chez les eucaryotes est un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs niveaux de régulation chacun agissant sur un type de molécule différent : l'ADN, l'ARN ou la protéine. Dans cette voie, les molécules d'ARN messagers (ARNm) occupent un rôle majeur faisant le lien entre l'ADN et la production de protéines, outils nécessaires pour les grandes fonctions biologiques comme le développement, la reproduction ou les réponses aux stress. Tout ARNm est issu du mécanisme de transcription orchestré par le complexe ARN polymérase II (ou Pol II). La molécule d'ARNm est d'abord présente dans une forme transitoire, le pré-ARNm, qui va subir plusieurs étapes de maturation co-transcriptionnelles et/ou post-transcriptionnelles incluant l'élimination des séquences introniques au cours de l'épissage et l'ajout de modifications canoniques comme la coiffe en extrémité 5' et la queue poly(A) en extrémité 3'. Une fois ces étapes achevées, les ARNm matures sont ensuite exportés vers le cytoplasme où ils rentrent en équilibre dynamique entre traduction, stockage et dégradation (Figure 1). En effet, les ARNm servent d'abord de matrice pour la synthèse de protéine au cours des cycles de traduction puis sont finalement engagés vers les voies de dégradation 5'-3' ou 3'-5' après un certain temps propre à chaque transcrit. Les ARNm peuvent également être stockés dans certains types de corpuscules sans membranes (regroupant également des protéines) pour réguler le flux de transcrits disponibles pour la traduction et la dégradation. Cet équilibre dynamique entre traduction, stockage et dégradation est principalement contrôlé par l'action de protéines de liaison à l'ARN ou RBP (RNA-Binding Protein) qui s'associent avec les ARNm pour former des structures mRNP (messenger Ribonucleoprotein particle) (Kishore et al., 2010). L'interaction des RBP sur les transcrits est permise par la présence de domaines de reconnaissance aux ARN dont les plus courants sont de type RRM (RNA Recognition Domain), KH (hnRNP K-Homology) ou à doigts de zinc (Cléry and Frédéric, 2012). La fixation des RBP est également influencée par des éléments *cis*-régulateurs présents sur les transcrits comme des motifs particuliers, des structures secondaires ou des modifications post-transcriptionnelles (Lee and Lykke-Andersen, 2013). Parmi ces modifications, une des plus abondantes consiste en l'ajout d'un groupement méthyl en position N<sup>6</sup> d'une adénosine interne donnant une N<sup>6</sup>-methyladénosine ou m<sup>6</sup>A.

En situation de stress, l'équilibre entre traduction et dégradation peut également être modifié faisant intervenir des mécanismes post-transcriptionnels de mise en place des voies de réponse spécifiques. La thématique de notre équipe vise à mieux comprendre ces mécanismes

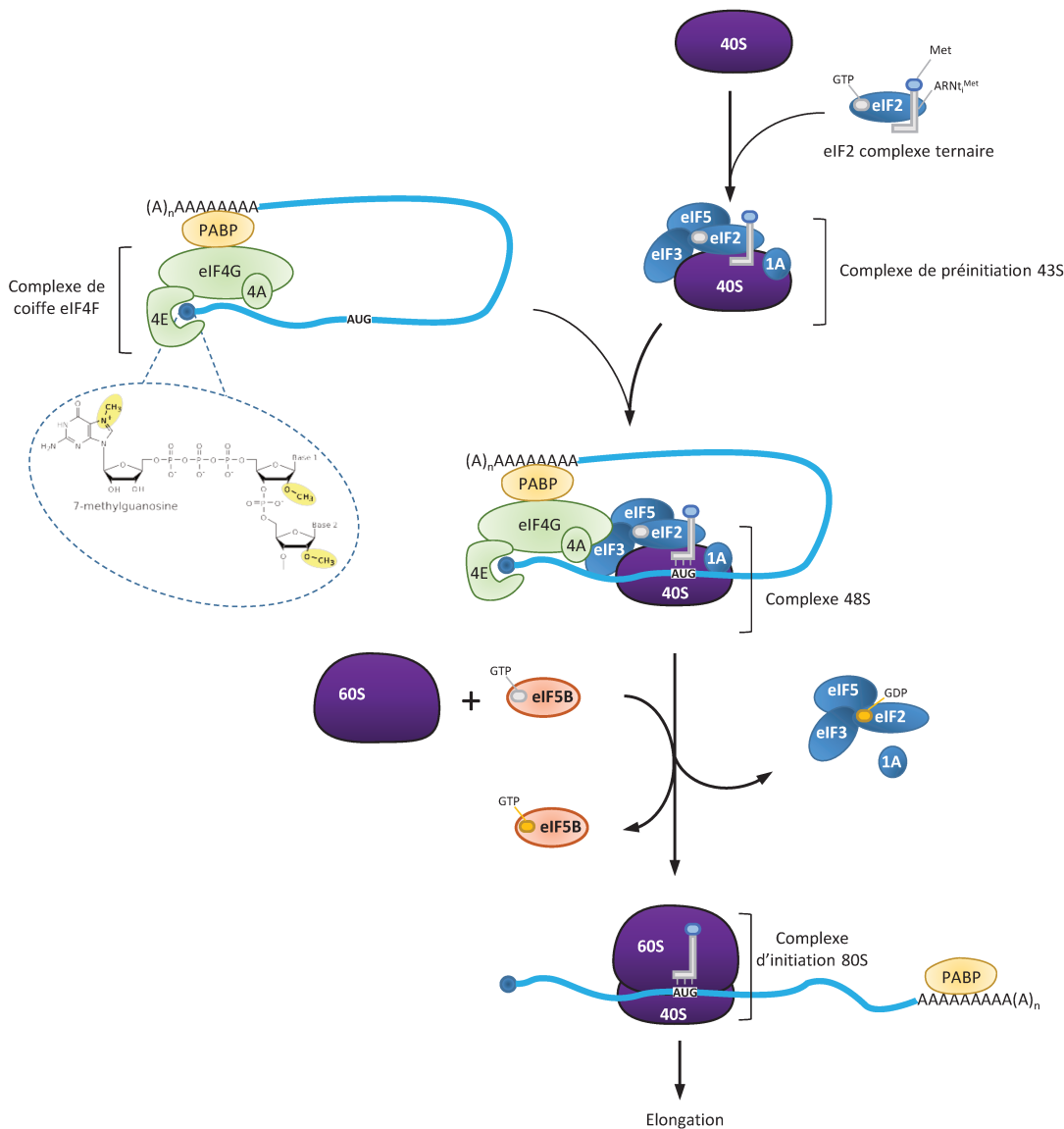
régulant le devenir des ARNm en situation de stress thermique chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Il a ainsi été montré l'implication du facteur LARP1 dans ce processus, une RBP évolutivement conservée agissant dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des transcrits. Dans les étapes précoces de la réponse au stress thermique, LARP1 interagit spécifiquement avec la machinerie de dégradation 5'-3' pour diriger un mécanisme massif de dégradation cytoplasmique agissant sur plus de 4 500 transcrits (Merret et al., 2013). Néanmoins, ce processus est loin d'être totalement compris puisqu'il suggère l'existence d'un moyen de sélection pour cibler les transcrits à dégrader. Afin de découvrir de nouveaux acteurs impliqués dans cette voie de dégradation déclenchée par le stress, les partenaires protéiques de LARP1 ont été identifiés par un système double hybride et ont notamment permis de définir une protéine à domaine YTH nommée ECT2 comme partenaire potentiel. Chez les mammifères, les protéines à domaine YTH sont qualifiées de lecteurs de méthylation puisqu'elles fixent directement avec les résidus m<sup>6</sup>A des transcrits. Une fois recrutées, ces protéines régulent de nombreuses étapes de la vie des ARNm méthylés comme l'épissage, la localisation, la stabilité ou la traduction ce qui va influencer des processus de développement, de différenciation cellulaire ou de réponse au stress (Zhao et al., 2016). Par ailleurs, il apparaît que l'installation de la méthylation sur les transcrits et les fonctions d'au moins une protéine à domaine YTH puissent être régulées en situation de stress (Zhou et al., 2015; Meyer et al., 2015), suggérant également l'importance de ces acteurs dans la mise en place des mécanismes de réponse au stress.

Les travaux développés au cours de cette thèse visent à étudier les fonctions de la protéine ECT2 en tant que lecteur de méthylation chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et notamment son rôle dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des ARNm méthylés en lien avec le facteur LARP1 mais aussi DCP5, une autre protéine importante dans la régulation de la traduction. Puisque la méthylation et les lecteurs semblent pouvoir répondre aux stress, l'implication et la régulation d'ECT2 ont également été étudiées en situation de stress thermique. Au cours de l'introduction, je présenterai dans un premier temps les mécanismes généraux de contrôle de la traduction et de la stabilité des transcrits et leur régulation en situation de stress. Dans un second temps, je m'attarderai sur l'action du facteur LARP1 dans ces processus de régulation. Finalement, je détaillerai les rôles moléculaires et physiologiques de la modification m<sup>6</sup>A des ARNm tout comme les fonctions des protéines à domaine YTH dans la régulation du devenir des ARNm méthylés.

# **INTRODUCTION**

---





## Figure 2 : Modèle de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes

Le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARN<sub>i</sub><sup>Met</sup> s'associe avec la sous-unité 40S et forme ensuite le complexe de pré-initiation 43S auquel s'ajoute d'autres facteurs comme eIF3 et eIF1A. En parallèle, les ARNm sont liés par le complexe de coiffe eIF4F composé de eIF4E, facteur de liaison du m<sup>7</sup>G, eIF4A, une hélicase ouvrant les structures secondaires de l'ARN et eIF4G contribuant à rapprocher les deux extrémités de l'ARNm par interaction avec la PABP. Cette conformation et l'activité hélicase de eIF4A stimulent l'assemblage du complexe 43S sur l'ARNm. Après une première lecture jusqu'au codon initiateur AUG *via* la reconnaissance par le Met-tRNA<sub>i</sub><sup>MET</sup>, le complexe 48S est formé et eIF5 stimule l'hydrolyse d'eIF2. La sous-unité 60S du ribosome est alors recrutée de façon eIF5B- et GTP-dépendante qui va aussi stimuler la dissociation des facteurs eIF1, eIF2, eIF3. Le complexe d'initiation 80S ainsi assemblé poursuit avec les étapes d'élongation. Inspiré de Jackson et al., 2010 et Klann & Dever, 2004.

# INTRODUCTION

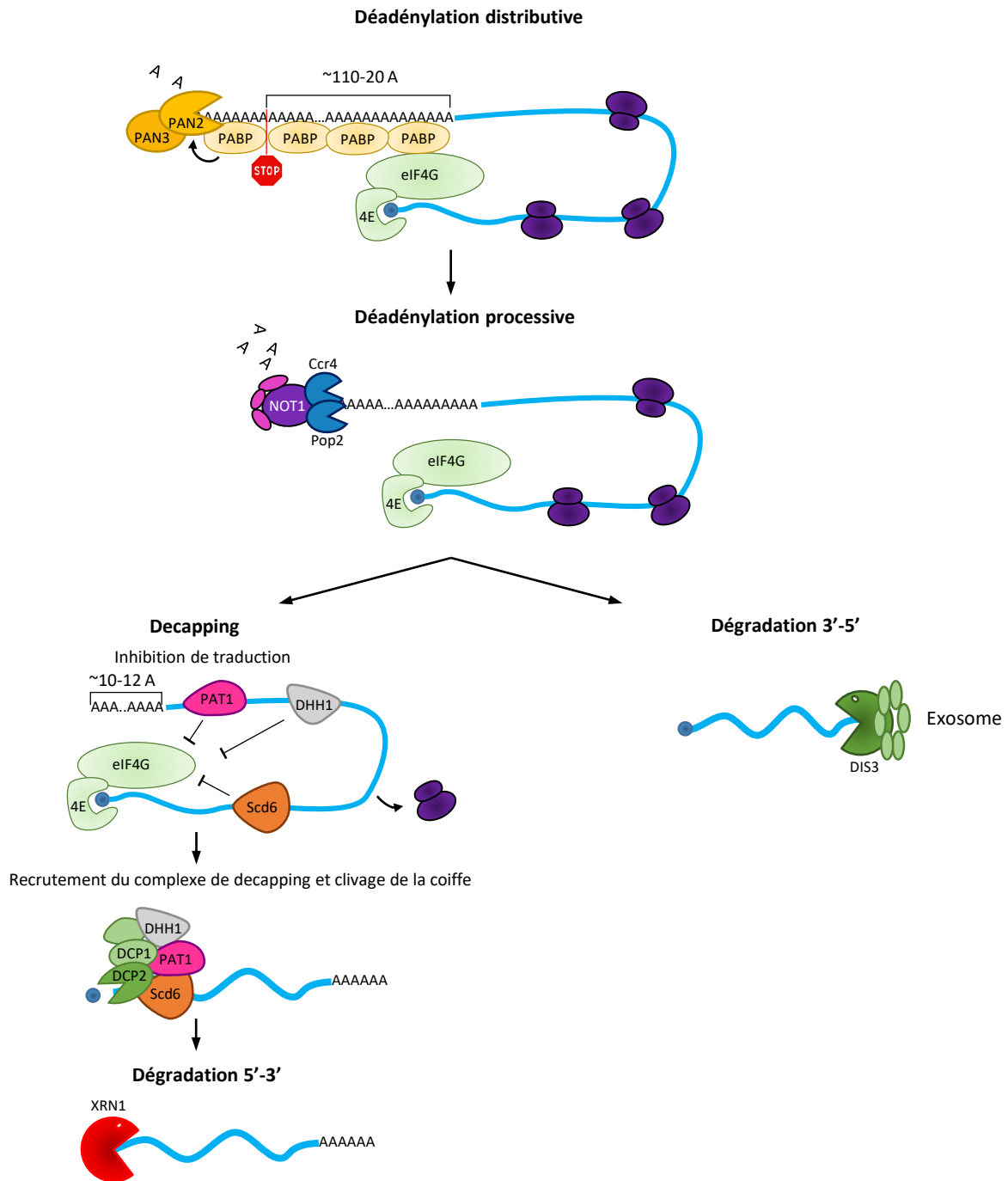
---

## PARTIE I – LES ARN MESSAGERS AU CŒUR D’UN ÉQUILIBRE ENTRE TRADUCTION ET DÉGRADATION

### I – LA VOIE D’INITIATION DE LA TRADUCTION DÉPENDANTE DE LA COIFFE

La fonction première d’un ARNm est de produire des protéines au travers du processus de traduction. Ce mécanisme est divisé en trois grandes étapes : l’initiation, l’élongation et la terminaison. Parmi ces étapes, la grande majorité des régulations s’opère au stade de l’initiation permettant un contrôle précoce de la synthèse de protéines.

Généralement, la traduction est initiée de façon dépendante de la présence d’une coiffe en extrémité 5’. Cette coiffe est composée d’une structure  $m^7Gppp$  (N<sup>7</sup>-méthylguanosine triphosphate) qui est connectée par un lien 5’-5’ au premier nucléotide de l’ARNm et dont les deux premiers résidus adjacents peuvent également être méthylés sur les riboses. Cette voie d’initiation dépendante de la coiffe fait intervenir au moins 13 facteurs eIF (eukaryotic Initiation Factors) d’initiation de traduction (Aitken and Lorsch, 2012; Jackson et al., 2010; Klann and Dever, 2004). La coiffe est liée par le facteur eIF4E qui interagit directement avec le résidu  $m^7G$  et va recruter le facteur eIF4G et l’hélicase eIF4A pour former le complexe de coiffe eIF4F (Figure 2). Dans ce complexe, eIF4G sert principalement de plateforme d’interaction pour les facteurs d’initiation et va également interagir avec la protéine PABP (Poly(A)-Binding protein) qui recouvre la queue poly(A) en extrémité 3’ des ARNm. L’interaction eIF4G-PABP rapproche alors les deux extrémités de l’ARNm qui adopte une conformation circularisée propice à l’assemblage du complexe de pré-initiation. Celui-ci est composé du complexe ternaire d’eIF2 (eIF2-GTP-Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>), de la sous-unité 40S du ribosome ainsi que d’autres facteurs d’initiation dont eIF5, eIF3 et eIF1A. Ce complexe de pré-initiation 43S ainsi formé est recruté sur l’ARNm par l’interaction entre eIF4G et eIF3. Une fois assemblé, le complexe 43S va faire une première lecture de la région 5’-UTR (Untranslated Region) dans le sens 5’-3’ en ouvrant les zones structurées grâce à l’activité hélicase d’eIF4A et eIF4B. Lorsque le codon initiateur AUG est reconnu par complémentarité avec l’ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>, le complexe 48S est formé où eIF2-GTP est hydrolysée par eIF5 pour stabiliser l’interaction de l’ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> sur le codon initiateur. Cette conformation stable stimule ensuite eIF5B qui va agir de façon GTP-dépendante pour recruter la sous-unité 60S du ribosome et libérer eIF2-



**Figure 3 : Modèle des voies majeures de la dégradation cytoplasmique**

La dégradation débute par un processus de déadénylation distributive opérée par PAN2-PAN3 dont l'activité est stimulée par la PABP jusqu'à réduire la queue poly(A) à une taille de 20 à 110 résidus adénosines selon les organismes. Le complexe Ccr4-Pop2-Not est ensuite recruté pour réduire de façon processive l'extrémité poly(A). Les ARNm déadénylés peuvent être dégradés dans le sens 3'-5' par l'action de l'exosome ou être entraînés vers le decapping. En effet, à partir d'une taille critique de 10 à 12 résidus, le processus de suppression de la coiffe peut être enclenché. Il se déroule par une première étape d'inhibition de traduction puis un recrutement du complexe de decapping et enfin un clivage de la coiffe. Les ARNm sans coiffe sont ensuite dégradés par l'exoribonucléase 5'-3' XRN1. Adapté de Parker, 2012.

GDP et les autres facteurs (eIF1A, eIF3, eIF5, eIF4F) du complexe de pré-initiation. L'initiation de traduction est ainsi finalisée par l'assemblage des sous-unités du ribosome formant le complexe d'initiation 80S qui va pouvoir poursuivre sa lecture pour les étapes d'élongation.

Bien qu'il s'agisse de la voie majoritaire d'initiation, il existe néanmoins d'autres mécanismes d'initiation plus rares ne nécessitant pas la présence d'une coiffe en 5'. Brièvement, parmi ceux-ci le plus connu est une voie faisant intervenir des éléments IRES (Internal Ribosome Entry Site). Les IRES ont été identifiés à l'origine dans les ARN de virus et se présentent comme des éléments structurés généralement situés en 5'UTR capables de recruter le complexe de pré-initiation en aval de la coiffe (pour revue Stoneley & Willis, 2004). Ce mécanisme d'initiation est ainsi très courant pour les ARN viraux qui peuvent contourner la voie canonique de la traduction dépendante de la coiffe. Les éléments IRES des ARNm eucaryotes sont largement moins structurés que leurs équivalents viraux mais semblent également impliqués pour la traduction de certains facteurs clés en condition de stress (Spriggs et al., 2010). Cette voie d'initiation est proposée comme une voie de secours dans des conditions de stress où l'activité du complexe eIF4F est compromise. Néanmoins, les mécanismes sont loin d'être entièrement compris. Plus récemment, la modification N<sup>6</sup>-méthyladénosine des ARNm est apparue comme un autre moyen de recruter la machinerie d'initiation sans dépendre de la présence d'une coiffe. Notamment en stress thermique, il a été montré qu'un seul résidu m<sup>6</sup>A en région 5'UTR est suffisant pour induire un mécanisme de traduction coiffe-indépendante pour faciliter la production de facteurs de réponse au stress (Zhou et al., 2015; Meyer et al., 2015).

## **II – MÉCANISMES GÉNÉRAUX DES VOIES PRINCIPALES DE DÉGRADATION**

### **CYTOPLASMIQUE**

Dans le cytoplasme, en dehors d'être engagé dans le processus de traduction, les ARNm subissent un processus de dégradation qui peut être enclenché par plusieurs mécanismes. La voie dite de « turnover » générale est majoritairement initiée par les mécanismes de déadénylation qui vont dégrader l'extrémité poly(A) en 3' des transcrits. Une fois déadénylés, les ARNm peuvent être dégradés par deux voies principales : (1) la voie 3'-5' *via* le recrutement de l'exosome, un large complexe composé d'une dizaine de facteurs formant une structure en anneau et de l'exoribonucléase 3'-5' Dis3 ; (2) la voie 5'-3' où lorsque l'extrémité poly(A) atteint une taille critique de 10 à 12 résidus, l'ARNm peut être ciblé par le complexe de suppression de coiffe ou decapping afin d'enclencher une dégradation par une exoribonucléase 5'-3' (Figure 3). Ces

mécanismes de dégradation ont été principalement caractérisés chez la levure ou en cellules somatiques de mammifères (Parker, 2012). Dans cette introduction, je me concentrerai uniquement sur la voie de dégradation 5'-3' initiée par la déadénylation. Cependant, bien qu'ils ne seront pas détaillés, il existe d'autres éléments pouvant initier les processus de dégradation comme par exemple les voies de contrôle qualité de la traduction des ARNm. Ces dernières incluent le NMD (Non-sens mediated decay), le NSD (Non-stop mediated decay) et le NGD (Non-go mediated decay) qui sont capables de déclencher la dégradation de transcrits aberrants lorsque respectivement un codon stop prématuré est détecté, un codon stop n'est pas détecté ou que l'élongation des ribosomes est bloquée (Shoemaker and Green, 2012). Dans chacun des cas, ces voies de contrôle de la traduction permettent de dégrader des transcrits aberrants pour empêcher la synthèse de protéines non fonctionnelles.

## **II.1 – La demi-vie des ARN messagers**

Dans la cellule, chaque ARNm possède une demi-vie spécifique allant de quelques minutes à plusieurs heures qui définit son temps d'action. Les demi-vies apparaissent très distinctes suivant les organismes et sont également très hétérogènes pour les transcrits au sein d'un même organisme. Par exemple, la demi-vie moyenne estimée des transcrits atteint environ 7 h en cellules de mammifères (Sharova et al., 2009), environ 6 h en cellules végétales (Narsai et al., 2007) et seulement 30 minutes chez la levure (Sharova et al., 2009). Chez la plante, la demi-vie estimée peut varier entre 12 min et plus de 24 h suivant le transcrit (Narsai et al., 2007). Ces études ont néanmoins été faites à partir d'un inhibiteur chimique de transcription qui pourrait perturber la stabilité des transcrits. Généralement, les transcrits présentant un temps de vie limité sont associés à des fonctions régulatrices alors que les plus stables remplissent des fonctions constitutives liées au métabolisme ou à la structure cellulaire.

## **II.2 – Le mécanisme de déadénylation**

La déadénylation est l'étape limitante dans laquelle l'extrémité poly(A) est raccourcie par des enzymes déadénylases et se déroule en deux phases distinctes impliquant des complexes différents (Parker, 2012; Yan, 2014). La première est dite distributive puisqu'elle agit de façon lente et non sélective et implique l'action du complexe PAN2-PAN3. Ce complexe dont PAN2 porte l'activité catalytique va être recruté et stimulé par la PABP en liaison sur l'extrémité poly(A) pour diminuer la queue poly(A) jusqu'à une taille modérée et différente suivant les organismes. Chez la levure par exemple, où l'extrémité poly(A) des ARNm est en moyenne de 70 résidus, le complexe

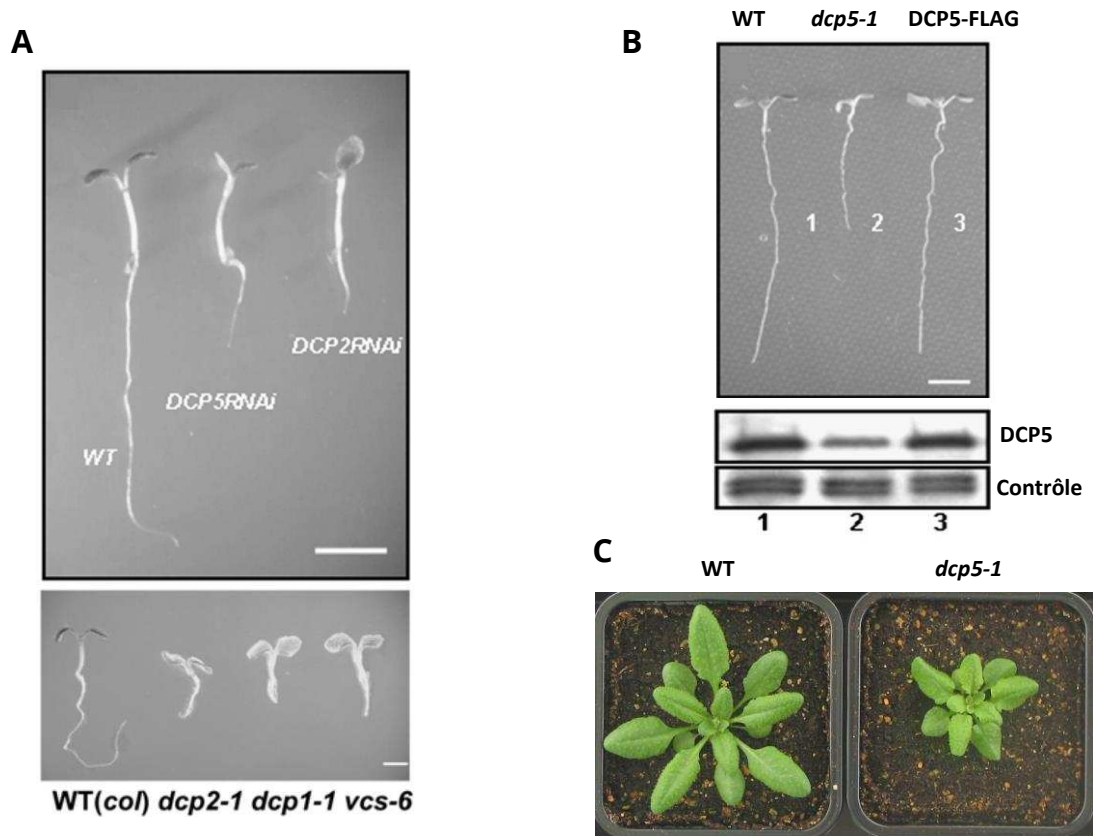
PAN2-PAN3 agit jusqu'à réduire la queue poly(A) à une taille de 20 à 25 résidus (Wolf and Passmore, 2014). En cellules humaines où les extrémités poly(A) des ARNm atteignent jusqu'à 250 résidus, le complexe PAN2-PAN3 réduit l'extrémité poly(A) jusqu'à environ 110 résidus (Yamashita et al., 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, la majorité des acteurs de la voie de dégradation (détaillés ensuite) est conservée hormis PAN2/PAN3 dont les orthologues n'ont pas été identifiés. La voie de déadénylation distributive est donc très peu documentée chez la plante.

Au cours de la déadénylation distributive, la réduction de l'extrémité 3' diminue la quantité de protéines PABP en liaison avec l'ARNm ce qui permet de stimuler la deuxième phase de déadénylation. Cette seconde phase est dite processive et implique le complexe majeur de déadénylation Ccr4/Pop2/Not. Ce complexe multimérique est composé d'une dizaine de facteurs dont l'activité déadénylase est assurée par Ccr4 et Pop2 (aussi connu sous le nom de Caf1). L'activité de Ccr4 est inhibée par la PABP (Tucker et al., 2002) ce qui supporte l'idée que le retrait des PABP sur l'extrémité poly(A) est nécessaire pour stimuler l'activité du complexe Ccr4/Pop2/Not et dégrader les derniers résidus A. Ce complexe est stabilisé par le facteur Not1 qui agit comme plateforme d'interaction avec les déadénylases et d'autres membres du complexe incluant des protéines Not et les facteurs Caf40 et Caf130. Contrairement au complexe PAN2/PAN3, les sous-unités clés du complexe CCR4/CAF1/NOT sont présentes chez *Arabidopsis thaliana* et agissent dans des fonctions similaires aux orthologues de levure et des mammifères (Liang et al., 2009).

## **II.2 – L'inhibition de traduction, le decapping et la dégradation 5'-3'**

La voie de dégradation 5'-3' agissant sur les ARNm déadénylés requiert une étape préalable où la coiffe doit être clivée pour permettre à l'exoribonucléase 5'-3' Xrn1 (XRN4 chez *Arabidopsis thaliana*) d'agir sur l'extrémité 5'-monophosphate. Le processus de decapping peut être divisé en trois phases qui sont : (1) l'inhibition de traduction par des facteurs répresseurs (Pat1, Scd6, Dhh1), (2) le recrutement du complexe de decapping composé de l'holoenzyme Dcp1/Dcp2 et de facteurs activateurs (complexe Lsm1-7, Edc3, Edc4/Hedls) stimulant l'activité de l'holoenzyme et (3) le clivage de la coiffe par Dcp2 libérant un résidu m<sup>7</sup>GDP qui sera ciblé par Xrn1 (Nissan et al., 2010).

Parmi les facteurs du complexe de decapping inhibant la traduction, Scd6 est l'une des protéines dont le mécanisme d'action est le mieux documenté. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré que Scd6p inhibe la traduction à l'étape d'initiation en bloquant l'assemblage du complexe de pré-initiation. Ce rôle répresseur est dépendant de la présence de



**Figure 4 : Phénotypes associés à la mutation ou la réduction d'expression des acteurs du decapping chez *Arabidopsis thaliana***

**(A)** Comparaison développementale de plantules de 6 jours sauvages (WT : Col0) ou mutée par RNAi pour DCP5 ou DCP2 (panneau supérieur, barre d'échelle 0,5 cm) ou mutée par insertion d'ADN-T dans les gènes de DCP2, DCP1 ou VCS (panneau inférieur, barre d'échelle 1 mm). Chacune des mutations réprime totalement l'expression des facteurs concernés et provoque un arrêt développemental au stade figuré. Extrait de Xu et al 2006 et Xu & Chua 2009. **(B)** Comparaison développementale de plantules de 10 jours sauvages (WT), de la lignée hypomorphe *dcp5-1* et d'une lignée *dcp5-1* complétée d'un transgène DCP5-FLAG (panneau supérieur, barre d'échelle 1,5 cm). Le panneau inférieur présente une analyse par western blot de la quantité de DCP5 dans chacune des plantes à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre DCP5 en comparaison d'une protéine contrôle (non spécifiée). Extrait de Xu & Chua 2009. **(C)** Comparaison développementale à 4 semaines de plantes sauvages (WT) ou hypomorphe pour DCP5 (*dcp5-1*) après 4 semaines (image personnelle).

certain motifs RGG dans sa séquence protéique qui sont des répétitions arginine-glycine-glycine (Nissan et al., 2010). Ces motifs permettent à Scd6p d'interagir de façon directe avec le facteur eIF4G pour inhiber l'étape d'initiation et former une structure mRNP traductionnellement inactive (Rajyaguru et al., 2012). Par ailleurs, l'action répressive de Scd6p peut être influencée par des modifications post-traductionnelles. En effet, par ajout de méthylation sur les arginines des motifs RGG, l'affinité de Scd6p pour eIF4G est augmentée et renforce son rôle répresseur (Poornima et al., 2016). La méthylation des motifs RGG a ainsi été proposée comme moyen de contrôle sur l'action de Scd6p. Le facteur Scd6 fait partie de la famille des protéines RAP55 qui agissent de façon évolutivement conservée comme répresseur de traduction (Marnef et al., 2009). Il a ainsi été démontré que les membres orthologues de RAP55 sont capables de réprimer la traduction chez la drosophile (Tral, Wilhelm et al., 2005), l'homme (RAP55, Yang et al., 2006) ou encore le xénope (xRAP55, Tanaka et al., 2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'orthologue de Scd6 connu sous le nom de DCP5 (Decapping Protein 5) est un répresseur de traduction qui est requis pour le decapping et interagit avec DCP1 au moins dans le développement post-embryonnaire (Xu & Chua, 2009, 2012). La délétion de DCP5 par RNAi conduit à un phénotype léthal dans un stade post-embryonnaire (6 jours) où les plantes cessent de se développer après l'émergence des cotylédons (Figure 4-A). De même, les mutations des autres acteurs du decapping : DCP1, DCP2 et VCS (orthologue chez la plante d'EDC4/Hedls), conduisent à un même phénotype léthal dès 6 jours, supportant le rôle essentiel du decapping dans le développement post-embryonnaire de la plante. Pour étudier le rôle de DCP5, une lignée hypomorphe a été construite à partir d'une insertion d'ADN-T dans le gène DCP5 réduisant par 5 la quantité de la protéine (Figure 4-B). Ces plantes se développent au-delà du développement embryonnaire mais présentent des défauts morphologiques et une croissance réduite (Figure 4-B et C). À partir de cette lignée hypomorphe, des travaux ont montré que DCP5 inhibe plus particulièrement la traduction de transcrits codant des facteurs de stockage des lipides au cours du développement post-embryonnaire (Xu & Chua, 2009). Bien que DCP5 soit un répresseur de traduction, son mécanisme d'action n'est pas connu. Cependant, la présence de motifs RGG dans la séquence DCP5 (données non publiées) suggère un mode d'action évolutivement conservé sur le complexe de coiffe.

La protéine DHH1 est un autre acteur conservé agissant comme répresseur de traduction. DHH1 est une hélicase possédant des motifs DEAD lui permettant de lier et d'hydrolyser l'ATP ainsi que d'interagir avec les ARNm (Presnyak and Coller, 2013). Par des analyses *in vitro*, il a été montré que Dhh1p de levure inhibe la traduction de façon ATP-dépendante en bloquant la formation du complexe 48S de pré-initiation (Coller and Parker, 2005). Néanmoins, son rôle



apparaît différent de Scd6 puisqu'elle n'agit pas sur le complexe de coiffe. En effet, Dhh1p et son orthologue humain (RCK/p54) répriment la traduction d'ARN viraux contenant des IRES, c'est-à-dire ne nécessitant pas le complexe de coiffe pour l'initiation de traduction (Coller and Parker, 2005). De même, dans un contexte où la fonction d'eIF4E ou d'eIF3 est compromise, Dhh1p agit toujours comme répresseur de traduction supportant une action dans une étape post-initiation (Sweet et al., 2012). L'adressage de Dhh1p sur un ARNm rapporteur provoque une saturation des ribosomes sur ce dernier tout en diminuant la quantité de protéine qu'il produit. Par cette observation, Dhh1p a été caractérisée comme un répresseur de traduction induisant un ralentissement de la vitesse d'élongation des ribosomes. Bien que son mécanisme inhibiteur ne soit pas encore entièrement compris, il a été montré que Dhh1p interagit physiquement avec certaines protéines ribosomales supportant une action sur les ribosomes (Radhakrishnan et al., 2016). Ces derniers travaux ont également démontré que Dhh1p est préférentiellement associée aux ARNm contenant des codons non-optimaux où la vitesse d'élongation des ribosomes y est ralentie. Plus précisément, le concept d'optimalité des codons est défini selon l'abondance de chacun des ARNt correspondant et leur capacité à être utilisé par le ribosome pour la traduction. Ainsi, un codon « optimal » possède un ARNt correspondant abondant et sera plus facilement traduit à l'inverse d'un codon « non-optimal » correspondant à un ARNt pauvre. Chez la levure, il a été montré que les ARNm les plus stables sont enrichis en codons optimaux à l'inverse des transcrits les plus instables qui présentent un enrichissement en codons non-optimaux (Presnyak et al., 2015). En fonction des codons, la vitesse d'élongation des ribosomes sur les transcrits est différente puisque la faible disponibilité de certains ARNt correspondant aux codons non-optimaux ralentie la lecture des ribosomes. Il a ainsi été démontré que ce ralentissement des ribosomes est favorable au recrutement de Dhh1p qui facilite la dégradation de ces transcrits (Radhakrishnan et al., 2016). Dhh1p est requise pour la dégradation de ces transcrits en stimulant probablement leur decapping puisqu'elle interagit avec Dcp2 et qu'elle est nécessaire à l'activité du complexe d'excision de coiffe (Nissan et al., 2010). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe trois homologues de DHH1 : DHH1 (At2g45810), DHH2 (At4g00660) et DHH3 (At3g61240) (nos données non publiées) possédant des domaines DEAD mais leurs fonctions restent inconnues.

Bien que Scd6p et Dhh1p soient requises pour le decapping, elles ne stimulent pas directement l'activité de l'holoenzyme Dcp1/Dcp2 (Nissan et al., 2010). Ainsi, d'autres facteurs remplissent ce rôle comme Pat1, le complexe Lsm1-7, Edc1-3 ou encore Edc4/Hedls qui stimulent l'activité de Dcp2. Au niveau structurel, chez la levure, la liaison de la protéine Edc3 sur Dcp2 allonge une structure en hélice de Dcp2 pour former une surface positive plus étendue et favoriser

probablement l'affinité aux ARNm et donc l'activité de decapping (Charenton et al., 2016). Edc4/Hedls qui est spécifique des métazoaires facilite l'interaction entre Dcp1 et Dcp2 en cellules humaines, ce qui est nécessaire à l'activité de decapping (Fenger-Grøn et al., 2005). Finalement, le clivage de la coiffe est coordonné avec l'action de l'exoribonucléase XRN1 puisque chez l'homme et la mouche, XRN1 interagit directement avec DCP1 et également avec EDC4 dans une plus faible affinité (Braun et al., 2012). L'interaction XRN1-DCP1 est d'ailleurs nécessaire à l'activité de decapping supportant un lien étroit entre la suppression de la coiffe et les étapes suivantes de dégradation 5'-3'. Curieusement, alors que la mutation de Xrn1p chez la levure ralentit la dégradation d'un nombre conséquent de transcrits, chez *Arabidopsis thaliana* la mutation de son orthologue fonctionnel XRN4 (Kastenmayer and Green, 2000) ne semble affecter la stabilité que d'un certain nombre de transcrits (Souret et al., 2004). Néanmoins, ces travaux ont étudié l'impact d'XRN4 sur l'accumulation des ARN polyadénylés or dans le modèle d'action de la dégradation 5'-3', les orthologues d'XRN4 agissent majoritairement sur les ARN déadénylés ce qui implique que la majorité des cibles n'a pas pu être identifiée. En situation de stress il apparaît cependant que XRN4 est cette fois requise pour la dégradation cytoplasmique de plus de 4 500 de transcrits polyadénylés dans un phénomène nommé « Heat stress mediated decay » (HMSD) (Merret et al., 2013).

Plus généralement, il a longtemps été pensé que le mécanisme de traduction est antagoniste à la dégradation et que les ribosomes doivent être dissociés des transcrits pour qu'ils puissent être dégradés. Néanmoins, plus récemment, l'existence d'un mécanisme de dégradation co-traductionnelle, s'opérant sur les ARNm en cours d'élongation dans les polysomes, a été démontrée de façon évolutivement conservée chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Hu et al., 2009) et *Schizosaccharomyces pombe* (Pelechano et al., 2015), chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Tat et al., 2016) ainsi que chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Hou et al., 2016; Merret et al., 2015; Yu et al., 2016). Ce mécanisme est étroitement lié à l'élongation des ribosomes puisque les transcrits dégradés de façon co-traductionnelle sont majoritairement ceux provoquant un ralentissement des ribosomes. Chez la plante par exemple, un stress thermique conduit à une pause des ribosomes en cours d'élongation provoquée par une accumulation de peptides naissants hydrophobes et mal repliés (Merret et al., 2015). C'est précisément sur ces transcrits en arrêt d'élongation que l'exoribonucléase XRN4 exerce son rôle de dégradation pour potentiellement empêcher une synthèse supplémentaire de protéines aberrantes. Ainsi, ce processus est perçu comme une voie permettant d'éliminer les transcrits avec une vitesse d'élongation compromise et donc pouvant donner des protéines aberrantes. Dans chacun des cas,

la dégradation s'opère dans la voie 5'-3' ce qui implique une étape initiale de suppression de la coiffe. Dans ce sens, ce mécanisme permet une dégradation des transcrits sans perturber la lecture du dernier ribosome en cours d'élongation puisque les deux se font dans le sens 5'-3'.

### **III – RÉGULATION DE LA TRADUCTION ET DE LA STABILITÉ DES ARN MESSAGERS EN SITUATION DE STRESS**

Les organismes vivants développent de nombreux mécanismes physiologiques et moléculaires pour s'acclimater aux conditions environnementales en constante évolution. Au niveau cellulaire, les effets majeurs d'un stress se caractérisent par une reprogrammation cellulaire globale entraînant notamment : l'activation transcriptionnelle des gènes de réponse au stress, l'inhibition massive de la traduction et des modifications globales de la stabilité des ARNm. Ainsi, lors de l'exposition à un stress, les mécanismes de traduction et du contrôle de la stabilité des transcrits sont au cœur de nombreuses régulations.

#### **III.1 – Régulation des facteurs d'initiation de traduction**

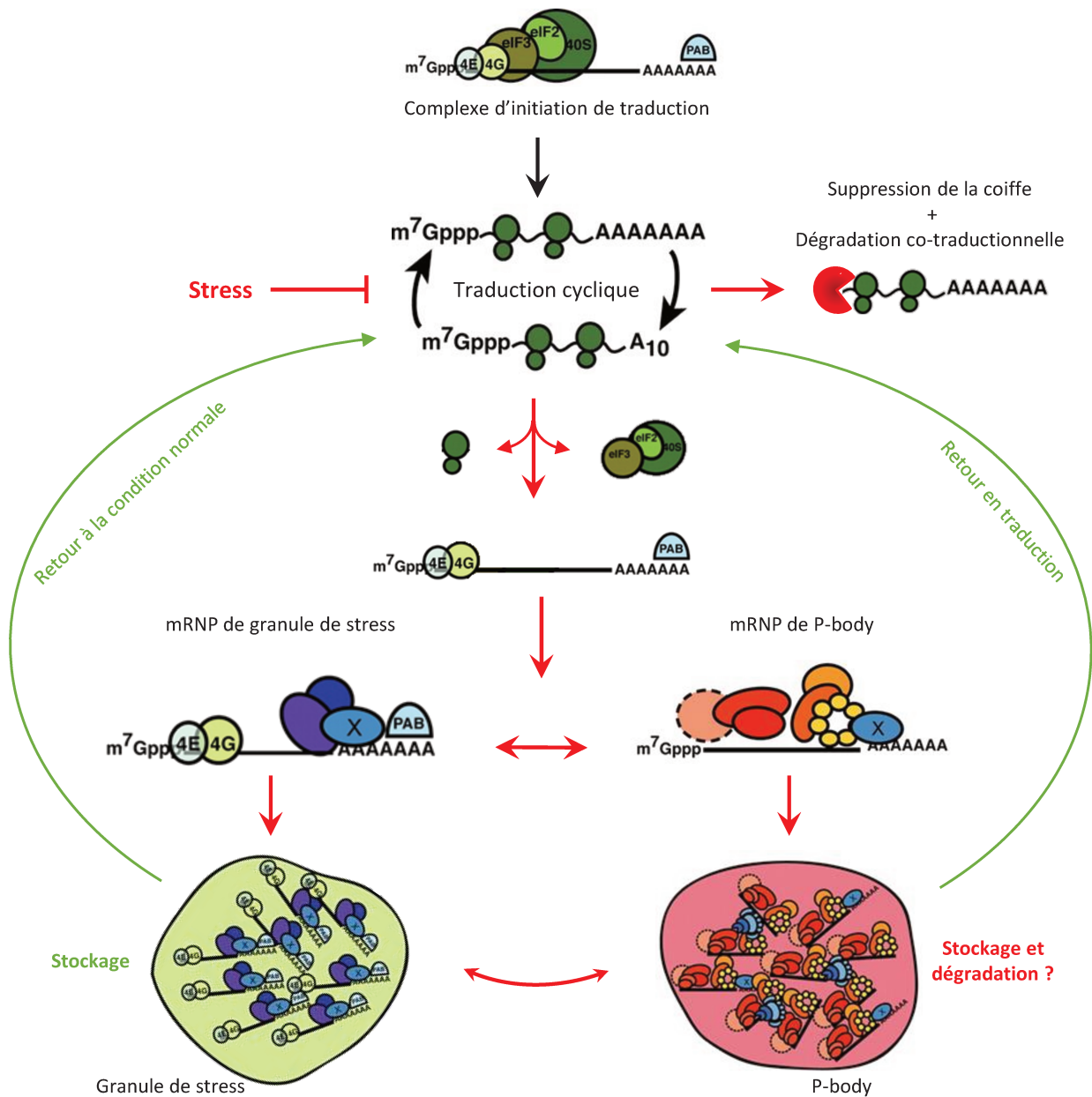
Pour faire face à un stress, la traduction des ARNm est tout d'abord majoritairement inhibée permettant une régulation immédiate et précise du niveau de protéine produite. En ce sens, l'activité de nombreux facteurs d'initiation de traduction est revue à la baisse. Les exemples les plus connus concernent notamment eIF2 et le complexe de coiffe eIF4F qui sont régulés de façon post-traductionnelle par des événements de phosphorylation. Le facteur eIF2, qui fait partie du complexe de pré-initiation en association avec la sous-unité 40S, est composé de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Ce facteur est phosphorylé chez les animaux par 4 kinases différentes (HRI, PKR, PERK et GCN2) agissant chacune dans des conditions de stress spécifiques mais toutes ciblent la sérine 251 de la sous-unité  $\alpha$  supportant un mécanisme de régulation unique (Holcik and Sonenberg, 2005). La forme phosphorylée d'eIF2 inhibe l'activité d'eIF2B qui est chargée de recycler les eIF2-GDP en eIF2-GTP, nécessaires à la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt<sup>Met</sup>. En diminuant la quantité de complexe ternaire disponible, la phosphorylation d'eIF2 participe à la répression globale de la traduction. Chez la plante, seul l'orthologue de GCN2 a été reporté comme une kinase d'eIF2 qui est active en réponse à de nombreux stress abiotiques comme les rayons UV, les carences nutritives, le stress oxydatif ou encore des stress biotiques (Lageix et al., 2008). L'activité d'AtGCN2 est notamment nécessaire à la croissance de la plante en situation de stress soutenant le rôle essentiel de la régulation d'eIF2.

D'autre part, le complexe de coiffe est également régulé par des événements de phosphorylation mais de façon indirecte par l'action des protéines de liaison à eIF4E, les 4E-BP (eIF4E-Binding protein). Au nombre de 3 homologues chez les mammifères, les 4E-BP sont majoritairement phosphorylées en condition normale par un complexe kinase majeur nommé mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) (Batoool et al., 2017). Dans leurs versions phosphorylées, les 4E-BP sont considérées inactives puisqu'elles n'interagissent pas avec eIF4E qui peut stimuler librement l'initiation de traduction en fixant la coiffe. Cependant, en réponse à certains stress (hypoxie ou carence en glucose par exemple), l'activité du complexe mTORC1 est inhibée et les 4E-BP non phosphorylées agissent en compétition avec eIF4G pour lier eIF4E. Une fois liées sur eIF4E, les 4E-BP empêchent le recrutement du complexe de pré-initiation et par conséquent diminuent la synthèse de protéine. Bien que le complexe TOR soit conservé chez la plante *Arabidopsis thaliana*, on ne connaît pas à ce jour d'orthologue de 4E-BP et l'existence d'une voie de répression agissant directement sur eIF4E reste une question ouverte (Sesma et al., 2017).

### **III.2 – Rôles des p-bodies et des granules de stress**

La répression de traduction en situation de stress provoque en conséquence un désengagement massif des ARNm des polysomes. Bien que certains ARNm soient dégradés de façon co-traductionnelle en réponse au stress (Merret et al., 2015), de nombreux autres transcrits traductionnellement réprimés se retrouvent dans le cytosol. Ces populations ont alors tendance à s'agréger dans certains types d'agrégats cytoplasmiques dépourvus de membranes dont les processing bodies (p-bodies) et les granules de stress (Figure 5). Ainsi, le nombre et la taille de ces agrégats augmentent en conséquence dans des conditions où l'initiation de traduction est inhibée.

Les p-bodies sont des structures regroupant des facteurs généraux du mécanisme de suppression de la coiffe, des répresseurs de traduction ainsi que des facteurs de déadénylation et de dégradation 5'-3' (Parker and Sheth, 2007). Contrairement aux granules de stress qui apparaissent spécifiquement en situation de stress, les p-bodies sont déjà détectables en situation normale mais en nombre limité par rapport à une condition de stress (Kedersha et al., 2005). Puisqu'ils regroupent la machinerie de dégradation et que la perte de fonction des acteurs du decapping augmente la taille des p-bodies, certains modèles proposent les p-bodies comme des sites actifs de dégradation cytoplasmique (Decker and Parker, 2012). Néanmoins, ce modèle est aujourd'hui encore débattu. En effet, compromettre la formation des p-bodies n'inhibe pas les mécanismes de dégradation supposant d'autres sites actifs (Eulalio et al., 2007). De plus, des évidences ont également montré que des ARNm traductionnellement réprimés dans les p-bodies



**Figure 5 : Modèle de relocalisation cytoplasmique des ARNm au cours d'un stress**

Alors qu'en condition normale, la traduction est achevée par cycle successif, une situation de stress inhibe majoritairement l'initiation de traduction et les ARNm sont désengagés des polysomes. Des données démontrent également qu'une partie des ARNm est dégradée de façon co-traductionnelle au moins en réponse au stress thermique chez la plante (Merret et al 2015). Ces ARNm peuvent alors être liés par des mRNP de type granule de stress ou processing body (P-body) pour s'agréger dans des ces deux types d'agrégats cytoplasmiques. Les granules de stress regroupent majoritairement des facteurs d'initiation de traduction et sont proposés comme lieux de stockage alors que les p-bodies accumulent les facteurs du decapping et de la dégradation 5'-3'. Le rôle des p-bodies est encore débattu et des données récentes suggèrent qu'ils pourraient également servir de lieux de stockage (Aizer et al., 2014). Les deux types de granules sont suggérés très dynamiques et échangeant des mRNP. Certains ARNm peuvent repartir en traduction une fois le retour à la condition normale. Modifiée de Buchan et al., 2008.

peuvent retourner dans le cytosol pour être réengagés en traduction (Bregues et al., 2005). Avec cette observation, les p-bodies sont également proposés comme de lieux de stockage d'ARNm réprimés (Aizer et al., 2014). Récemment, une étude a été menée en cellules humaines sur des p-bodies isolés en condition normale et plus de 6 000 transcrits ont été identifiés en association avec ces agrégats (Hubstenberger et al., 2017). Il a été montré que les protéines produites par ces transcrits sont moins abondantes que les transcrits non adressés aux p-bodies, supportant l'idée que les ARNm sont majoritairement réprimés dans les p-bodies. Néanmoins, aucune évidence sur leur dégradation 5'-3' dans les p-bodies n'a pu être faite ; en effet des intermédiaires tronqués en 5' n'ont pas été détectés suggérant que les transcrits accumulés sont protégés du decapping. De même, la dissolution des p-bodies ne semble pas affecter la quantité à l'équilibre de ces transcrits, suggérant qu'ils y sont stockés sans être dégradés. La majorité des transcrits associés aux p-bodies code des fonctions régulatrices et les auteurs proposent alors que les p-bodies constituent un réservoir pour en contrôler leur disponibilité. Les résultats de ces travaux sont donc en contradiction avec le rôle précédemment publié des p-bodies comme lieux de dégradation des ARNm. Néanmoins, pour expliquer les observations précédentes où la taille des p-bodies augmente en l'absence des acteurs du decapping, les auteurs proposent qu'il s'agirait d'une conséquence de l'augmentation des ARNm non dégradés dans le cytoplasme qui viendraient alors s'accumuler dans les p-bodies. Cependant, cette étude a été réalisée à partir de p-bodies formés en condition constitutive, ce qui n'exclut pas que leur rôle puisse être différent en situation de stress puisque leur nombre et leur taille augmentent. On peut également supposer que la composition des p-bodies en termes d'acteurs protéiques et de transcrits puisse varier entre une condition normale et une situation de stress ou même en fonction de l'intensité du stress.

Les granules de stress sont quant à eux des agrégats spécifiques d'une situation de stress et regroupent majoritairement les acteurs de l'initiation de traduction comme les facteurs du complexe de coiffe, les eIF, les PABP ou encore les composants de la sous-unité 40S du ribosome (Anderson and Kedersha, 2008). Au niveau fonctionnel, les granules de stress sont proposés comme lieux de stockage des ARNm traductionnellement réprimés dans le but de pouvoir les réengager rapidement en traduction lorsque la situation de stress disparaît. Les granules de stress ne sont pas uniformes et semblent distinguer une structure cœur articulée autour d'une région périphérique moins dense et dynamique (Protter and Parker, 2016). Récemment, une étude protéomique a été menée à partir de granules de stress induits par stress oxydatif en cellules humaines pour en identifier les composants protéiques (Jain et al., 2016). Plus de 400 protéines

ont ainsi été identifiées dans la structure cœur des granules de stress ; la moitié d'entre elles regroupe des protéines de liaison à l'ARN alors que l'autre moitié est composée de facteurs sans propriété apparente de liaison à l'ARN. Ces derniers possèdent majoritairement des régions de faible complexité ou intrinsèquement désordonnées qui facilitent l'agrégation des ARN et des structures mRNP au sein des granules de stress. Ainsi, de nombreuses interactions protéines-protéines existent entre les composants des granules de stress supportant un réseau d'agrégation dense. Certaines protéines sont notamment requises pour contrôler l'assemblage des granules de stress comme les facteurs TIA-1 (T-cell Intracellular Antigen 1) et TIAR (TIA-1-related) (Waris et al., 2014). Ces facteurs ont la propriété de se fixer sur les ARNm et de favoriser leur agrégation *via* la présence de domaine prion-like dans leur séquence. Chez la plante, le facteur UBP1c, orthologue des TIAR, séquestre des ARNm dans les granules de stress au cours d'un stress oxydatif et favorise ensuite leur retour en traduction après la dissociation des granules (Sorenson and Bailey-Serres, 2014). Puisque les granules de stress permettent un stockage d'ARNm, il est proposé que les transcrits contenus dans ces corpuscules remplissent des fonctions essentielles. De façon évolutivement conservée, il apparaît notamment que les transcrits codant les facteurs d'initiation ou les protéines ribosomales sont majoritairement retrouvés dans les granules de stress. Chez les mammifères, ces transcrits sont définis comme les ARNm à motif 5'TOP (5'Terminal Oligopyrimidine) et sont très abondants dans les granules de stress (Damgaard and Lykke-Andersen, 2011). Il s'agit là encore d'un moyen pour contrôler la traduction au cours d'un stress puisqu'en stockant et réprimant ces transcrits, la synthèse des composants nécessaires à la traduction est réduite. Ainsi, leur localisation dans les granules de stress permet leur stabilisation et ils pourront être réengagés rapidement en traduction une fois les granules de stress dissociés. De même, chez la levure il a été montré que les transcrits codant les protéines ribosomales sont stabilisés au cours d'une carence en glucose pour repartir pour facilement en traduction suite au stress (Arribere et al., 2011). Chez la plante, les travaux de l'équipe ont également montré qu'en situation de stress thermique, les ARNm codant les protéines ribosomales sont stockés et repartent ensuite en traduction afin de coordonner la synthèse de ribosome avec la levée du stress (Merret et al., 2017). Le retour en traduction de ces transcrits est dépendant de la protéine HSP101 (Heat Shock Protein 101) qui favorise la dissociation des granules de stress une fois le retour à la condition normale. En l'absence de HSP101, la reprise de traduction est alors compromise par un retard d'assemblage des polysomes. Chez la levure *S. cerevisiae*, la dissociation des granules de stress formés en stress thermique requiert également l'activité des chaperonnes HSP104 et HSP70 supposant un rôle conservé de ces protéines dans la reprise de la

traduction (Cherkasov et al., 2013). Au-delà d'un rôle dans la protection et le stockage des ARNm traductionnellement réprimés, il est également proposé que les granules de stress participent à l'homéostasie cellulaire en situation de stress en séquestrant des protéines de signallement possédant des régions de faible complexité (Kedersha et al., 2013). Au travers de cette séquestration, de nombreuses voies de signallement sont régulées afin de faciliter préférentiellement la mise en place des voies de réponses aux stress.

La formation des p-bodies et celle des granules de stress semblent intimement liées. En effet, il a été montré chez la levure qu'en l'absence de certains facteurs d'assemblage des p-bodies (Edc3, Lsm4), la formation des granules de stress est compromise (Buchan et al., 2008). À l'inverse, réduire la formation des granules de stress ne semble pas affecter l'accumulation des p-bodies. Ces données suggèrent que les p-bodies pourraient être précurseurs dans la formation des granules de stress ce qui suppose alors des échanges dynamiques de transcrits entre les deux types de structures. Cette observation est cohérente avec le fait que certains ARNm de p-bodies peuvent repartir en traduction ce qui peut impliquer probablement une transition préalable dans les granules de stress. Bien que cela suggère une certaine dynamique entre les p-bodies et les granules de stress, la résolution du protéome de ces corpuscules a permis de montrer que les acteurs sont majoritairement spécifiques de chaque agrégat (Hubstenberger et al., 2017; Jain et al., 2016). Cependant, il existe tout de même certaines protéines qui peuvent être partagées entre les p-bodies et les granules de stress dont par exemple les répresseurs de traduction DHH1 et RAP55/Scd6 ou l'exoribonucléase XRN1 (Decker and Parker, 2012). Finalement, bien que les deux types de corpuscules accumulent des ARNm traductionnellement réprimés, les transcrits semblent être inhibés en traduction de façon différente. En effet, l'absence de facteurs d'initiation dans les p-bodies suppose un blocage de la traduction avant l'étape d'initiation alors que la présence de facteurs d'initiation et de sous-unités 40S dans les granules de stress suggère plutôt un blocage après l'assemblage du complexe 40S. Cette observation pourrait ainsi proposer que les transcrits stockés dans les granules de stress peuvent repartir plus facilement en traduction. En résumé, en situation de stress, les agrégats cytoplasmiques participent à établir un « tri » des transcrits où certains sont protégés de la dégradation et stockés en attendant le retour aux conditions normales. Selon les modèles, certains ARNm pourraient également être dégradés dans les p-bodies, participant à l'équilibre général des mécanismes de reprogrammation cellulaire (Decker and Parker, 2012). De même, les granules de stress sont proposés comme régulateurs de protéines possédant des régions de faible complexité en favorisant leur séquestration.



### III.3 – Régulation de la stabilité des transcrits en réponse au stress

De nombreux travaux font part de processus de régulation globale de la stabilité des transcrits en réponse à certains stress. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, des effets généraux de stabilisation ou de déstabilisation ont été recensés en fonction du type et de l'intensité du stress. Lors d'un choc thermique, il a été estimé que la stabilité de près de 62 % des transcrits est modifiée avec une grande majorité qui est déstabilisée (Castells-Roca et al., 2011). Une autre étude a démontré qu'en réponse à plusieurs stress, de multiples ARNm sont stabilisés et principalement en conséquence d'une inhibition du mécanisme de déadénylation (Hilgers et al., 2006). Ce mécanisme propose que les ARNm ainsi stabilisés sont stockés pour permettre à la cellule de mettre en place les réponses moléculaires. D'autres travaux montrent cependant des effets différents suivant l'intensité du stress (Romero-santacreu et al., 2009). En effet, lors d'un stress osmotique d'intensité moyenne, il y a une déstabilisation globale des ARNm hormis les ARNm codant les facteurs de réponse au stress qui sont eux stabilisés. À l'inverse, un stress osmotique sévère conduit à une stabilisation générale et à une séquestration des transcrits dans les p-bodies. Dans le cas d'une carence en glucose, il a été montré que les ARNm dont la traduction est bloquée sont majoritairement dégradés (Arribere et al., 2011). Seule une fraction de 400 transcrits a la capacité d'être stockée dans les p-bodies pour repartir ensuite en traduction avec un retour à la condition normale. Ces travaux sur la levure supposent donc qu'en condition de stress, les ARNm sont sélectivement affectés et certaines classes de transcrits peuvent être préférentiellement stabilisées notamment ceux qui permettent la mise en place de la voie de réponse au stress concernée. En cellules humaines, de nombreuses populations d'ARNm sont également déstabilisées en réponse aux UV ou un stress thermique (Fan et al., 2002). Néanmoins, comme chez la levure, certains stress abiotiques inhibent les mécanismes de déadénylation et de dégradation permettant une stabilisation globale des transcrits (Gowrishankar et al., 2006).

Chez *Arabidopsis thaliana*, une étude transcriptomique menée en stress thermique montre des modifications globales de l'expression des ARNm avec une majorité qui est sous-accumulée (Larkindale and Vierling, 2007). De même, les travaux de l'équipe ont identifié une déstabilisation massive de près de 4 500 ARNm, soit environ 25 % du transcriptome, dans les étapes précoces du stress thermique (Merret et al., 2013) (Voir partie II.3 de la partie suivante). En empêchant ce mécanisme, les plantes montrent des défauts de survie à des régimes de stress thermique, démontrant que la déstabilisation de ces transcrits est essentielle. Néanmoins, comme indiqué précédemment, certains autres transcrits sont stabilisés lors d'un stress thermique dont ceux

codant les protéines ribosomales (Merret et al., 2017). Ces mécanismes impliquent donc une régulation précise et sélective de la stabilité des transcrits en réponse au stress.

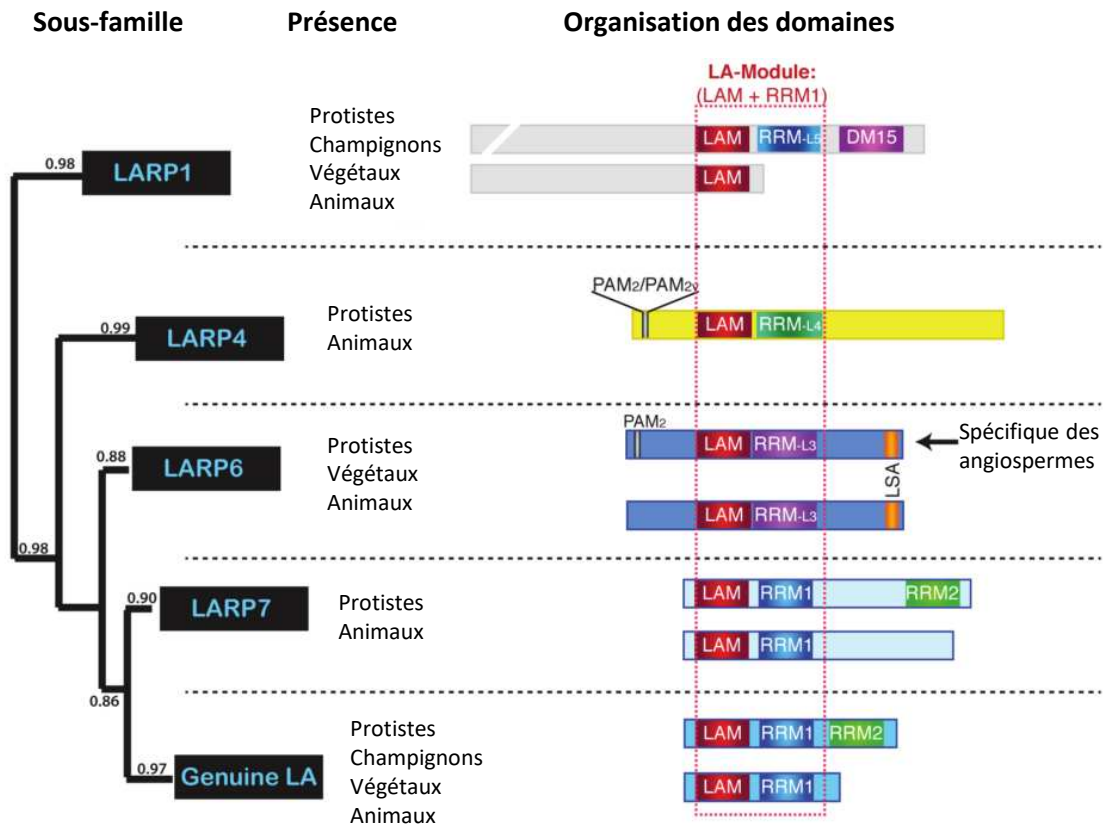
### **III.4 – Implication des acteurs de la stabilité dans les réponses au stress**

En plus des facteurs d'initiation de la traduction, plusieurs acteurs du contrôle de la stabilité des transcrits sont également modifiés post-traductionnellement en réponse à certains stress. De nombreux exemples concernent les acteurs du complexe de decapping qui sont régulés par des événements de phosphorylation en réponse au stress de façon évolutivement conservée. En cellules humaines par exemple, DCP1 est notamment phosphorylée en réponse à un stress oxydatif (Blumenthal et al., 2009) ou une infection virale (Dickey et al., 2015). De même chez la levure, Dcp2p est phosphorylée en réponse à un appauvrissement en glucose (Yoon et al., 2010). Cette phosphorylation est requise pour sa localisation dans les p-bodies et pour stabiliser son interaction avec Dhh1p. De plus, la forme phosphorylée affecte préférentiellement la stabilité de certains ARNm suggérant une régulation précise de l'activité de Dcp2p. Chez la plante *Arabidopsis thaliana*, DCP1 est phosphorylée en réponse à un stress hydrique (Xu & Chua, 2012) et thermique (Motomura et al., 2015 et nos données non publiées). En réponse au stress hydrique, la phosphorylation de DCP1 favorise son interaction avec DCP5, orthologue de Scd6p de levure, et les auteurs proposent un mécanisme de stabilisation du complexe permettant d'agir de façon plus sélective sur les transcrits. Un autre membre du complexe de decapping, VARICOSE (VCS) qui est l'orthologue d'EDC4/Hedls, est phosphorylé en réponse à un stress osmotique (Soma et al., 2017) tout comme un des trois homologues du facteur activateur de decapping PAT1 en réponse à un stress biotique (Roux et al., 2015), affectant dans chacun des cas la stabilité de certaines populations de transcrits spécifiques. Le complexe LSM1-7 d'*Arabidopsis* favorise le decapping et la dégradation de certains transcrits spécifiques en condition de stress salin, hydrique ou de température basse (Perea-Resa et al., 2016). Il n'a pas été démontré que ces acteurs sont phosphorylés en réponse à ces stress mais au moins le facteur LSM1 contient une séquence consensus pour une MAPK kinase pouvant suggérer une régulation similaire par phosphorylation. L'ensemble de ces travaux démontre ainsi une régulation précise du mécanisme de decapping en réponse aux stress par des événements de phosphorylation. Cette modification est proposée comme un moyen de reprogrammer la sélectivité du complexe de suppression de coiffe pour agir préférentiellement sur certains transcrits permettant de mettre en place les voies de réponses au stress.

Hormis les facteurs du complexe de decapping, d'autres acteurs de la dégradation sont également impliqués dans des voies de réponse au stress chez la plante. C'est notamment le cas des déadénylases AtCaf1a et AtCaf1b, deux homologues du facteur CAF1 du complexe CCR4-CAF1-NOT. Ces deux facteurs semblent agir de façon non redondante pour réguler la déadénylation de certains transcrits en réponse à certains stress abiotiques (oxydatifs et salin) et biotiques (Walley et al., 2010; Liang et al., 2009). Enfin, l'exoribonucléase cytoplasmique XRN4, l'orthologue fonctionnel de Xrn1p de levure, est requise pour les mécanismes de thermotolérance chez la plante (Merret et al., 2013) soutenant davantage que la régulation de la stabilité des transcrits est essentielle au processus d'acclimatation au stress.

*En résumé, l'équilibre entre la traduction et la dégradation des transcrits est un point déterminant dans le contrôle de l'expression des gènes puisqu'il régule la nature et la quantité de protéines produites. Comme le démontrent de nombreux travaux, la régulation de cet équilibre est essentielle en situation de stress pour mettre en place les voies de réponses moléculaires et physiologiques. Néanmoins, l'inhibition de traduction et le contrôle de la stabilité en situation de stress ne s'opèrent pas seulement par une régulation des facteurs d'initiation de traduction et des acteurs de la dégradation. En effet, les protéines de liaison à l'ARN sont également nécessaires pour contrôler cette balance et pour cibler des populations de transcrits spécifiques.*





**Figure 6 : Phylogénie et structure primaire des sous-familles de protéines à motif La**

Analyse phylogénétique des protéines à motif La menée par alignement des séquences du motif LA. Ces protéines se classent en 5 sous-groupes : la protéine La authentique et 4 sous-familles LARP1, 4, 6 et 7. La présence des sous-familles dans les grands groupes du vivant est indiquée au centre et l'organisation des domaines des représentants de chaque groupe est illustrée à droite. PAM2 : PAB-interacting Motif 2, LAM : La-Motif, RRM : RNA Recognition Motif, LSA : LAM and S1-Associated. Modifié de Deragon & Bousquet-Antonelli, 2015.

## **PARTIE II – LE RÔLE DE LA PROTÉINE LARP1 DANS LE CONTRÔLE DE LA TRADUCTION ET DE LA STABILITÉ DES ARN MESSAGERS**

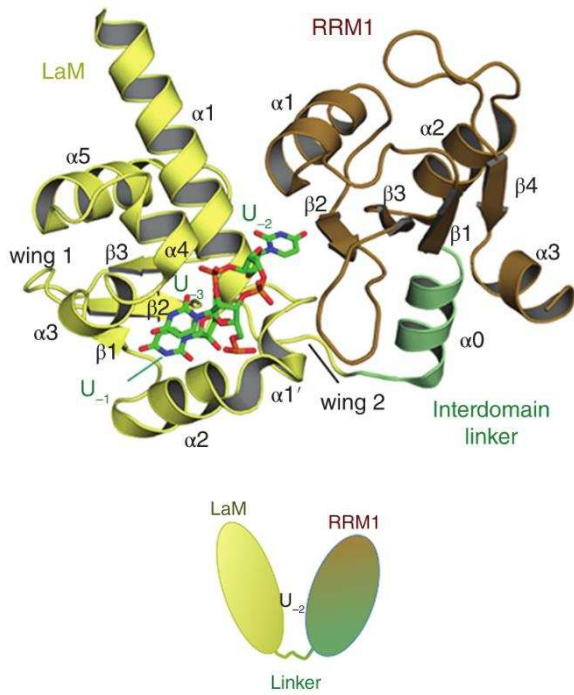
Le cycle de vie des ARNm est majoritairement contrôlé par l'action de protéines de liaison à l'ARN (RBP) qui s'assemblent sur les transcrits pour former des structures mRNP. Certaines RBP vont avoir un impact ponctuel sur une étape précise du cycle de vie des ARNm alors que d'autres peuvent influencer le devenir des transcrits tout au long de leur parcours cellulaire. Pour interagir avec les ARNm, les RBP possèdent des motifs ou domaines de liaison très divers qui sont capables de reconnaître de façon générale les ARN ou de cibler certains motifs particuliers permettant le contrôle de populations spécifiques. Parmi l'ensemble des RBP, la protéine LARP1, appartenant à la famille des protéines à motif « La », apparaît comme un régulateur important dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des ARNm.

### **I – PHYLOGÉNIE, DOMAINES ET STRUCTURES DES PROTÉINES À MOTIF LA**

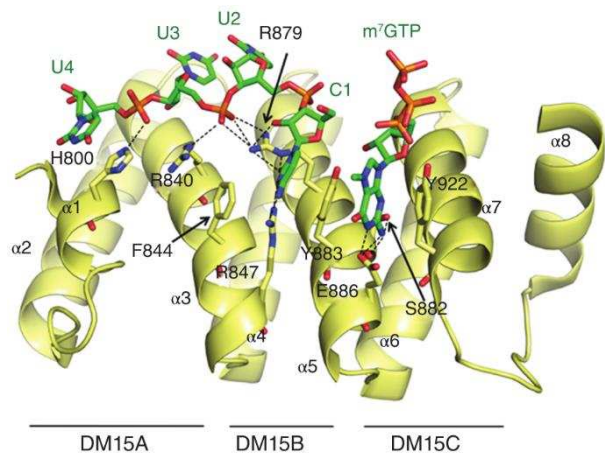
Les protéines à motif La constituent une large famille évolutivement conservée de facteurs de liaison aux ARN codants et non codants. Cette famille comprend plusieurs sous-groupes contenant la protéine La authentique et les LARP (La-Related Protein) divisées en sous-familles : LARP1, LARP4, LARP6 et LARP7 (Bousquet-Antonelli and Deragon, 2009). Chaque sous-famille est orientée vers des fonctions distinctes allant de la régulation des transcrits non codants pour la protéine La authentique et LARP7, à la régulation du métabolisme de populations d'ARNm spécifiques pour LARP1, 4 et 6 (Maraia et al., 2017). Au niveau phylogénétique, chaque sous-famille n'est pas représentée dans tous les organismes et certaines sous-familles peuvent posséder plusieurs membres au sein d'une même espèce (Figure 6). Par exemple, chez les végétaux les membres LARP7 et LARP4 sont absents et LARP1 possède 3 homologues. Parmi les protéines LARP, la sous-famille LARP1 constitue le groupe le plus homogène et le plus évolutivement conservé.

Au niveau structurel, ces protéines partagent un module La central, composé du motif La (LaM), adoptant un repliement de type « winged-helix motif », et d'un domaine RRM (RRM1). Chez la protéine La authentique, ces deux structures fonctionnent en synergie pour lier une séquence UUU-3'OH des transcrits Pol III (Alfano et al., 2004). Le LaM et le RRM1 sont reliés par une séquence « linker » permettant le positionnement du LaM en face du RRM1. Cette région confère une « forme en V » au module La qui joue un rôle dans la spécificité de liaison à l'ARN

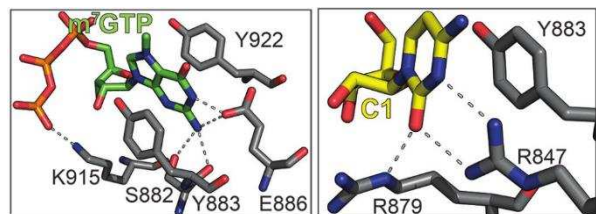
**A** Module LA de la protéine La humaine



**B** Motif DM15 de LARP1



**C**



**Figure 7 : Structure tridimensionnelle du module La de la protéine La et du motif DM15 de LARP1**

**(A)** Structure générale du module La de la protéine La humaine en interaction avec une séquence ARN UUU-3'OH. Le motif LaM est représenté en jaune, le RRM1 en marron et la région « linker » en vert. Extrait de Maraia et al., 2017. **(B)** Structure du motif DM15 de la protéine LARP1 humaine en association avec une séquence ARN 5'-CUUU. Extrait de Maraia et al., 2017. **(C)** Visualisation de la reconnaissance du résidu m<sup>7</sup>GTP (gauche) et du C en +1 (droite). Les potentielles liaisons hydrogènes sont indiquées en lignes pointillées. Extrait de Lahr et al., 2017.

(Figure 7-A). Chez les LARP, les deux structures LaM et RRM1 ont co-évolué suggérant une action synergique conservée pour la liaison à l'ARN (Bousquet-Antonelli and Deragon, 2009). Néanmoins, bien que le mode de liaison puisse être conservé, le domaine RRM1 présente des divergences au sein des LARP pouvant expliquer la spécialisation de chaque sous-famille pour leurs transcrits cibles. En dehors du module La, plusieurs autres domaines sont présents dans ces protéines et sont proposés pour contribuer à la spécialisation des fonctions de chaque sous-groupe. Les protéines La et LARP7 possèdent ainsi un second domaine RRM (RRM2), LARP6 un motif LSA en extrémité N-terminale, LARP4 et 6 un motif PAM2 d'interaction à la PABP et enfin LARP1 possède un motif DM15 (Figure 6). Ce dernier est composé de trois sous-unités « helix-turn-helix » répétées (DM15A, B et C) adoptant un repliement de type HEAT (Lahr et al., 2015), une structure impliquée dans des interactions protéines-protéines et notamment retrouvée dans des domaines du facteur eIF4G. Ce domaine est capable de lier l'ARN de façon indépendante au module La (Lahr et al., 2015). Récemment, il a été montré que le motif DM15 est un nouveau motif de liaison à la coiffe en 5' des ARNm (Lahr et al., 2017). Plus précisément, le motif DM15 se fixe préférentiellement sur les coiffes suivies d'un C en +1, c'est-à-dire sur les résidus m<sup>7</sup>GpppC (Figure 7-B). Le résidu m<sup>7</sup>Gppp est directement lié par deux tyrosines alors que d'autres résidus arginines établissent des liaisons hydrogènes avec le C en +1 (Figure 7-C). La présence d'un C adjacent à la coiffe a été recensé comme un évènement rare puisque dans 80 % des cas il s'agit d'un A ou d'un G (Meyuhas and Kahan, 2015). Les résidus m<sup>7</sup>GpppC sont néanmoins caractéristiques d'une certaine classe d'ARNm possédant un motif 5'TOP, recensé sur de nombreux transcrits codant les protéines ribosomales, des facteurs d'initiation eIF ou encore la PABP (Meyuhas and Kahan, 2015). Le motif 5'TOP des ARNm est ainsi caractérisé par un résidu C adjacent à la coiffe (N+1) suivi d'un groupe de 4 à 15 pyrimidines. Au moins chez les mammifères, LARP1 est impliquée dans la régulation des ARNm à motifs 5'TOP mais son rôle apparaît encore controversée (voir partie II.2). En effet, il n'est pas encore clair si LARP1 agit sur ces ARNm grâce à la présence des séquences TOP riches en pyrimidine ou simplement par sa fonction de liaison à la coiffe des transcrits présentant un C en +1. Finalement, en dehors du motif DM1, les fonctionnalités et le rôle du module La de LARP1 sont très peu documentés à ce jour.

## II – FONCTION DE LA PROTÉINE LARP1

Au niveau fonctionnel, chez les eucaryotes, le facteur LARP1 régule de nombreux processus physiologiques comme la reproduction, la prolifération cellulaire ou encore les voies de réponse aux stress. LARP1 est principalement documentée pour avoir un rôle (positif ou négatif) sur le



contrôle de la traduction et de la stabilité des ARNm suivant les organismes et les situations de stress (Deragon and Bousquet-Antonelli, 2015). En ce sens, il semble que LARP1 interagisse avec la machinerie de traduction de façon évolutivement conservée et une interaction LARP1-PABP a été montrée au moins chez la drosophile (Blagden et al., 2009), l'homme (Burrows et al., 2010) et chez la plante (Bousquet-Antonelli C., données non publiées). Chez la protéine humaine, un motif PAM2 dégénéré a été identifié au sein du domaine RRM1 et a été démontré expérimentalement comme nécessaire au moins en partie à l'interaction ARN-indépendante avec la PABP (Fonseca et al., 2015).

## II.1 – Rôle de LARP1 chez le nématode et la levure

Chez le ver *Caenorhabditis elegans*, LARP1 est impliquée dans l'oogenèse en régulant la stabilité de certains transcrits clés. D'une part, l'absence de LARP1 induit un défaut d'oogenèse lié à une sur-accumulation de certains transcrits (*let-60*, *mpk-1* et *lip-1*) de la voie de signalisation RAS-MAPK (Nykamp et al., 2008). Les auteurs de l'étude ont ainsi montré que LARP1 régule négativement la stabilité de ces transcrits pour favoriser l'oogenèse et proposent que cette action ait lieu dans les p-bodies où LARP1 s'accumule. D'autre part, l'absence de LARP1 conduit également à une masculinisation du ver par une sur-accumulation du transcrit *fem-3* favorisant la spermatogenèse (Zanin et al., 2010). Les auteurs ont également démontré que LARP1 régule négativement la stabilité de ce transcrit pour favoriser l'oogenèse. Bien que LARP1 soit déterminante dans le contrôle de la stabilité de ces transcrits, son mécanisme d'action reste encore indéterminé.

Chez la levure *S. cerevisiae*, seules trois protéines à domaine La existent : l'authentique protéine La et deux homologues de LARP1 : Sro9p et Slf1p. Ces dernières ne possèdent qu'un motif La sans domaine RRM ni motif DM15 (Bousquet-Antonelli and Deragon, 2009). Slf1p est majoritairement cytoplasmique alors que Sro9p apparaît comme nucléo-cytoplasmique (Schenk et al., 2012). Ces deux facteurs sont capables de s'associer aux ARNm en cours de traduction dans les polysomes et interagissent avec eIF4E et eIF4G de façon ARN-dépendante et avec la PABP de façon ARN-indépendante (Kershaw et al., 2015). Par ces interactions, Sro9p et Slf1 semblent agir de façon redondante pour réguler positivement la stabilité et la traduction de certains transcrits codant les composants ribosomiaux nécessaires à la synthèse de protéines. Par ailleurs, il a été montré que Slf1p est impliquée dans la voie de réponse au stress oxydatif en stabilisant certains transcrits clés de la voie de réponse (Schenk et al., 2012). Les auteurs proposent que cette stabilisation facilite leur traduction permettant de mettre en place la résistance au stress. Bien que

Sro9p et Slf1p sont clairement impliquées dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des transcrits, leur mode d'action reste encore énigmatique sachant qu'elles ne possèdent qu'un motif La.

## **II.2 – Rôle de la protéine LARP1 dans la régulation des ARNm 5'TOP chez les mammifères**

La fonction et le mode d'action de la protéine LARP1 sont largement mieux documentés chez les mammifères mais restent encore débattus puisque des effets antagonistes ont été observés selon les différents travaux. Malgré les différences, toutes ces études s'accordent à montrer que LARP1 est impliquée dans la régulation des ARNm à motif 5'TOP codant les composants de la machinerie de traduction. Chez les mammifères, ces transcrits à motif 5'TOP sont régulés de façon dépendante de l'activité kinase du complexe mTORC1, un complexe régulateur majeur dans la synthèse de protéines. En condition de croissance optimale, le complexe mTORC1 accélère la production des composants de la traduction codés par ces ARNm 5'TOP pour augmenter la synthèse globale de protéines. Parmi la recherche des substrats de mTORC1, plusieurs études ont fait apparaître LARP1 comme candidat (Hsu et al., 2011; Yu et al., 2011). De plus, une interaction entre LARP1 et le facteur RAPTOR, un composant du complexe mTORC1, a été démontrée par deux études indépendantes proposant un lien direct entre le rôle de mTORC1 et l'action de LARP1 (Tcherkezian et al., 2014; Fonseca et al., 2015). Plus récemment, une dizaine de sites de phosphorylations a été identifiée sur LARP1 principalement en région centrale de la protéine et un en aval du motif DM15 (Hong et al., 2017). Parmi ces sites, au moins 8 sont sensibles à l'activité de mTORC1 et impliquent plusieurs kinases de la voie TOR que sont mTOR, Akt et S6K1.

Des premiers travaux ont d'abord montré que LARP1 stabilise des ARNm à 5'TOP *via* une liaison sur leur extrémité 3' terminale de la queue poly(A) (Aoki et al., 2013). Une autre étude propose que LARP1 joue un rôle stabilisateur en association avec la sous-unité 40S des ribosomes (Gentilella et al., 2017). Les auteurs montrent ainsi qu'en l'absence de LARP1 ou des sous-unités essentielles du complexe 40S, la stabilité de plusieurs transcrits 5'TOP diminue alors que d'autres ARNm sans 5'TOP ne sont pas affectés. L'absence de LARP1 diminue la quantité d'ARNm 5'TOP dans la fraction non polysomale (40S notamment) sans modifier leur distribution dans les fractions lourdes. Curieusement bien que cette distribution soit modifiée, la quantité des protéines produites par ces transcrits est similaire en l'absence de LARP1. Les auteurs proposent ainsi que LARP1 joue principalement un rôle majeur dans la stabilité des ARNm 5'TOP sans affecter

grandement leur traduction, ce qui est très différent des études détaillées ci-dessous. Cependant, ces travaux ont été réalisés sur des cellules humaines cancéreuses ce qui pourrait expliquer que de nombreux mécanismes et facteurs sont dérégulés dans cette situation de cancer.

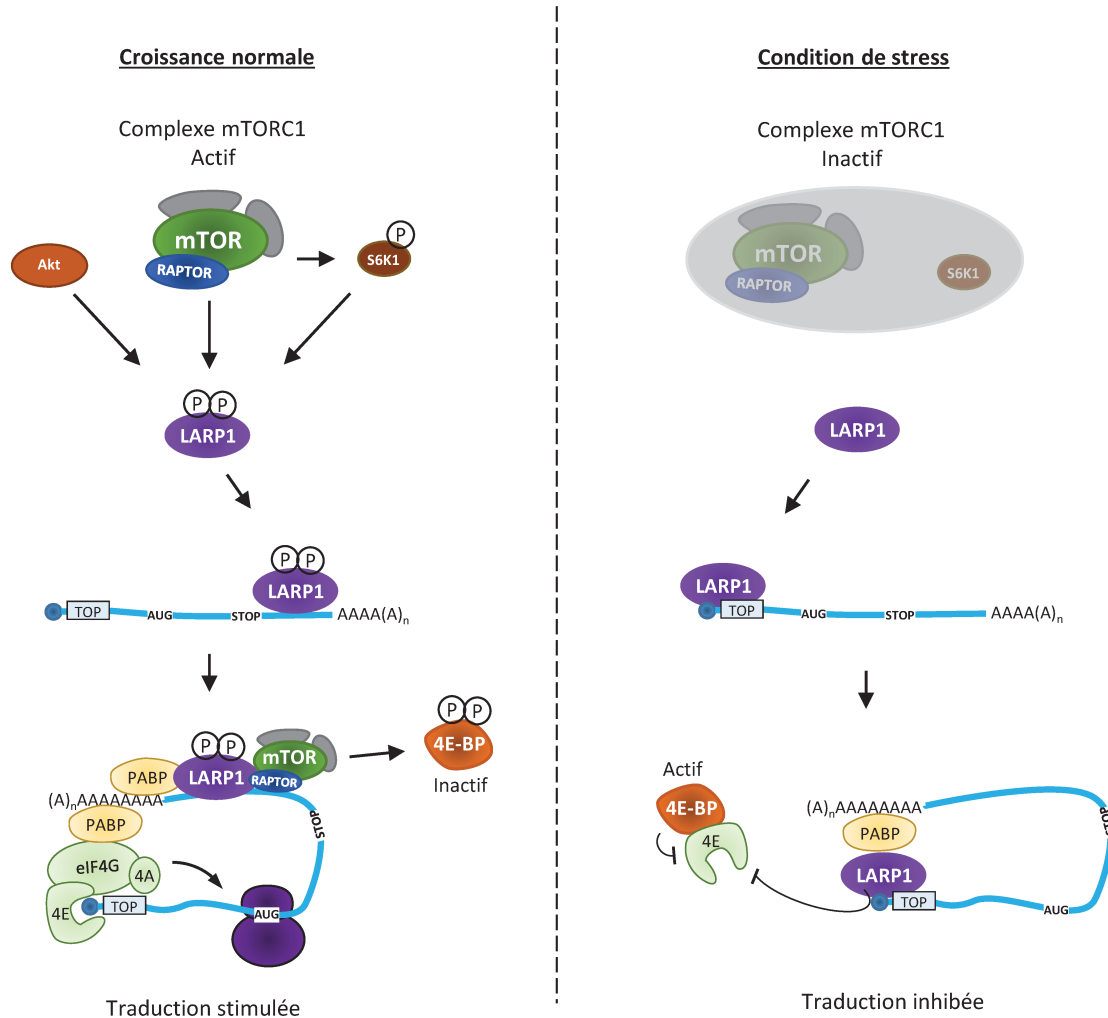
Concernant le rôle de LARP1 dans la traduction des ARNm à motif 5'TOP, des travaux ont d'abord montré que l'absence de LARP1 conduit à une diminution globale de la synthèse de protéine avec une baisse conséquente de l'assemblage des polysomes (Tcherkezian et al., 2014). Cette observation a été expliquée par une traduction diminuée des ARNm à motifs 5'TOP en l'absence de LARP1, ce qui produit moins de facteurs nécessaires au mécanisme de traduction. Le mécanisme alors proposé est que LARP1 agirait comme stimulateur de traduction des ARNm 5'TOP de façon dépendante à l'activité de mTORC1 et en interagissant avec la machinerie d'initiation de traduction (eIF4A, PABP). Néanmoins, une étude parallèle a démontré l'effet opposé où LARP1 agirait comme répresseur de traduction des ARNm à 5'TOP en réponse à l'activité de mTORC1 (Fonseca et al., 2015). Les résultats de cette étude montrent que l'inhibition de mTORC1 augmente la liaison de LARP1 sur les ARNm à 5'TOP tout en diminuant celle d'eIF4G, proposant une compétition entre LARP1 et eIF4G régulée par l'activité de mTORC1. Par ailleurs, dans cette étude l'absence de LARP1 n'affecte que très peu l'assemblage des polysomes et la synthèse globale de protéine suggérant un impact plus précis sur des transcrits spécifiques. Ainsi, en l'absence de LARP1 et/ou en inhibant mTORC1, les ARNm à motif 5'TOP sont relocalisés de la fraction légère des polysomes vers les fractions lourdes, suggérant un rôle répresseur de LARP1 pour la traduction de ces transcrits de façon dépendante à l'activité de mTORC1.

Plus récemment, des travaux ont permis d'expliquer cette différence d'action en démontrant les rôles antagonistes des formes phosphorylées et non phosphorylées de LARP1 (Hong et al., 2017). En condition normale de croissance, la version phosphorylée de LARP1 lie majoritairement la région 3'UTR des ARNm à motifs 5'TOP et n'empêche pas l'assemblage du complexe de coiffe sur les transcrits. De façon intéressante, la liaison de LARP1 en 3'UTR favorise le recrutement du complexe mTORC1 sur cette même région et facilite la phosphorylation des substrats 4E-BP et S6K1 en augmentant leur association avec mTORC1. De ce fait, l'augmentation de la phosphorylation sur 4E-BP réduit son rôle de séquestration d'eIF4E et la traduction est indirectement stimulée par l'augmentation de la quantité d'eIF4E disponible. Avec cette observation, les auteurs expliquent pourquoi LARP1 a été identifiée précédemment comme stimulateur de traduction des ARNm 5'TOP mais il s'agit ici d'un effet indirect *via* une plus forte inhibition de 4E-BP. À l'inverse, quand l'activité du complexe mTORC1 est compromise au cours de

certain stress, LARP1 n'est plus phosphorylée et agit comme répresseur de traduction sur ces transcrits. Ils ont ainsi démontré que cette forme non phosphorylée se fixe sur ces transcrits en ciblant des régions riches en pyrimidines dans la partie 3' des régions 5'UTR et que cette liaison réprime leur traduction. Les auteurs proposent alors que LARP1 est un stimulateur de traduction indirect en condition normale et un répresseur direct dans sa forme non phosphorylée. Néanmoins, bien que ces travaux permettent d'expliquer les effets antagonistes de LARP1, les auteurs ne montrent pas comment la fixation de LARP1 sur les régions 5'UTR des ARNm 5'TOP inhibe la traduction.

Dans cette optique, il a été montré que le domaine DM15 présent en extrémité C-terminale est impliqué dans la liaison des motifs 5'-TOP (Lahr et al., 2015). Plus précisément, le domaine DM15 lie directement la coiffe m<sup>7</sup>GpppC présente dans les motifs 5'TOP (Lahr et al., 2017). Le motif DM15 a une plus grande affinité qu'eIF4E pour les résidus m<sup>7</sup>GpppC et peut ainsi déplacer une eIF4E déjà fixée sur cette coiffe. À l'opposé, le motif DM15 a très peu d'effet sur les coiffes ne présentant pas un C en +1, pour lesquelles eIF4E reste préférentiellement fixée. Ces données proposent alors que LARP1 puisse agir en compétition avec eIF4E de façon spécifique pour les coiffes des ARNm 5'TOP et bloquer ainsi leur traduction en empêchant l'assemblage du complexe de coiffe. Les travaux menés par Hong et al (2017) ont cependant identifié que dans un contexte où LARP1 joue le rôle de répresseur de traduction (mTORC1 inhibé), elle se fixe sur des régions riches en pyrimidines en extrémité 3' de la région 5'UTR ce qui ne fait de lien direct avec la coiffe. Néanmoins, dans cette étude, une approche de PAR-CLIP (Photoactivable ribonucleoside crosslinking and immunoprecipitation) a été utilisée et par principe cette technique est incompatible avec le fait d'identifier un site de liaison direct à la coiffe.

L'ensemble de ces travaux définit un modèle où LARP1 est phosphorylée par le complexe mTORC1 en condition basale et agirait comme stimulateur indirect du métabolisme des ARNm 5'TOP codant les composants clés de la traduction (Figure 8). C'est en recrutant mTORC1 sur les transcrits que LARP1 facilite l'activité de mTORC1 pour phosphoryler 4E-BP et ainsi réduire son effet répresseur. À l'inverse, en condition de stress où le complexe mTORC1 est inactivé, LARP1 non phosphorylée agirait en répresseur de traduction par compétition avec eIF4E pour lier la coiffe des motifs 5'TOP. Ce rôle serait soutenu par l'action du facteur 4E-BP également actif dans cette situation de stress pour séquestrer eIF4E. Concrètement, cela propose un rôle direct de LARP1 comme inhibiteur de traduction qui peut être inhibée par des événements de phosphorylation. Ceci indique donc que LARP1 a une action très précoce dans l'inhibition de traduction puisqu'elle



**Figure 8 : Modèle d'action de la protéine LARP1 humaine sur le contrôle de la traduction des ARNm 5'TOP**

En condition de croissance normale, LARP1 est phosphorylée par le complexe mTORC1, la kinase Akt et S6K1 (aussi cible de mTORC1). Cette forme phosphorylée s'associe préférentiellement sur la région 3'UTR des ARNm à motifs 5'TOP où elle interagit avec la PABP et recrute également le complexe mTORC1 *via* RAPTOR. L'interaction de LARP1 phosphorylée avec mTORC1 facilite la phosphorylation de 4E-BP par mTORC1. Dans ce contexte, 4E-BP est davantage réprimée et le complexe eIF4F peut s'assembler sur les ARNm 5'TOP pour stimuler leur traduction. En situation de stress où mTORC1 est inactif (appauvrissement en nutriments, hypoxie, etc), la version non phosphorylée et active de LARP1 se fixe plutôt sur le 5'UTR et la coiffe des motifs 5'TOP en y déplaçant eIF4E. L'initiation de traduction est inhibée par blocage de l'assemblage du complexe de coiffe et 4E-BP non phosphorylée participe à séquestrer eIF4E. Adapté des données de Fonseca et al., 2015, Hong et al., 2017 et Lahr et al., 2017.

bloque l'assemblage d'eIF4E. Finalement en dehors des ARNm 5'TOP, LARP1 lie également d'autres transcrits non associés au mécanisme de traduction (Hong et al., 2017). Le rôle moléculaire de LARP1 sur ces transcrits reste néanmoins toujours inconnu.

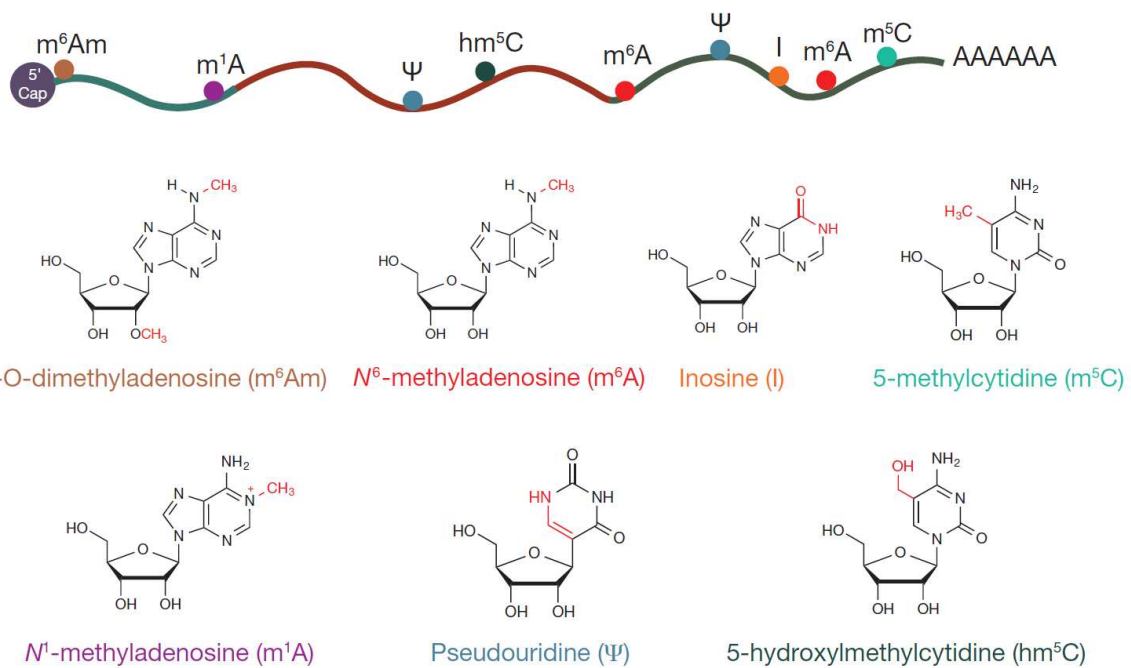
### **II.3 – Rôle fonctionnel de la protéine LARP1 chez *Arabidopsis thaliana***

En comparaison des mammifères, le rôle de LARP1 est largement moins connu chez les végétaux. Néanmoins, chez *Arabidopsis thaliana* le complexe TOR est conservé et régule également des transcrits codant des protéines ribosomales (Dobrenel et al., 2016). De même, ces transcrits semblent présenter un motif en 5' riche en pyrimidines, rappelant le motif 5'TOP des mammifères. Malgré cela, le rôle de LARP1 dans leur régulation n'a pas encore été étudié mais pourrait contribuer à mieux comprendre le rôle de cette protéine chez la plante. Trois homologues distincts de LARP1 sont codés par le génome d'*Arabidopsis* (LARP1a, b et c) mais seul l'homologue LARP1a possède un module La entier (LaM et RRM) et un motif DM15, essentiel à la fonction de LARP1 chez les mammifères. À ce jour, les seuls travaux menés sur cette protéine ont été réalisés par l'équipe et ont montré que LARP1a (nommée LARP1 pour la suite) est impliquée dans le contrôle de la stabilité de milliers de transcrits en réponse au stress thermique (Merret et al., 2013). C'est en interagissant de façon spécifique au cours du stress thermique avec l'exoribonucléase XRN4 que LARP1 facilite le processus nommé « Heat stress-mediated decay » où plus de 4 500 ARNm sont dégradés dans le cytoplasme dans les étapes précoces de réponse au stress. Il a été montré que LARP1 est en partie co-localisée avec XRN4 dans les p-bodies en situation de stress, pouvant être un site potentiel de ce mécanisme de dégradation. De plus, LARP1 est nécessaire pour adresser XRN4 dans les polysomes et permettre un mécanisme de dégradation co-traductionnelle. Les facteurs DCP1 et DCP2 sont également préférentiellement associés aux polysomes en situation de stress mais de façon non dépendante à la présence de LARP1, supportant une étape initiale de decapping dans le mécanisme de dégradation co-traductionnelle. Finalement, les mutants *xrn4* mais aussi *larp1* dans un moindre effet, présentent des défauts de survie à certains régimes de stress thermique attestant du rôle essentiel de ces facteurs dans les voies de réponses au stress thermique. Étonnamment, les ARNm ciblés pour la dégradation codent majoritairement pour des facteurs remplissant des fonctions de ménage (développement, transcription, processus cellulaires, etc.) supposant un ciblage précis des ARNm à dégrader. Bien que les cibles de la dégradation co-traductionnelle soit sélectionnées en raison d'une pause d'élongation des ribosomes (Merret et al., 2015), les mécanismes de sélection sur les autres transcrits traductionnellement réprimés sont encore indéterminés.

*En résumé, chez les eucaryotes la protéine LARP1 joue un rôle important dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des transcrits en condition normale comme lors de certains stress abiotiques. En dehors des protéines de liaison à l'ARN, un autre niveau de régulation des ARNm repose sur la présence de modifications post-transcriptionnelles. Ces modifications contribuent à influencer le devenir des ARNm en régulant de nombreuses étapes de leur cycle de vie.*







**Figure 9 : La diversité des modifications post-transcriptionnelles des ARN messagers**

Liste non exhaustive des différentes modifications chimiques s'installant sur les ARNm. Extrait de Li et al, 2016b.

# PARTIE III – LE RÔLE DE LA MODIFICATION N<sup>6</sup>-MÉTHYLADÉNOSINE DANS LE CONTRÔLE DU DEVENIR DES ARN MESSAGERS

## I – LES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES CHEZ LES EUCARYOTES

À ce jour, 112 modifications post-transcriptionnelles différentes ont été identifiées (Cantara et al., 2011). Cette ressource réunit l'ensemble des résidus dont la structure chimique a été définie pour des ARN « naturels » ou pour des intermédiaires hydrolysés d'ARN. Ces modifications sont principalement recensées sur les ARN de transfert (ARNt), les ARN ribosomiques (ARNr) ou les ARNm et plus rarement sur les petits ARN nucléaires (ARNsn). Les modifications les plus communes consistent en l'ajout de groupement méthyl (CH<sub>3</sub>) sur différentes positions des résidus A, C, G ou U (Liu & Jia, 2014) mais les fonctions précises de ces modifications restent encore inconnues pour la plupart d'entre elles. Concernant les ARNm, au moins 13 types de modifications différentes sont recensés (Cantara et al., 2011) incluant de la pseudouridylation ( $\Psi$ ), un dérivé isomérique d'uridine, de l'inosine et de nombreuses méthylations (Figure 9) (Li et al., 2016b). Ces méthylations s'installent sur les résidus guanosines avec la m<sup>7</sup>G de la coiffe, sur les cytosines avec la 5-méthylcytosine (m<sup>5</sup>C) et plus fréquemment sur les adénosines avec la N<sup>6</sup>-méthyladénosine (m<sup>6</sup>A) et la N<sup>1</sup>-méthyladénosine (m<sup>1</sup>A). La méthylation peut également s'installer sur le ribose pour donner des résidus 2'-O-méthylés et peut s'ajouter sur des résidus déjà modifiés sur leur base azotée ce qui donne par exemple la N<sup>6</sup>,2'-O-diméthyladénosine (m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>). Parmi l'ensemble des modifications des ARNm, la m<sup>6</sup>A est l'une des plus abondantes. Bien qu'elles soient connues depuis de nombreuses décennies pour certaines, ces modifications sont étudiées de façon plus intense depuis le début des années 2010 en raison de nouvelles techniques de profil de distribution à l'échelle du transcriptome (Roundtree et al., 2017). Cependant, la détection de modifications faiblement représentées sur les ARNm reste une tâche difficile avec les moyens technologiques actuels et la présence de certaines modifications sur les ARNm est encore controversée.

La pseudouridylation est surtout abondante sur les ARN non codants où elle participe à stabiliser les structures des ARNt et ARNr (Gray, 2000). L'installation de la pseudouridine est assurée par la famille des PUS (PseudoUridine Synthase) dont les principales sont TRUB1 et PUS7 chez les mammifères (Safra et al., 2017). Récemment, à partir d'une technique de conversion des pseudouridines en un résidu identifiable par séquençage, trois groupes ont permis de montrer chez l'homme et la levure l'existence de milliers de sites pseudouridylés sur les ARN mais

seulement quelques centaines sur des ARNm (Carlile et al., 2014; Lovejoy et al., 2014; Schwartz et al., 2014a). Il semble également que PUS7 puisse induire des centaines de pseudouridines sur les ARNm en réponse à des facteurs environnementaux comme les stress thermique pour contribuer à stabiliser leur structure (Carlile et al., 2014; Schwartz et al., 2014a).

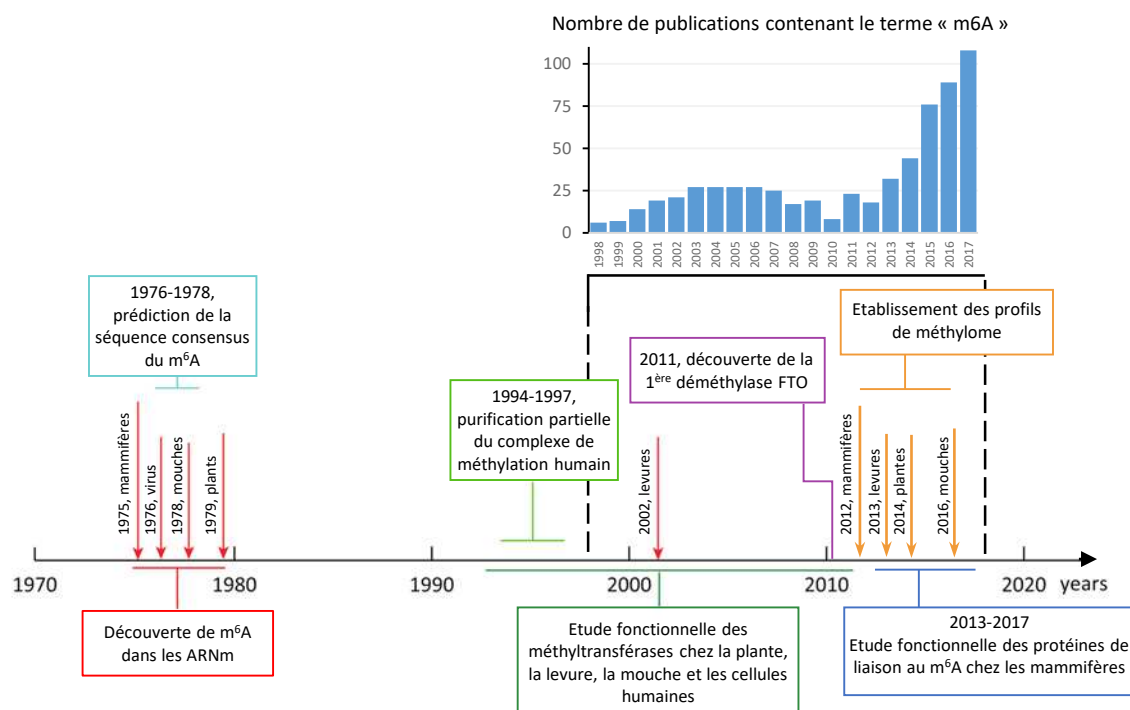
Concernant les résidus méthylés, la m<sup>5</sup>C a été identifiée chez l'homme sur plus de 8 000 sites d'ARNm, représentant 0,4 % des cytosines, mais aussi sur des ARNt et des ARN non codants (Squires et al., 2012). Plus récemment, une autre étude a recensé plus de 5 000 sites sur presque 2 000 ARNm différents (Yang et al., 2017a). Ainsi, des profils à l'échelle du transcriptome ont pu être établis chez les mammifères (Amort et al., 2017), les plantes (David et al., 2017) ou encore la levure *S. cerevisiae* (Edelheit et al., 2013). La m<sup>5</sup>C est mis en place par deux classes d'enzymes principales (TRDMT1 et NSUN2) dont les fonctions ont été principalement étudiées sur les ARNt. Chez les ARNm, la m<sup>5</sup>C est majoritairement catalysée par NSUN2 (NOP2/Sun domain protein 2) et elle est enrichie sur des régions riches en GC, autour du codon initiateur de traduction suggérant un lien avec la traduction (Yang et al., 2017a). De plus, une protéine spécifique de liaison au m<sup>5</sup>C, ALYREF (Aly/REF export factor), a pu être identifiée et semble participer à l'export nucléaire des ARNm modifiés par m<sup>5</sup>C (Yang et al., 2017a).

La N<sup>1</sup>-méthyladénosine a récemment été étudiée à l'échelle du transcriptome par deux groupes indépendants qui dénombrent cette modification sur environ 0,02 % des adénosines de transcrits polyadénylés (Dominissini et al., 2016; Li et al., 2016a). Cette modification montre un enrichissement dans les régions 5'UTR et autour du codon initiateur de traduction, pouvant suggérer un rôle dans la traduction. Tout comme la m<sup>6</sup>A qui sera détaillée par la suite, cette modification semble être dynamique puisque le facteur ALKBH3 (Alkylation repair homolog 3) est capable de déméthyliser les m<sup>1</sup>A en A (Li et al., 2016a). Par ailleurs, cette modification semble également répondre à des facteurs environnementaux et des centaines de sites sont induits en situation de stress.

La N<sup>6</sup>-méthyladénosine qui est au cœur du sujet de ce manuscrit, est l'une des plus abondantes des modifications post-transcriptionnelles (de 1 à 1,5 % des adénosines totales des transcrits polyadénylés) et a été une des premières modifications internes suggérée comme dynamique (Jia et al., 2013).

## II – CARACTÉRISTIQUES CONSERVÉES DE LA N<sup>6</sup>-MÉTHYLADÉNOSINE

Bien que la modification m<sup>6</sup>A soit présente dans les ARNt, les ARNr et au moins l'ARNsn U6, le rôle de cette marque sera ici principalement détaillé sur les transcrits de la polymérase II. La présence de m<sup>6</sup>A dans les ARN polyadénylés a été reportée pour la première fois il y a plus de 40 ans chez les mammifères (Desrosiers et al., 1974; Perry and Kelley, 1974) (Figure 10). Néanmoins, il a fallu attendre 2012 pour avoir un regain d'intérêt grâce à l'établissement du profil de distribution à l'échelle du transcriptome (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012). Le « méthylome » a d'abord été établi sur des cellules humaines et chez la souris et deux études indépendantes ont ainsi identifié environ 13 000 sites méthylés sur près de 7 000 transcrits. Presque 95 % de ces sites ont été détectés sur des ARNm, montrant que la m<sup>6</sup>A est majoritairement une modification d'ARN codants. Néanmoins, environ 200 transcrits non codants, majoritairement des lncRNA (long non coding RNA), portent également cette marque. En moyenne il y a entre 1 à 3 résidus m<sup>6</sup>A par transcrit, ce qui représente jusqu'à 1,5 % des résidus adénosines. Des caractéristiques conservées ont pu être mises en avant sur la distribution du m<sup>6</sup>A avec premièrement le fait qu'elle s'installe sur une séquence consensus DR-m<sup>6</sup>A-CH (D : G, A ou U; R : G>A; H : A, C ou U) avec un contexte GAC dans 70 % des cas et AAC dans 30 %. Deuxièmement, la distribution du m<sup>6</sup>A n'est pas aléatoire et elle est enrichie dans les longs exons internes et surtout autour du codon stop avec une abondance qui décroît le long du 3'UTR. Des études plus récentes démontrent que le codon stop n'est pas impliqué dans l'installation de la méthylation mais que celle-ci coïncide plutôt avec la présence du dernier exon (Ke et al., 2015). Ainsi pour les transcrits présentant un codon stop dans l'avant dernier exon, l'installation de la méthylation n'est pas corrélée avec la présence du codon stop mais avec le début du dernier exon. Même si la méthylation est enrichie au début du 3'UTR, la séquence consensus DRACH est répartie de façon uniforme sur les transcrits ce qui suggère un mécanisme de sélection précis et évolutivement conservé. En effet, l'enrichissement en 3'UTR et l'installation sur une séquence DRACH sont également retrouvés chez la levure *S. cerevisiae* (Schwartz et al., 2013), la mouche *D. melanogaster* (Lence et al., 2016) et les plantes supérieures avec *A. thaliana* (Luo et al., 2014; Wan et al., 2015) et le riz *Oryza sativa* (Li et al., 2014b). Enfin, il apparaît que la m<sup>6</sup>A s'installe préférentiellement dans des régions évolutivement conservées (Meyer et al., 2012). En cohérence, de nombreux sites communs sont partagés sur les mêmes transcrits au moins chez l'homme et la souris (Dominissini et al., 2012). Tout ceci implique que les mécanismes d'installation du m<sup>6</sup>A ont été maintenus avec les pressions de la sélection naturelle. Par ailleurs, des travaux récents



**Figure 10 : Historique des découvertes sur la modification m<sup>6</sup>A des ARNm**

L'histogramme présente le nombre de publications contenant le terme m<sup>6</sup>A entre 1998 et 2017 selon les données Pubmed de la ressource NCBI (National Center for Biotechnology Information). Chronologie modifiée de Jia. et al, 2013.

**Tableau 1 : Listes des principaux acteurs du complexe de m<sup>6</sup>A méthyltransférase et des déméthylases chez des espèces modèles eucaryotes**

ND : non documenté. AB : Absent. Modifié de Meyer & Jaffrey, 2017.

Organisme	Facteurs du complexe de méthyltransférase					Déméthylases	
	METTL3	METTL14	WTAP	KIAA1429	RBM15/15B	FTO	ALKBH5
<i>Homo sapiens</i>	METTL3	METTL14	WTAP	KIAA1429	RBM15/15B	FTO	ALKBH5
<i>Mus musculus</i>	Mettl3	Mettl14	Wtap	Virma	Rbm15/15b	Fto	Alkbh5
<i>Drosophila melanogaster</i>	Ime4	Kar4	Fl(2)D	Virilizer	Nito	ND	ND
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTA	MTB	FIP37	VIR	ND	AB	ALKBH9B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ime4	Kar4	mum2	ND	ND	ND	ND
<i>Schyzosaccharomyces pombe</i>	Ime4	ND	ND	ND	ND	ND	ND

démontrent que les profils de méthylation des transcrits encore associés à la chromatine sont majoritairement identiques à ceux des ARNm nucléaires proposant que l'installation du m<sup>6</sup>A est co-transcriptionnelle (Ke et al., 2017).

En dehors des m<sup>6</sup>A en position interne sur les transcrits, il existe un autre type de résidu m<sup>6</sup>A uniquement localisé dans la continuité de la coiffe en 5'. Généralement le premier résidu suivant la coiffe et parfois le second sont modifiés sur leurs riboses en position 2' par ajout de méthylation. Dans le cas où le premier résidu est une 2'-O-méthyladénosine, il peut être davantage modifié par ajout d'un groupement méthyl en position N<sup>6</sup> de l'adénosine, donnant une N<sup>6</sup>,2'-O-diméthyladénosine (m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>). Cette modification est installée par une ou des méthyltransférase(s) encore inconnue(s) à ce jour mais différente(s) du complexe de méthyltransférase installant le m<sup>6</sup>A interne (Schwartz et al., 2014b). À ce jour, la présence de m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> n'a pas été démontrée chez les végétaux tout comme l'existence de coiffe de type 1 ou 2, c'est-à-dire avec des modifications supplémentaires sur les résidus adjacents à la coiffe (Furuichi, 2015).

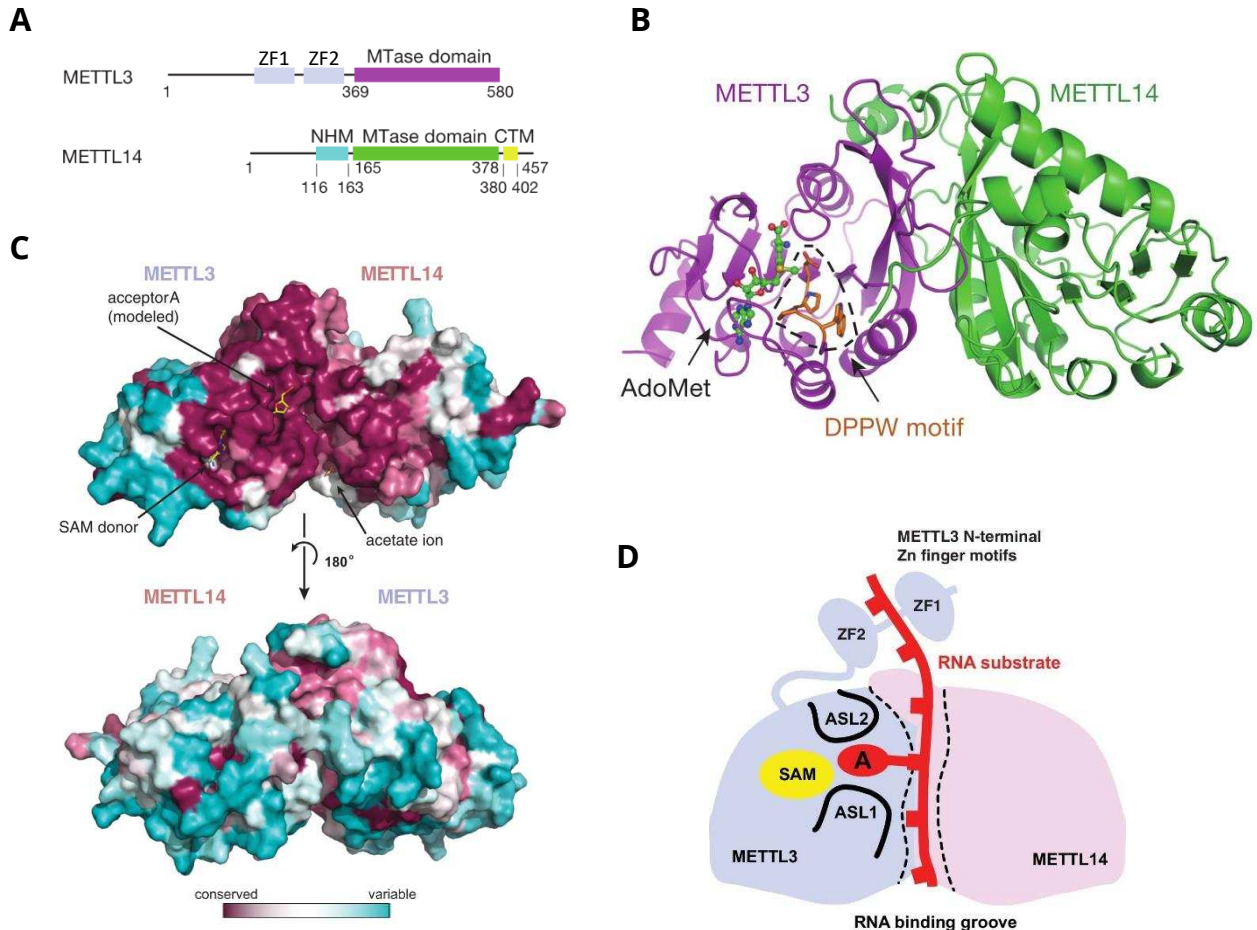
### III – LA MACHINERIE D'INSTALLATION DYNAMIQUE DE LA MÉTHYLATION

La particularité de la méthylation m<sup>6</sup>A est qu'elle est suggérée comme dynamiquement régulée par un système d'installation et de désinstallation. Ainsi, les m<sup>6</sup>A sont déposées sur les transcrits Pol II par un large complexe de méthyltransférase qualifié de « writer » composé d'une structure cœur conservée incluant 2 méthylases (METTL3 et METTL14) ainsi que 4 co-facteurs (WTAP, KIAA1429 et RBM15/RBM15b) identifiés à ce jour (Tableau 1). À l'inverse, la méthylation peut être activement déméthylée par l'action de facteurs déméthylases qualifiés de « erasers » qui sont ALKBH5 (Alkylation repair homolog 5) et potentiellement FTO (Fat mass and obesity-associated protein) appartenant tous les deux à la famille des Alkb dioxygénase non-hème Fe(II) et α-KG-dépendante. Le rôle de FTO dans ce processus reste néanmoins encore débattu.

#### III.1 – Le complexe de m<sup>6</sup>A-méthyltransférase

##### ➤ Les facteurs METTL3 et METTL14

Concernant le complexe de m<sup>6</sup>A-méthyltransférase, les premiers travaux menés sur des extraits nucléaires de cellules humaines avec un système de méthylation *in vitro* ont permis d'identifier deux complexes principaux, un premier MT-A d'une masse de 200 kDa et un second MT-B de 875 kDa (Bokar et al., 1994). Par la suite, il a été montré dans le complexe MT-A que



**Figure 11 : Structure des complexes METTL3-METTL14 impliqués dans l'installation du m<sup>6</sup>A**

**(A)** Organisation de la structure primaire des protéines METTL3 et METTL14 humaines. MTase domain : domaine méthyltransférase. NHM : N-terminal  $\alpha$ -helical motif. CTM : C-terminal motif. ZF : motif à doigts de zinc. Modifié de Wang et al, 2016b. **(B)** Représentation tridimensionnelle de l'hétérodimère METTL3-METTL14 en complexe avec le substrat AdoMet, illustré en bâtonnet vert. Le motif DPPW, site actif de liaison au substrat est entouré en ligné hachurée. Extrait de Wang et al, 2016b. **(C)** Conservation de séquence des surfaces du dimère METTL3-METTL14. Panneau supérieur : face d'interaction du dimère avec les cibles ARN contenant le site actif de METTL3. Panneau inférieur : face opposée au site d'interaction avec les ARN. Extrait de Sledz & Jinek, 2016. **(D)** Modèle d'action proposé pour le dimère METTL3-METTL14 dans l'installation de la méthylation des ARN. METTL14 agit comme coordinateur dans la liaison aux substrats ARN et METTL3 porte l'activité catalytique. L'adénosine destinée à être méthylée se positionne dans le cœur catalytique de METTL3 encadrée par deux boucles (Active Site Loop, ASL1 et ASL2). La partie N-terminale de METTL3 possède deux motifs à doigts de zinc (ZF1 et ZF2) qui contribuent à la reconnaissance du substrat. Extrait de Sledz & Jinek, 2016.

l'activité de liaison au SAM (S-adenosyl methionine) est principalement portée par un facteur de 70 kDa, alors nommé MT-A70 (Bokar et al., 1997) et plus connu actuellement sous le nom de METTL3 (Methyltransferase like 3). Ce facteur fait partie d'une famille de méthyltransférase évolutivement conservée dont l'orthologue possède les mêmes fonctions dans l'installation du m<sup>6</sup>A chez de nombreux organismes modèles eucaryotes. Dans les cellules HeLa, la réduction de l'expression de METTL3 par siRNA conduit à une diminution d'environ 30 % du niveau de m<sup>6</sup>A soutenant l'importance du facteur dans la mise en place de la méthylation (Liu et al., 2014). Néanmoins, il a été montré que l'activité du complexe est assurée par les facteurs METTL3 et METTL14 qui agissent en hétérodimère avec un ratio de 1 pour 1 (Liu et al., 2014; Ping et al., 2014; Schwartz et al., 2014b; Wang et al., 2014c). METTL14 est un homologue de METTL3 avec lequel il partage 43 % d'identité. Ces deux facteurs possèdent un domaine méthyltransférase (Figure 11-A) mais celui de METTL14 est majoritairement dégénéré. En effet, des études de structure ont permis de démontrer que l'activité de méthylation est uniquement portée par METTL3 qui possède un domaine de liaison au SAM actif contrairement à METTL14 (Śledź and Jinek, 2016; Wang et al., 2016b, 2016c) (Figure 11-B). Le résidu adénosine destiné à être méthylé s'oriente vers le site actif de METTL3 en se stabilisant autour de deux structures en boucles. METTL3 possède par ailleurs deux motifs à doigt de zinc en extrémité N-terminale qui contribuent à la reconnaissance de l'ARN. Dans ce complexe, METTL14 n'a donc pas d'activité méthyltransférase mais elle est nécessaire pour établir et maintenir des interactions avec les ARN cibles qui sont liés par une surface hautement conservée formée par le dimère (Figure 11-C). METTL14 agit donc comme un adaptateur nécessaire à l'activité de METTL3 et à l'installation du m<sup>6</sup>A (Figure 11-D). Bien que METTL3 porte l'activité de liaison au SAM, des tests *in vitro* à partir de la protéine recombinante ont démontré qu'elle seule possède une faible activité de méthyltransférase comme METTL14 (Liu et al., 2014). À l'inverse, la présence des deux facteurs décuple l'activité de méthyltransférase démontrant un effet synergique entre les deux facteurs proposant que METTL14 soit nécessaire pour stimuler METTL3. Les complexes METTL3-METTL14 montrent une très légère préférence pour les ARN non structurés et lient préférentiellement des motifs GGAC, en accord avec la séquence consensus du m<sup>6</sup>A.

#### ➤ Le facteur WTAP

Le facteur WTAP (Wilms' Tumor 1-Associated Protein) est également crucial pour l'installation de la méthylation et interagit directement avec les dimères METTL3-METTL14 (Liu et al., 2014; Ping et al., 2014; Schwartz et al., 2014b). La diminution d'expression de WTAP par siRNA



conduit à une réduction significative du niveau de m<sup>6</sup>A dans les ARNm (Ping et al., 2014). WTAP ne possède aucune activité de méthylation mais agit comme un cofacteur des hétérodimères METTL3-METTL14. La localisation des hétérodimères METTL3-METTL14 dans des foci nucléaires (nuclear speckles), nécessaire à l'activité du complexe, est permise grâce à l'interaction avec WTAP. En effet, en l'absence de WTAP, l'adressage de METTL3 et METTL14 dans ces foci est drastiquement diminué, ce qui réduit la quantité de m<sup>6</sup>A sur les ARNm (Ping et al., 2014). À l'inverse l'absence de METTL3 ou METTL14 n'affecte pas la localisation de WTAP. Ainsi, WTAP participe à l'installation du m<sup>6</sup>A en localisant METTL3 et METTL14 dans les sites actifs nucléaires. Ces foci nucléaires regroupent également des facteurs d'épissage pouvant supporter un lien entre la méthylation et l'épissage. De même, WTAP a initialement été identifiée comme partenaire de la protéine WT1 (Wilms' Tumor 1) et est proposée comme un régulateur d'épissage en lien avec leur localisation dans ces foci nucléaires regroupant des facteurs d'épissage (Little et al., 2000). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'orthologue de WTAP, Mum2p (muddled meiosis 2) interagit également avec l'orthologue de METTL3, Ime4p (Inducer of Meiosis 4) et sont colocalisées dans le nucléole (Schwartz et al., 2013). Cette localisation est également nécessaire à la mise en place de la méthylation pendant la méiose mais dépend du facteur SLZ1 (Sporulation-specific Leucine Zipper 1). SLZ1 est le troisième facteur du complexe de méthyltransférase MIS (Mum2-IME4-SLZ1) chez la levure mais ne possède pas d'homologue chez les mammifères. Finalement, l'étude de WTAP en cellules humaines a permis de montrer que les résidus m<sup>6</sup>A associés à l'extrémité 5' (m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>) impliquent un autre complexe de méthyltransférase. En effet, la réduction de WTAP par interférence avec un ARN ne modifie pas l'abondance de pics de m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> en position +1 de la coiffe à l'inverse des m<sup>6</sup>A internes où près de 10 000 sites sont affectés (Schwartz et al., 2014b).

➤ Le facteur KIAA1429

Afin d'identifier de nouveaux partenaires du complexe de méthylation, les partenaires protéiques de WTAP ont été étudiés et ont notamment permis d'identifier la protéine KIAA1429 ou Virilizer (Horiuchi et al., 2013). La réduction de ce facteur par siRNA conduit à une diminution par 4 du niveau de m<sup>6</sup>A en cellule humaine, démontrant son implication dans l'installation de la méthylation (Schwartz et al., 2014b). Chez la mouche *D. melanogaster*, les orthologues de KIAA1429 et WTAP, qui sont Virilizer et FL(2)d (Female Lethal (2)d) respectivement, interagissent entre-eux et régulent l'épissage alternatif de certains transcrits du déterminisme sexuel (Ortega et al., 2003). Le facteur KIAA1429 contient deux régions enrichies en prolines et glutamines respectivement dont les fonctions restent inconnues (Yang et al., 2015). Bien que ce facteur soit

impliqué dans l'installation de la méthylation, sa contribution dans le complexe reste encore indéterminée à l'heure actuelle.

➤ Les facteurs RBM15 et RBM15B

Enfin, parmi les autres partenaires de WTAP, deux autres facteurs ont été identifiés : RBM15 (RNA Binding Motif protein 15) et son paralogue RBM15b (Horiuchi et al., 2013). Ces deux protéines interagissent également avec METTL3 par l'intermédiaire de WTAP (Patil et al., 2016). Dans la même optique que les autres acteurs du complexe, en ciblant RBM15 et RBM15b par siRNA en cellules humaines, une réduction significative du niveau de m<sup>6</sup>A est observée supportant leur rôle dans l'installation de la méthylation. Parmi les cibles de RBM15/RBM15B, le long ARN non codant *XIST* (X-inactive specific transcript) a été identifié. Ce transcrit est impliqué dans la répression transcriptionnelle des gènes portés par un des chromosomes X chez l'homme. Il a ainsi été montré que cet ARN porte 78 sites méthylés qui sont nécessaires à la répression transcriptionnelle menée par *XIST* sur un chromosome X. RBM15 et RBM15b semblent néanmoins avoir des rôles redondants puisque la mutation des deux est nécessaire pour baisser de façon significative le niveau de m<sup>6</sup>A sur *XIST*. Au niveau fonctionnel, ces facteurs se fixent sur des régions riches en U, adjacentes aux sites consensus de méthylation, pour recruter le complexe de méthylation *via* WTAP et induire la méthylation sur ces sites proches (Patil et al., 2016). Cette observation suggère que RBM15 et RBM15b ne sont pas directement des composants du complexe de méthylation mais qu'ils servent de médiateur dans la sélection d'une partie des cibles de ce complexe. Tous les sites consensus de méthylation ne sont pas précédés d'une région riche en U, supposant que RBM15 et RBM15b ne sont impliqués que dans un sous-ensemble de transcrits cibles du complexe. Néanmoins, ces facteurs apparaissent comme des composants conservés du complexe de méthylation puisque chez la mouche, l'orthologue de RBM15 nommée *Spenito* a été démontré dans le complexe « writer » (Lence et al., 2016). Ce facteur interagit avec *Ime4* et *Fl2(d)*, les orthologues respectifs de METTL3 et WTAP et sa réduction d'expression conduit également à une diminution du niveau de m<sup>6</sup>A chez la mouche.

### **III.2 – Les facteurs m<sup>6</sup>A-déméthylases**

La N<sup>6</sup>-methyladénosine est une modification post-transcriptionnelle particulière puisque certains facteurs peuvent activement déméthyliser ce résidu en adénosine par des processus oxydatifs ce qui suggère que cette modification pourrait être dynamique.

## ➤ Le facteur FTO

La protéine FTO fait partie d'une large famille de facteurs AlkB qui catalysent un large éventail de réactions oxydatives de déméthylation sur l'ARN ou l'ADN de façon dépendante aux ions fer ferreux (Fe<sup>II</sup>) et à l' $\alpha$ -ketoglutarate. En 2011, des premiers travaux ont d'abord suggéré que le facteur FTO puisse être une m<sup>6</sup>A-déméthylase (Jia et al., 2011). Ces travaux ont montré à partir de tests *in vitro* que la présence de FTO supprime les résidus m<sup>6</sup>A présents sur des cibles artificielles. De même, en cellules humaines la réduction de FTO par siRNA augmente de 23 % le contenu en m<sup>6</sup>A sur les ARNm alors que sa surexpression entraîne une diminution d'environ 18 % de m<sup>6</sup>A, suggérant son activité m<sup>6</sup>A-déméthylase *in vivo*. Néanmoins, cette fonction de FTO est encore débattue. Son modèle d'action a été récemment revu puisqu'il semble que les résidus m<sup>6</sup>A internes ne sont pas des cibles de FTO mais plutôt les résidus m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> adjacents à la coiffe en extrémité 5' (Mauer et al., 2017). En effet, les sites m<sup>6</sup>A affectés dans des souris mutées pour FTO sont majoritairement proches de l'extrémité 5' ce qui a orienté les auteurs de cette étude vers le fait que FTO déméthyle préférentiellement la m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>. Dans cette optique, des tests *in vitro* ont montré que pour la même quantité d'ARN, il y a besoin de 10 fois moins de FTO pour déméthyliser un m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> en extrémité 5' que pour un m<sup>6</sup>A interne. De plus, la mutation de FTO dans des cellules embryonnaires de souris augmente le ratio m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>:A<sub>m</sub> des ARNm sans affecter significativement le ratio m<sup>6</sup>A:A. Cette même étude a également mis en avant que les ARNm arborant une m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> juste après la coiffe sont moins susceptibles à l'activité de decapping de DCP2. Le m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> confère donc un avantage pour la stabilité des transcrits et FTO régule le devenir des ARNm en participant à la déméthylation de ces résidus. Bien que ces travaux tendent à reconsidérer le rôle de FTO sur le m<sup>6</sup>A, la plupart des autres études sur FTO se sont concentrées sur des sites m<sup>6</sup>A internes et ont recensé des variations de quantité en l'absence de FTO. Ceci pourrait donc suggérer que FTO agit préférentiellement sur le m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> mais aussi potentiellement dans un moindre effet sur le m<sup>6</sup>A interne.

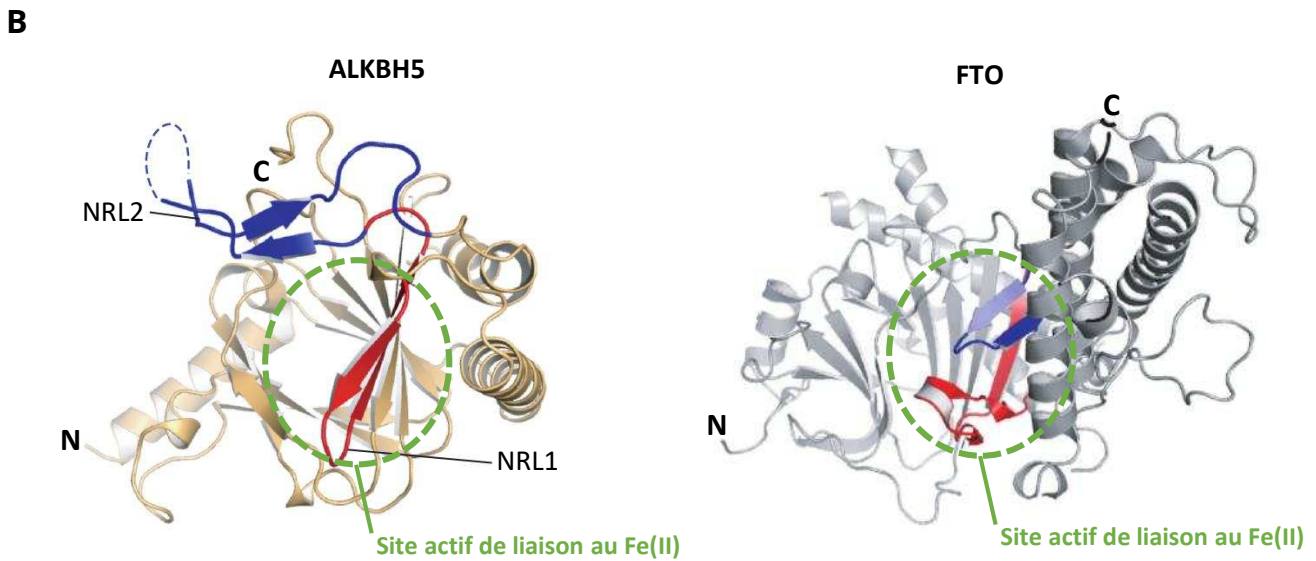
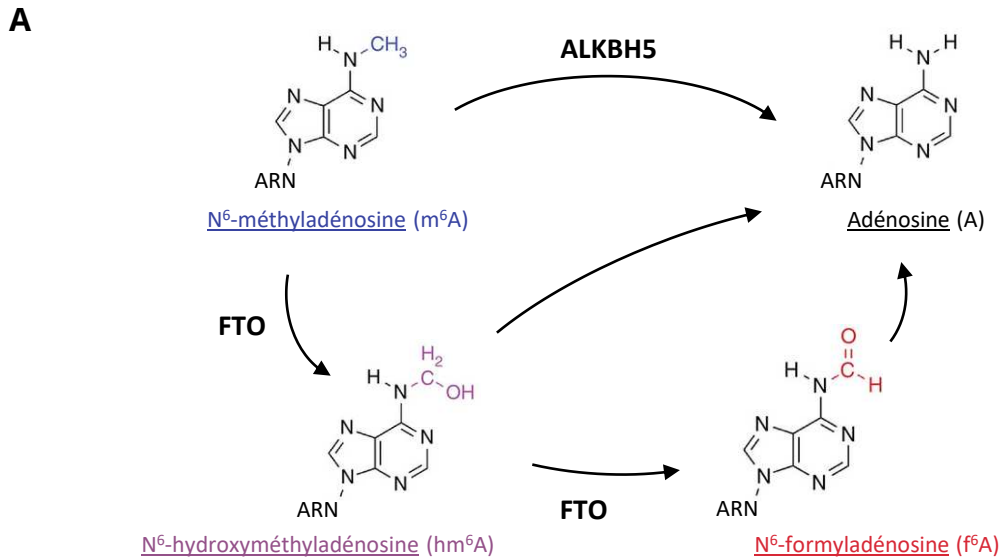
À l'origine, le facteur FTO est surtout connu pour son lien avec l'obésité (Hess and Brüning, 2014). En effet, chez les mammifères, la régulation du gène FTO conduit à des effets inverses sur l'homéostasie énergétique et la masse corporelle. La mutation du gène FTO dans la souris réduit la prise de poids et l'obésité en augmentant les dépenses énergétiques mais entraîne en conséquence des retards développementaux et une augmentation de la mortalité postnatale (Fischer et al., 2009). À l'inverse, la surexpression de FTO favorise l'obésité en augmentant la prise de poids et notamment la masse grasseuse par une hausse de la prise de nourriture (Church et al.,

2010). Plus récemment, un lien direct a pu être fait entre l'activité déméthylase de FTO et l'adipogenèse. En effet, en diminuant la méthylation sur des exons du transcrit *RUNX1T1*, FTO influence son épissage alternatif pour induire un isoforme favorisant la différenciation en tissus adipeux (Zhao et al., 2014). De façon plus sévère chez l'homme, la mutation de FTO entraîne également des retards développementaux postnatals associés à de multiples malformations (Boissel et al., 2009). L'activité de FTO est également impliquée dans le cancer où il joue un rôle d'oncogène en favorisant la suppression de m<sup>6</sup>A sur certains transcrits clés (Li et al., 2016c). L'ensemble de ces données démontre le caractère essentiel de FTO et potentiellement de la dynamique de méthylation dans le développement sans pouvoir distinguer pour le moment l'implication respective du m<sup>6</sup>A ou du m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>.

➤ Le facteur ALKBH5

Chez les mammifères, parmi les 9 membres de la famille comprenant FTO et 8 ALKBH, le facteur ALKBH5 montre également une préférence de déméthylation pour les substrats m<sup>6</sup>A (Zheng et al., 2013). La réduction d'expression de ce facteur conduit notamment à une modeste hausse du m<sup>6</sup>A cellulaire de presque 10 % et la surexpression entraîne une diminution de m<sup>6</sup>A dans les ARNm d'environ 29 %, supportant sa fonction physiologique comme m<sup>6</sup>A-déméthylase. À l'inverse de FTO, la mutation de ALKBH5 augmente seulement le niveau de m<sup>6</sup>A et pas celui du m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> (Mauer et al., 2017) ce qui supporte sa fonction déméthylase uniquement pour le m<sup>6</sup>A. Néanmoins, comme FTO, le facteur ALKBH5 est localisé au niveau de foci nucléaires suggérant que son activité s'opère principalement sur des ARNm nucléaires (Zheng et al., 2013). La mutation d'ALKBH5 augmente l'export nucléaire des ARNm et suppose que la déméthylation exercée par ALKBH5 favorise la rétention nucléaire des ARNm méthylés. Au niveau physiologique, la mutation d'ALKBH5 chez la souris entraîne des défauts de fertilité mâle en affectant les processus de spermatogénèse (Zheng et al., 2013).

Les données de littérature suggèrent que FTO et ALKBH5 catalysent leurs réactions de façon distincte sur le m<sup>6</sup>A, ce qui coïncide avec leur préférence de substrat (Figure 12-A). Les réactions oxydatives de FTO sont effectuées en deux phases distinctes sur le m<sup>6</sup>A qui génèrent un intermédiaire de réaction : le N<sup>6</sup>-hydroxyméthyladénosine (hm<sup>6</sup>A) et un autre produit final d'oxydation, le N<sup>6</sup>-formyladénosine (f<sup>6</sup>A) (Fu et al., 2013). Curieusement, ces deux formes sont détectables *in vivo* et ont une demi-vie d'environ 3 h, suggérant qu'elles n'existent pas seulement sous la forme d'intermédiaires éphémères et pourraient intervenir dans la régulation des ARNm. À l'inverse, ALKBH5 déméthyle le m<sup>6</sup>A de façon directe sans générer d'intermédiaires (Chen et al.,



**Figure 12 : Différence fonctionnelle et structurale des facteurs FTO et ALKBH5**

**(A)** Processus oxydatifs de déméthylation par les facteurs FTO et ALKBH5. Le facteur ALKBH5 déméthyle les résidus  $\text{N}^6$ -méthyladénosines sans intermédiaire de réaction alors que les réactions catalysées par FTO se font en deux étapes générant du  $\text{N}^6$ -hydroxyméthyladénosine ( $\text{hm}^6\text{A}$ ) et du  $\text{N}^6$ -formyladénosine ( $\text{f}^6\text{A}$ ) par hydrolyse supplémentaire. Inspiré de Fu et al., 2013. **(B)** Représentation de la structure tridimensionnelle des facteurs ALKBH5 (gauche) et FTO (droite). Le site actif de liaison aux ions fer ferreux ( $\text{Fe(II)}$ ) est entouré en vert. Deux boucles essentielles participant à la discrimination des substrats entre ALKBH5 et FTO sont indiquées en rouge (NRL1 : Nucleotide Recognition Loop 1) et bleu (NRL2). Modifié de Aik et al., 2014.

2014). Par ailleurs, l'acide méclofénamique a été montré comme inhibiteur spécifique de l'activité déméthylase de FTO sans modifier celle de ALKBH5 (Huang et al., 2015), attestant davantage que les deux agissent différemment. Au niveau structurel, les deux facteurs possèdent un site actif similaire et classique des protéines AlkB dioxygénases, à savoir un cœur catalytique formé par une hélice- $\beta$  double brin composée de 11 feuillets- $\beta$  et 5 hélices- $\alpha$  (Aik et al., 2014; Chen et al., 2014; Xu et al., 2014a). Néanmoins, les deux se différencient par contre au niveau de la longueur de certaines structures en boucle proches des sites actifs qui sont déterminantes dans la reconnaissance des substrats (Figure 12-B). Le site actif de FTO possède également un équivalent de couvercle formé par 2 feuillets- $\beta$  qui est absent chez ALKBH5 possédant un site actif en conformation plus ouverte. Puisque ALKBH5 ne génère pas d'intermédiaires de déméthylation, il a été proposé que son site actif plus exposé témoigne d'une action plus directe que FTO.

En résumé, le niveau de  $m^6A$  ne dépend donc pas seulement de l'activité du complexe de méthyltransférase mais également de facteurs à activité  $m^6A$ -déméthylase. Bien que le rôle de FTO soit encore controversé, ceci a permis d'élaborer un concept clé dans le métabolisme de la méthylation ARNm, à savoir la notion de modification dynamique à l'origine du terme « épitranscriptomique ».

## **IV – RÔLES BIOLOGIQUES DE LA MÉTHYLATION $m^6A$**

### **IV.1 – Les rôles cellulaires**

L'identification de tous ces facteurs contrôlant le niveau de  $m^6A$  des ARNm a permis d'établir les principales fonctions de la méthylation. Au niveau cellulaire, l'action de la méthylation ne se limite pas seulement aux ARNm puisqu'elle est également impliquée dans des processus de régulation d'ARN non codants incluant la biogénèse des miARN où la méthylation des pri-miARN facilite leur maturation (Alarcón et al., 2015b, 2015a). De plus, la méthylation du long non codant *XIST* favorise la répression transcriptionnelle des gènes du chromosome X (Patil et al., 2016). Concernant les ARNm, la méthylation affecte de nombreuses étapes de leur régulation comme l'épissage, l'export nucléaire, la stabilité et la traduction (Meyer & Jaffrey, 2017; Wu et al., 2017).

De nombreux travaux ont tout d'abord permis de relier la méthylation à un contrôle négatif de la stabilité des transcrits. Début 2014, un premier groupe a démontré en cellules humaines que la méthylation est directement responsable de la dégradation de milliers de transcrits par l'action d'un lecteur direct (Wang et al., 2014b) (Voir partie V.1.2). Les études des mutants « knockdown »

des méthylases de mammifères ont également illustré qu'avec la diminution de la méthylation, les transcrits cibles de METTL3 et METTL14 sont plus stables témoignant que la méthylation accélère leur dégradation (Batista et al., 2014; Wang et al., 2014c). De façon générale, les transcrits méthylés sont associés à une demi-vie plus courte démontrant que la méthylation est une marque favorisant le catabolisme des ARNm.

Plusieurs études ont ensuite proposé que la méthylation pourrait influencer les mécanismes d'épissage alternatifs (Yang et al., 2015). Tout d'abord, les facteurs du complexe de méthylation ainsi que les déméthylases sont colocalisés dans des foci nucléaires où s'accumulent également des facteurs d'épissage, supposant un lien entre l'installation de la méthylation et l'épissage (Liu et al., 2014). Ensuite, les données de méthylome ont souligné que la méthylation est plus abondante dans les gènes possédant plusieurs variants d'épissages par rapport à ceux codant un seul transcrit (Dominissini et al., 2012). De même, par mutation du facteur FTO, l'augmentation du niveau de m<sup>6</sup>A semble favoriser l'inclusion des exons pour les transcrits avec plusieurs variants d'épissages (Zhao et al., 2014). Sur ces transcrits, il a été proposé que la méthylation facilite le recrutement du facteur d'épissage SRSF2 (Serine and arginine-Rich Splicing Factor 2) qui favorise l'épissage constitutif (inclusion des exons) et inhibe l'épissage alternatif (exclusion des exons). Cependant, des données plus récentes obtenues en lignées cellulaires montrent que l'absence de méthylation provoquée par un knockdown de METTL3 ne modifie que très peu les profils d'épissage alternatifs (Ke et al., 2017). En analysant tous les exons internes constitutifs des transcrits portant de la méthylation, aucune différence significative d'épissage n'est apparue dans le mutant METTL3. Par ailleurs, environ 2 000 transcrits ont été identifiés pour avoir des sites de méthylation dans des exons internes alternatifs mais l'inclusion ou l'exclusion de ces exons est affectée dans seulement 5 % des transcrits en l'absence de METTL3. Ces données suggèrent donc que globalement la méthylation n'a pas d'impact sur l'épissage constitutif et un impact très mineur sur l'épissage alternatif, ce qui suggère que seuls certains transcrits spécifiques sont concernés.

La méthylation influence également la traduction des ARNm. En cellules humaines, il a été démontré qu'un lecteur direct est capable de stimuler la traduction des ARNm méthylés (Wang et al., 2015) (voir partie V.1.2). Chez la levure, les ARNm en cours de traduction dans les polysomes pendant la méiose sont enrichis en m<sup>6</sup>A par rapport aux ARNm non traduits, suggérant un rôle positif pour l'engagement traductionnel (Bodi et al., 2015). Malgré ce rôle positif, des données en cellules humaines montrent que la méthylation semble ralentir l'élongation des ribosomes (Choi et

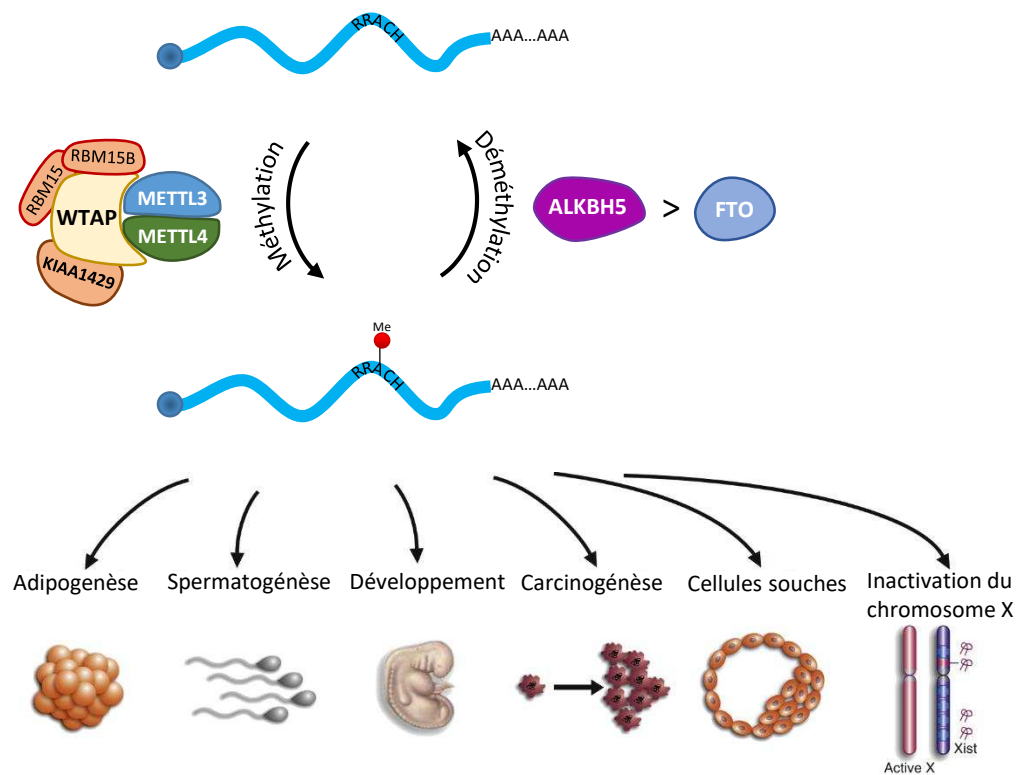
al., 2016). En effet, la présence d'un m<sup>6</sup>A dans un ARNm retarde légèrement le décodage du codon par l'ARNt associé et réduit la dynamique de lecture des ribosomes. La présence de transcrits méthylés dans les fractions des polysomes pourrait donc être également une conséquence de ce ralentissement d'élongation où un plus grand nombre de ribosomes serait assemblé sur ces ARNm.

## IV.2 – Les rôles physiologiques

Au niveau physiologique, la méthylation contribue à de nombreux processus incluant par exemple la régulation de l'horloge circadienne chez les mammifères en régulant l'expression de certains gènes clés (Fustin et al., 2013). Plusieurs travaux ont également démontré que la méthylation des ARN viraux incluant HIV-1 favorise l'infection virale (pour revue Kennedy et al., 2017). De façon générale, la méthylation chez les eucaryotes est nécessaire aux processus de développement, de différenciation cellulaire et de reproduction (Figure 13). Certains mécanismes ont notamment été reliés aux impacts cellulaires de la méthylation.

Par exemple, le rôle de la méthylation sur la stabilité des transcrits est primordial dans les transitions développementales et les processus de différenciation cellulaire où les programmes transcriptionnels sont rapidement modifiés (Aguilo & Walsh, 2017). Dans des cellules souches embryonnaires de mammifères, une première étude a montré que la mutation de METTL3 ou METTL14 diminue le taux de prolifération cellulaire en affectant à la baisse la stabilité de certains transcrits codant des facteurs de pluripotence (Wang et al., 2014c). La méthylation a donc d'abord été proposée comme nécessaire au maintien de la pluripotence et de l'auto-renouveaulement des cellules souches. Néanmoins, ce modèle a très vite été contredit par les travaux de plusieurs autres groupes. Des résultats opposés ont montré que la méthylation installée par METTL3 facilite les mécanismes de différenciation cellulaire en déstabilisant des dizaines de transcrits codant des facteurs clés du maintien de la pluripotence (*NANOG*, *MYC*, *LIN28*...). Sans la déstabilisation de ces facteurs, les mécanismes de différenciation sont inhibés et les cellules restent dans un état « naïf » pluripotent (Batista et al., 2014; Geula et al., 2015). Dans ce modèle, le facteur ZFP217 (zinc finger protein 217) a été impliqué dans le maintien de la pluripotence (Aguilo et al., 2015). Précisément, dans les cellules pluripotentes, ZFP217 séquestre METTL3 pour inhiber l'installation de m<sup>6</sup>A sur les transcrits clés de la pluripotence. Ces transcrits sont alors moins dégradés ce qui entraîne le maintien de la pluripotence cellulaire. À l'inverse, avec la diminution de la quantité de ZFP217, la méthylation est davantage installée et accélère le catabolisme de ces transcrits ce qui favorise la différenciation cellulaire. L'action de la méthylation dans les transitions développementales





**Figure 13 : Impacts physiologiques de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARNm**

Le niveau de m<sup>6</sup>A est dynamiquement contrôlé par le complexe de méthylation (METTL3, METTL4, WTAP, KIAA1429 et RBM15/15B) et les facteurs déméthylases (ALKBH5 et FTO), et affecte de nombreux processus biologiques. Inspiré de Aguilo & Walsh (2017).

semble être une caractéristique évolutivement conservée. En effet, la méthylation est également impliquée dans la transition maternelle-zygote chez le poisson zèbre (Zhao et al., 2017) et la souris (Ivanova et al., 2017). Dans les deux cas, la méthylation des ARNm maternelles contribue à faciliter leur dégradation et à enclencher le programme propre aux cellules zygotiques.

Bien que l'impact de la méthylation sur l'épissage alternatif a été montré comme mineur, un exemple précis est connu chez la mouche où la méthylation contrôle l'épissage d'un transcrit impliqué dans le déterminisme sexuel. Trois études ont illustré qu'en plus de présenter des défauts développementaux et comportementaux, les mouches mutées pour le facteur IME4 (orthologue de METTL3) affichent un biais sexuel vers les individus mâles (Lence et al., 2016; Hausmann et al., 2016; Kan et al., 2017). Ces différences s'expliquent notamment par une régulation de l'épissage alternatif du transcrit *Sxl* (Sex lethal factor) qui est requis pour le déterminisme du sexe femelle et le dosage par compensation de l'activité des chromosomes sexuels chez les mâles. Chez les mâles justement ce transcrit contient un exon interne supplémentaire qui possède un codon stop prématuré alors que chez les femelles cet exon est exclu. Il a ainsi été démontré que des sites de méthylation sont présents dans les introns de ce transcrit et favorisent l'exclusion de l'exon facilitant la différenciation femelle. Ces travaux soutiennent donc un lien entre la méthylation et la régulation de gènes liés au sexe. De même, chez les mammifères, la méthylation est nécessaire à la spermatogénèse. L'augmentation du niveau de m<sup>6</sup>A engendrée par la mutation du facteur ALKBH5 conduit à un défaut de fertilité chez les souris en raison d'évènements d'apoptoses plus fréquents chez les spermatocytes (Zheng et al., 2013). Étonnamment, la diminution du niveau de m<sup>6</sup>A par la mutation de METTL3 conduit également à un défaut de fertilité mâle supposant une régulation précise du niveau de m<sup>6</sup>A dans la spermatogénèse (Xu et al., 2017). L'absence de METTL3 conduit à la dérégulation de l'expression de dizaines de transcrits impliqués dans le cycle cellulaire et la méiose, ce qui bloque les mécanismes de différenciation des cellules spermatiques. En plus d'influencer la stabilité de ces transcrits, de nombreux évènements d'épissages alternatifs sont aussi affectés dans des gènes clés de la spermatogénèse, renforçant encore une fois le lien entre la régulation de l'épissage dépendante de la méthylation de certains transcrits et les processus de reproduction.

### **IV.3 – Les rôles moléculaires**

Au niveau moléculaire, la conséquence majeure de la méthylation est d'influencer le recrutement de protéines de liaison à l'ARN qui vont affecter le devenir des ARNm méthylés. Ce mode d'action peut tout d'abord être indirect en affectant la stabilité de structures secondaires,

qui va faciliter la liaison de certains facteurs. En effet, structurellement, la méthylation m<sup>6</sup>A est installée sur une position qui participe à l'appariement des nucléotides sur la face Watson et Crick. Dans le contexte d'un appariement double brin, cette position N<sup>6</sup> est directement impliquée dans les liaisons hydrogènes avec le résidu U complémentaire. La méthylation déposée sur cette position des adénosines diminue la stabilité de l'appariement ce qui réduit la formation de duplex ARN (Roost et al., 2015). Ainsi, ceci explique le fait que la m<sup>6</sup>A est préférentiellement détectée sur des régions de transcrits non structurées (Schwartz et al., 2013; Spitale et al., 2015). Il a ainsi été proposé que la méthylation des ARNm agisse comme un interrupteur (« m<sup>6</sup>A-switch ») pour les interactions ARN-protéines en ouvrant les structures secondaires. La déstabilisation de certaines structures en tiges boucles permet notamment de favoriser le recrutement des facteurs HNRNPC (Liu et al., 2015) et HNRNPG (Liu et al., 2017) ce qui influence l'épissage de ces cibles. *In vivo*, ce sont des milliers de sites de m<sup>6</sup>A-switch qui ont pu être identifiés ce qui propose que la méthylation puisse influencer le recrutement de facteurs HNRNP sur de multiples transcrits.

D'autre part, la méthylation peut également modifier l'affinité de certaines protéines RBP sur les ARNm. Récemment, un groupe a identifié l'ensemble des protéines d'interaction au m<sup>6</sup>A dans plusieurs types de cellules (humaines et souris) et compartiments subcellulaires (Edupuganti et al., 2017). Parmi les facteurs identifiés, certains présentent une affinité plus importante pour les transcrits méthylés incluant des HNRNP et le facteur FRM1 (Fragile X Mental Retardation 1) (voir partie V.2). À l'inverse, d'autres facteurs fixent préférentiellement un ARN non méthylé incluant G3BP1 et G3BP2, deux acteurs qui augmentent la stabilité de leurs cibles. La répulsion de ces protéines sur les ARNm méthylés pourrait donc également contribuer au rôle négatif sur la stabilité exercé par la méthylation.

Finalement, la méthylation peut être directement liée par des protéines qualifiées de lecteurs. De façon robuste, les travaux menés par Edupuganti et al. (2017) ont pu démontrer que les protéines à domaine YTH sont les lecteurs majoritaires de la méthylation des ARNm.

## **V – LES PROTÉINES DE LIAISON À LA MÉTHYLATION M<sup>6</sup>A**

La méthylation est contrôlée par le complexe de méthylation et les facteurs déméthylases et sert principalement à influencer la liaison de protéines spécifiques sur l'ARNm. Parmi ces protéines, les protéines à domaine YTH sont les plus documentées à ce jour comme des lecteurs directs. Leur étude, principalement chez les mammifères, a ainsi permis d'expliquer plus en détails

le rôle de la méthylation dans la stabilité des transcrits, l'épissage mais également dans le contrôle de la traduction.

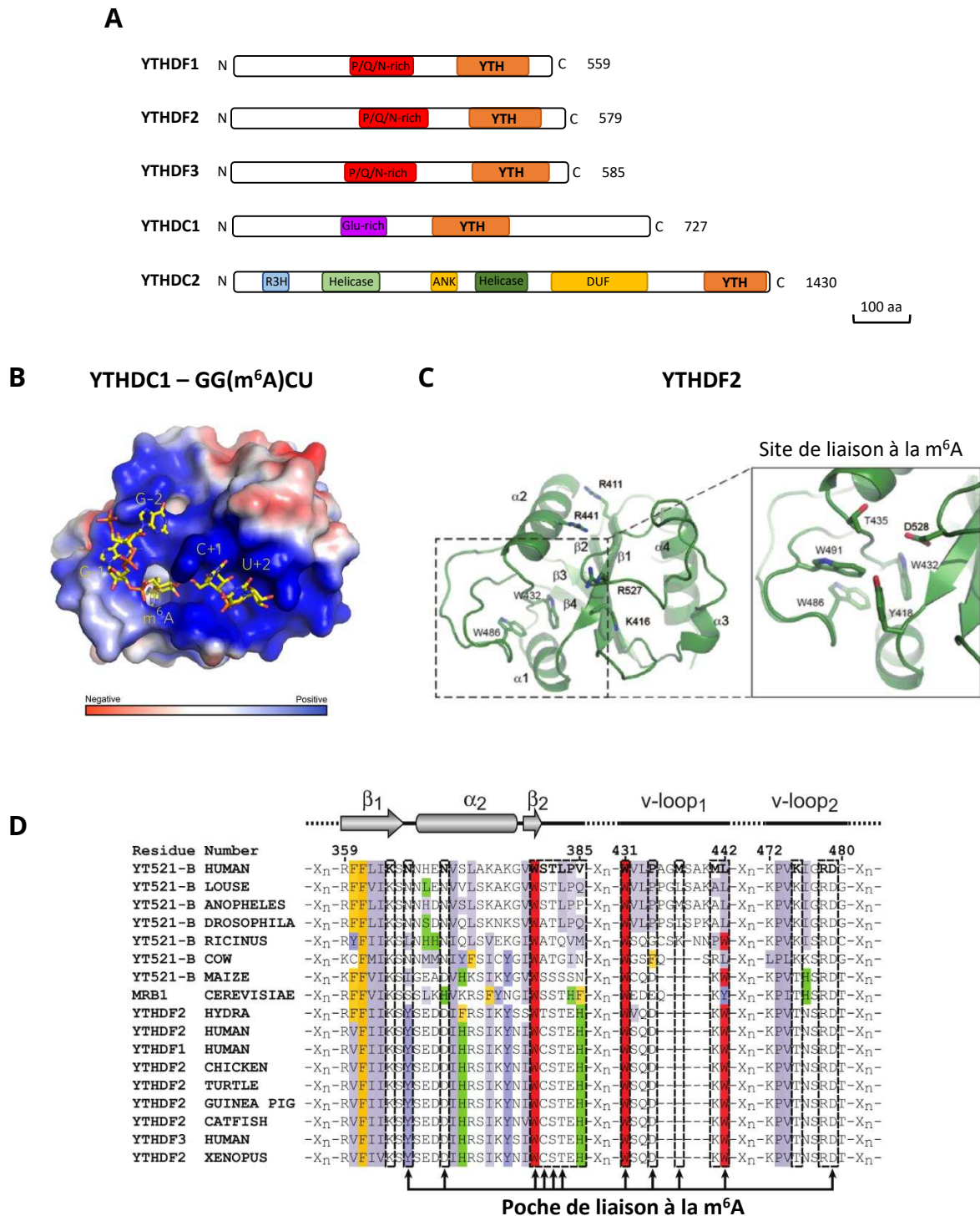
## **V.1 – Les protéines à domaine YTH**

### **V.1.1 – Structure des protéines à domaine YTH**

Le domaine YTH (YT521-B Homology) est un domaine très conservé chez les eucaryotes et a été défini avec une taille de 100 à 180 résidus selon les organismes. Ce domaine a été déterminé par homologie avec le domaine caractéristique de YT521-B aujourd'hui connu sous le nom de YTHDC1 (Stoilov et al., 2002). Au niveau structurel, il possède généralement un enchaînement de 4 hélices- $\alpha$  et 6 feuillets- $\beta$  avec une grande conservation de résidus aromatiques dans les feuillets- $\beta$ , rappelant la conformation des domaines RRM de liaison à l'ARN. Il a d'abord été montré que le domaine YTH lie des ARN simple brin *in vitro* avec une préférence de liaison sur une séquence dégénérée (Zhang et al., 2010). La fonction du domaine YTH a par la suite été précisée comme étant un domaine évolutivement conservé de liaison aux résidus m<sup>6</sup>A des ARN. À l'heure actuelle, aucun autre domaine n'est connu pour remplir cette fonction.

Chez les mammifères où les fonctions des protéines à domaine YTH sont les plus documentées, 5 de ces facteurs sont codés par le génome : YTHDF1 à 3 (YTH Domain Family protein) et YTHDC1 et 2 (YTH Domain Containing protein). Au niveau des structures, YTHDF1, 2 et 3 sont relativement similaires avec le domaine YTH présent en extrémité C-terminale et la présence en N-terminale de régions de faible complexité riches en résidus proline/glycine/asparagine (P/Q/N). YTHDC1 possède par contre un domaine YTH en position centrale avec une région riche en acide glutamique en N-terminale. Finalement, YTHDC2 est la plus complexe et possède d'autres domaines à activité hélicase (Figure 14-A). Au vu des distinctions, les protéines à domaine YTH ont été classées en deux types s'apparentant soit aux YTHDF soit aux YTHDC. Dans la première recherche de protéine de liaison aux résidus m<sup>6</sup>A, YTHDF2 et YTHDF3 ont pu être retrouvées en interaction spécifique avec une cible méthylée plutôt que non méthylée (Dominissini et al., 2012). Par la suite, la capacité de liaison aux m<sup>6</sup>A a pu être confirmée pour les 3 autres protéines à domaine YTH des mammifères à l'aide d'analyses *in vitro* d'affinité avec des cibles méthylées, d'expériences de gel retard ou encore par la résolution de leur structure tridimensionnelle en interaction avec un ARN méthylé.

La structure du domaine YTH en complexe avec un ARN méthylé a ainsi été résolue pour plusieurs protéines à domaine YTH dont les deux protéines humaines YTHDC1 (Xu et al., 2014b) et



**Figure 14 : Modalité d'interaction des protéines à domaine YTH avec les ARNm méthylés**

(A) Schéma des structures primaires des 5 protéines à domaine YTH des mammifères. Les régions conservées ou domaines sont indiqués par des couleurs différentes. ANK : répétitions ankyrine; DUF: domaine de fonction inconnue; Glu-rich : région riche en Glutamate; P/Q/N-rich : région riche en Proline/Glutamine/Asparagine; R3H : domaine R3H; Glu-rich : région riche en Glu. YTH : domaine YTH. (B) Représentation des surfaces électrostatiques de YTHDC1 en association avec un oligonucléotide GG(m<sup>6</sup>A)CU coloré en bâtonnets jaunes et rouges. Modifié de Xu et al., 2014b. (C) Structure tridimensionnelle de YTHDF2 et du site de liaison à la méthylation. La poche aromatique de liaison est principalement formée par trois tryptophanes qui établissent les contacts directs avec le m<sup>6</sup>A. Modifié de Zhu et al., 2014. (D) Alignement des séquences protéiques du site de liaison à la méthylation de certaines protéines à domaine YTH d'eucaryotes. Les résidus hydrophobes sont colorés en violet clair et ceux aromatiques en jaune, vert et rouge. Les tryptophanes essentiels à la liaison sont indiqués en rouge. Les autres résidus impliqués dans la liaison à la méthylation sont pointés par une flèche. Modifié de Theler et al., 2014.

YTHDF2 (Zhu et al., 2014), la protéine PHO92/MRB1 de levure *S. cerevisiae* (Xu et al., 2015), le facteur MRB1 de la levure *Zygosaccharomyces rouxii* (Luo & Tong, 2014) ou encore la protéine YTHDC1 (YT521-B) de rat (Theler et al., 2014). Toutes ces études s'accordent à montrer que le mode d'interaction du domaine YTH avec un ARN méthylé est extrêmement conservé. L'ARN est contacté par une surface hautement positive (Figure 14-B) et le résidu N<sup>6</sup>-méthyladénosine s'incorpore dans une poche de liaison hydrophobe formée par des résidus aromatiques conservés. Bien que plusieurs résidus hydrophobes soient impliqués dans la formation de cette cage de liaison, trois tryptophanes ont été montrés comme essentiels dans les contacts directs avec l'adénosine méthylée (Figure 14-C). En effet, la mutation de ces tryptophanes en résidus non aromatiques inhibe drastiquement la liaison aux ARN méthylés sans influencer la structure générale du domaine. Ces tryptophanes sont très conservés dans les protéines à domaine YTH suggérant un mode d'interaction similaire chez les eucaryotes (Figure 14-D). À noter que dans les protéines de type YTHDC, un des trois tryptophanes est muté en leucine mais le mode de liaison et l'affinité pour la m<sup>6</sup>A est relativement similaire. L'affinité du domaine YTH pour ses cibles méthylées a été définie par un  $K_d$  (constante d'affinité) de 1 à 2  $\mu\text{M}$  (Xu et al., 2014b, 2015; Zhu et al., 2014). Des travaux ont également suggéré que le domaine YTH puisse lier des ARN non méthylés mais dans une affinité au moins 50 fois plus faible qu'une cible méthylée (Theler et al., 2014). De plus, hormis les trois tryptophanes contactant la méthylation, d'autres résidus sont impliqués dans des liaisons avec les nucléotides voisins du m<sup>6</sup>A permettent d'expliquer la préférence d'installation de la méthylation sur la séquence consensus DRACH. Néanmoins, en testant plusieurs combinaisons de cette séquence, aucune préférence significative n'est apparue pour la fixation du domaine YTH sur un type particulier de séquence primaire (Xu et al., 2015) comme GAC ou AAC qui apparaît dans 70 % et 30 % des sites de m<sup>6</sup>A respectivement. De même, les sites de liaison à l'échelle du transcriptome des 5 protéines à domaine YTH de mammifères ne montrent pas de préférence pour un G ou un A juste avant les m<sup>6</sup>A (Patil et al., 2016).

Les expériences d'affinité des domaines YTH avec une cible méthylée ont permis d'établir des constantes d'affinité  $K_d$  de l'ordre du  $\mu\text{M}$  ce qui est néanmoins une affinité relativement faible par rapport à d'autres domaines de liaison aux acides nucléiques. En effet, cette affinité est bien inférieure aux domaines RRM ou PUF qui fixent des séquences ARN dans une affinité de l'ordre du nM voire inférieure (Chen & Varani, 2013). Ceci laisse supposer que l'interaction entre le domaine YTH et les ARNm méthylés nécessite probablement d'autres facteurs qui aident à maintenir les complexes entre ces protéines lectrices et les ARNm.

### V.1.2 – Rôle des protéines à domaine YTH chez les mammifères

À ce jour, les rôles des protéines à domaine YTH ont été presque exclusivement étudiés chez les mammifères en cellules humaines ou chez la souris (YTHDC2). Les fonctions des 5 facteurs (YTHDF1-3 et YTHDC1-2) ont été établies dans des étapes de régulation post-transcriptionnelle. Les YTHDF et YTHDC présentent des différences de localisations subcellulaires puisque les trois YTHDF sont majoritairement cytoplasmiques, YTHDC1 est nucléaire et YTHDC2 semble remplir des fonctions cytoplasmiques.

#### ➤ Le facteur YTHDF2

Le premier rôle d'une protéine à domaine YTH sur la régulation des ARNm méthylés a été documenté par l'étude de YTHDF2. Il a ainsi été montré que ce facteur est directement impliqué dans le contrôle de la stabilité des transcrits porteurs de m<sup>6</sup>A (Wang et al., 2014b). En combinant une approche de PAR-CLIP (Photoactivable ribonucleoside crosslinking and immunoprecipitation) et de RIP-seq (RNA of immunoprecipitated ribonucleoprotein complex), les auteurs de cette étude ont pu identifier de façon robuste, 1 277 transcrits cibles de YTHDF2. En l'absence de YTHDF2, ces transcrits ont une demi-vie prolongée par rapport à des transcrits non cibles, proposant que YTHDF2 favorise leur dégradation. De plus, YTHDF2 est uniquement retrouvée en interaction avec des ARNm non associés aux ribosomes et se localise dans les p-bodies où les auteurs proposent qu'elle y relocalise ses cibles pour faciliter leur dégradation. L'extrémité N-terminale de YTHDF2 est essentielle à la déstabilisation des transcrits puisque la région présente, riche en résidus P/Q/N, est responsable de son agrégation dans les p-bodies. L'adressage de la région N-terminale de YTHDF2 sur un ARNm rapporteur suffit à induire sa dégradation alors que le domaine YTH seul n'est pas suffisant. Par la suite, le mécanisme de YTHDF2 a été précisé puisqu'il a été montré qu'elle recrute le complexe de déadénylation CCR4-NOT sur ses cibles (Du et al., 2016). En interagissant de façon directe avec CNOT1, YTHDF2 induit la déadénylation de ses cibles méthylés. Encore une fois, la région N-terminale de YTHDF2 est suffisante pour induire le processus de déadénylation puisqu'elle contient la région d'interaction avec CNOT1. Curieusement, les premiers travaux de Wang et al (2014) n'avait pas montré d'effet de YTHDF2 sur le taux de déadénylation mais seulement un ARNm rapporteur avait été utilisé pouvant expliquer un effet moindre. En résumé, ces travaux sur YTHDF2 ont permis de démontrer que le domaine YTH a pour fonction unique de cibler les transcrits méthylés alors que la région N-terminale de YTHDF2 sert essentiellement à recruter d'autres facteurs ou réguler sa localisation subcellulaire. De plus, ces

études ont ainsi permis de proposer un moyen de la régulation négative des transcrits opérée par la méthylation avec l'intervention de YTHDF2.

Il a été montré que YTHDF2 est régulée de façon endogène par le biais d'un micro-ARN. En effet, la quantité du transcrit *YTHDF2* est contrôlée par le miR-145 qui lie un site dans la région 3'-UTR de *YTHDF2* (Yang et al., 2017b). La surexpression de ce miARN diminue la quantité de YTHDF2 de façon dose-dépendante et par conséquent, le niveau de stabilité des cibles de YTHDF2 augmente. À l'inverse, l'inhibition de miR-145 diminue significativement le niveau de m<sup>6</sup>A cellulaire et s'explique par une augmentation de la quantité de YTHDF2 qui stimule davantage la dégradation des transcrits méthylés. Ce mécanisme est proposé comme une voie de contrôle sur l'activité de YTHDF2.

#### ➤ Le facteur YTHDF1

À l'inverse de YTHDF2 qui agit dans la déstabilisation des transcrits méthylés, le facteur YTHDF1 favorise leur traduction sans affecter leur stabilité (Wang et al., 2015). De la même façon que pour YTHDF2, près de 1 260 transcrits cibles de YTHDF1 ont été définis par PAR-CLIP et RIP-seq. Au travers d'une approche de ribosome profiling, il a été montré que la réduction d'expression de YTHDF1 par siRNA conduit à une diminution significative du chargement des ribosomes sur ses cibles et affecte négativement leur efficacité de traduction. L'identification des partenaires protéiques de YTHDF1 a montré qu'elle interagit avec de nombreux facteurs de l'initiation de traduction dont des dizaines de protéines ribosomales et des facteurs d'initiation eIF3. Ces données ont ainsi montré que YTHDF1 facilite la traduction de ses cibles méthylées en contactant des facteurs d'initiation de traduction. Comme pour YTHDF2, la partie N-terminale de YTHDF1 est essentielle à son rôle puisqu'elle est suffisante pour induire un effet stimulateur sur l'initiation de traduction. Curieusement, bien que ce rôle soit différent de YTHDF2, les deux lecteurs YTHDF1 et 2 partagent près de 50 % de cibles communes. De même, d'autres données concernant les sites de liaison des YTHDF à l'échelle du transcriptome suggèrent qu'elles partagent principalement les mêmes sites m<sup>6</sup>A dans les ARNm (Patil et al., 2016). Ainsi, encore aujourd'hui il est difficile d'expliquer la différence des fonctions entre ces deux lecteurs, d'autant plus que les parties N-terminales de YTHDF1 et YTHDF2 partagent près de 55 % d'identité mais qui pourtant attirent des partenaires protéiques différents et induisent des effets distincts sur les transcrits méthylés. Avec une approche de cinétique après un marquage des ARN (Wang et al., 2015), un modèle a néanmoins émergé proposant que dans un premier temps les transcrits méthylés soient



liés par YTHDF1 pour être plus facilement traduits puis dans un second temps par YTHDF2 pour être dégradés (Figure 15).

### ➤ Le facteur YTHDF3

Cette vision a également été confortée avec l'étude de YTHDF3 qui semble coopérer avec YTHDF1 et YTHDF2 dans le cytoplasme. Sur le même principe, 1 239 transcrits cibles de YTHDF3 ont été identifiées avec 50 % qui sont aussi des cibles de YTHDF1 ou YTHDF2 et près de 30 % qui sont communs aux trois facteurs (Shi et al., 2017). Comme YTHDF1, le facteur YTHDF3 interagit avec de nombreuses sous-unités ribosomales et l'efficacité de traduction de ses cibles diminue lorsque YTHDF3 est éteint par siRNA (Li et al., 2017; Shi et al., 2017). Néanmoins l'effet de YTHDF3 est moins prononcé que celui de YTHDF1, suggérant que YTHDF3 agit plutôt en coopération avec ce dernier. L'hypothèse de coopération entre les lecteurs a été renforcée par le fait que les trois lecteurs interagissent entre-eux sans nécessité d'ARN donc probablement directe. De plus, la mutation de YTHDF3 diminue la spécificité de liaison de YTHDF1 et 2 sur leurs cibles méthylées, suggérant que YTHDF3 participe à la sélection des cibles des deux autres lecteurs de méthylation. Comme YTHDF2, l'absence de YTHDF3 augmente le niveau de m<sup>6</sup>A cellulaire, suggérant son rôle dans la déstabilisation des ARNm méthylés. Par marquage des ARN, il a été montré que YTHDF3 lie de façon plus précoce les ARNm méthylés par rapport à YTHDF1 qui elle-même lie les cibles avant YTHDF2. L'ensemble de ces données a donc permis de proposer que les protéines YTHDF coopèrent dans le cytoplasme pour accélérer le métabolisme des transcrits méthylés (Figure 15).

### ➤ Le facteur YTHDC1

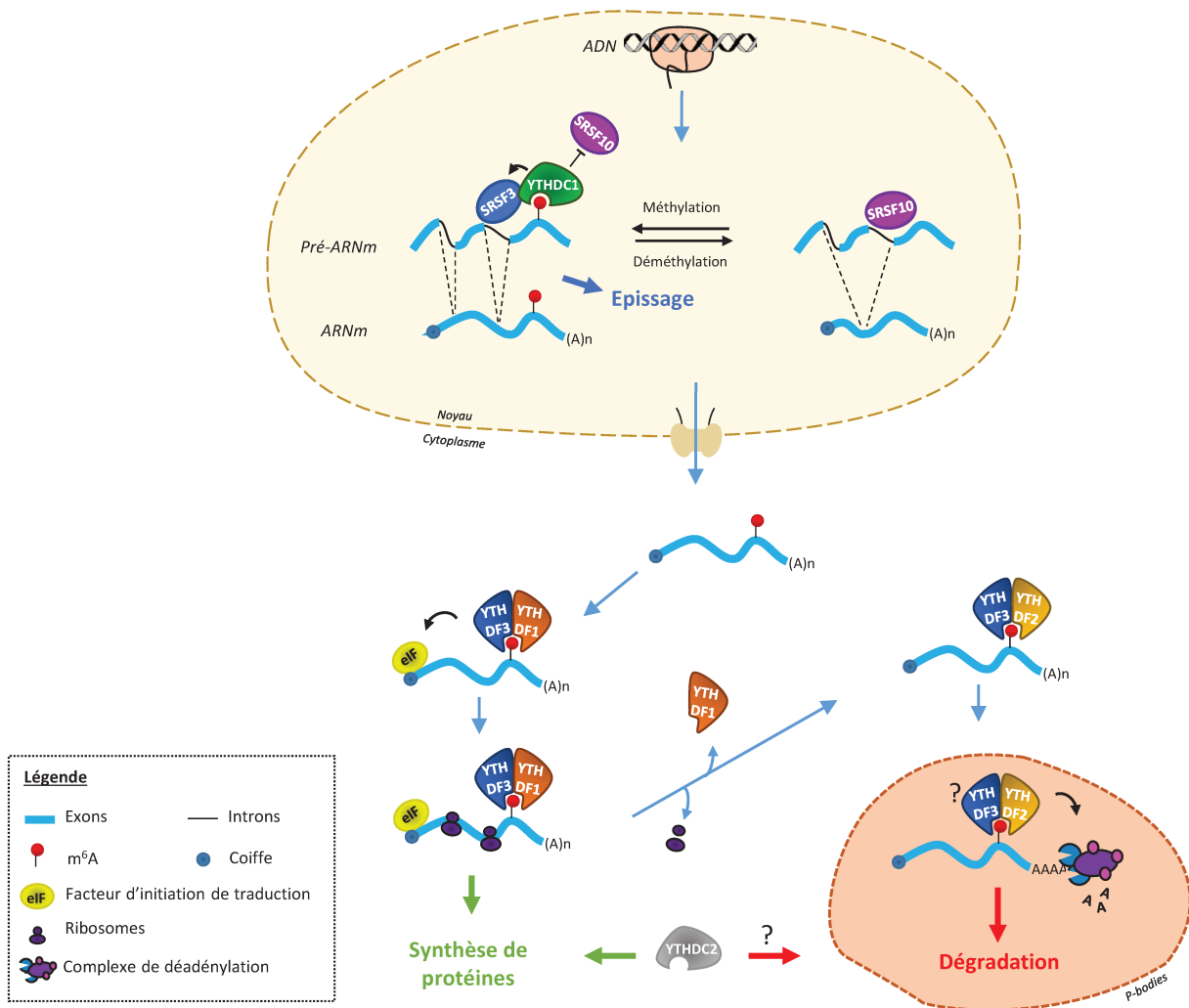
Le facteur YTHDC1 apparaît nucléaire et son rôle a été démontré dans l'épissage des ARNm méthylés. Sa fonction dans la régulation de l'épissage alternatif était déjà connue avant même de démontrer sa capacité de liaison au m<sup>6</sup>A (Rafalska et al., 2004). Le lien avec la méthylation a ensuite été exploré pour montrer que YTHDC1 favorise l'inclusion des exons des pré-ARNm méthylés (Xiao et al., 2016). En interagissant avec ses cibles, YTHDC1 recrute le facteur d'épissage SRSF3 qui facilite la reconnaissance des exons et leur inclusion. À l'inverse, YTHDC1 inhibe la fonction de SRSF10 qui facilite l'exclusion des exons. YTHDC1 favorise ainsi la localisation de SRSF3 dans les foci nucléaires de l'épissage tout en bloquant l'accumulation de SRSF10 dans ces mêmes foci. Ces données corrént avec des travaux précédents montrant que la méthylation favorise l'inclusion des exons (Zhao et al., 2014). Néanmoins, puisque globalement la méthylation affecte très peu d'évènements d'épissage alternatifs (Ke et al., 2017), cela suppose que l'impact de YTHDC1 est minoritaire ou qu'elle a un nombre réduit de cibles dans la cellule. Au-delà de son rôle

dans l'épissage des ARNm, YTHDC1 lie également une minorité d'ARN non codants dont *XIST* qui est impliqué dans la répression d'expression d'un chromosome X (Patil et al., 2016). En effet, après que RBM15/RBM15B recrute le complexe de méthylation sur l'ARN *XIST* pour y installer des dizaines de m<sup>6</sup>A, c'est uniquement le lecteur YTHDC1 qui lie *XIST*. En l'absence de m<sup>6</sup>A tout comme en l'absence de YTHDC1, la répression du chromosome X exercée par l'ARN *XIST* diminue. Le mécanisme d'action de YTHDC1 pour induire cette répression transcriptionnelle est encore peu connu mais parmi les partenaires protéiques de YTHDC1, de nombreux facteurs épigénétiques ont été identifiés comme des membres du complexe Polycomb. Cette découverte a permis de proposer pour la première fois un lien entre une modification épitranscriptomique et les régulations épigénétiques.

#### ➤ Le facteur YTHDC2

Une première étude sur des cellules cancéreuses a suggéré que YTHDC2 facilite le développement des métastases en stimulant la traduction d'ARN oncogènes comme *HIF-1α* (Tanabe et al., 2016). Néanmoins cette fonction n'a pas été corrélée avec sa capacité de lecteur de m<sup>6</sup>A. Plus récemment, il a été démontré chez la souris que YTHDC2 augmente à la fois l'efficacité de traduction de ses cibles méthylés et stimule leur dégradation (Hsu et al., 2017). En l'absence de YTHDC2, ces transcrits sont ainsi moins traduits et plus abondants. Au vu de ces effets, il est encore difficile d'expliquer comment YTHDC2 peut agir dans deux voies de régulation bien distinctes. Néanmoins, l'identification des partenaires de YTHDC2 a montré qu'elle interagit avec des facteurs impliqués dans l'initiation de traduction comme des protéines ribosomales mais aussi des facteurs des voies de dégradation comme XRN1 et XRN2 ou certains acteurs du mécanisme de « Non-sens mediated decay » comme UPF1. Au final, ces travaux proposent que les fonctions de YTHDC2 sont partiellement redondantes avec les autres YTHDF cytoplasmiques en participant à la fois dans la stimulation de traduction mais aussi dans la déstabilisation des ARNm méthylés. À noter que la localisation subcellulaire de la protéine n'a pas été étudiée mais les effets de YTHDC2 sur les transcrits méthylés ainsi que ses partenaires l'orientent vers une localisation cytoplasmique.

En résumé, l'étude des protéines à domaine YTH comme les lecteurs directs de m<sup>6</sup>A a permis de mieux comprendre le rôle de la méthylation dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm. Au vu des localisations subcellulaires des lecteurs et de la préférence de cibles (ARN non codants et pré-ARNm pour YTHDC1), on constate que la méthylation affecte les ARNm tout au long de leur vie (Figure 15). Ainsi, les ARNm méthylés sont dans un premier temps liés par YTHDC1



**Figure 15 : Rôle des lecteurs de m<sup>6</sup>A dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm méthylés**

La méthylation est dynamiquement contrôlée dans le noyau (des évidences de déméthylation cytoplasmiques ne sont toujours pas documentées) et les lecteurs de m<sup>6</sup>A régulent plusieurs étapes du métabolisme des ARNm méthylés. Dans le noyau, YTHDC1 facilite l'inclusion des exons de ses cibles méthylées en recrutant le facteur SRSF3 et en inhibant SRSF10 (Xiao et al. 2016). Dans le cytoplasme, les ARNm méthylés sont proposés pour être d'abord liés par YTHDF1 et/ou YTHDF3 qui vont stimuler leur traduction en interagissant avec des facteurs d'initiation de traduction (Wang et al. 2015; Shi et al. 2017; Li et al. 2017). Par la suite, YTHDF3 et YTHDF2 participent à la déstabilisation des transcrits (Wang et al. 2014b; Li et al. 2017). Au moins YTHDF2 relocalise les ARNm méthylés vers les p-bodies et réduit leur stabilité en recrutant le complexe de déadénylation. La localisation de YTHDF3 dans les p-bodies n'a pas été étudiée. YTHDC2 stimule également la traduction et la dégradation de ses cibles ARNm méthylés mais sa présence dans les p-bodies n'a pas non plus été étudiée (Hsu et al. 2017).

qui régule les mécanismes d'épissage alternatifs dans le noyau et favorise l'inclusion des exons. Une fois dans le cytoplasme, ils sont ensuite liés par YTHDF1 et YTHDF3 pour être plus facilement traduits puis finalement par YTHDF2 qui va stimuler leur déadénylation et faciliter leur dégradation dans les p-bodies. Au vu des données actuelles sur YTHDC2, ses fonctions seraient similaires aux YTHDF ce qui placerait ce lecteur dans le cytoplasme pour réguler à la fois la traduction et la dégradation des ARNm méthylés.

### V.1.3 – Rôle des protéines à domaine YTH en dehors des mammifères

En dehors des mammifères, le rôle des protéines à domaine YTH est peu connu et seules quelques-unes ont été étudiées chez le poisson zèbre, les levures et la mouche.

Chez le poisson *Danio rerio*, bien qu'il existe autant d'homologues de protéines à domaine YTH que chez les mammifères, seule la fonction de Ythdf2 a été récemment étudiée. Ce lecteur favorise la transition développementale du zygote en facilitant la dégradation de transcrits maternels méthylés (Zhao et al., 2017). Son rôle apparaît donc similaire à YTHDF2 des mammifères qui est aussi impliquée dans le contrôle de la stabilité des transcrits méthylés de façon générale mais aussi dans le contrôle de la transition maternelle à zygote (Ivanova et al., 2017).

Chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, une seule protéine à domaine YTH est codée par le génome qui est Pho92p (Phosphate metabolism factor 92) aussi connue sous le nom de Mrb1 (Methylated RNA Binding protein 1). Lors de la phase haploïde, ce facteur a été impliqué dans la régulation du phosphate cellulaire en stimulant la dégradation du transcrit *PHO4*, un important facteur de transcription dans la voie de signallement du phosphate (Kang et al., 2014). Le facteur Pho92p se lie sur la partie 3'-UTR du transcrit *PHO4* de façon dépendante à la quantité de phosphate et réduit sa stabilité en contactant le complexe de déadénylation *via* une interaction avec Pop2p. Son rôle rappelle celui de YTHDF2 qui est aussi capable d'interagir avec le complexe de déadénylation chez les mammifères (Du et al., 2016). Néanmoins, cette étude n'a démontré ni de lien avec la méthylation ni avec la capacité de liaison à la m<sup>6</sup>A de Pho92p. La capacité de liaison de Pho92p sur les ARNm méthylés a par la suite été démontré avec des analyses d'affinités et de structures, supportant une affinité relativement similaire aux protéines à domaine YTH des mammifères (Xu et al., 2015). Cependant, chez la levure la méthylation semble s'accumuler uniquement lors de la sporulation par méiose et d'après les données de méthylome obtenues avec un mutant *IME4* (Schwartz et al., 2013), le transcrit *PHO4* n'a pas été identifié comme méthylé dans la phase méiotique. Il a ainsi été suggéré que soit Pho92p peut lier un transcrit *PHO4* non méthylé soit que *PHO4* est méthylé de façon indépendante à *IME4*. La

présence de m<sup>6</sup>A dans les ARNm a également été démontrée dans des levures en phase haploïde mais essentiellement dépendante de Ime4p (Yadav and Rajasekharan, 2017). Les fonctions de Pho92p liées à sa capacité de lecteur de méthylation chez la levure sont donc encore peu précises.

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, il n'existe également qu'une seule protéine à domaine YTH, Mmi1p (Meiotic mRNA interception 1) qui est aussi liée à la régulation de la méiose. En phase mitotique Mmi1p cible les transcrits spécifiques de la méiose pour stimuler leur dégradation *via* l'exosome et réprimer l'induction de la méiose (Harigaya et al., 2006). La liaison de Mmi1p sur ces transcrits se fait sur le motif DSR (Determinant of Selective Removal) spécifiquement retrouvé dans les ARNm de l'induction méiotique. Bien que cette protéine à domaine YTH soit également impliquée dans le contrôle de la stabilité de transcrits comme ses orthologues de mammifères, il s'avère que Mmi1p n'a pas la capacité d'interagir avec la méthylation m<sup>6</sup>A des ARNm (Wang et al., 2016a). Il a ainsi été montré par des analyses structurales que la conformation spatiale du domaine YTH de Mmi1p ne permet pas de lier les résidus m<sup>6</sup>A à cause de mutations sur des acides aminés essentiels pour accommoder la méthylation. La cage aromatique du domaine YTH de Mmi1p n'est d'ailleurs pas impliquée dans la liaison au motif DSR mais nécessite une autre surface de liaison à l'opposé de la cage aromatique. À ce jour, Mmi1p est la seule protéine à domaine YTH documentée comme n'ayant pas la capacité de lier les résidus N<sup>6</sup>-methyadénosines. Néanmoins, aucun résidu m<sup>6</sup>A n'a été recensé chez cette espèce de levure, ce qui est cohérent avec le fait que le domaine YTH de Mmi1p n'a pas été évolutivement sélectionné pour remplir les fonctions de lecteur de méthylation.

Finalement, les deux seules protéines à domaine YTH chez la mouche *Drosophila melanogaster* ont récemment été identifiées comme lectrices de la méthylation. La première nommée GC6422 est majoritairement cytoplasmique et orthologue des protéines de type YTHDF alors que la seconde nommée YT521-B est exclusivement nucléaire et orthologue des protéines de type YTHDC (Lence et al., 2016). Dans trois études indépendantes, le lecteur nucléaire a été directement impliqué dans le décryptage de la méthylation sur le transcrit *Sxl* pour réguler son épissage alternatif et le déterminisme sexuel de la mouche (Lence et al., 2016; Hausmann et al., 2016; Kan et al., 2017). Ainsi comme chez les mammifères, le lecteur de méthylation nucléaire est impliqué dans la régulation de l'épissage, ce qui suggère une fonction conservée de la méthylation dans les processus de maturation des ARNm. Le rôle du lecteur cytoplasmique chez la mouche est cependant encore indéterminé.

## V.2 – Les autres types de lecteurs sans domaine YTH

Bien que les protéines à domaine YTH soient les principales impliquées dans la liaison aux résidus m<sup>6</sup>A des ARNm, d'autres lecteurs directs ne possédant pas de domaine YTH ont été documentés chez les mammifères. C'est notamment le cas du facteur eIF3 qui joue un rôle essentiel dans le mécanisme de traduction coiffe-indépendant en réponse au stress thermique (voir partie VI). Le facteur eIF3 est un complexe de 13 sous-unités dont au moins les sous-unités eIF3a, c, d et I sont requises pour lier le m<sup>6</sup>A (Meyer et al., 2015). Dans ce contexte, il est donc proposé que la méthylation n'est pas contactée par un domaine mais plutôt par une surface formée par plusieurs sous-unités d'eIF3. La reconnaissance au niveau structurel n'a pas été étudiée mais sa résolution pourrait aider à mieux comprendre comment un ARNm méthylé peut être lié autrement que par un domaine YTH. Par ailleurs, le facteur HNRNPA2B1 a été démontré comme facteur de liaison direct au m<sup>6</sup>A des pri-miARN pour en réguler leur maturation en miARN *via* des interactions avec DROSHA et DGCR8, des facteurs du complexe microprocesseur de maturation des miARN (Alarcón et al., 2015a, 2015b). Les modalités d'interaction restent néanmoins inconnues. Enfin, le facteur METTL3 du complexe de m<sup>6</sup>A-méthyltransférase a également été montré comme un lecteur direct de méthylation. Bien qu'elle soit majoritairement impliquée dans l'installation de la méthylation dans le noyau, METTL3 est aussi détectée dans le cytoplasme et stimule la traduction d'ARNm méthylés en interagissant avec des facteurs d'initiation de traduction comme eIF4E et eIF3 (Lin et al., 2016). Ces travaux démontrent encore une fois l'implication de la méthylation dans la stimulation de la traduction.

Plus récemment, d'autres lecteurs potentiels ont été identifiés comme des facteurs HNRNP et FMR1 (Edupuganti et al., 2017). Néanmoins, il semble que la fixation des HNRNP et de FRM1 sur les transcrits soit seulement influencée par la présence de méthylation qui augmenterait l'affinité de liaison. Il est donc encore difficile de distinguer ces facteurs comme des lecteurs directs. Ainsi, FRM1 possède entre autre trois domaines KH qui semblent tous requis pour la liaison à la méthylation mais dont les modalités d'interaction ne sont pas déterminées. FRM1 est notamment connu pour avoir un rôle de répresseur de traduction en ralentissant la progression des ribosomes une fois fixé sur ses cibles (Darnell et al., 2011). De façon intéressante, il a été montré que FRM1 partage un nombre conséquent de cibles communes avec le lecteur YTHDF1 qui agit dans la stimulation de la traduction (Edupuganti et al., 2017). Ces résultats suggèrent donc que FRM1 et YTHDF1 pourrait agir en compétition pour les mêmes ARNm méthylés mais avec une conséquence opposée sur le contrôle de la traduction. Dans le même principe, il a été montré que la

méthylation repousse le facteur G3BP1 dont les sites de fixation sur les transcrits corrént en partie avec ceux de YTHDF2. Sachant que G3BP1 a un rôle stabilisateur et YTHDF2 un rôle négatif pour la stabilité sur les transcrits, cette observation pourrait également suggérer une compétition entre G3BP1 et YTHDF2 avec des conséquences opposées pour les ARNm méthylés.

## **VI – RÔLE DE LA MÉTHYLATION m<sup>6</sup>A EN SITUATION DE STRESS**

### **VI.1 – Distribution modifiée et rôle dans la traduction**

Jusqu'à présent, seul le rôle de la méthylation et des lecteurs en situation normale ont été présentés mais qu'en est-il de l'impact de la m<sup>6</sup>A en situation de stress ? Les premiers travaux de Dominissini *et al.* en 2012 ont testé le profil global de m<sup>6</sup>A dans des cellules humaines exposées à un stress thermique, hormonal ou des rayonnements UV. Bien que mineurs, certains sites de m<sup>6</sup>A semblent être spécifiquement identifiés en réponse à un stress particulier. Cette observation a suggéré pour la première fois que le programme de méthylation des ARNm puisse être régulé en fonction de stimuli externes. Plus récemment, il a été montré en cellules humaines que la quantité de m<sup>6</sup>A installée sur les ARN poly(A)+ augmente globalement en situation de stress hypoxique (Fry *et al.*, 2017). Après avoir identifié les transcrits qui sont préférentiellement plus méthylés avec le stress, il a été démontré que la méthylation contribue à stabiliser ces transcrits au cours du stress. La stabilisation des transcrits n'augmente cependant pas leur engagement traductionnel ou la quantité des protéines associées au cours du stress mais facilite leur traduction avec le retour aux conditions normales.

Un autre rôle essentiel de la méthylation a été démontré dans la réponse au stress thermique. En effet, il a été montré en situation de stress thermique que des résidus m<sup>6</sup>A sont spécifiquement installés sur les régions 5'-UTR de certains transcrits et que ces résidus enclenchent un mécanisme de traduction indépendant de l'activation par la coiffe (Meyer *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015). En situation normale, la traduction est majoritairement initiée par la reconnaissance de la coiffe *via* le complexe eIF4F qui recrute le complexe 43S de pré-initiation. En situation de stress thermique, cette voie est majoritairement inhibée mais les auteurs ont montré que les facteurs eIF3 sont capables de lier la méthylation pour induire directement l'initiation de traduction par l'assemblage de la sous-unité 40S. Ceci suggère que la présence de m<sup>6</sup>A en 5'-UTR puisse agir de façon similaire au groupement méthyl des résidus m<sup>7</sup>G de la coiffe pour faciliter l'assemblage des complexes d'initiation de traduction. De façon intéressante, le transcrit codant HSP70 (Heat shock protein factor 70), nécessaire à la mise en place de la réponse au stress

thermique, fait partie de ces cibles arborant de la m<sup>6</sup>A en 5'-UTR et qui sont traduites par cette voie de traduction coiffe-indépendante. Ces travaux ont ainsi mis en avant que la méthylation est essentielle pour la synthèse de facteurs clés de réponse au stress par une voie de traduction alternative puisque le mécanisme principal de traduction dépendante de la coiffe est compromis avec le stress.

## **VI.2 – Régulation du lecteur YTHDF2**

La fonction des lecteurs de méthylation est très peu documentée en situation de stress. Seuls des travaux ont été menés sur YTHDF2 en situation de stress thermique où sa fonction y apparaît régulée. En effet, alors qu'en condition normale YTHDF2 stimule la dégradation des ARNm méthylés en les relocalisant dans les p-bodies, en situation de stress thermique YTHDF2 est relocalisée dans le noyau et semble lier les ARNm néo-synthétisés portant des m<sup>6</sup>A en 5'-UTR (Zhou et al., 2015). La présence de YTHDF2 protège les transcrits de l'activité déméthylase du facteur FTO et sont ainsi exportés vers le cytoplasme en conservant leur m<sup>6</sup>A en 5'-UTR, ce qui est peut ensuite stimuler leur traduction par une voie indépendante à la coiffe. Bien que le rôle de FTO soit débattu, dans cette étude ils ont démontré qu'une adénosine 2'O-méthylée n'est pas suffisante pour induire la traduction indépendante de la coiffe, supportant que l'effet est bien attribué aux résidus m<sup>6</sup>A plutôt qu'aux m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>. Ainsi, en stress thermique YTHDF2 n'agit plus dans la dégradation des transcrits mais joue plutôt un rôle protecteur et essentiel à la mise en place de la réponse au stress. Pour la première fois, des données suggèrent que les fonctions d'un lecteur de méthylation peuvent être régulées par un stimulus environnemental. À ce jour, en dehors de YTHDF2, aucun autre lecteur de méthylation n'a été étudié en situation de stress abiotiques.

## **VII – LA N<sup>6</sup>-MÉTHYLADÉNOSINE CHEZ LA PLANTE *ARABIDOPSIS THALIANA***

Le métabolisme et les fonctions de la méthylation des ARNm ont été largement étudiés chez les mammifères au cours des dernières années. À ce jour, le rôle des résidus m<sup>6</sup>A et des lecteurs de méthylation sont beaucoup moins documentés chez les végétaux.

### **VII.1 – Profil de distribution sur les ARNm**

La première détection de m<sup>6</sup>A chez la plante remonte à la fin des années 1970 chez le maïs (Nichols J.L., 1979), témoignant que la méthylation est évolutivement conservée chez les végétaux comme la grande majorité des autres modifications post-transcriptionnelles (Burgess et al., 2016). Il a été estimé chez *Arabidopsis thaliana* que la m<sup>6</sup>A représente 1,5 % des résidus adénosines ce



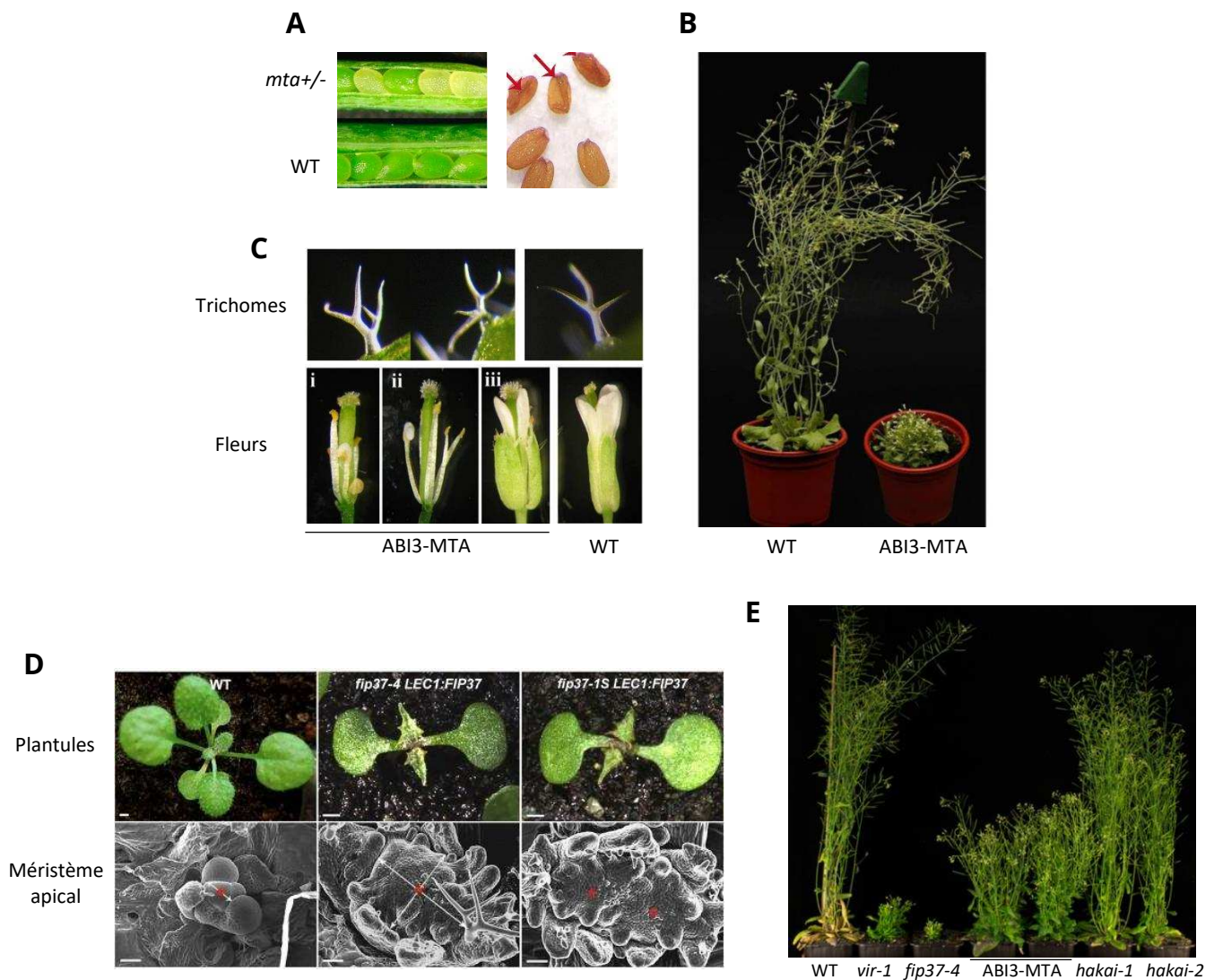
qui est relativement similaire à l'abondance mesurée chez les mammifères (Zhong et al., 2008). De même il a été montré que la méthylation est enrichie dans l'extrémité 3' des transcrits dans une région 100 à 150 résidus en amont de la queue poly(A) (Bodi et al., 2012). Plus récemment, trois études indépendantes ont pu établir le profil de méthylation à l'échelle du transcriptome (Luo et al., 2014; Shen et al., 2016; Wan et al., 2015). Des milliers de transcrits méthylés ont été identifiés dans chacune de ces études représentant même jusqu'à 19 000 transcrits soit plus de 70 % du transcriptome selon Wan et al. (2015). Bien que certains sites apparaissent spécifiques d'un type de tissu ou d'un écotype, la grande majorité d'entre-eux est commune supposant une installation sur ces sites conservés. Certains transcrits méthylés sont également communs entre la plante et les mammifères (Luo et al., 2014). Au niveau de la distribution, il a été observé que la méthylation est présente sur toute la longueur des transcrits mais affiche un enrichissement net (jusqu'à 10 fois plus) au début du 3'-UTR. De plus, comme chez les mammifères, la m<sup>6</sup>A est préférentiellement installée sur une séquence consensus RRACH (R : A ou G, H : U, A ou G). Les mêmes observations de distribution ont été faites à partir de données de méthylome chez le riz (Li et al., 2014b). Ces résultats soutiennent que la distribution non aléatoire du m<sup>6</sup>A est une caractéristique qui a été sélectionnée au cours de l'évolution même chez les végétaux. D'autre part, en plus de l'accumulation au début du 3'-UTR, une étude a également recensé un enrichissement modeste autour du codon initiateur de traduction (Luo et al., 2014). De façon intéressante, les transcrits concernés sont majoritairement associés à des fonctions chloroplastiques et liées à la photosynthèse. Cette observation a suggéré que cette distribution unique aux plantes était également associée à des fonctions spécifiques aux végétaux. Cependant, cette distribution reste encore assez débattue puisqu'elle n'a pas été retrouvée dans les autres profils de méthylome chez *Arabidopsis* (Wan et al., 2015; Shen et al., 2016). En résumé, même si des différences sont apparues entre les différents profils de méthylation établis, tous s'accordent à montrer que comme chez les mammifères, la méthylation est très abondante chez les végétaux et qu'elle est majoritairement retrouvée au début du 3'UTR.

## VII.2 – Les facteurs du complexe de méthylation

Jusqu'à présent, au moins 5 acteurs ont pu être identifiés dans le complexe de méthylation chez la plante (Růžička et al., 2017), à savoir MTA (orthologue de METTL3), MTB (METTL14), FIP37 (WTAP), VIR (Virilizer/KIAA1429) et HAKAI, un acteur dont les rôles chez les mammifères n'ont pas encore été liés à la m<sup>6</sup>A. À l'exception du facteur HAKAI, la mutation de chacun des autres facteurs

conduit à un phénotype létal dès le stade embryonnaire, témoignant du caractère essentiel de la méthylation des ARNm (Zhong et al., 2008; Shen et al., 2016; Růžička et al., 2017).

Le transcrit MTA est exprimé de façon relativement faible mais s'accumule de façon plus importante dans la graine, les fleurs et les méristèmes, suggérant un rôle pour la méthylation au moins dans ces tissus (Zhong et al., 2008). L'absence de MTA provoque un phénotype létal (Figure 16-A). La réduction du m<sup>6</sup>A dans la graine associée à la mutation de MTA entraîne ainsi un arrêt précoce du développement embryonnaire au stade globulaire. Cet effet létal a par la suite été contourné en exprimant de façon spécifique MTA pendant les stades embryonnaires à l'aide du promoteur ABI3, spécifiquement actif dans la graine (Parcy et al., 1994). Les plantes transgéniques ABI3:MTA sont viables au-delà du développement embryonnaire mais présentent de sévères défauts développementaux avec une perte de la dominance apicale (Bodi et al., 2012) (Figure 16-B). De même, ces plantes transgéniques présentent des défauts d'architecture des fleurs avec un ordre altéré des organes ou des problèmes de différenciation entre les tissus, mais également un défaut de développement des trichomes, une structure branchée sur les surfaces aériennes des végétaux (Figure 16-C). L'ensemble de ces défauts est proposé comme une conséquence de la faible expression de MTA et de la diminution de m<sup>6</sup>A dans le développement post-embryonnaire. Ceci a donc démontré qu'en plus d'être essentielle pour le stade embryonnaire, la méthylation est aussi cruciale pour le développement général des plantes. C'est en étudiant les partenaires de MTA chez *Arabidopsis* que l'implication du facteur FIP37 (FKBP12-interacting protein 37 kD) dans le complexe de méthylation a été montrée pour la première fois chez les eucaryotes avant même son orthologue WTAP (Zhong et al., 2008). FIP37 a d'abord été montrée comme crucial au développement de la plante et impliquée dans des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et de différenciation de trichomes (Vespa et al., 2004). De façon similaire à MTA, l'effet embryolétal de FIP37 a été contourné à partir de plantes exprimant un transgène spécifiquement exprimé au stade embryonnaire (LEC1:FIP37). Avec ces plantes, un rôle essentiel de FIP37 a été démontré dans le contrôle du développement du méristème apical (Shen et al., 2016). Avec une expression réduite de FIP37 entraînant une diminution de m<sup>6</sup>A sur les ARNm, les plantes présentent un défaut développemental sévère avec une prolifération excessive du méristème apical (Figure 16-D). Cette prolifération s'aggrave avec la croissance des plantes qui peuvent parfois mourir prématurément. Il a été montré que la méthylation médiée par FIP37 sur les transcrits des acteurs clés du méristème (WUSCHEL et SHOOMERISTEMLESS) permet de confiner leur expression dans le méristème apical. La m<sup>6</sup>A régulerait négativement la stabilité de ces transcrits pour restreindre la



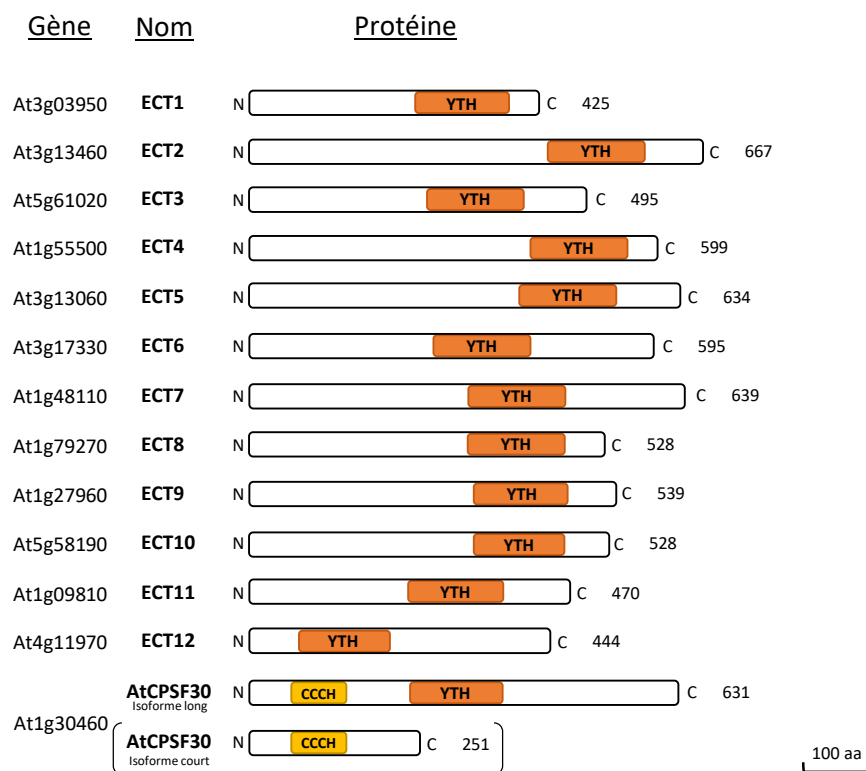
**Figure 16 : Aperçu des phénotypes liés à la réduction du m<sup>6</sup>A des ARNm chez la plante *Arabidopsis thaliana***  
**(A)** Contenu des siliques de plantes sauvages (WT, Wild type) ou hétérozygotes pour la mutation du facteur MTA. Les graines homozygotes pour la mutation *mta* apparaissent blanches (panneau de gauche) et deviennent non viables après maturation (panneau de droite). Extrait de Zhong et al., 2008. **(B)** Comparaison développementale d'une plante adulte sauvage (WT) et d'une mutant *mta* exprimant le transgène ABI3-MTA. Extrait de Bodi et al., 2012. **(C)** Comparaison de trichomes (panneau supérieur) et de fleurs (panneau inférieur) de plantes sauvages ou transgéniques ABI3-MTA. Les trichomes des plantes ABI3-MTA présentent plus de branches que ceux de plantes sauvages et présentent également des défauts d'organisation des fleurs. Dans la photo i et ii, les pétales et sépales ont été retirées. Extrait de Bodi et al., 2012. **(D)** Comparaison développementale des plantules de 15 jours sauvage ou de deux lignées mutantes *fip37* différentes exprimant un transgène LEC1:FIP37 (panneau supérieur). Le panneau inférieur montre la zone du méristème apical correspondante observée au microscope électronique. Les astérisques rouges désignent le méristème apical. Barre d'échelle : 1 mm (panneau supérieur), 50  $\mu$ m (panneau inférieur). Extrait de Shen et al., 2016. **(E)** Comparaison développementale à 7 semaines de différents mutants du complexe de méthylation chez la plante. Extrait de Růžička et al. 2017.

sur-prolifération du méristème. Ainsi, comme chez les mammifères, il apparaît que la m<sup>6</sup>A favorise la déstabilisation des transcrits. Néanmoins, la voie d'action précise n'a pas encore été étudiée.

Plus récemment d'autres facteurs ont été identifiés dans le complexe de méthylation chez la plante : MTB, VIR et HAKAI. La réduction de VIR conduit à un niveau de m<sup>6</sup>A atteignant 5 à 15 % du niveau retrouvé dans des plantes normales, celle de MTB à un niveau de 50 % et HAKAI à un niveau de 35% (Růžička et al., 2017). Ces trois facteurs sont donc requis pour la mise en place de la méthylation. Curieusement, bien que la quantité de m<sup>6</sup>A diminue, les plantes mutées pour HAKAI par un système CRISPR/Cas9 sont viables contrairement aux mutations des autres facteurs. Le développement des mutants *hakai* n'est que très légèrement affecté par rapport aux plantes sauvages, à l'inverse des lignées hypomorphes de VIR, MTA et FIP37 dont la dominance apicale est affecté de façon proportionnelle à la réduction du m<sup>6</sup>A (Figure 16-E). Chez les mammifères, ce facteur HAKAI est une ubiquitine ligase E3 qui régule de façon post-traductionnelle la stabilité d'un complexe de cadhérines E (Fujita et al., 2002). Néanmoins, ce facteur a également été identifié comme interagissant de WTAP chez les mammifères (Horiuchi et al., 2013) suggérant un rôle évolutivement conservé dans le complexe de méthylation mais encore indéterminé. Finalement, chez la plante tous les facteurs du complexe de méthylation sont principalement localisés dans le noyau supportant que comme chez les mammifères, la méthylation est installée de façon précoce sur les ARNm. L'ensemble de ces études a ainsi démontré la conservation fonctionnelle du complexe de méthylation et le rôle physiologique de la méthylation m<sup>6</sup>A pour la plante.

### VII.3 – Les facteurs m<sup>6</sup>A déméthylases

Le génome d'*Arabidopsis* code 13 protéines de la famille ALKBH (Mielecki et al., 2012). Curieusement, aucune ne semble faire partie du clade évolutif de FTO et de ALKBH5. Néanmoins, très récemment, il a été montré que le facteur ALKBH9B semble remplir le rôle de déméthylase chez la plante (Martínez-Pérez et al., 2017). Par des tests *in vitro* à partir de la protéine recombinante, les auteurs de cette étude ont montré que ALKBH9B déméthyle complètement un substrat ARN simple brin porteur de m<sup>6</sup>A. ALKBH9B est une protéine cytoplasmique et se colocalise avec les p-bodies et les siRNA-bodies, un autre type de corpuscule cytoplasmique. Curieusement, cette localisation est différente des déméthylases des mammifères puisqu'aucune évidence de localisation cytoplasmique n'a été montrée pour FTO et ALKBH5. Le rôle de ALKBH9B a seulement été étudié dans la réponse à une infection des plantes par un virus AMV (alfafa mosaic virus). Dans ce processus, il a été montré que les ARN du virus portent des résidus m<sup>6</sup>A qui sont ciblés par l'activité déméthylase de ALKBH9B. En l'absence de ce facteur, les ARN viraux sont



**Figure 17 : Structure primaire des 13 protéines à domaine YTH chez *Arabidopsis thaliana***

Le nombre total de résidus est indiqué pour chacune des protéines. Le domaine YTH est indiqué en orange et le domaine à doigts de zinc (CCCH domain) en jaune pour les 2 isoformes de AtCPSF30.

hyperméthylés et l'infection du virus est réduite. ALKBH9B est proposé comme un régulateur positif de l'infection virale par son activité déméthylase. Ces données suggèrent ainsi que la méthylation des ARN viraux contribue à diminuer leur stabilité. En dehors de ces travaux, le rôle constitutif de ALKBH9B dans la plante n'a pas été décrit.

#### **VII.4 – Les potentiels lecteurs de méthylation**

Étant donné le rôle essentiel de la méthylation dans le développement de la plante, cela laisse supposer que les lecteurs de méthylation assurent des fonctions tout aussi importantes (Fray & Simpson, 2015). Cependant, actuellement aucun lecteur de méthylation n'a été caractérisé chez les végétaux à ce jour. Malgré cela, il existe de nombreuses protéines à domaine YTH dans le règne végétal et dans une plus grande abondance que chez les mammifères avec par exemple 26 membres identifiés dans le génome de la pomme (Wang et al., 2014a), 12 chez le riz et 13 chez *Arabidopsis* (Li et al., 2014a) mais dont les fonctions sont largement inconnues. Plus particulièrement chez *Arabidopsis*, les 13 protéines à domaine YTH comprennent une famille de 12 membres nommés les ECT (Evolutionarily Conserved C-terminal region) et le facteur AtCPSF30. Au niveau des structures primaires, les protéines ECT1 à 11 possèdent un domaine YTH en position C-terminale ce qui est similaire aux protéines YTHDF humaines alors que ECT12 et AtCPSF30 ont un domaine YTH en position centrale similaire à la protéine YTHDC1 humaine (Figure 17). Parmi ces 13 protéines, AtCPSF30 est celle dont les fonctions sont les mieux renseignées. En effet, il s'agit de l'orthologue de CPSF30 (Cleavage and polyadenylation specificity factor 30 kD) qui est une protéine nucléaire requise chez les mammifères et la plante pour la polyadénylation et la terminaison de l'extrémité 3' des ARNm (Hunt, 2014). Cependant, bien qu'il s'agisse d'une protéine évolutivement conservée, le domaine YTH dans CPSF30 est retrouvé uniquement dans un isoforme spécifique des plantes supérieures. De ce fait, les fonctions d'AtCPSF30 ont principalement été étudiées sur la version de l'isoforme sans YTH correspondant à l'orthologue des animaux et de la levure. Le rôle du domaine YTH dans l'isoforme long d'AtCPSF30 reste encore inconnu.

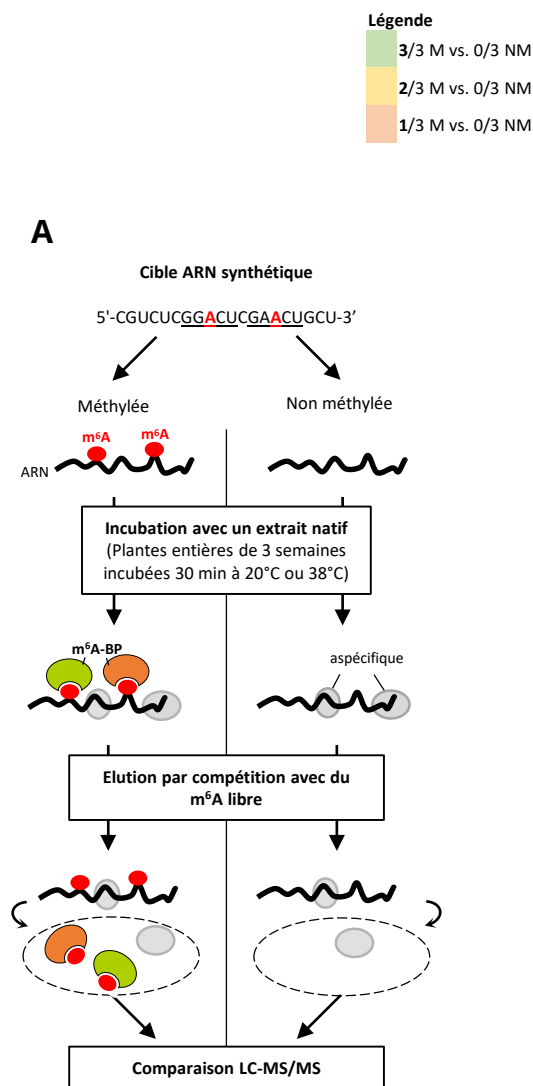
La fonction des protéines ECT est très peu documentée. Une seule étude fait part d'une implication potentielle d'ECT1 et ECT2 dans les voies de signalisation cellulaires liées au calcium (Ok et al., 2005). Par un crible double hybride, il a été montré qu'ECT1 et 2 interagissent avec le facteur CIPK1 (CBL-interacting protein kinase 1), une serine/thréonine kinase impliquée dans la réponse au calcium cellulaire. Chez les mammifères les interactions des protéines YTHDF requièrent majoritairement la partie N-terminale or en utilisant des mutants de délétion d'ECT1 et

ECT2, la présence du domaine YTH a été démontré comme indispensable à l'interaction avec CIPK1 en système double hybride. Néanmoins, l'interaction *in vivo* CIPK1 n'a cependant été confirmée que pour ECT1. De plus, ECT1 semble majoritairement nucléaire et cette localisation nécessite la présence domaine YTH. Plus généralement, aucune protéine ECT n'a été démontrée comme lecteur de méthylation mais par des analyses *in vitro*, il a été démontré qu'au moins ECT4 possède la capacité de se lier à un ARN (Li et al., 2014a). Plus récemment, un groupe a développé une approche à l'échelle du protéome pour identifier les protéines de liaison aux ARN polyadénylés (Reichel et al., 2016). Parmi les facteurs identifiés, toutes les protéines ECT, à l'exception d'ECT9 et 12, ont pu être démontrées comme facteurs de liaison aux ARN. Ces données suggèrent donc que les protéines ECT pourraient participer aux régulations post-transcriptionnelles des ARNm mais leur contribution en tant que potentiels lecteurs de méthylation demeure inconnue.

# **RÉSULTATS PRÉALABLES ET OBJECTIFS**

---





**B**      **20°C**

Score	Gène	Protéine	Activité principale décrite ou prédite	Peptides			Couverture de séquence [%]
				M 1	M 2	M 3	
44.316	At3g13460	ECT2	Liaison à l'ARN	1	2	5	11.5
42.084	At3g13060	ECT5	Liaison à l'ARN	0	2	5	13.9
8.5602	At1g43190	PTB3	Liaison à l'ARN	1	0	1	2.8
7.0904	At5g61020	ECT3	Liaison à l'ARN	0	1	2	5.5
16.17	At4g24270	EMB140	Liaison à l'ARN	0	0	2	3.1
12.29	At1g62770	PMEI9	Inhibiteur de pectine méthylestérase	0	0	2	25
6.526	At1g51590	MNS1	Maturation des N-glycanes	1	0	0	2.7

**C**      **38°C**

Score	Gène	Protéine	Activité principale décrite ou prédite	Peptides			Couverture de séquence [%]
				M 1	M 2	M 3	
15.268	-	rbcS	Membre de la petite sous-unité de la Rubisco	1	1	2	16
33.589	At3g13060	ECT5	Liaison à l'ARN	3	5	0	12.5
12.615	At1g76940	-	Liaison à l'ARN	1	0	1	13.3
11.953	At3g62820	-	Inhibiteur de pectine méthylestérase	2	1	0	13.9
8.4061	At1g71040	LPR2	Liaison ion cuivre	1	1	0	3.1
7.6375	At3g13460	ECT2	Liaison à l'ARN	1	1	0	6.8
6.2248	At3g07810	F17A17.15	Liaison à l'ARN	1	1	0	2.6
18.66	At2g19730	RPL28A	Constituant du ribosome	2	0	0	11.9
13.09	At1g05190	EMB2394	Constituant du ribosome	2	0	0	12
12.03	At2g41840	RPS2C	Constituant du ribosome	0	0	2	8.1
12.01	At4g23670	-	Liaison ion cuivre	0	0	1	16.2
10.9	At5g04430	BTR1	Liaison à l'ARN	0	2	0	8
10.73	At4g32610	-	Liaison ion cuivre	1	0	0	6.3
9.903	At2g25670	-	Inconnu	1	0	0	6.3
7.984	At5g06930	-	Inconnu	0	1	0	2.1
7.908	AtCg00020	psbA	Liaison à la chlorophylle	0	0	1	3.7
7.674	AtCg00280	psbC	Liaison à la chlorophylle	0	0	1	4
7.383	At3g05910	PAE12	Activité hydrolase	1	0	0	3.9
7.141	At3g20370	-	Inconnu	1	0	0	4.5
6.778	At4g00100	RPS13B	Constituant du ribosome	0	0	1	7.9
6.341	At1g70200	RBD1	Liaison à l'ARN	1	0	0	2.7
6.291	At5g47210	-	Liaison à l'ARN	0	0	1	3
6.242	At1g15300	-	Inconnu	1	0	0	1.6
6.223	At2g03140	-	Inconnu	0	0	1	0.6
6.179	At5g17170	ENH1	Liaison au fer	1	0	0	6.6

**Figure 18 : Identification de protéines de liaison à la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN**

**(A)** Représentation des différentes étapes de l'expérience de la colonne d'affinité à un ARN méthylé. La séquence de l'ARN synthétique de 20 nucléotide est indiquée avec les 2 sites consensus de méthylation soulignées et le A central en rouge. Les ovales gris désignent des protéines non spécifiques se liant sur l'ARN indifféremment de la présence de m<sup>6</sup>A. m<sup>6</sup>A-BP : protéines de liaison au m<sup>6</sup>A. **(B-C)** Liste des protéines spécifiquement identifiées avec la cible méthylée en condition normale **(B)** ou en situation de stress thermique **(C)**. Le nombre de peptides pour chaque protéine est indiqué pour chacun des réplicats biologiques issus de la colonne méthylée (M). Le score est dérivé de l'indice PEP (posterior error probability) qui est calculé selon la probabilité d'avoir un faux positif en fonction de la taille du peptide et de son identification. Les facteurs retrouvés dans les 3 réplicats de la colonne méthylée sont indiqués en vert, ceux 2 fois sur 3 en jaune et ceux 1 fois sur 3 en orange. Dans chacun des cas, ces facteurs n'ont pas été retrouvés à partir de la cible non méthylée.

# RÉSULTATS PRÉABLABLES ET OBJECTIFS

---

## I – IDENTIFICATION DES PARTENAIRES PROTÉIQUES DE LARP1

Pour rappel, la thématique de recherche de l'équipe est centrée sur le rôle des RBP dans les reprogrammations post-transcriptionnelles en réponse au stress thermique chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. En ce sens, les travaux publiés en 2013 dans *Cell Reports* (Merret et al., 2013) ont mis en évidence un phénomène massif de dégradation cytoplasmique sur plusieurs milliers d'ARNm médié par la protéine LARP1 et l'exoribonucléase XRN4. La découverte de ce mécanisme a néanmoins soulevé des questions sur les processus de sélection permettant le ciblage spécifique des ARNm à dégrader. Au vu de l'implication de LARP1 dans la réponse au stress, une recherche d'interactants de cette RBP a été menée par un crible double hybride. Parmi les 15 candidats identifiés par cette approche dont notamment XRN4 et PAB2, deux protéines à domaine YTH ont été reconnues : ECT2 et ECT8. Puisque les travaux sur les protéines à domaine YTH chez les mammifères montrent qu'elles régulent entre-autre la stabilité des ARNm méthylés, l'hypothèse alors émise serait que ces protéines à domaine YTH d'*Arabidopsis* puissent également agir dans la déstabilisation de certains transcrits par une interaction avec LARP1. Ce premier modèle envisagé propose que la méthylation pourrait être un moyen de cibler les transcrits à dégrader en condition de stress chez la plante et que les complexes LARP1-XRN4 seraient dirigés sur ces cibles méthylées par le biais des lecteurs potentiels de méthylation ECT2 ou ECT8. Ces suggestions impliquent néanmoins de démontrer la fonctionnalité de lecteurs de méthylation chez *Arabidopsis*, notamment ECT2 et/ou ECT8, tout comme de déterminer l'existence des interactions entre LARP1 et ECT2 ou ECT8 dans la plante.

## II – IDENTIFICATION DE PROTÉINES DE LIAISON À LA MÉTHYLATION M<sup>6</sup>A

En conséquence, les premiers travaux de ma thèse ont été dédiés à l'identification de protéines de liaisons aux résidus m<sup>6</sup>A chez *Arabidopsis thaliana*. Aucun de ces lecteurs n'avait été identifié ou caractérisé dans un végétal supérieur à cette période. Pour cela, nous avons choisi de mettre en place une approche globale en développant une chromatographie d'affinité pour un ARN méthylé (Figure 18-A). Cette méthode a déjà été utilisée en cellules humaines et chez la levure et a permis d'identifier des lecteurs de méthylation chez ces espèces (Dominissini et al., 2012; Schwartz et al., 2013). Un travail d'optimisation a été nécessaire pour exploiter cette

approche à partir de tissus végétaux, ce qui avait fait l'objet de mon stage de master 2 (Scutenaire, 2014). Avec cette approche, l'idée est de comparer par spectrométrie de masse les protéines s'associant de manière spécifique ou avec une plus forte affinité pour un ARN synthétique méthylé par rapport à un même ARN dans sa version non méthylée (séquence issue de Wang et al., 2014b). La méthode d'élution a été réalisée par compétition avec un excès de m<sup>6</sup>A libre (Dominissini et al., 2013) afin de favoriser le décrochage des facteurs affins pour la méthylation. L'approche a été conduite en triplicat biologique à partir d'extraits natifs de protéines de plantes de 3 semaines cultivées en condition normale pour déterminer les lecteurs constitutifs de la méthylation des ARN mais également à partir de plantes incubées 30 min à 38°C afin de déterminer si un stress environnemental modifie qualitativement et/ou quantitativement les facteurs de liaison à la méthylation.

En comparant les résultats obtenus pour les deux types de colonnes (méthylée ou non méthylée), 7 protéines ont été spécifiquement retrouvées dans la colonne méthylée en condition normale (Figure 18-B). Parmi celles-ci, il y a deux protéines, PTB3 et EMB140, qui ont une capacité prédite de liaison à l'ARN, le facteur MSN1 lié au métabolisme des sucres, un inhibiteur de pectine méthylestérase nommé PME19 mais surtout trois protéines à domaine YTH : ECT2, 3 et 5. En analysant les peptides identifiés, il s'avère que seule ECT2 est présente dans les trois réplicats associés avec la cible méthylée. Les autres facteurs sont identifiés dans deux des trois réplicats dont ECT3 et 5, ou un seul réplicat sur les trois. La profondeur réduite de l'approche n'a cependant pas permis d'établir d'analyses statistiques. Malgré cela, trois protéines à domaine YTH ont pu être identifiées dont ECT2 dans trois réplicats différents ce qui suggère que les protéines à domaine YTH ont une fonction conservée de liaison aux ARN méthylés.

D'autre part, en condition stressée, 25 protéines sont spécifiquement identifiées en liaison avec la cible méthylée (Figure 18-C). Parmi celles-ci, seulement un facteur est présent dans les trois réplicats avec la cible méthylée. Il s'agit d'une unité de la Rubisco, une protéine très abondante chez les végétaux qui peut potentiellement être attribuée à du bruit de fond. Les 24 autres facteurs sont présents dans un ou deux réplicats sur les trois. Au niveau de leur fonction, la majorité des candidats possède une activité prédite de liaison à l'ARN *via* la présence de domaine RRM (RNA-Recognition Motif). Il y a également des constituants structuraux des ribosomes ou encore des facteurs avec une activité prédite de liaison aux ions cuivres et fers. Finalement, deux protéines à domaine YTH, ECT2 et ECT5 sont encore une fois identifiées. En dehors de ces deux protéines à domaine YTH, aucun autre facteur n'est commun entre la condition normale et la

situation de stress. Ceci renforce l'idée que l'identification d'ECT2 et 5 est bien spécifique de leur association avec la cible méthylée et rejoint le fait que les protéines à domaine YTH ont une fonction évolutivement conservée de liaison aux ARN méthylés. Même si d'autres facteurs identifiés en condition normale ou au cours d'un stress pourraient remplir ces fonctions de liaison aux résidus m<sup>6</sup>A, il est apparu évident de se concentrer sur les protéines à domaine YTH puisque ce sont les lecteurs les plus documentés à ce jour chez les eucaryotes.

D'autre part, même si l'approche de protéomique n'a pas été menée avec un paramètre quantitatif, il est intrigant de voir que le nombre de peptides d'ECT5 est très similaire entre les deux conditions environnementales (7 peptides au total dans les trois réplicats à 20°C contre 8 peptides à 38°C) alors que le nombre de peptides d'ECT2 diminue par 4 dans la condition stressée. En considérant les trois réplicats, le nombre de peptides pour ECT2 passe ainsi de 8 en condition normale à 2 en situation de stress thermique. Dans la même optique, ECT3 n'est pas retrouvée dans la situation de stress. Bien que cette observation soit très préliminaire, elle pourrait suggérer que le stress puisse influencer sur la capacité d'ECT2 et/ou ECT3 à interagir avec un ARN méthylé. Au vu d'une telle hypothèse, il est apparu indispensable d'explorer plus en détails le lien entre le stress thermique et la fonction des lecteurs de méthylation chez *Arabidopsis*.

### III – OBJECTIFS

Au cours des dernières années, de nouvelles voies de régulation de l'expression sont apparues avec la découverte de modifications pos-transcriptionnelles comme la N<sup>6</sup>-méthyladenosine pouvant influencer le devenir des ARNm. À l'image de l'épigénétique sur l'ADN, ce nouveau code épitranscriptomique est gouverné par l'action des lecteurs directs de ces modifications qui apportent un niveau supplémentaire de régulation post-transcriptionnelle. Ainsi, pour comprendre le rôle de la méthylation m<sup>6</sup>A sur le métabolisme des ARN messagers, il est primordial d'élucider l'action de ces lecteurs et de leurs effets sur les transcrits méthylés. C'est dans cette optique que s'inscrivent ces travaux de thèse avec pour objectif d'identifier et de caractériser les fonctions du premier lecteur de méthylation des ARNm chez *Arabidopsis thaliana*. Au vu des données existantes chez l'homme et des résultats préliminaires de colonne d'affinité, notre choix s'est rapidement orienté vers l'étude des protéines ECT, c'est-à-dire les protéines à domaine YTH chez la plante. Néanmoins, même si trois d'entre-elles ont été identifiées avec une cible ARN méthylée en condition normale, il est apparu judicieux de se concentrer plus précisément sur le candidat ECT2. En effet, les premières données pointent sur le fait qu'ECT2 : (i)

est un interactant en double hybride de LARP1, une protéine largement impliquée dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des ARNm ; (ii) est la protéine candidate retrouvée de façon systématique (3 réplicats) avec un ARN synthétique méthylé en condition normale ; (iii) semble moins s'associer à une cible méthylée en situation de stress thermique pouvant suggérer une modification de sa capacité de liaison à la méthylation. Ces travaux de thèse ont donc été axés autour de plusieurs questions afin d'étudier plus précisément le rôle de cette protéine :

1- La protéine ECT2 est-elle une protéine de liaison aux ARNm méthylés chez *Arabidopsis thaliana* ? Quel est son rôle dans le développement ?

Pour répondre à ces questions, une première description globale du facteur ECT2 a été effectuée. Tout d'abord, des analyses évolutives de protéines à domaine YTH ont été effectuées pour déterminer si ECT2 possède effectivement la capacité à lier la méthylation des ARNm. Ainsi, des approches *in vivo* ont été développées pour y étudier son association avec des cibles porteuses de m<sup>6</sup>A. Puisque la méthylation est essentielle à la survie et au développement des plantes, le rôle d'ECT2 dans le développement a été évalué. Enfin, la localisation subcellulaire de la protéine a été étudiée pour dégager une première piste quant à sa fonction moléculaire. Ces travaux concernent l'ensemble du Chapitre I.

2- Quels sont les partenaires protéiques de la protéine ECT2 ?

Pour tenter de répondre à cette question, j'ai réalisé une approche non ciblée consistant à déterminer dans quel(s) complexe(s) la protéine ECT2 s'intègre. Pour cela, une recherche de partenaires protéiques a été effectuée à l'échelle du protéome. L'identification des partenaires a ainsi permis d'émettre des hypothèses sur les fonctions moléculaires d'ECT2. Cette approche fera l'objet du Chapitre II.

3- Quel est le rôle d'ECT2 dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des ARN messagers en lien avec ses partenaires ?

Nous savons que les protéines à domaine YTH humaines sont impliquées dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des transcrits méthylés. Ainsi par une approche ciblée, les fonctions moléculaires d'ECT2 ont été étudiées plus particulièrement en lien avec la protéine LARP1, un partenaire potentiel d'ECT2 impliqué dans ces voies de régulation post-transcriptionnelles. L'analyse principale a consisté à mesurer l'impact d'ECT2 sur le translatome à l'aide d'une approche de séquençage d'ARN. Ces approches seront développées au cours du Chapitre III.

4- Les conditions environnementales régulent-elles les fonctions d'ECT2 ? Et si oui, par quel(s) moyen(s) ? ECT2 joue-t-elle un rôle dans les voies de réponse à un stress thermique ?

Curieusement, l'expérience de colonne d'affinité à une cible ARN méthylée suggère une différence d'association d'ECT2 en condition de stress. Ainsi, des travaux ont été menés pour définir si la capacité d'ECT2 à lier la m<sup>6</sup>A pourrait être modifiée avec un stress thermique et pour découvrir comment une telle régulation est possible. De plus, l'implication d'ECT2 dans la réponse au stress a été mesurée en lien avec le fait qu'elle interagit avec LARP1, un acteur impliqué dans les mécanismes d'adaptation des plantes au stress thermique. Ces points seront finalement étudiés dans le Chapitre IV.



# **RÉSULTATS**

---



# RÉSULTATS

---

## CHAPITRE I – CARACTÉRISATION D’ECT2 COMME LECTEUR DE MÉTHYLATION ET ÉTUDE DE SON RÔLE DANS LE DÉVELOPPEMENT

Jusqu’à présent aucune protéine de liaison à la méthylation m<sup>6</sup>A n’a été identifiée chez un organisme du règne végétal. Les données précédentes de chromatographie d’affinité pour un ARN méthylé ont permis de mettre en avant la protéine ECT2 et d’autres ECT comme candidats pour remplir ces fonctions. Ce premier chapitre regroupe des travaux faisant l’objet d’un article soumis récemment au journal *The Plant Cell*. Ces travaux ont eu pour objectif de faire une première description globale sur la protéine ECT2 en tant que protéine de liaison à la m<sup>6</sup>A chez *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, sa fonction de liaison aux ARNm méthylés a été étudiée tout comme son implication dans le développement de la plante. Les analyses évolutives menées au cours de ces travaux nous ont amenés à renommer la protéine ECT2 par AtYTHDF2A (DF2A). Néanmoins, en dehors des travaux de cet article, le nom d’ECT2 a été conservé pour l’ensemble de ce manuscrit.

Au niveau physiologique, le rôle d’ECT2 a été étudié plus particulièrement dans le développement des trichomes où deux études précédentes ont montré que leur morphologie pourrait être liée à la méthylation. En effet, des défauts de trichomes sont engendrés en diminuant l’expression de MTA (Bodi et al., 2012) ou en surexprimant FIP37 (Vespa et al., 2004), deux acteurs du complexe de m<sup>6</sup>A-méthyltransférase. Les trichomes sont des structures cellulaires spécialisées présentes sur les surfaces aériennes des végétaux qui participent à de nombreuses fonctions comme la protection face aux insectes herbivores, la réduction des pertes d’eau lors de la respiration ou encore la protection contre les UV (Serna and Martin, 2006). Chez certaines espèces les trichomes sont des structures unicellulaires très étendues comme chez le coton (*Gossypium* spp) où ils servent à l’industrie textile. Chez *Arabidopsis thaliana*, les trichomes sont également unicellulaires et sont couramment étudiés comme modèles dans les processus de différenciation cellulaire (Yang & Ye, 2013). Sur la surface abaxiale des feuilles, la cellule de trichome est multibranchée et possède généralement 3 branches et plus rarement 4 branches. Le trichome a la particularité d’être une cellule générée par endoreduplication, c’est-à-dire que son contenu en ADN est répliqué sans subir de division nucléaire. En moyenne, le contenu ADN d’un trichome est de 32C suggérant au moins 4 cycles d’endoreduplication. De nombreux mutants liés au cycle cellulaire montrent des défauts de branchages suggérant que le nombre de branches est

directement relié à l'état de ploïdie du trichome (Perazza et al., 1999). Ainsi, dans les plantes surexprimant FIP37, l'augmentation du nombre de branches sur les trichomes a été directement relié à un problème d'endoréduplication (Vespa et al., 2004). En dehors d'un défaut de cycle cellulaire, la croissance des trichomes et le nombre de branches sont également régulés par les réseaux du cytosquelette (Tian et al., 2015; Mathur and Chua, 2000).



1 **The YTH domain protein AtYTHDF2A (*ECT2*) from *Arabidopsis thaliana* is an**  
2 **m<sup>6</sup>A reader required for normal trichome branching**

3 Jérémy Scutenaire<sup>a,b</sup>, Jean-Marc Deragon<sup>a,b</sup>, Viviane Jean<sup>a,b</sup>, Jean-Jacques  
4 Favory<sup>a,b</sup>, Rémy Merret<sup>a,b,1</sup> and Cécile Bousquet-Antonelli<sup>a,b,1</sup>

5

6 <sup>a</sup>LGDP-UMR5096, CNRS 58 av. Paul Alduy 66860 Perpignan, FRANCE

7 <sup>b</sup>LGDP-UMR5096, Université de Perpignan Via Domitia, 58 av. Paul Alduy 66860  
8 Perpignan, FRANCE

9 <sup>1</sup>Address correspondence to [remy.merret@univ-perp.fr](mailto:remy.merret@univ-perp.fr) or [cecile.antonelli@univ-](mailto:cecile.antonelli@univ-perp.fr)  
10 [perp.fr](mailto:cecile.antonelli@univ-perp.fr). The authors responsible for distribution of materials integral to the findings  
11 presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions to  
12 Authors ([www.plantcell.org](http://www.plantcell.org)) are Rémy Merret ([remy.merret@univ-perp.fr](mailto:remy.merret@univ-perp.fr)) and Cécile  
13 Bousquet-Antonelli ([cecile.antonelli@univ-perp.fr](mailto:cecile.antonelli@univ-perp.fr)).

14

15 **ABSTRACT**

16 Methylations at position N<sup>6</sup> of internal adenosines (m<sup>6</sup>As) are the most abundant and  
17 widespread of mRNA modifications. They play crucial roles for organisms  
18 reproduction, growth and development by controlling gene express pattern at the  
19 post-transcriptional level. Their function is decoded by so called readers, that share  
20 the structured YTH domain, which forms an hydrophobic pocket directly  
21 accommodating the m<sup>6</sup>A residue. While the physiological and molecular functions of  
22 YTH readers have been extensively studied in animals, no data is available so far on  
23 plant readers and this despite the fact that m<sup>6</sup>As are crucial for their survival and  
24 development. Higher plants contain high numbers of YTH-domain proteins. We  
25 provide here their comprehensive evolutionary analysis and demonstrate that they  
26 are highly likely to be actual readers with redundant but also specific cellular  
27 functions. We also show, that the YTHDF2A (*LECT2*) protein from *Arabidopsis*  
28 *thaliana* is binding to m<sup>6</sup>A containing RNAs *in vivo* and that this property relies on the  
29 m<sup>6</sup>A binding pocket carried by its YTH domain. DF2A is mainly cytoplasmic and  
30 relocates to stress granules upon heat exposure, suggesting that it acts to control  
31 mRNA fate in the cytosol. As previously found for m<sup>6</sup>As, we demonstrate that DF2A  
32 m<sup>6</sup>A binding ability is required for normal trichome formation and propose that this  
33 reader acts alone to mediate m<sup>6</sup>A role in trichome branching.

34

35 **INTRODUCTION**

36 Gene expression regulation is a multi-layered process that takes place at the  
37 transcriptional and post-transcriptional level and is crucial for organism development,  
38 growth and survival. Recently, chemical modification of mRNAs emerged as an  
39 additional and important layer in the control of gene expression. The repertoire of

40 these modifications on the transcriptome, represents what is now called the cell  
41 "RNA Epigenome" (He, 2010) or "Epitranscriptome" (Saletore, Meyer et al., 2012).  
42 Methylation at position N<sup>6</sup> of internal adenosines (m<sup>6</sup>As) is the most abundant and  
43 widespread of these modifications. It is conserved and found on mRNAs of most  
44 eukaryotes such as animals (Dominissini, Moshitch-Moshkovitz et al., 2013), yeast  
45 (Schwartz, Agarwala et al., 2013) or higher plants (Li, Wang et al., 2014, Luo,  
46 MacQueen et al., 2014, Wan, Tang et al., 2015) and represents some 1.5% of the  
47 total number of adenosines on mRNAs. m<sup>6</sup>As are enzymatically deposited by a so  
48 called "writer" complex and can be reverted to unmodified As, by so called "erasers".  
49 The core of the heteromultimeric writer complex is composed of METTL3, the active  
50 methylase, METTL14, a degenerated methylase that acts to activate METTL3 and is  
51 required for recognition and binding to RNA substrates (Sledz & Jinek, 2016, Wang,  
52 Doxtader et al., 2016) and WTAP, a stabilizing cofactor required for m<sup>6</sup>A deposition  
53 (Schwartz, Mumbach et al., 2014) and localization of the complex to nuclear speckles  
54 (Ping, Sun et al., 2014). In animals this complex was also found to contain the  
55 KIAA1429 (fly Virilizer (Lence, Akhtar et al., 2016)) protein which associates with  
56 METTL3 (Schwartz et al., 2014). The m<sup>6</sup>A writer complex not only targets mRNAs,  
57 but also pol II non coding RNAs such as primary transcripts of microRNAs (pri-  
58 miRNAs) (Alarcon, Lee et al., 2015), long non-coding RNAs (lncRNAs) (Dominissini  
59 et al., 2013, Meyer, Saletore et al., 2012), circular RNAs (circRNA) (Yang, Fan et al.,  
60 2017) or small nuclear (snRNA) (Bringmann & Luhrmann, 1987) and nucleolar RNAs  
61 (snoRNAs) (Linder, Grozhik et al., 2015). m<sup>6</sup>A deposition is a co-transcriptional  
62 process, that was shown in mammalian cells to take place carried on pre-mRNA  
63 before splicing is completed (Ke, Pandya-Jones et al., 2017). m<sup>6</sup>As are not evenly  
64 distributed on an mRNA molecule; they are found at the RRACH (R=G/A, H: U>A>C)

65 consensus site (GAC in 70% of the cases) and almost exclusively on exons,  
66 preferentially long internal exons with a very strong enrichment in terminal exons and  
67 3'-UTRs (Dominissini et al., 2013, Ke, Alemu et al., 2015, Meyer et al., 2012,  
68 Schwartz et al., 2013, Schwartz et al., 2014).

69 The biological consequences of m<sup>6</sup>A methylation are multiple but a common feature  
70 is that it is required in fundamental processes in all studied organisms. m<sup>6</sup>As were  
71 found to be necessary for cell survival and proliferation in mammals (Dominissini et  
72 al., 2013, Wang, Li et al., 2014b), cell fate determination in yeast and mammals  
73 (Agarwala, Blitzblau et al., 2012, Chen, Hao et al., 2015, Wang et al., 2014b),  
74 gametogenesis and zygote development in mice (Hsu, Zhu et al., 2017, Ivanova,  
75 Much et al., 2017), sex determination and neuronal functions in fly (Hausmann, Bodi  
76 et al., 2016, Kan, Grozhik et al., 2017, Lence et al., 2016). At the cellular level under  
77 constitutive growth conditions, m<sup>6</sup>A marks trigger mRNA turnover (Du, Zhao et al.,  
78 2016, Ke et al., 2017, Shi, Wang et al., 2017, Wang, Lu et al., 2014a) and stimulate  
79 translation (Hsu et al., 2017, Li, Chen et al., 2017, Shi et al., 2017, Wang, Zhao et al.,  
80 2015). In mammals and fly at least, transcriptome wide analyses demonstrated that  
81 the m<sup>6</sup>A mark does not influence constitutive splicing and has only a very marginal  
82 impact on alternative splicing (Ke et al., 2017, Lence et al., 2016). Likewise, m<sup>6</sup>A was  
83 found to have an inhibitory impact on proximal polyA site choice, but its involvement  
84 on alternative polyadenylation is very limited, at least under normal growth conditions  
85 (Ke et al., 2015). The m<sup>6</sup>A mark also acts directly on chromatin where it contributes  
86 to DNA repair (Xiang, Laurent et al., 2017) and to X-Inactive Specific Transcripts  
87 (XIST)-dependent gene silencing (Patil, Chen et al., 2016). At the molecular level,  
88 this epitranscriptomic mark directly influences the recruitment of RNA Binding  
89 Proteins (RBPs) to the transcript. Firstly m<sup>6</sup>As can act as molecular switches

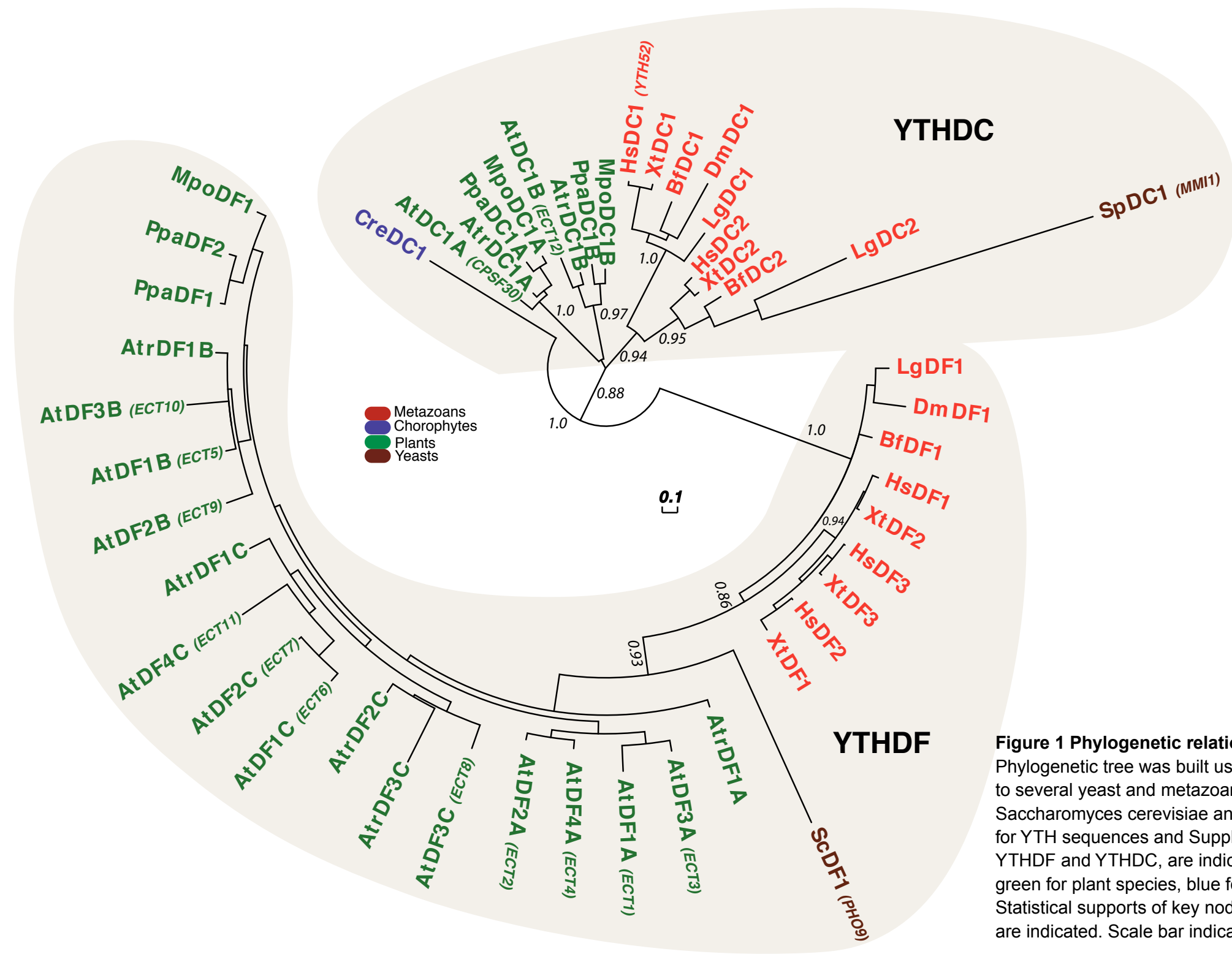
90 controlling the RNA-structure dependent accessibility of RBPs. They were indeed  
91 found to remodelate local structures and by doing so to enhance the binding of the  
92 HNRNPC protein to mRNAs and lncRNAs (Liu, Dai et al., 2015). Secondly they  
93 directly influence the binding affinity of RBPs in a sequence dependent manner,  
94 either repelling or attracting proteins by decreasing or increasing their affinity for RNA  
95 (Edupuganti, Geiger et al., 2017). Finally, they can act as anchors for so called "m<sup>6</sup>A  
96 readers". These readers form a large family of eukaryotic proteins that share the YTH  
97 (YT512-B Homology) domain (Zhang, Theler et al., 2010). YTH domains form two  
98 evolutionary clades, named DC and DF which adopt a similar  $\alpha$ -helix- $\beta$ -sheet fold  
99 forming an hydrophobic pocket containing two to three aromatic residues essential  
100 for m<sup>6</sup>A mononucleoside binding (Li, Zhao et al., 2014, Luo & Tong, 2014, Theler,  
101 Dominguez et al., 2014, Xu, Wang et al., 2014, Zhu, Roundtree et al., 2014). Three  
102 of the DF type (YTHDF1-3) and two of the DC type (YTHDC1 and 2) proteins are  
103 present in mammals (Wang & He, 2014). The YTHDF1-3 proteins act in a  
104 cooperative and integrated manner in the cytoplasm of mammalian cell lines to  
105 convey the constitutive roles of m<sup>6</sup>A on mRNA translation and stability control (Shi et  
106 al., 2017). YTHDF3 facilitates the m<sup>6</sup>A binding of YTHDF1 which in turn recruits  
107 either components of the translation initiation machinery to promote mRNA  
108 translation (Shi et al., 2017, Wang et al., 2015) or the YTHDF2 protein which triggers  
109 mRNA decay (Du et al., 2016, Shi et al., 2017, Wang et al., 2014a). In mice testis,  
110 the m<sup>6</sup>A-dependent binding of YTHDC2 to few hundred mRNAs promotes their  
111 translation and trigger their decay respectively through recruitment of components of  
112 the translation initiation machinery and of actors of the mRNA turnover process (Hsu  
113 et al., 2017). Human YTHDC1 mediates the role of m<sup>6</sup>A on transcriptional repression.  
114 Indeed it binds to the XIST RNA on its m<sup>6</sup>A marks and is required to transcriptionally



115 inactivate genes present on the XIST-targeted X chromosome (Patil et al., 2016). In  
116 fly, Ythdc1 mediates the role of m<sup>6</sup>A on the alternative splicing of *sex lethal (sxl)*,  
117 specifically promoting the excision of its male specific intron in female (Hausmann et  
118 al., 2016, Kan et al., 2017, Lence et al., 2016). Consistently with their m<sup>6</sup>A reader  
119 functions, the physiological roles of these YTH proteins overlap those of the writer  
120 complex. The YTHDF2-mediated decay of mouse oocyte transcripts is determinant  
121 for proper female gametogenesis and early zygotic development (Ivanova et al.,  
122 2017). In mice, YTHDC2 is crucial for both male and female fertility ; its loss of  
123 function mutant affecting meiosis progression during both spermatocyte and oocyte  
124 formation (Hsu et al., 2017). In fly, loss of Ythdc1 or Ime4 (the homolog of METTL13)  
125 similarly affects sex determination, both mutants showing a sex bias towards  
126 maleness (Hausmann et al., 2016, Lence et al., 2016).

127 The m<sup>6</sup>A mark is also present in higher plants and was shown to display the same  
128 features as in other organisms. Enriched in last exons and at 3'-UTRs of transcripts,  
129 m<sup>6</sup>As are deposited on the RRACH consensus and show a similar abundance (1-3  
130 m<sup>6</sup>A per mRNA and some 1.5% of the total number of adenosines) (Li, Xiong et al.,  
131 2016, Luo et al., 2014, Zhong, Li et al., 2008). The core components of the writer  
132 complex are also present in *Arabidopsis thaliana*, with the MTA (METTL13) and MTB  
133 (METTL14) methylases, the FIP37 (WTAP) and VIRILIZER (KIAA1429) cofactors,  
134 plus the E3-ubiquitin ligase HAKAI (Ruzicka, Zhang et al., 2017) that is also likely to  
135 be part of the mammalian writer complex (Horiuchi, Kawamura et al., 2013).  
136 Downregulation of these proteins leads to reduce relative levels of m<sup>6</sup>A in mRNAs  
137 and shared pleiotropic phenotypes. Deletion of *MTA*, *MTB*, *FIP37* or *VIR* stops  
138 embryogenesis at the globular stage (Bodi, Zhong et al., 2012, Ruzicka et al., 2017,  
139 Shen, Liang et al., 2016, Vespa, Vachon et al., 2004, Zhong et al., 2008).

140 Hypomorphic *mta*, *mtb*, *fip37* or *vir* mutants show growth delay, aberrant Shoot  
141 Apical Meristem proliferation, reduced root growth and aberrant gravitropic  
142 responses, the severity of which being directly proportional to the diminution of the  
143 m<sup>6</sup>A/A ratio (Ruzicka et al., 2017). Moreover, downregulation of MTA or  
144 overexpression of FIP37 leads to aberrant trichome formation, with an increase of  
145 trichomes with four to six branches (Bodi et al., 2012, Vespa et al., 2004).  
146 Assessment of the DNA content of FIP37 overexpressor lines supports that this  
147 phenotype might be the consequence of excessive rounds of endoreduplication (Vespa  
148 et al., 2004). These genetic analyses support that, as in the case in animals and  
149 yeast, m<sup>6</sup>As are also crucial for plant fundamental processes. How m<sup>6</sup>A controls  
150 mRNA fate and expression in plants is not known so far, nevertheless the presence  
151 of YTH domain proteins suggests that, here again, it can act as an anchor to RBPs.  
152 Nonetheless, the characterization of plant YTH domain proteins physiological,  
153 cellular or molecular roles is lacking behind as no tools nor data are available so far.  
154 We report here the first comprehensive evolutionary analysis of YTH domains from  
155 higher plants and the first functional characterization of a putative plant m<sup>6</sup>A reader,  
156 the AtYTHDF2A (shortened to DF2A) protein (previously named ECT2). We show  
157 that DF2A is mainly cytosolic, relocalizes to stress granules upon heat stress, and  
158 forms a complex *in vivo* with m<sup>6</sup>A RNA only when carrying an unaltered aromatic m<sup>6</sup>A  
159 binding cage. Plants depleted of *DF2A* show a trichome branching defect identical to  
160 that of hypomethylated plants (Bodi et al., 2012) or FIP37 overexpressor (Vespa et  
161 al., 2004). This phenotype cannot be complemented with a *DF2A* allele defective for  
162 its m<sup>6</sup>A binding pocket. We hereby identify the first physiological role for a plant YTH  
163 protein and demonstrate that trichome formation requires that the m<sup>6</sup>A mark is  
164 decoded by one of the thirteen Arabidopsis YTH proteins.



**Figure 1 Phylogenetic relations among Viridiplantae, metazoan, and yeast YTH domains**  
 Phylogenetic tree was built using representative YTH motifs from Viridiplantae compared to several yeast and metazoan YTHs including the ones from human, drosophila, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* (see Supplemental Table 1 for YTH sequences and Supplemental Table 2 for a list of name codes). The two clades, YTHDF and YTHDC, are indicated. The color code is the following: brown for yeast species, green for plant species, blue for Chlorophyte species and red for metazoan species. Statistical supports of key nodes calculated with the approximate likelihood-ratio test are indicated. Scale bar indicates length of 0.1 substitution/site.

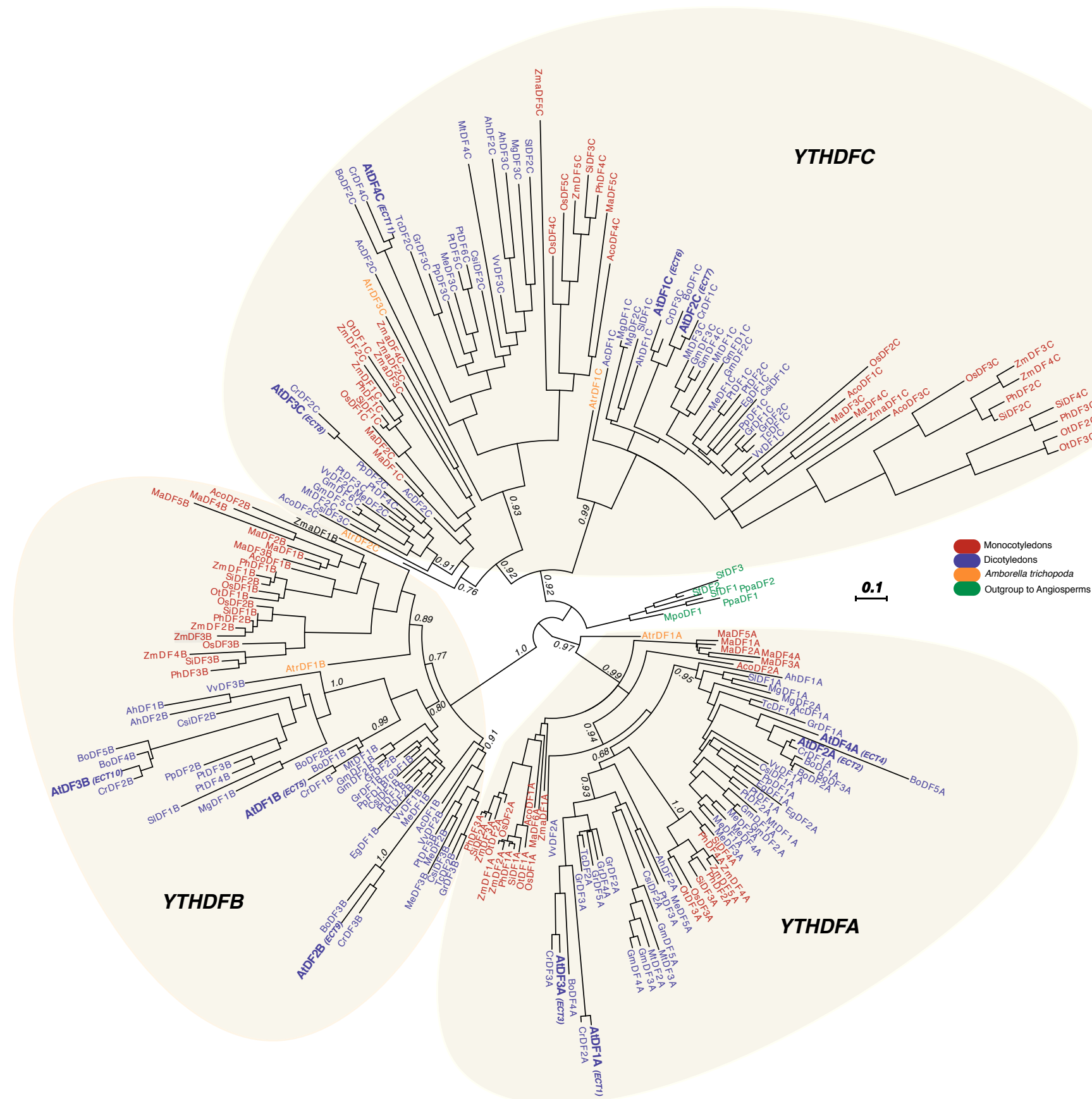
165

## 166 **RESULTS**

### 167 **Evolutionary analysis of YTH domain proteins from higher plants**

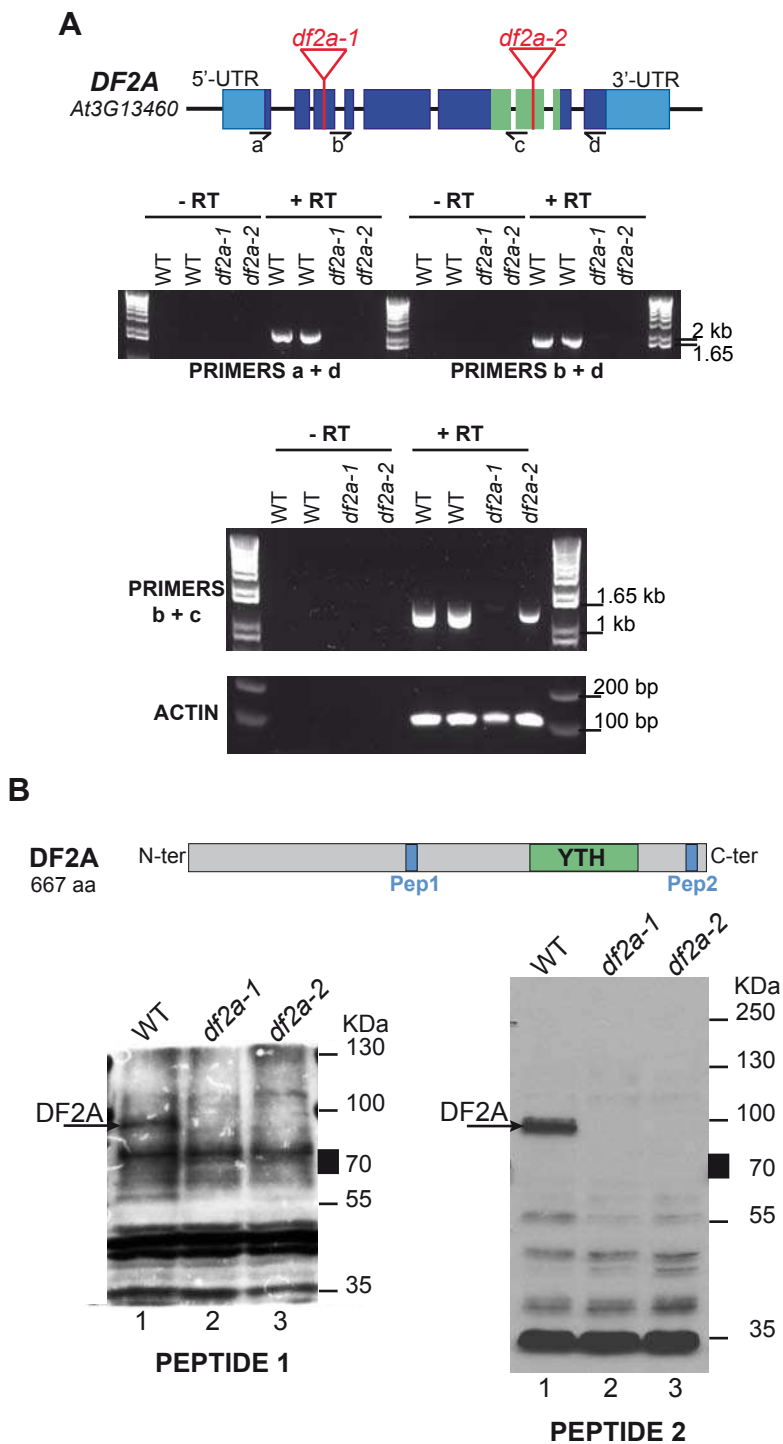
168 Using a phylogenetic approach, we first compared representative Viridiplantae YTH  
169 domains to several yeast and metazoan YTHs including the ones from human,  
170 drosophila, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. To  
171 represent the Viridiplantae lineage, we initially collected YTH-containing proteins  
172 from a Chlorophyte species (*Chlamydomonas reinhardtii*), from species that are  
173 respectively outgroups for the Angiosperms (*Marchantia polyphorma*, *Physcomitrella*  
174 *patens*), at the root of the Angiosperm lineage (*Amborella trichopoda*) and from  
175 *Arabidopsis thaliana*. We confirm by this analysis that Viridiplantae YTH domains  
176 have a common ancestry with yeast and metazoan domains and can be classified in  
177 the two previously defined YTH-DC and -DF groups (Roundtree & He, 2016) (Figure  
178 1). Based on this result, and to adopt a systematic nomenclature, we decided to  
179 name each YTH-containing protein by the initials of its species of origin, followed by  
180 either “DF” or “DC”, by a number and possibly a letter (A, B or C) referring to a  
181 subgroup when appropriate (see below). When another name already existed in the  
182 literature, it was added in parenthesis for convenience (see Supplemental Table 1 for  
183 all YTH sequences and Supplemental Table 2 for a list of all name codes used in this  
184 study).

185 To have a closer look at the evolutionary history of Viridiplantae YTH domains, we  
186 next identified and collected 297 YTH-containing proteins from 32 representative  
187 species and found that 57 of these domains belong to the DC group and 240 to the  
188 DF group. Our phylogenetic analysis of the DF group shows that plant DF proteins  
189 can be further separated in three subgroups (DFA, DFB and DFC) with the exception



**Figure 2 Phylogenetic relations among plant YTHDF proteins**  
 Phylogenetic tree was built using the YTH domain of 240 DF proteins from 29 species representing the diversity of the Viridiplantae lineage (see Supplementary Table 1 for YTH sequences, Supplemental Table 2 for a list of name codes and Supplemental Figure 1 for the alignment used to build the tree). The three clades DFA, DFB, DFC are indicated. The color code is the following: green for outgroup species to Angiosperms, orange for Amborella trichopoda, blue for dicotyledon species and red for monocotyledon species. Statistical supports of key nodes calculated with the approximate likelihood-ratio test are indicated. Scale bar indicates length of 0.1 substitution/site.

190 of species that are outgroups for the Angiosperms, where a single DF version is  
191 present, and Chlorophyte species, that lack DF proteins (Figure 2). The conservation  
192 of at least one protein version from each DF subgroup in all Angiosperm species  
193 strongly suggests a scenario in which a gene duplication event occurred in the  
194 Angiosperm common ancestor followed by the neofunctionalization of the duplicated  
195 copies, and that DF-containing proteins from the different subgroups are likely not  
196 completely redundant. A putative sign of neofunctionalization of the DF type YTH  
197 domains is represented by the aspartic acid for asparagine (D for N) change found  
198 systematically in the alpha helix 1 of the DFB domains (see Supplemental Figure 1).  
199 This position corresponds to position 401 of the human YTHDF1 protein, and a D for  
200 N change at this position was shown to increase by 15 fold the affinity for an m<sup>6</sup>A  
201 target (Xu, Liu et al., 2015). Therefore, plant DFB proteins are likely to have a higher  
202 affinity for m<sup>6</sup>A than proteins belonging to the other two subgroups. Apart from the  
203 YTH motif, plant DF proteins do not present other highly conserved amino acid  
204 regions, except for a small domain (around 50 amino acids), N-terminal to most  
205 YTHDF motifs, that presents a bias in amino acid composition in favor of tyrosine,  
206 proline and glutamine (YPQ-rich, see Supplemental Figure 2). This bias in  
207 composition is similar to the one found in the three human DF proteins that possess  
208 a PQ-rich region, N-terminal to their YTH domain (Wang et al., 2014a).  
209 The phylogenetic tree of the Viridiplantae DC group also revealed two subgroups,  
210 DCA and DCB (Supplemental Figure 3 and 4). Plant DCA proteins all possess, in  
211 addition to the YTH domain, three zinc fingers with homologies to a cleavage and  
212 polyadenylation specificity factor (CPSF) domain and the Arabidopsis protein  
213 AtDC1A (CPSF30), was shown to be part of the plant polyadenylation complex  
214 (Addepalli & Hunt, 2007). Surprisingly, while DCA and DCB proteins are present in all



**Figure 3: Characterization of two DF2A knockout mutants.**

(A) RT-PCR analyses of steady-state levels of DF2A mRNA in wild-type (WT), *df2a-1* (SALK\_002225) and *df2a-2* (SAIL\_11\_D07) seedlings. Top panel: schematic representation of DF2A genomic locus, boxes represent exons with light blue corresponding to UTRs and dark blue to coding regions. In addition, green boxes label the region coding for DF2A YTH domain. The position of primers used for PCR assays is reported as well as the insertion sites of T-DNA in *df2a-1* and *df2a-2* lines. (B) Western blot analyses of DF2A protein steady-state levels in wild-type (WT), *df2a-1* and *df2a-2* plants. Custom made antibodies respectively raised against a centrally (pep1-pos. 281-295) and a C-terminally (pep2- pos. 642-656) located peptide were used.

215 species that are outgroups to the Angiosperms and in all dicotyledon species, no  
216 DCB proteins was found in the monocotyledon lineage suggesting that this version of  
217 the YTH motif was lost in the common ancestor of monocotyledon.

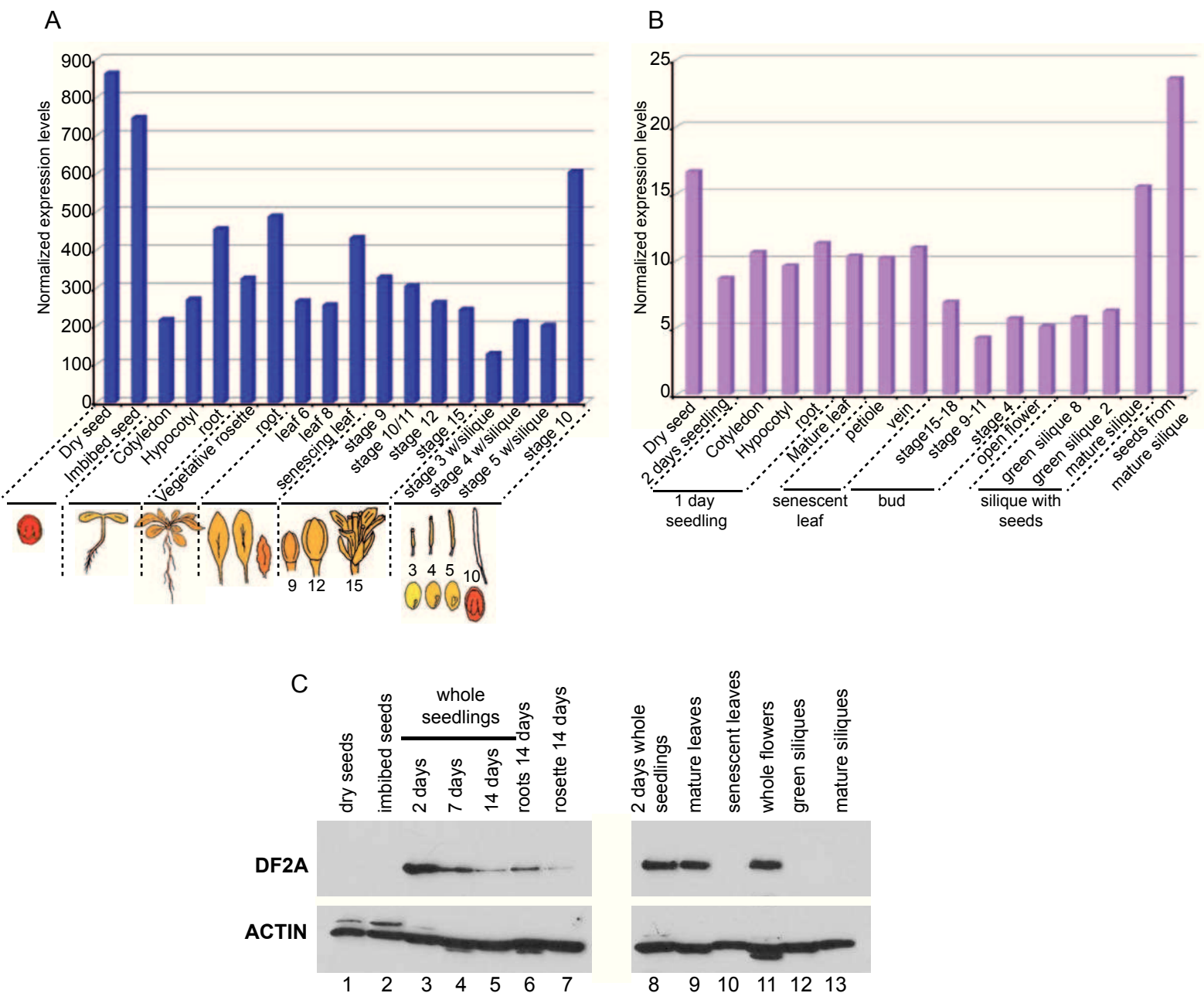
218 To get a first understanding of YTH domain protein function in plants, we ran a first  
219 functional analyses of the AtYTHDF2A protein, previously named ECT2 (At3G13460)  
220 and which for the sake of clarity we will refer to as DF2A in the following sections of  
221 this manuscript.

222

### 223 **Characterization of two *df2a* knockout T-DNA insertion lines and DF2A specific** 224 **antibodies**

225 To study DF2A physiological and molecular functions, we collected two T-DNA  
226 insertion lines from Arabidopsis stock centers and determined whether they are  
227 knockdown or knockout. We mapped through sequencing the positions of the T-  
228 DNAs and found that they are inserted in exon 3 (at position + 524 from the ATG) in  
229 line SALK\_002225 and in exon 7 (at position + 2402 from the ATG) in line  
230 SAIL\_11\_D07. We respectively named these lines *df2a-1* and *df2a-2* (Figure 3A).  
231 Using an RT-PCR approach with three sets of primers, we analysed the steady-state  
232 levels of *DFA2* mRNA in wild-type and mutant backgrounds. No PCR signal was  
233 found to be amplified from cDNAs prepared from both mutant lines, using primers  
234 respectively located at the 5' and 3' ends of the coding region and permitting to  
235 amplify the full length *DF2A* mRNA (Figure 3A). The *df2a-1* mutant does not seem to  
236 produce any stable mRNA as shown by the fact that no PCR signal can be detected  
237 even when using a primer pair located downstream to the T-DNA insertion site,  
238 suggesting that this allele is a full knockout. Conversely, the *df2a-2* allele appears to  
239 allow the synthesis of a truncated mRNA corresponding to the coding region located





**Figure 4: The DF2A protein has a tissue specific expression profile**

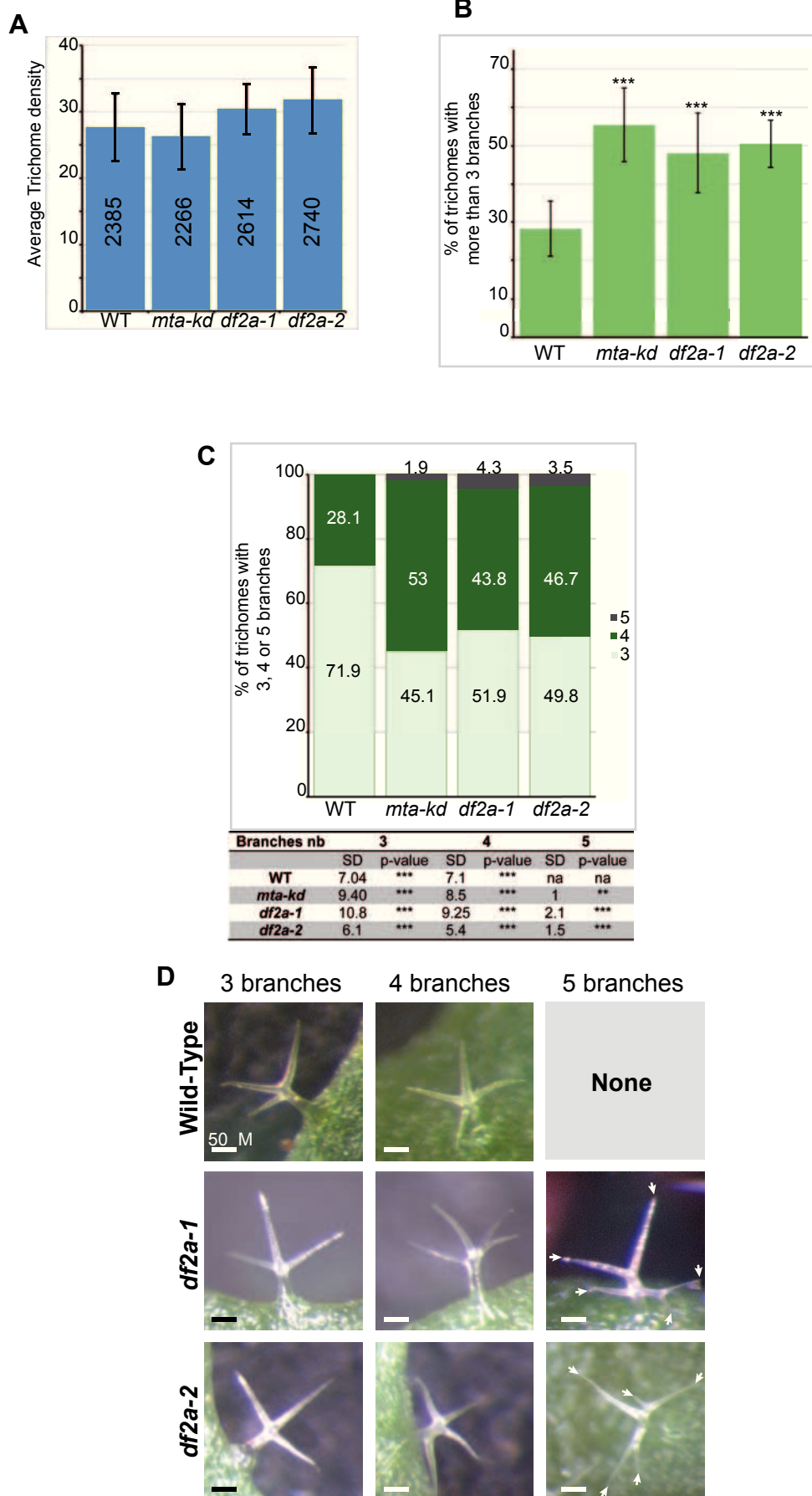
(A-B) DF2A mRNA levels across plant development. Data selected from publicly available databases at (A) eFP Browser (microarray) and (B) TRAVAdb (RNA-seq), (C) Western blot analyses of DF2A steady-state levels across development and in various tissues. Sample from 2 day old whole seedlings, was used as a reference and loaded both on gel one (left) and two (right) (lanes 3 and 8). ACTIN levels were used as loading control.

240 upstream to the T-DNA insertion site, suggesting that a truncated form of DF2A might  
241 be expressed in this mutant. To explore this possibility and confirm that *df2a-1* does  
242 not produce any full length nor truncated protein, we raised antibodies against two  
243 synthetic peptides respectively located in the central part upstream to the YTH  
244 domain (pep 1) and at the very C-terminus of the protein, downstream to the YTH  
245 domain (pep 2) (Figure 3B). We found that both antibodies allow the detection of a  
246 protein with an apparent size of 100 KDa in wild-type extracts (Figure 3B). In total  
247 extracts prepared from the *df2a-1* and 2 mutant lines this signal is no longer detected  
248 regardless of the antibody used, supporting that it corresponds to the endogenous  
249 DF2A protein. In addition, no signal that would be specific to one or both mutant line  
250 can be detected, suggesting that neither mutant allele allow the production of a full-  
251 length nor truncated DF2A protein. Considering the position of the peptides (both  
252 downstream to the T-DNA location in *df2a-1*), one could argue that a small protein  
253 corresponding to the first 50 amino acids of DF2A could remain undetected. Even if  
254 this was the case, this small protein could not support DF2A function. We hence  
255 conclude that *df2a-1* and *df2a-2* are both full knockout alleles.

256

### 257 **DF2A expression is likely regulated at the *pst*-transcriptional level**

258 Analysis of *DF2A* mRNA expression profile in publicly available databases (ATH1  
259 affimetrix data at the eFP browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)  
260 (Winter, Vinegar et al., 2007) and RNA-seq data at TraVA db (<http://travadb.org/>))  
261 (Figure 4A and B) suggests that this gene is ubiquitously expressed across plant  
262 development, with its highest level of expression in embryos at the green cotyledon  
263 stage and in dry and imbibed seeds. However, running a western blot analysis of  
264 DF2A steady state levels in total protein extracts prepared from various Arabidopsis



**Figure 5: DF2A is required for normal trichome branching**

(A-C) Histogram representation of : (A) the average trichome density per leaf, (B) the percentage of trichomes with more than 3 branches, (C) the percentage of trichomes with 3 (light green), 4 (green) or 5 branches (dark grey) in wild-type (WT), *mta* knockdown (*mta-kd*), *df2a-1* and *df2a-2* knockout lines. SDs were calculated from 11 biological replicates. p-values were obtained using a Dunnett test and determine whether mutant figures are statistically distinct from wild-type figures (\*\*\*:  $p\text{-value} < 10E-4$ , \*\*:  $10E-3 < p\text{-value} < 10E-2$ ). The total number of trichomes observed for each genotype is reported on histograms in (A). Table in (B) reports the SDs and p-values related to figures represented in the above histograms. n.a: non applicable. (C) A representative picture for each type of trichome observed in each genotype. Scale bars: 50 $\mu$ M.

265 tissues (Figure 4C), we found that mRNA and protein expression profiles are not in  
266 full agreement. DF2A protein can be detected in extracts from whole seedlings, roots,  
267 rosette, mature leaves and whole flowers (Figure 4C, lanes 3-7, 9 and 11) but is  
268 below detection level in green and mature siliques but also in dry and imbibed seeds  
269 (Figure 4C lanes 1, 2, 10, 12 and 13) two tissues where *DF2A* mRNA levels are  
270 particularly high. These discrepancies between mRNA and protein accumulations  
271 suggest that *DF2A* expression is tightly regulated at the post-transcriptional level.

272

### 273 **The DF2A protein is required for normal trichome branching.**

274 We next looked for growth or developmental phenotypes linked to *df2a* loss of  
275 function and could not observe any obvious morphological defect at the macro scale  
276 level (Supplemental figure 5A-F). The hypomorphic ABI3::MTA knockdown (*mta-kd*)  
277 line was found to display pleiotropic developmental and growth defects, amongst  
278 which an abnormal flower architecture. Particularly, in the first flowers of the *mta-kd*  
279 plant inflorescences, stamens were found to often show partial conversion to petal  
280 (Bodi et al., 2012). Given that we found DF2A to be strongly expressed in flowers  
281 (Figure 4C), we monitored the morphology of *df2a-1* and *df2a-2* flowers  
282 (Supplemental Figure 5G). We monitored mature flowers and looked for  
283 morphological defects and classified as deficient, flowers with at least one of the  
284 followings: (i) more than four petals, (ii) abnormal number of stamens (<6 or >6), (iii)  
285 stamens converted to petals. In our growth chamber conditions, both the wild-type  
286 and ko lines were found to display such flower defects at more than 30% frequency.  
287 Nevertheless the mutants were not found to be significantly distinct from the wild-  
288 type, supporting that the loss of *df2a* function does not phenocopy the low  
289 methylation phenotype in flowers. A second subtle defect of the *mta-kd* mutant is an

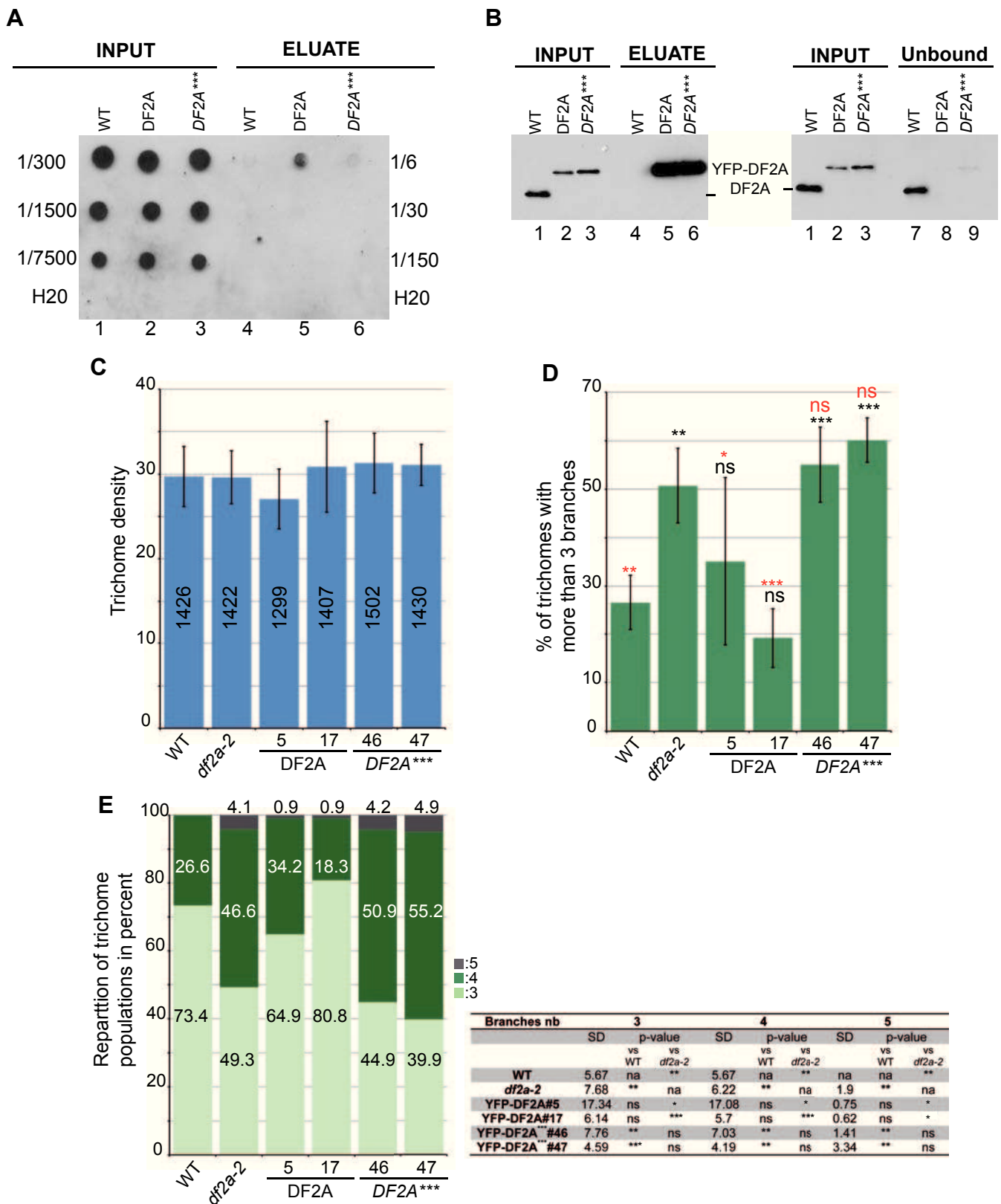
290 increase in the percentage of abnormal trichomes as compared to wild-type. Body *et*  
291 *al.* found that in the *mta-kd* background, 60% of the observed trichomes have four or  
292 more branches versus 24% in wild-type plants (Bodi *et al.*, 2012). Such phenotype  
293 was also observed in plants overexpressing FIP37, a core component and cofactor of  
294 the methylation complex (Ruzicka *et al.*, 2017, Shen *et al.*, 2016, Vespa *et al.*, 2004,  
295 Zhong *et al.*, 2008). Vespa *et al.*, found that overexpressor lines display on average  
296 twice more (42-45%) trichomes with four branches than the wild-type and have 5 to  
297 10% of five or six branch trichomes, a population undetected in normal plants (Vespa  
298 *et al.*, 2004). We hence monitored trichomes morphology of three week old plants of  
299 the *mta-kd*, *df2a-1*, *df2a-2* and wild-type backgrounds (Figure 5A-C). We conducted  
300 this experiment over eleven independent biological replicates, monitoring the first  
301 pairs of leaves of four plants of each genotype in each replicates. We observed a  
302 total of more than two thousand two hundred trichomes for each background (Figure  
303 5A). Wild-type plants display on average 72.1% and 27.9% of three and four branch  
304 trichomes and no five nor six branch trichomes as previously reported (Bodi *et al.*,  
305 2012, Vespa *et al.*, 2004). We reproduced the *mta-kd* phenotype, observing an  
306 increase in the frequency of trichomes with more than three branches (55.1%) and  
307 found that, as this was the case for the FIP37 overexpressor line, five branch  
308 trichomes appear at a frequency of 1.9% on average (Figure 5C). Both *df2a* knockout  
309 lines display a clear trichome developmental defect. Firstly they show a significant  
310 increase in the frequency of trichomes with more than three branches (47.3% for  
311 *df2a-1* and 50.4% for *df2a-2*) of the same order of magnitude as that observed in the  
312 hypomorphic *mta* plants. Secondly, looking at the trichome repartition according to  
313 their number of branches we observed that loss of *DF2A* appears to trigger the  
314 appearance of five branch trichomes at the frequency of 4 and 3.6% in *df2a-1* and

315 *df2a-2* respectively. These frequency variations are not related to discrepancies in  
316 trichome density between genotypes, as each line display on average between 25  
317 and 30 trichomes per leaf (Figure 5A). We conclude that DF2A is, as it is the case for  
318 MTA, required for normal trichome development.

319

### 320 **The DF2A protein associates with m<sup>6</sup>A containing RNAs *in vivo***

321 Considering our evolutionary analyses of the higher plant YTH domain proteins  
322 (Figure 1 and 2), we propose that Arabidopsis YTH proteins carry an m<sup>6</sup>A reading  
323 activity. To test this possibility for the DF2A protein, we prepared a point mutant allele  
324 (*DF2A<sup>\*\*\*</sup>*) where the tryptophans (W464, 521 and 526 on DF2A) (Supplemental Figure  
325 1) homologs to that found in the mammal and yeast proteins to form the m<sup>6</sup>A binding  
326 aromatic cage were substituted to alanines (Theler et al., 2014). We next constructed  
327 in the *df2a-2 ko* background, transgenic lines expressing YFP tagged versions of the  
328 wild-type and triple point mutant DF2A protein under the control of the *DF2A*  
329 upstream genomic sequences and selected two independent lines for each construct.  
330 Each of these four lines was found to express the YFP fusions at levels similar to that  
331 of the endogeneous protein (Supplemental Figure 6). To determine whether DF2A  
332 displays the ability to interact with m<sup>6</sup>A containing RNAs *in vivo* we ran RNA  
333 immunoprecipitation assays (Figure 6A, B). Crude extracts were prepared from  
334 transgenic seedlings (line 17 for YFP-DF2A and 46 for YFP-*DF2A<sup>\*\*\*</sup>*) and RNA-  
335 protein complexes immunoprecipitated with YFP nanotraps. An identical experiment  
336 was conducted in parallel with crude extracts from wild-type seedlings as a negative  
337 control. We next prepared a dot blot with RNA extracted from the input and eluate  
338 fractions (Figure 6A) that we probed with an anti-m<sup>6</sup>A antibody. This experiment was  
339 repeated over three independent biological replicates that gave identical results



**Figure 6: m6A binding by DF2A is required for normal trichome branching**

RNA ImmunoPrecipitation (RIP) assays (A and B). (A) Dot blot analysis of the input (lanes 1-3) and eluate fractions (lanes 4-6) obtained from wild-type (WT), (*df2a-2*; YFP-DF2A) (DF2A) and (*df2a-2*; YFP-DF2A<sup>\*\*\*</sup>) (DF2A<sup>\*\*\*</sup>) 15 day old seedlings. The percentages of the input and eluate fractions that were loaded are respectively reported on the left and right handsides of the panel. The blot was probed with an anti-m6A antibody. (B) Western blot monitoring of protein levels that were respectively present in each input, unbound and eluate fractions. 1/100th of the input and unbound fractions and 1/6th of the eluate fractions were loaded for each genotype. Blots were probed with the anti-DF2A antibody (pep2). Images presented correspond to one replicate over three independent replicates. (C-E) Trichome branching defect monitoring. Histograms show : (C) the density of trichome for each genotype. The total number of trichomes monitored is reported for each genotype. (D) the percentage of trichomes with more than three branches and (E) the repartition in percent of trichomes with 3, 4 or 5 branches. DF2A stands for *df2a-2* ko expressing the YFP-DF2A transgene. Two independent transgenic lines were tested (nb 5 and 17). DF2A<sup>\*\*\*</sup> stands for transgenic *df2a-1* lines expressing the triple DF2A point mutant (as in A and B) fused to the YFP tag. Two independent lines (nb 46 and 47) were analysed. The experiment was conducted over six independent replicates. Four pairs of leaves were analysed in each replicate. p-Values reported over the histograms in D and in the table in E were obtained with a Dunnett test to determine if figures are significantly distinct from wild-type (labeled in black) or from *df2a-2* (labeled in red). \* is for p-value <0.05 , \*\* <0.005, \*\*\* < 0.0001, n.s.: not significant and n.a.: not applicable.

340 (Figure 6A-B and data not shown). We observed that m<sup>6</sup>A containing RNAs can be  
341 immunoprecipitated together with the YFP-DF2A fusion, as demonstrated by the  
342 presence of an m<sup>6</sup>A signal in lane 5 of Figure 6A and no signal in lane 4  
343 corresponding to the negative control and this despite the fact that similar levels of  
344 m<sup>6</sup>A containing RNAs were detected in both inputs (Figure 6A lanes 1 and 2). When  
345 experiments were conducted with YFP-DF2A<sup>\*\*\*</sup> crude extracts we observed that the  
346 protein, which accumulates to levels similar to that of the YFP-DF2A fusion in inputs  
347 (compare lanes 2 and 3, Figure 6B), was immunoprecipitated as efficiently as the  
348 unmutated version (lanes 5 and 6, Figure 6B). Yet, m<sup>6</sup>A containing RNAs were no  
349 longer significantly enriched in the eluate fraction (lane 6, Figure 6A).  
350 We conclude from these RIP assays, that DF2A forms a complex *in vivo* with m<sup>6</sup>A  
351 containing RNAs and that its formation is dependent upon the presence of an  
352 unmutated aromatic cage on its YTH domain. Given the very high conservation of  
353 DF2A at the primary sequence level over a large evolutionary time, we propose that  
354 its YTH domain is an m<sup>6</sup>A reading domain.

355

### 356 **DF2A m<sup>6</sup>A reading activity is required for normal trichome branching**

357 To explore the possibility that *df2a* trichome branching defect is the consequence of  
358 the loss of DF2A m<sup>6</sup>A reading activity, we monitored the trichome morphology of  
359 *df2a-2* lines expressing either a wild-type or a triple (W to A) mutant allele of DF2A  
360 (Figure 6C-E). We observed trichome morphology on independent transgenic lines  
361 respectively expressing the wild-type and point mutant alleles of DF2A at levels  
362 similar to that of the endogenous protein (two independent lines for each construct  
363 (Supplemental Figure 6)). We proceeded as previously described and observed a  
364 total of more than 1200 trichomes for each genotype over six biological replicates



365 (Figure 6C). We found that lines expressing a wild-type *DF2A* allele, display a  
366 trichome morphology similar to that of wild-type plants, with an average level of four  
367 branch trichomes of 35 and 19% in transgenic lines and 26 % in wild-type. Moreover  
368 the population of five branch trichomes was significantly reduced as compared to that  
369 of the *df2a-2* mutant (0.9% versus 4.1%) (Figure 6E). A similar analysis conducted  
370 with C-terminally tagged *DF2A* (*DF2A-GFP*) gave similar results (data not shown).  
371 This shows that the trichome defects of *df2a-1* and 2 are the direct consequence of  
372 the full inactivation of *DF2A* and that the YFP and GFP translational fusions of *DF2A*  
373 are functional. When the mutated version was the sole allele of *DF2A* expressed, the  
374 trichome morphology of *df2a-2* was not restored to normal. Trichomes of the point  
375 mutant lines, display more than three branches at a frequency identical to that of the  
376 *df2a-2* mutant and significantly above that of the wild-type plants (55 and 60% for  
377 lines 46 and 47 respectively). In addition, five branch trichomes were also detected at  
378 frequencies similar to that of the *ko* lines (4.2 and 4.9%) (Figure 6E). These results  
379 show that a *DF2A* protein with a defective YTH domain is not able to restore normal  
380 trichome branching.

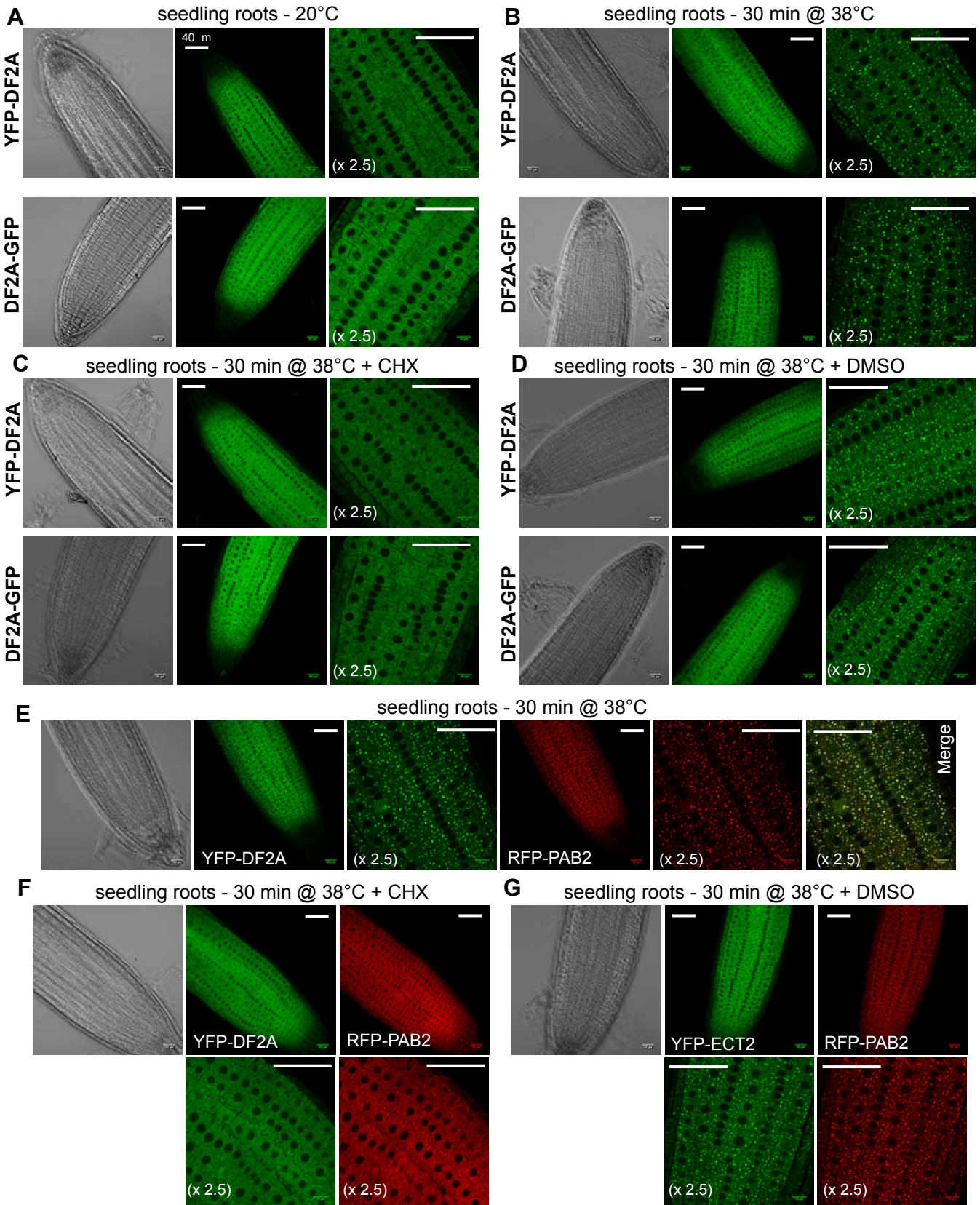
381 We postulate from results of these and RIP experiments, that the trichome branching  
382 defect of *df2a* *ko* lines, is linked to the loss of *DF2A* m<sup>6</sup>A reading activity.

383

#### 384 **DF2A is mainly cytoplasmic and relocated in stress granules upon heat** 385 **treatment**

386 Next, to get a hint on *DF2A* molecular roles, we characterized its subcellular  
387 distribution in root tips of seven day old seedlings (Figure 7). To this end, we used  
388 transgenic lines expressing fluorescently labeled *DF2A* and found to complement  
389 *df2a-2* trichome branching defects (Figure 6C-E and data not shown). Whatever the

390 environmental condition used, we found that both the N-terminal YFP and C-terminal  
391 GFP fusions display identical subcellular distributions (Figure 7). Under normal  
392 growth conditions, they are found to accumulate in the cytoplasm with a diffuse  
393 pattern and are excluded from the nucleus (Figure 7A). mRNA binding proteins  
394 located in the cytoplasm and involved in translation or stability control, often  
395 aggregate together with mRNPs into membraneless supramolecular structures.  
396 These bodies are of two main types in the cytoplasm: processing bodies (P-bodies)  
397 and Stress Granules (Anderson & Kedersha, 2008, Erickson & Lykke-Andersen,  
398 2011). In addition to various RBPs, P-bodies were found to contain actors of the 5'-  
399 mRNA turnover process while SGs contain the 48S pre-initiation complex and  
400 various actors of translation such as the Poly(A) Binding Protein (PABP). Conversely  
401 to SGs, P-bodies in mammalian and plant cells (Kedersha, Stoecklin et al., 2005,  
402 Weber, Nover et al., 2008) can be detected in normal growth conditions while stress  
403 situations that block translation initiation increases their size and number and triggers  
404 SG formation (Sfakianos, Whitmarsh et al., 2016, Weber et al., 2008). We and others  
405 previously found that exposure to 38°C for 30 min triggered the formation of such  
406 aggregates in Arabidopsis seedlings (Merret, Descombin et al., 2013). We hence  
407 exposed transgenic plantlets to such heat stress, monitored the fluorescent signal in  
408 roots and observed that the tagged DF2A proteins form punctuate foci in the cytosol  
409 (Figure 7B). Since the formation of SG and P-bodies is inhibited when translation  
410 elongation is blocked, we repeated an identical experiment but in the presence of  
411 cycloheximide or DMSO for mock treatment (Figure 7C and D). While, DF2A still  
412 forms foci in response to heat exposure in the presence of DMSO, it shows a diffuse  
413 pattern in the presence of cycloheximide, supporting that DF2A aggregates  
414 correspond to P-bodies or SGs. Since DF2A does not appear to form foci under



**Figure 7: Subcellular distribution of DF2A**

(A-D) Confocal monitoring of YFP-DF2A and DF2A-GFP subcellular distributions. The transgenic lines used are the same as those used to monitor DF2A ability to complement the trichome branching defect of *df2a-2* knockout (lines #17 and #50). (E-G) Confocal monitoring of the colocalization of YFP-DF2A and RFP-PAB2, using the (*df2a-2*; YFP-DF2A; RFP-PAB2) line. Root tips of 7 day old seedlings were monitored in: (A) Normal growth conditions: 20°C, (B, E) 30 min exposure to 38°C (Heat Stress), (C, F) 30 min exposure at 38°C in presence of 100μM of cycloheximide (CHX), (D, G) mock treatment: 30 min exposure at 38°C with x μM of DMSO. One representative image is shown for each transgenic line in each environmental condition. Each experiment was conducted over three independent replicates and a total of at least X roots were monitored for each conditions. White scale bars represent 40 μm. Images labeled "x 2.5", correspond to a 2.5 times enlargement of images placed on the left (A-D) or above (E-F).

415 normal growth conditions, we postulated that it associates to SG rather than P-  
416 bodies. We next ran colocalisation experiments, using a stable line co-expressing  
417 both YFP-DF2A and RFP-PAB2, a canonical marker of stress granules (Merret,  
418 Carpentier et al., 2017, Weber et al., 2008) (Figure 7E-G). Seedlings were exposed  
419 for 30 min at 38°C and the distribution of both fluorescently labeled proteins  
420 monitored (Figure 7E). As expected both the YFP and RFP signals appear as  
421 discrete foci in the cytosol and the vast majority of them overlaps (merge panel in  
422 Figure 7E). Here again, cycloheximide treatment prevents foci formation at 38°C  
423 while DMSO treatment has no impact (Figure 7F and G). All in all, these experiments  
424 allow to propose that under normal growth conditions, DF2A is mostly present in the  
425 cytosol and that upon stress triggered inhibition of translation initiation, it relocates to  
426 stress granules.

427

## 428 **DISCUSSION**

429 We report here a systematic evolutionary analysis of YTH domains from higher  
430 plants and retraced their evolutionary history. We firstly demonstrate that higher  
431 plants and bryophytes, like mammals, systematically display both DF and DC type  
432 motifs while chlorophytes only possess the DC type (Figures 1 and 2 and  
433 Supplemental Figures 3 and 4). Moreover we found that YTH motifs carry the amino  
434 acids required for RNA and m<sup>6</sup>A recognition and binding and that they are predicted  
435 to adopt the same structural fold as animal and yeast YTH domains (Supplemental  
436 Figures 3 and 4). In *Schizosaccharomyces pombe*, the Mmi1 protein carries a YTH  
437 domain that unambiguously belongs to the DC group (Figure 1, statistical support of  
438 1) and could based on this, be considered as an m<sup>6</sup>A binding motif. Yet, this domain  
439 lost this ability in the absence of such epitranscriptomic mark in fission yeast (Wu, Xu

440 et al., 2017). Structural analyses of Mmi1 YTH domain, show that it adopts a  
441 structural fold highly similar to that of m<sup>6</sup>A-binding motifs, and displays a putative m<sup>6</sup>A  
442 aromatic cage (Touat-Todeschini, Shichino et al., 2017, Wu et al., 2017).  
443 Nevertheless, while *bona fide* binding cages create an hydrophobic environment to  
444 accommodate m<sup>6</sup>A and consist in three amino acids with hydrophobic side chains  
445 (W/W/(Y,W or L)), the *S.pombe* cage has an histidine which is positively charged in  
446 third position and is likely to hinder m<sup>6</sup>A binding. In addition, the electrostatic surface  
447 surrounding the m<sup>6</sup>A cage in Mmi1 shows a large negative charge, while it is  
448 positively charged in YTH motifs that can bind m<sup>6</sup>A. Finally the second aromatic  
449 residu forming the m<sup>6</sup>A cage in *S. pombe* is turned 90° relative to that in other YTH  
450 motifs (Wu et al., 2017). These three particularities could explain why the Mmi1 YTH  
451 motif lost its ability to bind m<sup>6</sup>A residus. The YTH domain from higher plants display a  
452 canonical aromatic cage sequence (Supplemental Figures 1 and 3), hence although  
453 our analyses do not permit to conclude about the surrounding electrostatic surface  
454 nor about orientation of amino acids, we propose that higher plants carry *bona fide*  
455 m<sup>6</sup>A readers. Our evolutionary analyses also demonstrate that the DC and DF type  
456 motifs of higher plants further classify in three and two subclades respectively,  
457 suggesting that a neofunctionalization process most probably took place. This  
458 conducts us to propose that YTH domain proteins from plants are probably not fully  
459 redundant as it is the case for animal proteins. In agreement with this hypothesis, we  
460 find that domains from different clades are likely to have significantly different m<sup>6</sup>A  
461 binding affinities and that this feature was conserved across evolution.

462 We also report here the first initial functional characterization of a putative plant  
463 reader: the Arabidopsis DF2A (ECT2) protein. We demonstrate that *in vivo* the full  
464 length protein is in a complex with m<sup>6</sup>A containing RNAs. When the three tryptophan

465 residues of DF2A m<sup>6</sup>A binding pocket, were substituted to alanines, m<sup>6</sup>A RNAs were  
466 no longer co-immunoprecipitated by DF2A. Considering that these point mutations do  
467 not alter the level of DF2A<sup>\*\*\*</sup> protein, and that structural studies demonstrated that  
468 these tryptophans are directly involved in the recognition of the m<sup>6</sup>A residus (Theler  
469 et al., 2014), we propose that DF2A is directly binding m<sup>6</sup>A *in vivo* and that this  
470 binding relies on its YTH domain. DF2A is hence the first plant m<sup>6</sup>A reader to be  
471 characterized. Moreover this shows that one of the molecular modes of action of  
472 m<sup>6</sup>As in plant is, as in other eukaryotes, to act as an anchor for RNA Binding Proteins  
473 that will mediate m<sup>6</sup>A function on the regulation of mRNA or ncRNA fate and/or  
474 function.

475 Using full knockout mutants, we found that loss of DF2A does not impact plant  
476 embryogenesis, growth nor development at least at the macroscopic scale. Although  
477 one can expect that loss of m<sup>6</sup>A reader should recapitulate at least part of m<sup>6</sup>A  
478 physiological roles, the lack of macroscopic phenotypes of *df2a* knockout plants  
479 might be related to redundancy with other YTH proteins. Nevertheless, at least one  
480 physiological function seems to be carried exclusively by DF2A. Indeed we find that  
481 the DF2A protein, with an unaltered m<sup>6</sup>A binding pocket is necessary for normal  
482 trichome branching. Strikingly the trichome branching defect of knockout or DF2A<sup>\*\*\*</sup>  
483 plants is identical or even slightly more penetrant to that of the *mta-kd* mutant. We  
484 found that the percentages of trichomes with more than three branches are identical  
485 between *df2a* knockout and *mta-kd* mutant, but there are twice more five branch  
486 trichomes in the absence of DF2A. These findings support the conclusion that a  
487 single reader protein decodes m<sup>6</sup>A function in trichome development.

488 One puzzling observation is that the overexpression of FIP37 phenocopies *df2a* and  
489 *mta-kd* trichome branching defects (Vespa et al., 2004). FIP37 is a conserved core

490 component of the writer complex required for m<sup>6</sup>A deposition as shown by the strong  
491 decrease of the m<sup>6</sup>A/A ratio in *fip37* hypomorphic lines (Ruzicka et al., 2017).  
492 Whether overexpression of FIP37 increases this ratio has not been tested, but if this  
493 is the case, one could propose that not only m<sup>6</sup>A is necessary for trichome branching  
494 but also its levels must be finely balanced. The mammalian homolog of FIP37, WTAP  
495 was found to be required for the proper localization of the catalytic subunits of the  
496 writer complex (Ping et al., 2014) and hence proposed to act as a regulatory  
497 component. As such, appropriate stoichiometric levels of WTAP/FIP37 might be  
498 necessary for proper functioning of the writer, leading us to propose an alternative  
499 scenario were FIP37 overexpression would act as dominant negative and as such  
500 provoke the decrease of m<sup>6</sup>A levels.

501 Trichomes are elongated cells that consist in a stalk with 3 to 4 branches and a DNA  
502 content of 16 to 32C. The onset of their formation consists in the exit of pluripotent  
503 epidermal cells from the mitotic programme and their transit into the endocycle.  
504 These cells undergo a first DNA replication event coupled to an arrest of their mitotic  
505 cycle at the G2 to M transition. They then enter an endocycle during which they will  
506 undergo 2 to 3 endoreduplication events, before their DNA replication ceases  
507 (Breuer, Braidwood et al., 2014). The entry, progression into and exit of the  
508 endocycle are controlled through the precise regulation of the levels of cyclin (CYC)  
509 and cyclin-dependent kinases (CDKs); with the downregulation of mitotic-CDKs (M-  
510 CDKs) during the entry and progression phase and maintenance of the S-phase  
511 CDKs, which need to be periodically inactivated to enable the transition to G phase  
512 (Breuer et al., 2014, Edgar, Zielke et al., 2014). The exit of the endocycle requires  
513 the reactivation of CYC-CDKs that will promote the arrest of DNA replication. The  
514 number of branches of a trichome is directly correlated to its ploidy, and mutants with

515 overbranched trichomes were often found to have an elevated DNA content related  
516 to an excessive number of endocycles (Schellmann & Hulskamp, 2005). Whether the  
517 branching phenotype of hypomethylated *mta-kd* mutant is the consequence of too  
518 many rounds of endoreduplication, has not been determined so far. But trichomes of  
519 plant overexpressing FIP37, were found to display an elevated DNA content, with  
520 44% and 9% of mutant trichomes with DNA contents of 128 and 256C, conversely to  
521 wild-type trichomes which peak at 32C (Vespa et al., 2004). This supports that  
522 misregulation of m<sup>6</sup>A levels triggers excessive rounds of endoreduplication.  
523 Considering that we demonstrated that DF2A m<sup>6</sup>A binding ability is required for  
524 normal trichome branching, we propose that the overbranched phenotype of *ect2-ko*  
525 trichomes is also the consequence of increased ploidy and hence that DF2A plays a  
526 negative role on the endoreduplication process, either negatively controlling the  
527 endocycle progression and/or stimulating its arrest. In human fibroblast and  
528 endothelial cells, core components of the m<sup>6</sup>A writer complex (WTAP and Virilizer),  
529 known to be crucial for m<sup>6</sup>A deposition were found to positively regulate cell  
530 proliferation through stimulation of the G2 to M transition of the cell cycle by  
531 stabilizing the cyclin A2 mRNA (Horiuchi et al., 2013, Horiuchi, Umetani et al., 2006).  
532 In zebrafish, the YTHDF2 protein exerts an m<sup>6</sup>A-dependent stimulatory role on the  
533 G2 to M transition of the cell cycle during the maternal to zygotic transition, by  
534 promoting the decay of maternal transcripts amongst which cell cycle regulators  
535 (Zhao, Wang et al., 2017). In mammals the targets of YTHDF2, and those commonly  
536 bound by YTHDF1 and 3 were found to preferentially code for cell cycle associated  
537 factors (Li et al., 2017, Wang et al., 2014a). All these data demonstrate that m<sup>6</sup>A and  
538 its readers are crucial in the control of cell cycle progression. This observation leads  
539 us to propose that DFA2 could, in a m<sup>6</sup>A-dependent mode, antagonize the trichome



540 endocycle by acting as positive regulator of the mitotic cycle, by directly or indirectly  
541 participating in the post-transcriptional control of the levels of cyclins and cyclin-  
542 dependent kinases.

543 What are the molecular roles of DF2A, which type of m<sup>6</sup>A containing RNA it binds  
544 and how it influences m<sup>6</sup>A containing RNA fate and/or function are questions that still  
545 largely unexplored. The amino acid sequence analysis of regions outside of its YTH  
546 domain do not allow to determine if DF2A is the orthologue of one of the three  
547 mammal YTHDF proteins, nor to propose a molecular mode of action of DF2A on its  
548 targets. Indeed, apart for the YTH, a motif search conducted against a Conserved  
549 Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), did not  
550 allow to identify any remarkable protein domain in DF2A, as well as in any other plant  
551 DF-type protein, with the exception of a YPQ-rich region reminiscent to that found in  
552 human YTHDF proteins and in aggregation prone factors such as TIA-1, TIAR or  
553 prion-proteins (Wang et al., 2014a) (Supplemental Figure 2). The presence of such  
554 aggregation prone domain in DF2A N-terminal domain is consistent with the  
555 observation that this protein is a component of mRNP aggregates. Indeed, we clearly  
556 show that while DF2A is mainly localized in the soluble fraction of the cytosol under  
557 normal growth conditions, it relocates to stress granules in response to heat stress.  
558 Considering that, so far, lncRNAs or other type ncRNAs modified with m<sup>6</sup>A have  
559 never been reported to be present in stress granules, we hypothesize that DF2A  
560 binds to mRNAs. We cannot nevertheless, exclude at this stage that, as for YTHDC1,  
561 DF2A might have a dual role and also bind m<sup>6</sup>A containing ncRNAs.

562

## 563 **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

564 *Sequence selection, multiple sequences alignments and phylogenetic reconstruction.*

565 Blast searches (blastp and tblastn) were performed starting from known *A. thaliana*  
566 YTH domains on thirty-two species representing the diversity of the Viridiplantae  
567 lineage at the JGI Phytozome (V11) genomic resource  
568 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Each time a new YTH was found in a  
569 given species, it was itself used as a query in a new BLAST search. YTH sequences  
570 were aligned using the multiple sequence comparison by log-expectation (MUSCLE  
571 v3.7) software (Edgar, 2004). Trees were reconstructed using the fast maximum  
572 likelihood tree estimation program PHYML (Guindon & Gascuel, 2003) with the LG  
573 amino acids replacement matrix (Le & Gascuel, 2008). Statistical support for the  
574 major clusters were obtained using the approximate likelihood-ratio test (aLRT)  
575 (Anisimova & Gascuel, 2006). Bias in amino acids composition were detected using  
576 the Composition Profiler website (<http://www.cprofiler.org/>).

577

#### 578 *Arabidopsis lines and growth conditions*

579 We used Columbia-0 as wild-type ecotype. The *df2a-1* (SALK\_002225) and *df2a-2*  
580 (SAIL\_11\_D07) lines were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre  
581 (NASC). Stable transgenic lines were obtained through floral dip technique adapted  
582 from (Clough & Bent, 1998, Zhang, Henriques et al., 2006). Plants were either grown  
583 on soil or cultivated *in vitro* on plates containing 4.41 g/L of synthetic Murashige and  
584 Skoog (Duchefa) medium, pH 5.7 and 4 g/L of agar. Transgenic seeds selection was  
585 performed on MS medium containing 25 µg/L of Gentamycin. Seeds were surface  
586 sterilized, sown on plates, incubated for 48 h at 6°C in the dark and placed in a  
587 growth cabinet at 20°C with 16 h day/8 h dark and 130 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> light. For growth on  
588 soil, plants were placed in growth chamber with 16 h day/8 h dark, 100 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>  
589 light, 60 - 75 % humidity, 20°C.

590

### 591 *Cloning*

592 To obtain plasmid p825, the genomic region upstream to *DF2A* (AT3G13460) coding  
593 region (spanning from position - 2000 to - 1 from the ATG) was PCR amplified with  
594 primers 1156 and 1157 digested by *EcoRV* and *KpnI* and cloned into restrictions  
595 sites *Ecl136II* and *KpnI* of a derivative of pPZP221 upstream to a gateway receptor  
596 cassette and bearing the gentamycin resistance gene *aacC1* (Hajdukiewicz, Svab et  
597 al., 1994). *DF2A* coding region was PCR amplified from cDNAs reverse transcribed  
598 from total RNA with an oligodT primer. To obtain plasmid p819, *DF2A* CDS was PCR  
599 amplified with primers 1152 and 1153, and inserted at sites *SpeI* and *EcoRV*  
600 downstream to the YFP tag into a derivative of the pBluescript between the *AttL1* and  
601 *AttL2* gateway donor sites. To obtain plasmid p827, the *DF2A* CDS was PCR  
602 amplified with primers 1152 and 1154 and inserted at sites *SpeI* and *EcoRV*  
603 upstream to the GFP tag into a pBluescript derivate between the *AttL1* and *AttL2*  
604 gateway donor sites. The final binary vectors respectively expressing the YFP-*DF2A*  
605 and *DF2A*-GFP under the control of *DF2A* genomic sequences were obtained  
606 through gateway recombination. The triple point mutant CDS, we labeled *df2a<sup>\*\*\*</sup>*,  
607 codes for a mutated version of *DF2A* bearing three tryptophan to alanine  
608 substitutions (TGG to GCT) at positions 464, 521 and 526. It was custom made and  
609 ordered from Biomatik (<https://www.biomatik.com/>). It was fused downstream to the  
610 YFP tag and inserted through gateway recombination into plasmid p825 downstream  
611 to *DF2A* genomic sequences.

612

### 613 *Western blot analyses*

614 Total protein were extracted with a laemmli denaturing buffer, separated by SDS-  
615 PAGE (6.5% acrylamide) and electrotransferred on a PVDF membrane. We ordered  
616 from Eurogentec (double-X immunization program) custom made antibodies  
617 generated from rabbit with two DF2A specific peptides : pep1-TVSSRNQNYRSNSH,  
618 pos. 281-295 and pep2-TSSDVKVAENGSVAK, pos. 642-656. The anti-pep1  
619 antibody was used at 1/100<sup>th</sup> and anti-pep2 at 1/2000<sup>th</sup> dilution. The anti-ACTIN  
620 antibodies were used at 1/6.10<sup>5th</sup> dilution. Primary antibodies were incubated on  
621 membranes o/n at 4°C in a TBS-1%Tween-5% dry milk buffer, secondary antibodies  
622 (anti-rabbit HRP at 1/7500<sup>th</sup> for DF2A detection and anti-mouse HRP at 1/5000<sup>th</sup> for  
623 ACTIN detection) were incubated in the same buffer for 45 min at RT.

624

#### 625 *RT-PCR Assays*

626 Total RNA were extracted from various plant tissues using a protocol modified from  
627 (Logemann, Schell et al., 1987). Briefly, tissues were flash frozen and reduced to  
628 powder in liquid nitrogen. 200 mg of powder were resuspended in 700 µl of  
629 Guanidium extraction buffer (8 M Guanidium-HCl, 20 mM MES-pH7, 20 mM EDTA,  
630 5% β-mercaptoethanol) and incubated for 10 min on ice. RNA were separated from  
631 proteins, with two phenol-chloroform-IAA (25:24:1) and one chloroform-IAA  
632 extractions. RNA are precipitated o/n at -20°C with 0.7 vol of isopropanol and the  
633 pellet resuspended in RNase-free water. cDNAs were prepared from 0.5 mg of  
634 DNase-free total RNA using an oligodT<sub>18</sub> primer and the SuperScript™ III reverse  
635 transcriptase kit (Invitrogen™) following the manufacturer's instructions. PCR  
636 reactions were conducted from 1/20<sup>th</sup> of cDNA, with the GoTaq (Promega)  
637 polymerase and appropriate primers (see Supplemental table 2) according to  
638 manufacturer's instructions. The PCR reaction was conducted in a thermocycler with

639 an initial step at 95°C for 3 min followed by 25 cycles at 95°C for 30 sec, at T<sub>m</sub> for 30  
640 sec and at 72°C for 1 kb/min.

641

#### 642 *RNA ImmunoPrecipitation and m<sup>6</sup>A dot blot assays*

643 Whole 15 day old seedlings were flash frozen and crushed into liquid nitrogen and  
644 700 mg of frozen powder homogenized into 5.25 ml of lysis buffer (100 mM Tris-HCl  
645 pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Igepal, 1% plant protease inhibitor cocktail from Sigma).  
646 The crude extract was clarified by centrifugation for 10 min at 3,000 g and 4°C. The  
647 immunoprecipitation was performed from 3.75 mL of crude extract incubated for 1.5h  
648 at 4°C on a rotating with 40 µL of GFP-trap magnetic beads (Chromotek). To monitor  
649 protein immunoprecipitation efficiency, a parallel immunoprecipitation experiment  
650 was conducted from 700 µL of crude extract incubated with 7.5 µL of GFP-trap.  
651 Beads were washed six times with 1 mL of lysis buffer at 4°C. RNAs were eluted  
652 from beads with 400 µL of guanidium extraction buffer and precipitated o/n at -20°C  
653 with 800 µL of 100% EtOH, resuspended in 350 µL of RTL buffer (Qiagen RNEasy  
654 Micro kit), purified according to the manufacturer's instructions and concentrated in 6  
655 µl of RNase-free water using the RNA clean & concentrator kit R1015 from Zymo  
656 Research. RNA were extracted from 200 µL of crude extract, following the same  
657 procedure. Of note, RNA from both the eluate and input fractions were treated with  
658 DNase in course of the Qiagen RNEasy purification procedure. To elute proteins,  
659 beads were resuspended in 15 µL of Laemmli buffer, incubated for 5 min at 95°C and  
660 the supernatant separated from beads using a magnetic device.

661 The Dot blot analysis was performed as follow. RNA solutions were diluted as shown  
662 in Figure 6A, 1 µL of sample spotted on and UV-crosslinked to an Hybond N+  
663 membrane (GE Healthcare). The membrane was saturated for 2 h at RT in TBS-

664 1% tween-5% fat free dried milk, before being incubated with an anti-m<sup>6</sup>A antibody  
665 (Synaptic Systems) diluted at 1/1000<sup>th</sup> o/n at 4°C.

666

#### 667 *Trichome monitoring*

668 To monitor trichome branching defects, trichomes from the first pair of leaves on soil  
669 grown (see above for culture conditions) 3 weeks old plants were observed under a  
670 binocular loupe. The number of trichomes with 3, 4, and 5 branches were counted for  
671 each plant and respectively expressed as percentage over the total number of  
672 trichomes. One biological replicate corresponds to the monitoring of four plants per  
673 genotype. The statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett  
674 post hoc test using the XLSTAT software (Addinsoft).

675

#### 676 *Confocal microscopy and heat treatment*

677 Root tips from seven day old seedlings cultivated on solid MS medium *in vitro* (as  
678 described above) were used to monitor the subcellular distribution of fluorescently  
679 labeled DF2A. To perform cycloheximide (CHX) and/or heat stress treatment,  
680 seedlings were transferred to a six well plate containing 3 mL of liquid MS medium  
681 with 100 µM CHX or 0.1% DMSO for mock and incubated for 30 min at 20°C or 38°C  
682 (heat stress). Plantlets were vacuum infiltrated for 5 min in 1 mL of fixation solution  
683 (2% paraformaldehyde, 1X MTSB (50 mM PIPES pH7, 5 mM EGTA, 5 mM MgSO<sub>4</sub>),  
684 0.2% triton-X100) and further incubated at RT for 10 min. Seedlings were washed  
685 twice 5 min in 2 mL of 1X MTSB and stored at 4°C until microscopy analyses. The  
686 subcellular distribution of tagged DF2A was assessed with an LSM700 (Zeiss)  
687 confocal microscope with the following excitation and emission wavelength: GFP:  
688 488 nm / 490-540 nm; YFP: 514 nm / 520-550 and RFP: 561 nm / 580-640 nm.

689

## 690 **ACKNOWLEDGMENTS**

691 We would like to thank Rupert FRAY (University of Nottingham) for sharing the  
692 ABI3::MTA70 hypomorphic line. This work was supported by the Agropolis foundation  
693 (International mobility program), the CNRS, the University of Perpignan (UPVD), the  
694 TECNOVIV platform through utilization of the confocal microscope and l'Agence  
695 Nationale pour la Recherche (ANR HEAT-EpiRNA : ANR-17-CE20-0007-01 and  
696 ANR HEAT-Adapt: ANR-14-CE10-0015). JS was the recipient of a PhD grant from  
697 the French Ministère National de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

698

## 699 **REFERENCES**

700 Addepalli B, Hunt AG (2007) A novel endonuclease activity associated with the  
701 Arabidopsis ortholog of the 30-kDa subunit of cleavage and polyadenylation specificity  
702 factor. *Nucleic acids research* 35: 4453-63  
703 Agarwala SD, Blitzblau HG, Hochwagen A, Fink GR (2012) RNA methylation by the MIS  
704 complex regulates a cell fate decision in yeast. *PLoS Genet* 8: e1002732  
705 Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF (2015) N6-methyladenosine  
706 marks primary microRNAs for processing. *Nature* 519: 482-5  
707 Anderson P, Kedersha N (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem*  
708 *Sci* 33: 141-50  
709 Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast,  
710 accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539-52  
711 Bodi Z, Zhong S, Mehra S, Song J, Graham N, Li H, May S, Fray RG (2012) Adenosine  
712 Methylation in Arabidopsis mRNA is Associated with the 3' End and Reduced Levels  
713 Cause Developmental Defects. *Frontiers in plant science* 3: 48  
714 Breuer C, Braidwood L, Sugimoto K (2014) Endocycling in the path of plant  
715 development. *Current opinion in plant biology* 17: 78-85  
716 Bringmann P, Luhrmann R (1987) Antibodies specific for N6-methyladenosine react  
717 with intact snRNPs U2 and U4/U6. *FEBS letters* 213: 309-15  
718 Chen T, Hao YJ, Zhang Y, Li MM, Wang M, Han W, Wu Y, Lv Y, Hao J, Wang L, Li A, Yang Y,  
719 Jin KX, Zhao X, Li Y, Ping XL, Lai WY, Wu LG, Jiang G, Wang HL et al. (2015) m(6)A RNA  
720 methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency.  
721 *Cell stem cell* 16: 289-301  
722 Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated  
723 transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology*  
724 16: 735-43  
725 Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Salmon-Divon M, Amariglio N, Rechavi G (2013)  
726 Transcriptome-wide mapping of N(6)-methyladenosine by m(6)A-seq based on  
727 immunocapturing and massively parallel sequencing. *Nature protocols* 8: 176-89

728 Du H, Zhao Y, He J, Zhang Y, Xi H, Liu M, Ma J, Wu L (2016) YTHDF2 destabilizes m(6)A-  
729 containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex.  
730 Nature communications 7: 12626

731 Edgar BA, Zielke N, Gutierrez C (2014) Endocycles: a recurrent evolutionary innovation  
732 for post-mitotic cell growth. Nature reviews Molecular cell biology 15: 197-210

733 Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time  
734 and space complexity. BMC Bioinformatics 5: 113

735 Edupuganti RR, Geiger S, Lindeboom RGH, Shi H, Hsu PJ, Lu Z, Wang SY, Baltissen MPA,  
736 Jansen P, Rossa M, Muller M, Stunnenberg HG, He C, Carell T, Vermeulen M (2017) N6-  
737 methyladenosine (m6A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis.  
738 Nature structural & molecular biology

739 Erickson SL, Lykke-Andersen J (2011) Cytoplasmic mRNP granules at a glance. Journal  
740 of cell science 124: 293-7

741 Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large  
742 phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52: 696-704

743 Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P (1994) The small, versatile pPZP family of  
744 Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant molecular biology 25:  
745 989-94

746 Haussmann IU, Bodi Z, Sanchez-Moran E, Mongan NP, Archer N, Fray RG, Soller M (2016)  
747 m6A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust Drosophila sex  
748 determination. Nature 540: 301-304

749 He C (2010) Grand challenge commentary: RNA epigenetics? Nature chemical biology 6:  
750 863-5

751 Horiuchi K, Kawamura T, Iwanari H, Ohashi R, Naito M, Kodama T, Hamakubo T (2013)  
752 Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative  
753 splicing and the cell cycle. The Journal of biological chemistry 288: 33292-302

754 Horiuchi K, Umetani M, Minami T, Okayama H, Takada S, Yamamoto M, Aburatani H,  
755 Reid PC, Housman DE, Hamakubo T, Kodama T (2006) Wilms' tumor 1-associating  
756 protein regulates G2/M transition through stabilization of cyclin A2 mRNA. Proceedings  
757 of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 17278-83

758 Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, Guo Y, Shi X, Liu Y, Qi M, Lu Z, Shi H, Wang J, Cheng Y, Luo G, Dai Q,  
759 Liu M, Guo X, Sha J, Shen B, He C (2017) Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding  
760 protein that regulates mammalian spermatogenesis. Cell research 27: 1115-1127

761 Ivanova I, Much C, Di Giacomo M, Azzi C, Morgan M, Moreira PN, Monahan J, Carrieri C,  
762 Enright AJ, O'Carroll D (2017) The RNA m6A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-  
763 transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence.  
764 Molecular cell 67: 1059-1067 e4

765 Kan L, Grozhik AV, Vedanayagam J, Patil DP, Pang N, Lim KS, Huang YC, Joseph B, Lin CJ,  
766 Despic V, Guo J, Yan D, Kondo S, Deng WM, Dedon PC, Jaffrey SR, Lai EC (2017) The m6A  
767 pathway facilitates sex determination in Drosophila. Nature communications 8: 15737

768 Ke S, Alemu EA, Mertens C, Gantman EC, Fak JJ, Mele A, Haripal B, Zucker-Scharff I,  
769 Moore MJ, Park CY, Vagbo CB, Kussnierczyk A, Klungland A, Darnell JE, Jr., Darnell RB  
770 (2015) A majority of m6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3'  
771 UTR regulation. Genes & development 29: 2037-53

772 Ke S, Pandya-Jones A, Saito Y, Fak JJ, Vagbo CB, Geula S, Hanna JH, Black DL, Darnell JE,  
773 Jr., Darnell RB (2017) m6A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and  
774 are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover. Genes & development  
775 31: 990-1006



776 Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner  
777 D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are  
778 dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169: 871-84  
779 Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol*  
780 *Evol* 25: 1307-20  
781 Lence T, Akhtar J, Bayer M, Schmid K, Spindler L, Ho CH, Kreim N, Andrade-Navarro MA,  
782 Poeck B, Helm M, Roignant JY (2016) m6A modulates neuronal functions and sex  
783 determination in *Drosophila*. *Nature* 540: 242-247  
784 Li A, Chen Y, Ping X, Yang X, Xiao W, Yang Y, Sun H, Zhu Q, Baidya P, Wang X, Bhattarai D,  
785 Zhao Y, Sun B, Yang Y (2017) Cytoplasmic m6A reader YTHDF3 promotes mRNA  
786 translation. *Cell research*  
787 Li F, Zhao D, Wu J, Shi Y (2014) Structure of the YTH domain of human YTHDF2 in  
788 complex with an m(6)A mononucleotide reveals an aromatic cage for m(6)A recognition.  
789 *Cell research* 24: 1490-2  
790 Li X, Xiong X, Wang K, Wang L, Shu X, Ma S, Li C (2016) Transcriptome-wide mapping  
791 reveals reversible and dynamic N1-methyladenosine methylome. *Nat Chem Biol* 10  
792 Li Y, Wang X, Li C, H S, Yu J, S S (2014) Transcriptome-wide N<sup>6</sup>-methyladenosine  
793 profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors  
794 involved in selective mRNA modification. *RNA biology* 11: 1180-88  
795 Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, Meydan C, Mason CE, Jaffrey SR (2015)  
796 Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome.  
797 *Nature methods* 12: 767-72  
798 Liu N, Dai Q, Zheng G, He C, Parisien M, Pan T (2015) N(6)-methyladenosine-dependent  
799 RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature* 518: 560-564  
800 Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA  
801 from plant tissues. *Analytical biochemistry* 163: 16-20  
802 Luo GZ, MacQueen A, Zheng G, Duan H, Dore LC, Lu Z, Liu J, Chen K, Jia G, Bergelson J, He  
803 C (2014) Unique features of the m(6)A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*  
804 *communications* 5: 5630  
805 Luo S, Tong L (2014) Molecular basis for the recognition of methylated adenines in RNA  
806 by the eukaryotic YTH domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
807 *United States of America* 111: 13834-9  
808 Merret R, Carpentier MC, Favory JJ, Picart C, Descombin J, Bousquet-Antonelli C, Tillard  
809 P, Lejay L, Deragon JM, Charng YY (2017) Heat Shock Protein HSP101 Affects the Release  
810 of Ribosomal Protein mRNAs for Recovery after Heat Shock. *Plant physiology* 174: 1216-  
811 1225  
812 Merret R, Descombin J, Juan Y, Favory J, Carpentier M, Chaparro C, Charng Y, Deragon J,  
813 Bousquet-Antonelli C (2013) XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA  
814 decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell*  
815 *reports* 5: 1279-1293  
816 Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR (2012)  
817 Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near  
818 stop codons. *Cell* 149: 1635-46  
819 Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, Jaffrey SR (2016) m6A  
820 RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature* 537: 369-  
821 373  
822 Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, Adhikari S, Shi Y, Lv Y, Chen Y, Zhao  
823 X, Li A, Yang Y, Dahal U, Lou X, Liu X, Huang J, Yuan W, Zhu X, Cheng T et al. (2014)

824 Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine  
825 methyltransferase. *Cell research* 24: 177-189

826 Roundtree IA, He C (2016) RNA epigenetics--chemical messages for posttranscriptional  
827 gene regulation. *Curr Opin Chem Biol* 30: 46-51

828 Ruzicka K, Zhang M, Campilho A, Bodi Z, Kashif M, Saleh M, Eeckhout D, El-Showk S, Li H,  
829 Zhong S, De Jaeger G, Mongan NP, Hejatko J, Helariutta Y, Fray RG (2017) Identification  
830 of factors required for m<sup>6</sup>A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the  
831 conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol* 215: 157-172

832 Saletore Y, Meyer K, Korfach J, Vilfan ID, Jaffrey S, Mason CE (2012) The birth of the  
833 Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications. *Genome biology* 13:  
834 175

835 Schellmann S, Hulskamp M (2005) Epidermal differentiation: trichomes in *Arabidopsis*  
836 as a model system. *Int J Dev Biol* 49: 579-84

837 Schwartz S, Agarwala SD, Mumbach MR, Jovanovic M, Mertins P, Shishkin A, Tabach Y,  
838 Mikkelsen TS, Satija R, Ruvkun G, Carr SA, Lander ES, Fink GR, Regev A (2013) High-  
839 resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation  
840 program in yeast meiosis. *Cell* 155: 1409-21

841 Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, Wang T, Maciag K, Bushkin GG, Mertins P, Ter-  
842 Ovanesyan D, Habib N, Cacchiarelli D, Sanjana NE, Freinkman E, Pacold ME, Staija R,  
843 Mikkelsen TS, Hacohen N, Zhang F, S.A. C, Lander ES, Regev A (2014) Perturbation of  
844 m<sup>6</sup>A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites.  
845 *Cell reports* 10: 284-296

846 Sfakianos AP, Whitmarsh AJ, Ashe MP (2016) Ribonucleoprotein bodies are phased in.  
847 *Biochemical Society transactions* 44: 1411-1416

848 Shen L, Liang Z, Gu X, Chen Y, Teo ZW, Hou X, Cai WM, Dedon PC, Liu L, Yu H (2016)  
849 N(6)-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in *Arabidopsis*.  
850 *Developmental cell* 38: 186-200

851 Shi H, Wang X, Lu Z, Zhao BS, Ma H, Hsu PJ, Liu C, He C (2017) YTHDF3 facilitates  
852 translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell research* 27: 315-328

853 Sledz P, Jinek M (2016) Structural insights into the molecular mechanism of the m(6)A  
854 writer complex. *Elife* 5

855 Theler D, Dominguez C, Blatter M, Boudet J, Allain FH (2014) Solution structure of the  
856 YTH domain in complex with N6-methyladenosine RNA: a reader of methylated RNA.  
857 *Nucleic acids research* 42: 13911-9

858 Touat-Todeschini L, Shichino Y, Danguin M, Thierry-Mieg N, Gilquin B, Hiriart E,  
859 Sachidanandam R, Lambert E, Brettschneider J, Reuter M, Kadlec J, Pillai R, Yamashita A,  
860 Yamamoto M, Verdel A (2017) Selective termination of lncRNA transcription promotes  
861 heterochromatin silencing and cell differentiation. *The EMBO journal* 36: 2626-2641

862 Vespa L, Vachon G, Berger F, Perazza D, Faure JD, Herzog M (2004) The immunophilin-  
863 interacting protein AtFIP37 from *Arabidopsis* is essential for plant development and is  
864 involved in trichome endoreduplication. *Plant physiology* 134: 1283-92

865 Wan Y, Tang K, Zhang D, Xie S, Zhu X, Wang Z, Lang Z (2015) Transcriptome-wide high-  
866 throughput deep m(6)A-seq reveals unique differential m(6)A methylation patterns  
867 between three organs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome biology* 16: 272

868 Wang P, Doxtader KA, Nam Y (2016) Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3  
869 and Mettl14 Methyltransferases. *Molecular cell* 63: 306-17

870 Wang X, He C (2014) Reading RNA methylation codes through methyl-specific binding  
871 proteins. *RNA biology* 11

872 Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T,  
873 He C (2014a) N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability.  
874 Nature 505: 117-20

875 Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, Weng X, Chen K, Shi H, He C (2015)  
876 N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. Cell 161:  
877 1388-99

878 Wang Y, Li Y, Toth JI, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC (2014b) N6-methyladenosine  
879 modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. Nat Cell  
880 Biol 16: 191-8

881 Weber C, Nover L, Fauth M (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies  
882 are distinct from heat stress granules. The Plant journal 56: 517-530

883 Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic  
884 Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data  
885 sets. PloS one 2: e718

886 Wu B, Xu J, Su S, Liu H, Gan J, Ma J (2017) Structural insights into the specific recognition  
887 of DSR by the YTH domain containing protein Mmi1. Biochemical and biophysical  
888 research communications 491: 310-316

889 Xiang Y, Laurent B, Hsu CH, Nachtergaele S, Lu Z, Sheng W, Xu C, Chen H, Ouyang J, Wang  
890 S, Ling D, Hsu PH, Zou L, Jambhekar A, He C, Shi Y (2017) RNA m6A methylation  
891 regulates the ultraviolet-induced DNA damage response. Nature 543: 573-576

892 Xu C, Liu K, Ahmed H, Loppnau P, Schapira M, Min J (2015) Structural Basis for the  
893 Discriminative Recognition of N6-Methyladenosine RNA by the Human YT521-B  
894 Homology Domain Family of Proteins. The Journal of biological chemistry 290: 24902-  
895 13

896 Xu C, Wang X, Liu K, Roundtree IA, Tempel W, Li Y, Lu Z, He C, Min J (2014) Structural  
897 basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH domain. Nature chemical  
898 biology 10: 927-9

899 Yang Y, Fan X, Mao M, Song X, Wu P, Zhang Y, Jin Y, Yang Y, Chen L, Wang Y, Wong CC,  
900 Xiao X, Wang Z (2017) Extensive translation of circular RNAs driven by N6-  
901 methyladenosine. Cell research

902 Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) Agrobacterium-mediated  
903 transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. Nature protocols 1:  
904 641-6

905 Zhang Z, Theler D, Kaminska KH, Hiller M, de la Grange P, Pudimat R, Rafalska I, Heinrich  
906 B, Bujnicki JM, Allain FH, Stamm S (2010) The YTH domain is a novel RNA binding  
907 domain. The Journal of biological chemistry 285: 14701-10

908 Zhao BS, Wang X, Beadell AV, Lu Z, Shi H, Kuuspalu A, Ho RK, He C (2017) m6A-  
909 dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic  
910 transition. Nature 542: 475-478

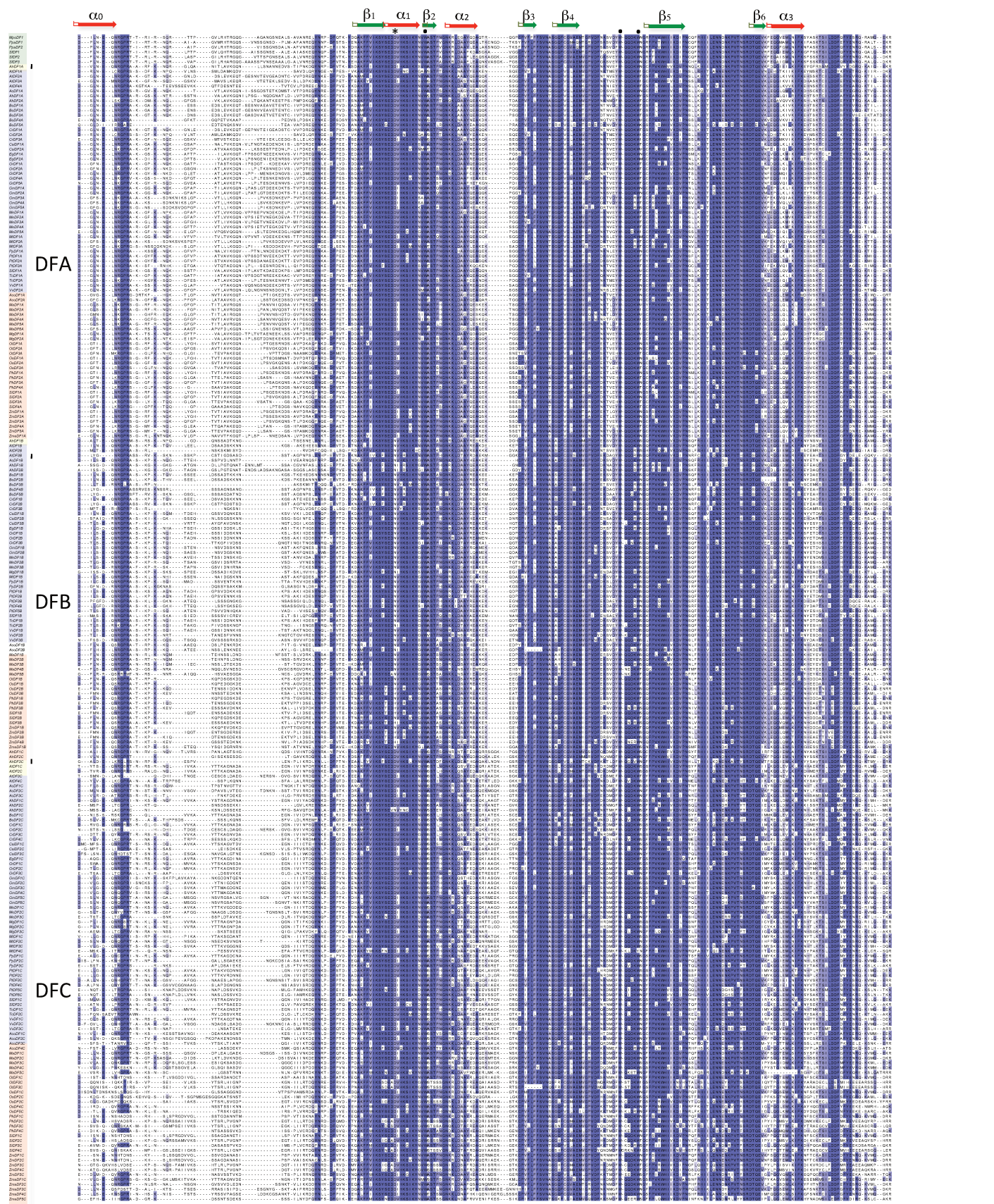
911 Zhong S, Li H, Bodi Z, Button J, Vespa L, Herzog M, Fray RG (2008) MTA is an Arabidopsis  
912 messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific  
913 splicing factor. The Plant cell 20: 1278-88

914 Zhu T, Roundtree IA, Wang P, Wang X, Wang L, Sun C, Tian Y, Li J, He C, Xu Y (2014)  
915 Crystal structure of the YTH domain of YTHDF2 reveals mechanism for recognition of  
916 N6-methyladenosine. Cell research 24: 1493-6

917

918

Outgroup to Angiosperms  
*Amborella trichopoda*  
 Dicotyledons  
 Monocotyledons

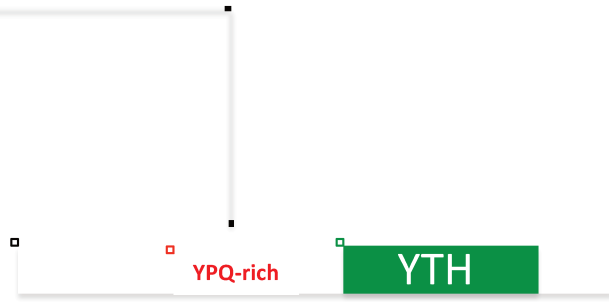
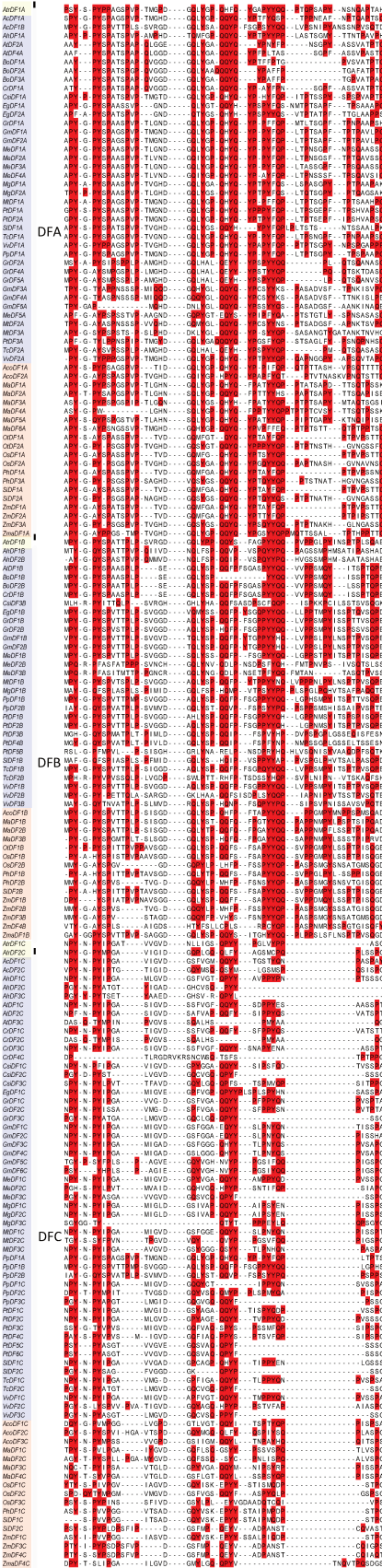


**Supplemental Figure 1 Alignment of the Viridiplantae YTHDF domains used to build the phylogenetic tree of Figure 2.** The definition of the plant YTHDF motif and the position of the structured regions were done according to published structural data on human and yeast YTHDF motifs (Xu, 2015 #1083) and the use of the pred4 protein secondary structure prediction server ([http://www.compbio.dundee.ac.uk/pred4/index\\_up.htm](http://www.compbio.dundee.ac.uk/pred4/index_up.htm)). Black dots indicate the three tryptophanes, possibly involved in forming the m<sup>6</sup>A binding aromatic cage (Theler, 2014 #1088). The asterisk indicate the D for N change, characteristic of the plant DFB subgroup, that was shown previously, for the human YTHDF1 protein (position 401), to increase by 15 fold the affinity to a m<sup>6</sup>A target (Xu, 2015 #1083).

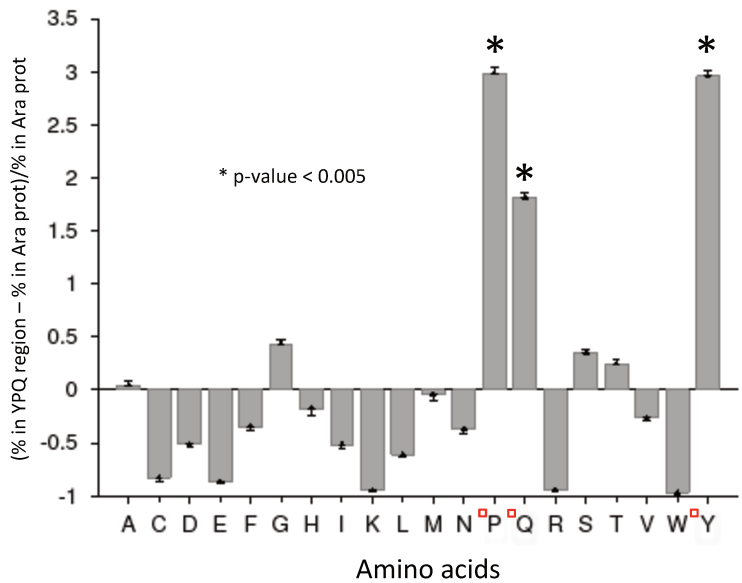


Amborella trichopoda  
 Dicotyledons  
 Monocotyledons

Y<sup>1</sup>PQ-rich



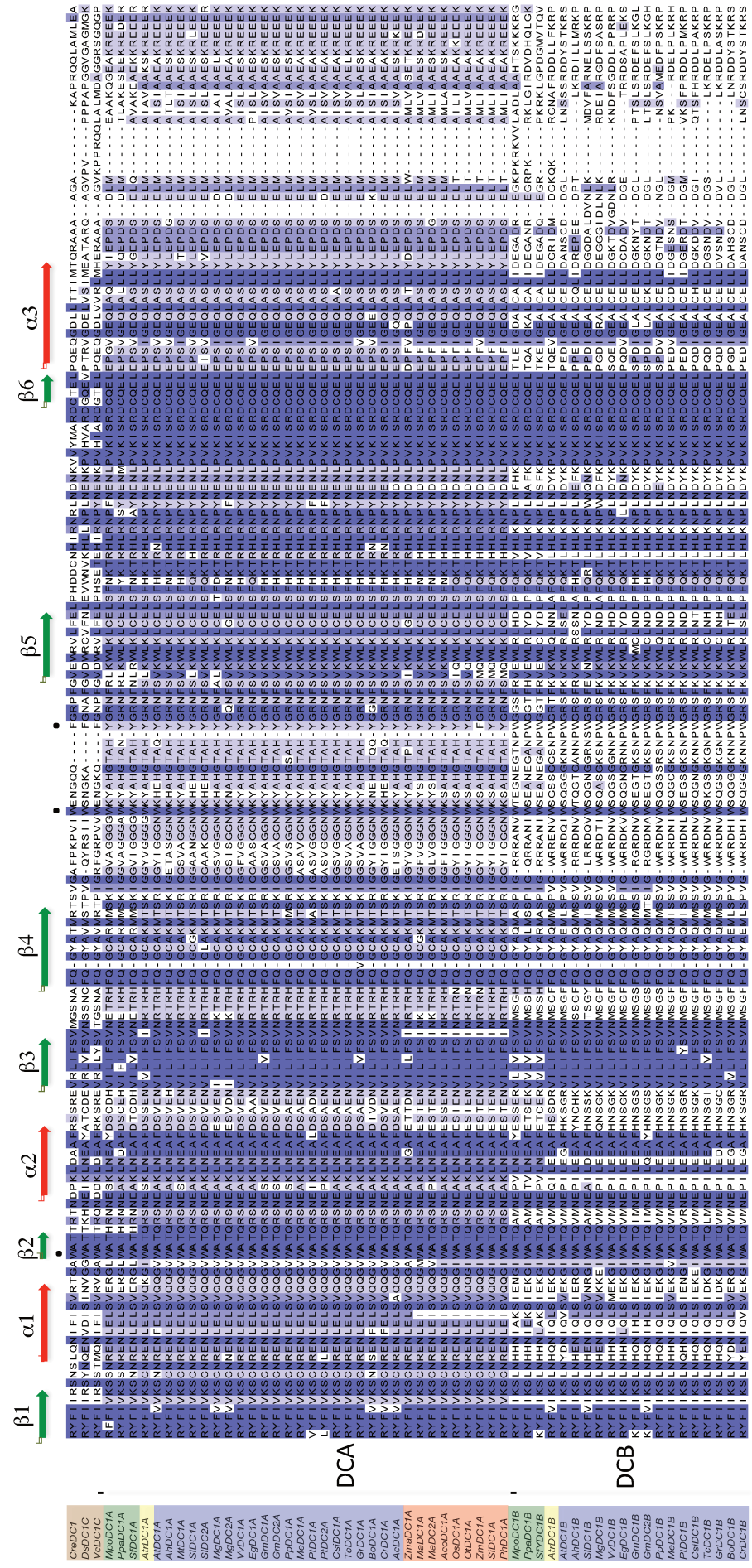
YTHDF



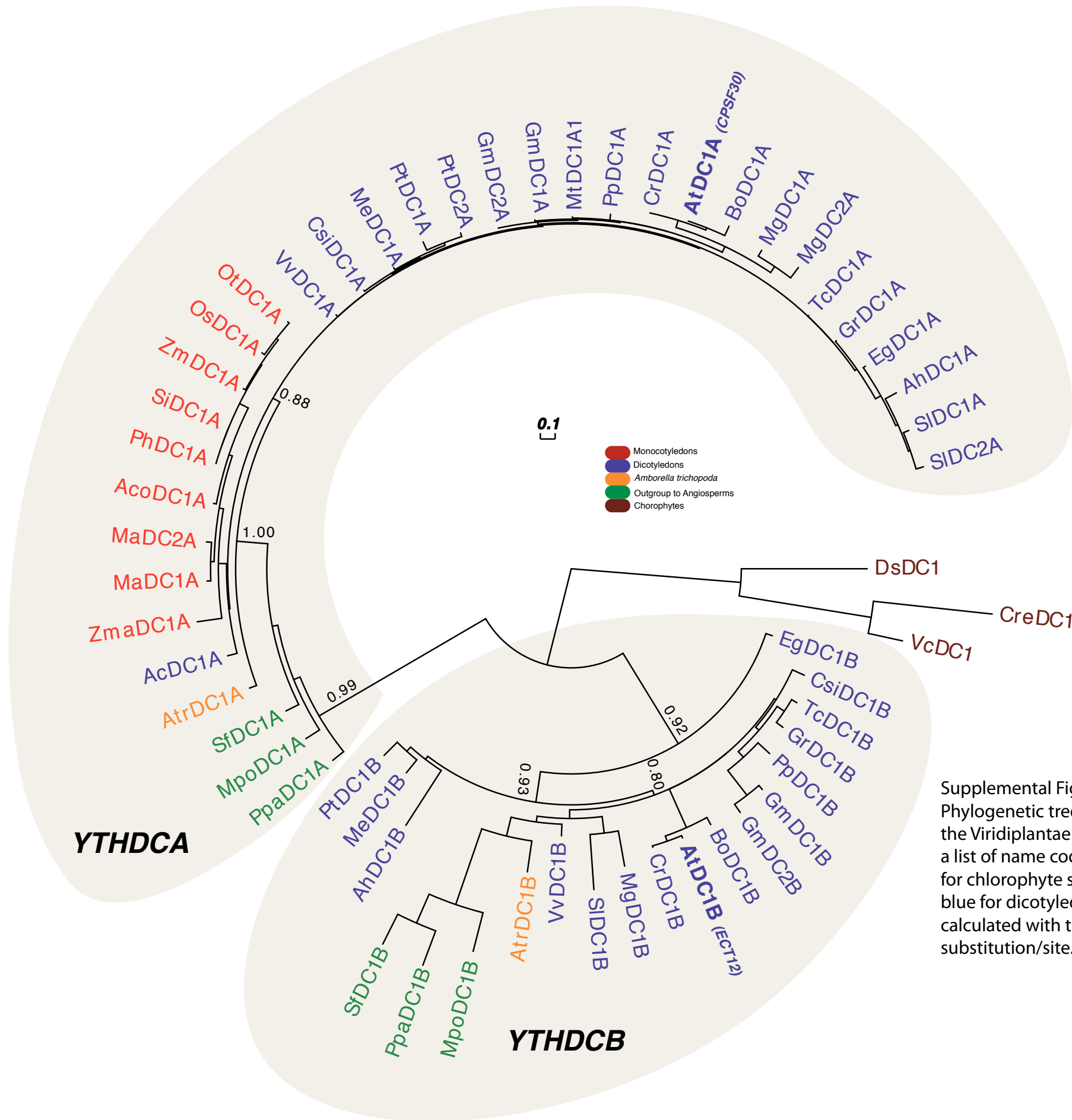
**Supplemental Figure 2 Identification of a YPQ-rich region in plant YTHDF proteins.**

Alignment of the YPQ-rich region present in most plant YTHDF proteins. The three amino acids are in red. The histogram shows the bias in composition of the YPQ-rich region when compared to all Arabidopsis proteins. The Y-axis represent the proportion of each amino acids in the YPQ-rich region compared to a database of all Arabidopsis proteins. The YPQ amino acids are statistically (p-value< 0.005) overrepresented in this region

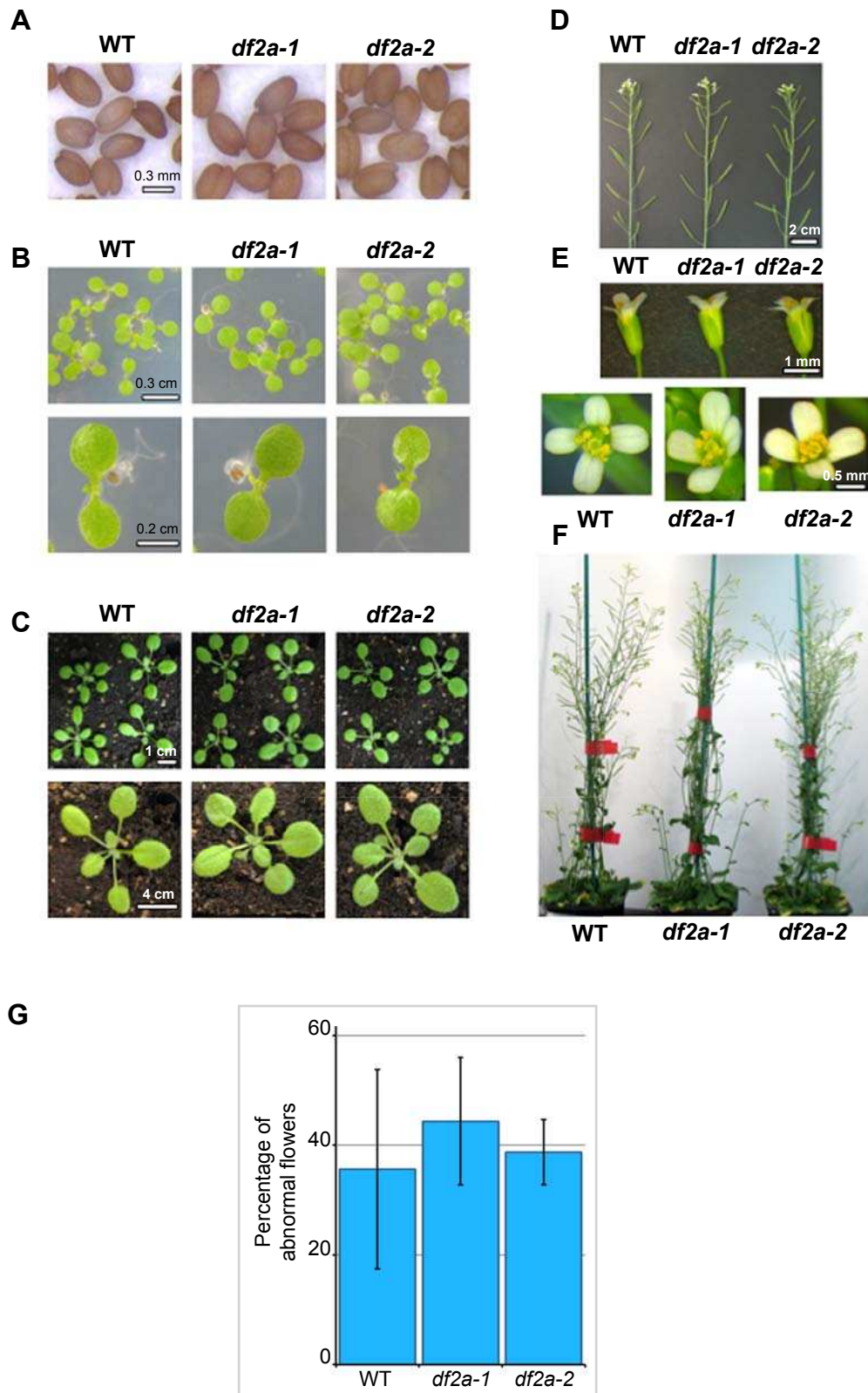
Chlorophyte  
 Outgroup to tracheophyte  
 Outgroup to angiosperm  
 Dicotyledon  
 Monocotyledon



**Supplemental Figure 3 Alignment of the Viridiplantae YTHDC used to build the phylogenetic tree of Supplemental Figure 4.** The definition of the plant YTHDF motif and the position of the structured regions were done according to published structural data on human YTHDC motifs (Xu, 2015 #1083) and the use of the pred4 protein secondary structure prediction server ([http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index\\_up.html](http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index_up.html)). Black dots indicate the three aromatic amino acids (W, F or Y) possibly involved in forming the m<sup>6</sup>A binding aromatic cage (Thaler, 2014 #1088).



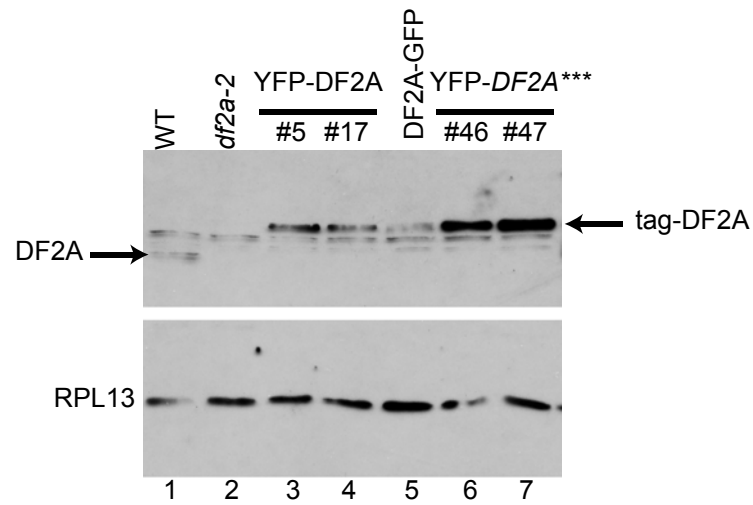
Supplemental Figure 4 Phylogenetic relations among plant YTHDC proteins  
 Phylogenetic tree was built using 57 YTHDC proteins from 32 species representing the diversity of the Viridiplantae lineage (see Supplemental Table 1 for YTH sequences and Supplemental Table 2 for a list of name codes). The two clades DCA, DCB are indicated. The color code is the following: brown for chlorophyte species, green for outgroup species to Angiosperms, orange for Amborella trichopoda, blue for dicotyledon species and red for monocotyledon species. Statistical supports of key nodes calculated with the approximate likelihood-ratio test are indicated. Scale bar indicates length of 0.1 substitution/site.



**Supplemental Figure 5: *dfa2* knockout does not trigger macro scale developmental defects nor growth delay**

(A-F) Monitoring of plant morphology across various developmental stages for wild-type (WT), *df2a-1* and *df2a-2* knockouts. (A) Dry seeds, (B) 7 day old seedlings, (C) 3 week old plants, (D) stem of adult plants, (E) open flowers, (F) adult plants. (G) Monitoring of flower defects. Flowers were observed with a binocular loupe and flowers considered as defective if they bore: (i) more than four petals, (ii) more or less than 6 stamens and/or (iv) stamens converted to petals. The histograms report the average percentage of flowers with at least one of these defects over the total number of flowers observed. SDs were calculated out of four independent biological replicates. Forty flowers were observed in each replicate for each genotype.

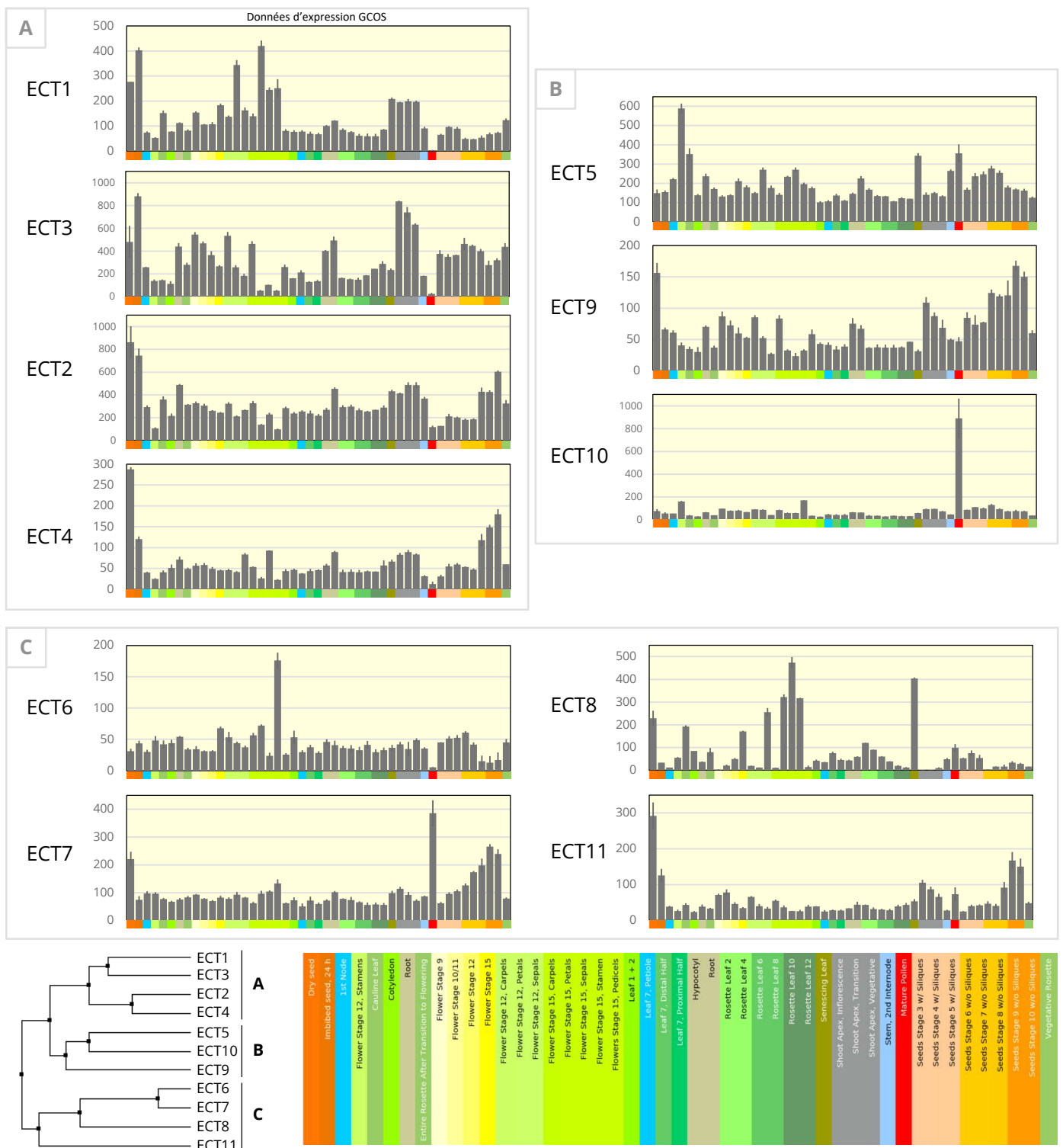




**Supplementary Figure 6: Transgenic DF2A protein levels**

Western blot analysis of steady-state levels of the transgenes YFP-DF2A (lanes 3, 4), DF2A-GFP (lane 5) and YFP-DF2A\*\*\* (lanes 6, 7) expressed in the *df2a-2* mutant background. Two independent transgenic lines were used for YFP-DF2A (lines 5 & 17) and YFP-DF2A\*\*\* (lines 46 and 47). Extracts prepared from wild-type (WT, lane 1) and knockout *df2a-2* (lane 2) plants were used as controls. Endogeneous and tagged DF2A proteins were detected with an anti-DF2A antibody (pep 2); an anti-RPL13 (at 1/10E6th) was used as loading control. The same blot was cut into two pieces respectively probed with the anti-DF2A (upper part) and anti-RPL13 (lower part) antibodies.





**Figure 19 : Profils d'expression des gènes codant les ECT à domaine YTH de type F chez *Arabidopsis thaliana***  
 Données issues de banque d'expression publiques (*Arabidopsis* eFP Browser, bar.utoronto.ca, Winter et al., 2007).  
 Les unités en ordonnées correspondent aux valeurs d'expression par une normalisation GCOS. Les profils sont regroupés en fonction de la phylogénie des protéines ECT, représentée sur l'arbre en bas à gauche, qui forme trois groupes A, B et C. La légende des histogrammes figure en bas à droite.

## II- RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES : EXISTE-T-IL UNE REDONDANCE

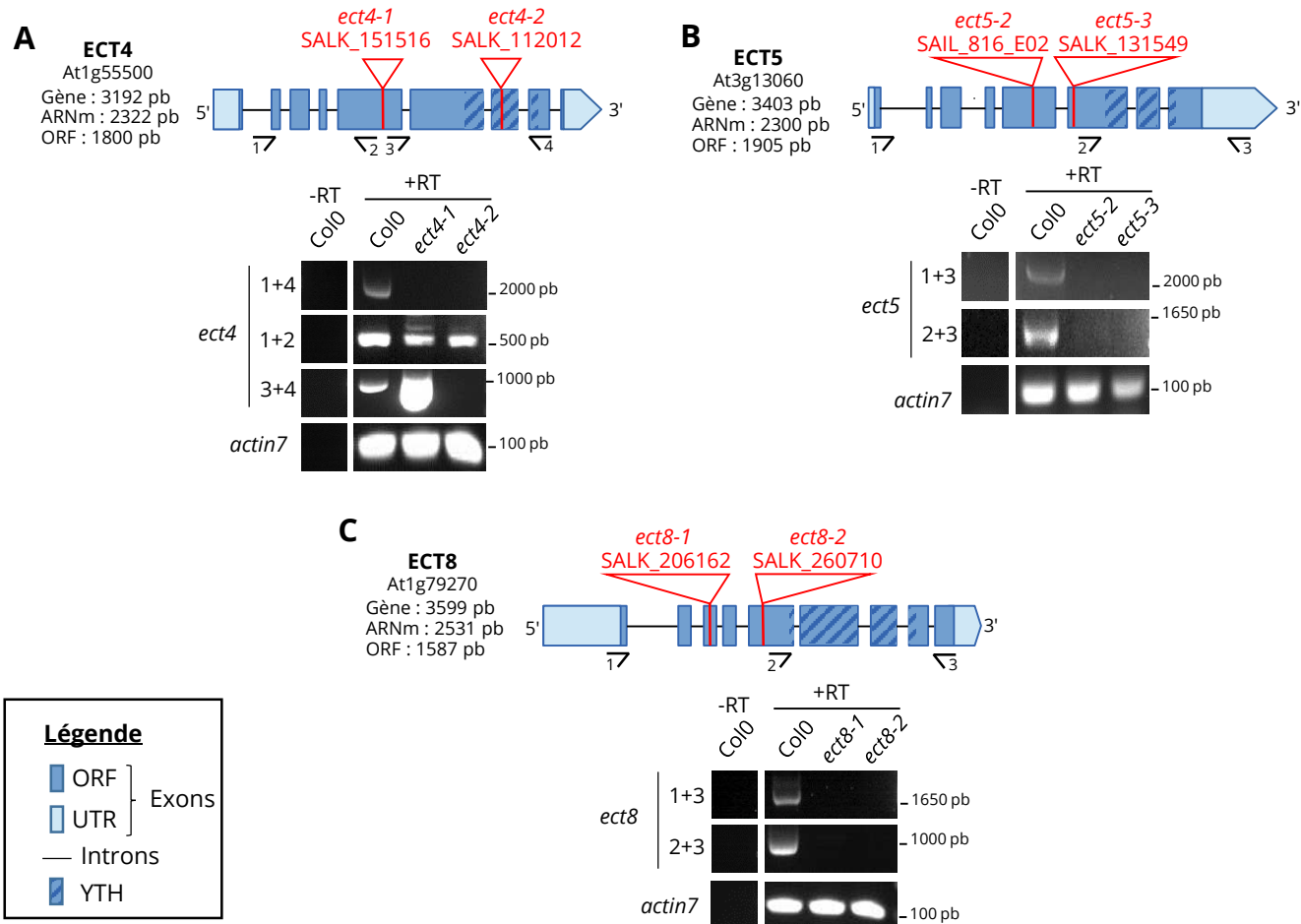
### FONCTIONNELLE ENTRE LES PROTÉINES ECT ?

Bien que ces travaux de thèse portent sur la protéine ECT2, il existe néanmoins 10 autres protéines ECT possédant un domaine YTH de type YTHDF ce qui peut suggérer une certaine redondance fonctionnelle. Ainsi, l'absence de phénotype développemental en dehors des trichomes pour les mutants *ect2* pourrait s'expliquer par la compensation fonctionnelle par d'autres protéines ECT. Cette partie regroupe des données préliminaires pour déterminer si d'autres ECT pourraient agir de façon similaire à ECT2.

#### II.1 – Comparaison des profils d'expression des transcrits

Un premier indice pouvant révéler une redondance fonctionnelle passe par la comparaison des profils d'expression des différentes ECT. Une analyse des profils d'expression des 11 gènes ECT de la famille des YTHDF est présentée dans la figure 19. Les gènes ECT du groupe A (ECT1 à 4) contrairement aux autres, présentent des profils d'expression globalement similaires mais à des échelles différentes. De façon similaire, les transcrits de ces 4 ECT sont plus faiblement exprimés dans le pollen. À l'inverse, l'expression de ces transcrits augmente progressivement au cours des étapes de maturation de la graine (hormis pour *ECT1*) pour atteindre un maximum en graines sèches et/ou imbibées. Bien que le transcrit *ECT2* soit fortement exprimée dans la graine, les résultats précédents ont montré que l'accumulation de la protéine y est différente et qu'elle n'est pas détectée dans la graine. Cette observation suggère donc un mécanisme précis de contrôle post-transcriptionnel sur l'ARNm d'*ECT2*. Contrairement au transcrit *ECT2* qui est le plus exprimée, *ECT4* possède les valeurs d'expression les faibles dans ce sous-groupe mais les profils d'expression de ces deux transcrits sont très similaires. De plus, au niveau des séquences protéiques *ECT2* et *ECT4* partagent plus de 75 % d'homologie avec des régions très conservées même en dehors du domaine YTH (données non montrées). Au vu de ces similitudes, cela pourrait proposer *ECT4* comme un homologue proche d'*ECT2* mais dont l'expression est relativement plus faible.

Dans les ECT du groupe B (*ECT5*, 9 et 10), *ECT5* est exprimée dans tous les tissus de façon relativement constante mais avec une plus forte expression dans les étamines. Le niveau d'expression d'*ECT9* est relativement faible mais croissante au cours de la maturation de la graine. Concernant *ECT10*, le transcrit apparaît spécifique du pollen mature où son expression est presque multipliée par 10 laissant présager un rôle lié à la reproduction.



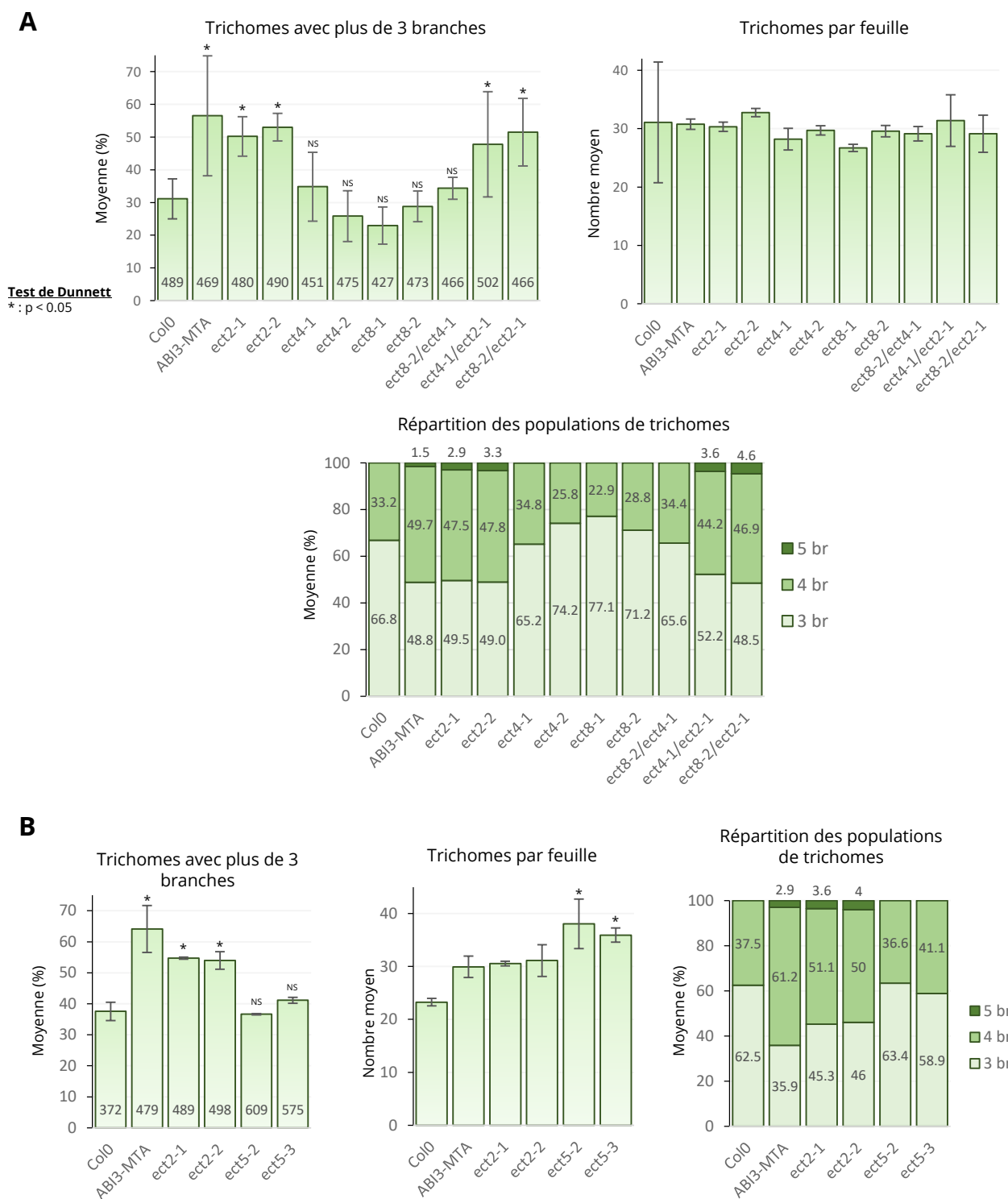
**Figure 20 : Caractérisation des lignées mutantes d'insertion ADN-T pour ECT4, ECT5 et ECT8**

(A) Structure du gène ECT4 et caractérisation des lignées transgéniques par RT-PCR. La position des ADN-T des deux lignées mutantes est indiquée en rouge. Les flèches numérotées précisent la position et l'orientation des amorces utilisées pour les RT-PCR. Les RT-PCR ont été menées à partir d'ARN issus de plantes Col0 ou des plantes mutantes *ect4-1* et *ect4-2*. Les mêmes échantillons non traités à la réaction de transcription inverse (RT) sont utilisés comme contrôle négatif. Le transcrite *actin7* est utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont présentés de la même façon pour ECT5 (B) et ECT8 (C).

Enfin les ECT du groupe C (ECT6-8 et 11) possèdent des profils très différents avec des expressions majoritairement faibles ou restreintes à certains tissus. Ainsi, *ECT6* est plus fortement exprimée dans les étamines et très faiblement dans le pollen à l'inverse d'*ECT7*. *ECT8* est plutôt exprimée dans la fleur et les feuilles sénescents alors qu'*ECT11* s'exprime de préférence dans la graine. Dans l'ensemble, ces données démontrent que les trois groupes d'ECT ont des profils d'expression très différents entre eux.

## II.2 – Analyse des trichomes dans des mutants pour ECT4, ECT5 et ECT8

Une autre piste a été explorée au travers de l'étude développementale de lignées mutantes pour certaines ECT. En effet, puisqu'*ECT2* est directement impliquée dans le développement du trichome par sa capacité à lier la méthylation, qu'en est-il des autres protéines ECT ? Pour cela, des mutants pour chacun des protéines ECT ont été caractérisés. Néanmoins, l'analyse a été concentrée sur : (i) *ECT4*, au vu de l'homologie importante avec *ECT2*, (ii) *ECT5* puisqu'elle est une autre protéine candidate retrouvée dans les expériences préliminaires de colonne d'affinité à un ARN méthylé, (iii) et sur *ECT8*, qui comme *ECT2* a également été retrouvée comme partenaire potentiel de LARP1 en système double hybride. De façon similaire à *ECT2*, deux lignées mutantes à insertion ADN-T ont été caractérisées pour *ECT4*, 5 et 8. Pour vérifier le caractère « knockout » de ces lignées mutantes et l'absence du transcrit d'intérêt, des expériences de RT-PCR ont été conduites. Dans les deux lignées *ect4-1* et *ect4-2*, aucun transcrit pleine taille n'est détecté (Figure 20-A, PCR 1+4). Néanmoins, une portion du transcrit en amont des sites d'insertion est exprimée dans une même proportion que la lignée Col0 (Figure 20-A, PCR 1+2). De plus, contrairement à la lignée *ect4-2*, un signal relativement fort par rapport à Col0 est détecté dans le mutant *ect4-1* pour un transcrit correspondant à la zone après l'insertion (Figure 20-A, PCR 3+4). Cette observation montre que la lignée mutante *ect4-1* surexprime une portion de transcrit contenant la séquence codant le domaine YTH, probablement en raison d'une activité parasite de l'ADN-T inséré dans le gène. Dans l'éventualité où ce transcrit serait traduit, il pourrait donc y avoir surproduction d'une forme tronquée disposant d'un domaine YTH intègre. Cependant, le comportement très similaire des deux lignées mutantes *ect4* (voir ci-dessous et Figure 21-A) laisse penser qu'*ect4-1* est probablement une lignée « knockout » comme *ect4-2*. Dans les lignées mutantes pour *ECT5* et *ECT8*, aucun transcrit pleine taille ni aucune portion tronquée de transcrit en aval du site d'insertion n'ont été détectés (Figure 20-B et C). Ces quatre lignées ayant des insertions ARN-T dans les gènes *ECT5* et *ECT8* ont donc été considérées comme « knockout ».



**Figure 21 : Observation des trichomes dans les mutants *ect4*, *ect5* et *ect8***

Pour chaque observation, les trichomes ont été observés sur la première paire de feuilles de 4 plantules de 3 semaines pour chaque génotype. **(A-B)** Représentation de la moyenne des trichomes avec plus de 3 branches en fonction du génotype, du nombre de trichomes par génotype et de la répartition des populations de trichomes dans des mutants concernant ECT4 et ECT8 **(A)** ou ECT5 **(B)**. Les barres d'erreurs proviennent de l'écart pour n=2 observations indépendantes. Le nombre total de trichomes observé (quel que soit le nombre de branches) pour chaque génotype est indiqué dans le premier histogramme. Les astérisques désignent le niveau de significativité selon le test de Dunnett. NS : non significatif.

Une fois ces lignées obtenues, les trichomes y ont été observés en comparaison des lignées ABI3-MTA et des mutants *ect2-1* et *ect2-2*. Aucune différence significative n'a été observée pour les deux lignées mutantes *ect4* et *ect8* ni dans un double mutant *ect4-1/ect8-2* (Figure 21-A). De même, aucun défaut de nombre de trichomes n'a été recensé et contrairement aux mutants *ect2*, aucun trichome à 5 branches n'a été observé dans ces lignées. Les doubles mutants *ect4-1/ect2-1* et *ect8-2/ect2-1* présentent quant à eux des défauts similaires aux lignées *ect2-1* et *ect2-2* avec une augmentation des trichomes à plus de 3 branches et l'apparition de trichomes à 5 branches. L'absence d'ECT4 ou ECT8 ne montre donc pas d'effet additionnel sur les trichomes par rapport à l'absence d'ECT2 seule. Concernant les mutants *ect5-2* et *ect5-3*, de la même façon aucun trichome à 5 branches n'y a été observé et la répartition du nombre de branches est similaire aux plantes Col0 (Figure 21-B). On note tout de même une augmentation significative du nombre moyen de trichomes par feuille mais seulement deux observations ont été effectuées. Comme ce défaut n'est pas observé dans la lignée ABI3-MTA, cela semble exclure un lien avec la méthylation. Pour le moment, les trichomes n'ont pas été observés dans un double mutant *ect2/ect5* en raison de la proximité génétique entre ces deux gènes qui rend difficile l'obtention d'un double mutant.

Ces observations soutiennent donc qu'au moins ECT4, ECT5 et ECT8 ne sont pas impliquées dans le développement du trichome et suggèrent ainsi qu'ECT2 pourrait être le lecteur de méthylation principal dans ce processus. Cela est d'ailleurs cohérent avec la similarité des défauts engendrés dans la lignée ABI3-MTA et les mutants *ect2*.

### **Conclusions du chapitre :**

Les travaux de ce chapitre ont d'abord montré qu'ECT2 possède les acides aminés nécessaires à l'interaction avec les résidus N<sup>6</sup>-méthyladénosines. En ce sens, les analyses *in vivo* menées par RIP ont pu démontrer qu'ECT2 lie des cibles endogènes méthylées. La mutation des trois tryptophanes, montrés essentiels dans la liaison aux résidus méthylés chez les protéines à domaine YTH de mammifères, ne permet plus à ECT2 de lier d'ARNm méthylés. Ceci supporte ECT2 comme un lecteur de méthylation chez la plante avec un mécanisme d'interaction aux résidus m<sup>6</sup>A similaire aux protéines YTHDF de mammifères.

Ces données ont également montré que la protéine ECT2 a un profil d'expression spécifique et n'est pas détecté dans les tissus sénescents, la graine et les siliques juvéniles ou matures. Bien qu'ECT2 soit exprimée de façon ubiquitaire dans les stades de développement végétatif, aucun défaut de développement général n'a été observé en l'absence d'ECT2. Puisqu'il existe au total 11 protéines ECT avec un domaine YTH de type F, ceci laisse supposer des



redondances fonctionnelles qui pourraient compenser l'absence d'ECT2. Néanmoins, l'implication d'ECT2 dans le développement des trichomes a pu être mise en avant. Il a ainsi été montré que l'absence d'ECT2 conduit à des défauts similaires à une réduction du facteur MTA, à savoir une augmentation des branches sur les trichomes. En comparaison aucun défaut n'a été observé en l'absence d'ECT4, 5 ou 8 supportant un rôle spécifique pour ECT2. De plus, ces défauts ont été directement reliés à la capacité de lecteur de méthylation d'ECT2 puisqu'une version d'ECT2 mutée sur les trois tryptophanes essentiels du domaine YTH résume ce phénotype. Ces données montrent ainsi pour la première fois le rôle physiologique d'un lecteur de méthylation dans une étape du développement. Finalement, sur un aspect moléculaire, la localisation de la protéine a été étudiée. Alors que la protéine est majoritairement diffuse dans le cytoplasme en situation normale, elle est clairement relocalisée dans les granules de stress au cours d'un stress thermique. Puisque cette localisation est dépendante de la dissociation des polysomes, cela suppose qu'ECT2 s'agrège dans des foci contenant des ARNm traductionnellement réprimés. Cette observation pourrait suggérer qu'ECT2 soit impliquée dans le contrôle de la traduction ou le stockage d'ARNm au cours d'un stress.

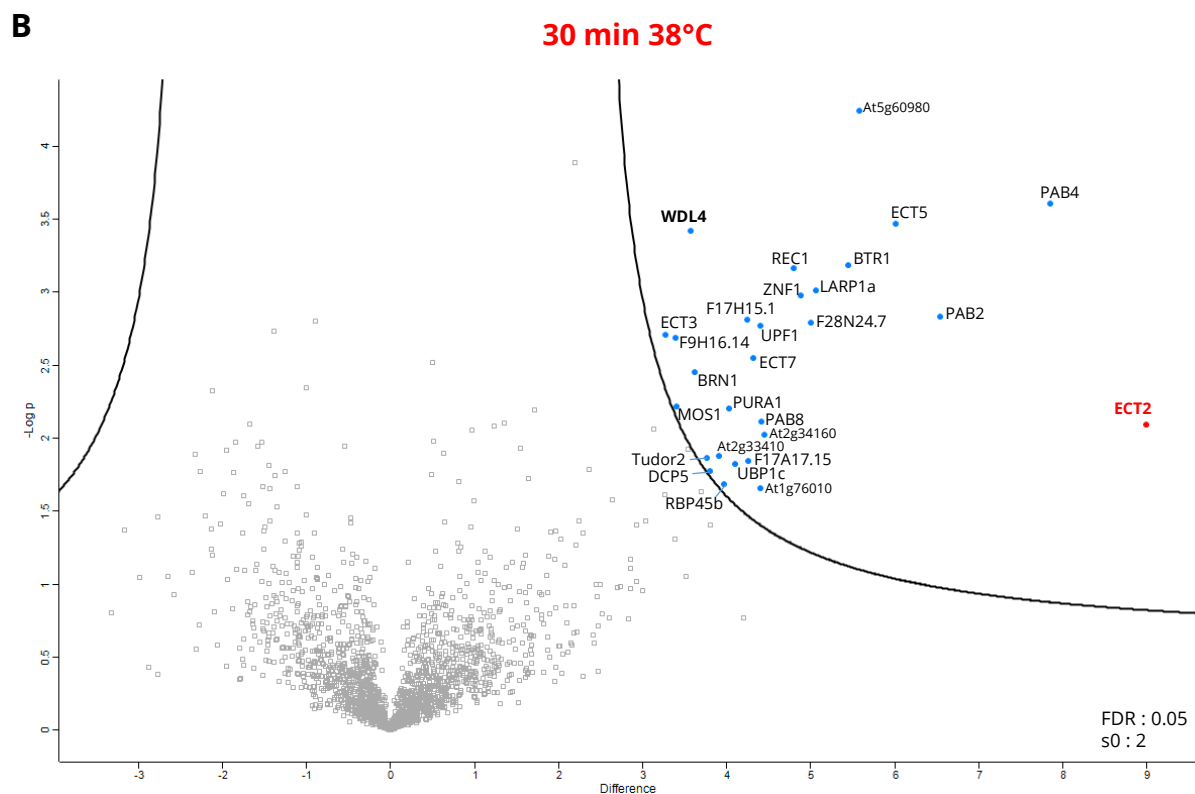
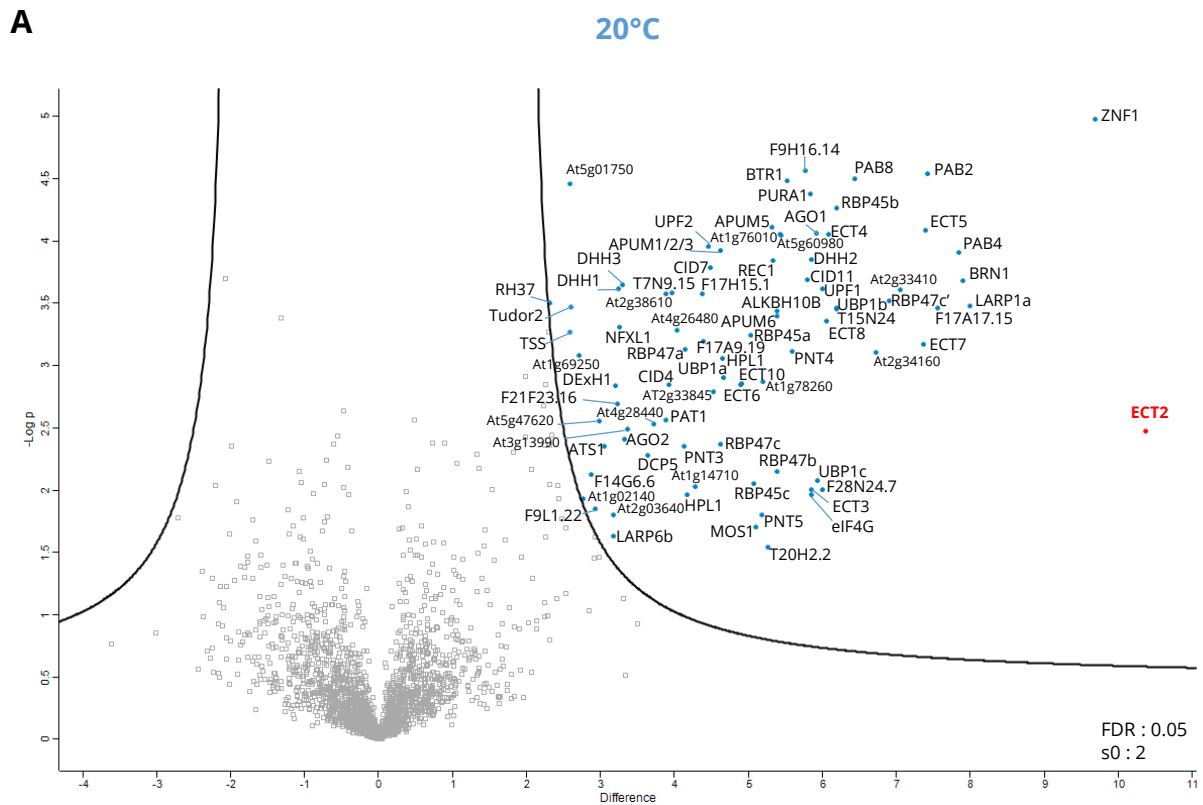
## CHAPITRE II – IDENTIFICATION DES PARTENAIRES PROTÉIQUES D’ECT2

Un des moyens pour renseigner les fonctions d’une protéine passe par l’étude de ses partenaires protéiques. Dans le cas des protéines à domaine YTH humaines, il a ainsi été montré que YTHDF1 stimule la traduction des ARN méthylés par le biais de ses nombreuses interactions avec des facteurs d’initiation de traduction (Wang et al., 2015). De même, YTHDF2 favorise la dégradation de ses cibles en recrutant le complexe de déadénylation par une interaction directe avec NOT1 (Du et al., 2016). Ces études illustrent également que les protéines à domaine YTH ont pour fonction de recruter d’autres facteurs qui vont agir directement sur l’ARN méthylé. L’identification des partenaires de ces protéines lectrices de m<sup>6</sup>A est donc indispensable pour comprendre leurs fonctions.

Dans cette démarche, nous avons choisi de documenter les partenaires protéiques d’ECT2 en condition normale pour étudier sa fonction constitutive mais également en réponse à un stress thermique en lien avec les résultats précédents. En effet, ECT2 est majoritairement relocalisée dans les granules de stress pouvant suggérer une régulation de sa fonction. La question se pose sur l’impact de cette relocalisation sur les interactions protéine-protéine d’ECT2. De plus, des données préliminaires ont démontré qu’ECT2 est un partenaire de LARP1 en double hybride (Résultats préalables I). L’identification des partenaires en situation de stress permettrait donc d’étudier si ECT2 interagit également avec LARP1 au cours d’un stress thermique pour aller dans l’hypothèse qu’ECT2 pourrait intervenir dans le mécanisme de dégradation des transcrits en réponse au stress.

### I – APPROCHE DE PROTÉOMIQUE QUANTITATIVE

Dans ce cadre, une collaboration a été initiée avec l’équipe du professeur Gordon SIMPSON qui m’a accueilli 4 semaines au sein de l’Université de Dundee en Ecosse pour accomplir l’identification des partenaires d’ECT2. La démarche a consisté à analyser en spectrométrie de masse des fractions co-immunoprécipitées avec la protéine de fusion YFP-ECT2 à partir de plantes de 14 jours exprimant ce transgène dans un fond mutant *ect2-2* et incubées 30 min à 38°C ou 20°C. Précédemment, il a été montré que ces plantes expriment le transgène dans un niveau équivalent à la protéine endogène. De plus, ces plantes complètent le défaut des trichomes observé dans un mutant *ect2* (voir chapitre I), ce qui suppose que la protéine de fusion YFP-ECT2 est fonctionnelle. L’analyse LC-MS/MS a été menée en triplicat biologique et des plantes Col0



**Figure 22 : Identification des partenaires protéiques d'ECT2 en condition normale et en situation de stress thermique**

Volcano plot montrant l'enrichissement de chaque protéine en abscisse en fonction de la significativité ( $-\log p$  value, test de Student) en ordonnée. Données obtenues à partir d'une co-immunoprécipitation de YFP-ECT2 en triplicat biologique à partir de plantes de 14 jours cultivées en condition normale **(A)** ou après 30 min de stress à 38°C **(B)**. L'enrichissement est calculé selon le logarithme du ratio de l'intensité des protéines co-immunoprécipitées avec YFP-ECT2 par rapport à Col0 ( $\log_2[\text{Intensité YFP-ECT2}/\text{Intensité Col0}]$ ). Une courbe hyperbolique sépare les candidats significatifs du bruit de fond selon le seuil fixé pour une p-value de 0.05 avec le test de Student (FDR = 0.05;  $s_0 = 2$ ). Le seul candidat spécifique de la condition 38°C **(B)** est indiqué en gras.

traitées dans les mêmes conditions ont été utilisées comme contrôle négatif. Afin de stabiliser les complexes et réduire le bruit de fond, les plantes utilisées pour l'expérience ont subi un crosslink au formaldéhyde et aucun traitement RNase n'a été effectué. Pour l'analyse, nous avons opté pour une démarche de protéomique quantitative sans étiquetage avec un isotope permettant de mesurer des paramètres relatifs à l'intensité de chaque protéine pour déterminer les candidats significatifs (Hubner et al., 2010). Cette expérience a ainsi permis d'identifier 83 partenaires d'ECT2 en condition normale et 27 en situation de stress thermique (test de Student, p-value < 0.05) (Figure 22 + Tableau 2). En comparant l'intensité des protéines enrichies dans les échantillons YFP-ECT2 par rapport au contrôle Col0, la protéine ECT2 est la plus enrichie dans les deux conditions testées. En condition normale, 125 peptides d'ECT2 ont été identifiés au total des 3 réplicats et ECT2 présente un enrichissement d'un facteur 10 par rapport au contrôle. En situation de stress, ce sont 108 peptides d'ECT2 qui sont recensés au total des 3 réplicats et ECT2 est enrichie environ 9 fois plus dans les échantillons YFP-ECT2 par rapport au contrôle. Ces données démontrent que l'efficacité d'immunoprécipitation de YFP-ECT2 est relativement similaire entre les deux conditions.

#### ➤ Les partenaires en condition normale

Concernant les partenaires protéiques à 20°C (Figure 22-A), un premier constat est que la presque totalité des facteurs identifiés a une activité de liaison à l'ARN. Une étude récente a permis de confirmer ou d'identifier de nombreuses protéines de liaison aux ARN à queue poly(A) à l'échelle du protéome chez *Arabidopsis thaliana* (Reichel et al., 2016). Selon cette source de données, 81 des 83 facteurs d'interactions d'ECT2 sont classés comme protéines de liaison à l'ARN. Ainsi seulement 2 partenaires d'ECT2 ne semblent pas avoir de capacité définie de liaison à l'ARN. Cette première observation générale démontre qu'ECT2 s'intègre bien dans des réseaux protéiques impliqués dans le métabolisme des ARN messagers.

Les partenaires définis d'ECT2 sont des protéines majoritairement localisées dans la fraction cytoplasmique. En s'intéressant à leur fonction, on remarque que la part la plus importante des partenaires est impliquée dans le contrôle de la traduction et/ou de la stabilité des ARN messagers (Tableau 3). On retrouve tout d'abord la présence de LARP1, ce qui confirme nos données préliminaires où ECT2 avait été identifiée comme partenaire de LARP1 en système double hybride (Résultats préalables I). On note ensuite la présence de facteurs canoniques comme les protéines PAB2, 4 et 8 mais aussi le facteur d'initiation de traduction eIF4G. En dehors de ces facteurs

**Tableau 2 : Comparaison des partenaires protéiques d'ECT2 en condition normale et en situation de stress**

Liste des partenaires d'ECT2 à partir de l'analyse protéomique. Pour chaque protéine est indiqué : le nombre de peptides dans chacun des réplicats (R1, R2, R3), la couverture de séquençage, la significativité (-log<sub>2</sub>(p-value); test de Student) ainsi que la différence (Intensité YFP-ECT2/Intensité Col0). La capacité de liaison à l'ARN de chaque protéine est classifiée en tant que AtRBP ou candidate selon les données de Reichel et al., 2016. ND : Non détectée.

#	AtG	Gène	Nom	Classification Reichel et al 2016	20°C							38°C											
					Nombre de peptides Col0			YFP-ECT2			Couverture Seq. (%)	-log (p-value)	Différence	Significatif	-log (p-value)	Différence	Nombre de peptides Col0			YFP-ECT2			Couverture Seq. (%)
					R1	R2	R3	R1	R2	R3							R1	R2	R3	R1	R2	R3	
-	At3g13460	ECT2	Evolutionarily conserved C-terminal region 2	AtRBP	1	6	12	37	44	44	65.3	2.479	10.369	Oui	2.096	8.984	6	6	17	33	41	34	64
1	At3g02830	ZFN1 / PNT1	Zinc finger CCCH domain containing protein 33	AtRBP	0	1	0	13	12	12	51.9	4.981	9.686	Oui	2.979	4.877	0	0	1	5	7	5	24.4
2	At5g21160	LARP1a	LA-related protein 1a	AtRBP	0	0	0	18	25	25	42.3	3.481	7.997	Oui	3.014	5.054	1	1	0	10	14	13	24.8
3	At4g03110	BRN1	RNA-binding protein Bruno like 1	AtRBP	0	0	0	16	17	16	37.2	3.683	7.903	Oui	2.459	3.609	0	0	0	4	6	6	12.2
4	At2g23350	PAB4	Polyadenylate-binding protein 4	AtRBP	15	12	9	34	37	36	52.6	3.906	7.851	Oui	3.613	7.838	1	6	6	29	34	31	52.7
5	At3g07810	F17A17.15	-	AtRBP	1	0	0	14	14	16	52	3.461	7.552	Oui	1.851	4.255	0	0	0	5	8	8	24
6	At4g34110	PAB2	Polyadenylate-binding protein 2	AtRBP	10	10	9	35	38	36	61.8	4.544	7.425	Oui	2.837	6.535	3	9	6	30	34	32	59
7	At3g13060	ECT5	Evolutionarily conserved C-terminal region 5	AtRBP	1	0	1	23	23	23	50.9	4.090	7.399	Oui	3.471	6.006	1	0	1	13	19	17	46.1
8	At1g48110	ECT7	Evolutionarily conserved C-terminal region 7	AtRBP	0	0	1	16	18	20	39.4	3.170	7.374	Oui	2.551	4.306	1	0	1	6	15	12	32.9
9	At2g33410	-	-	AtRBP	0	1	0	9	11	10	38.9	3.611	7.046	Oui	1.884	3.897	0	3	0	5	8	5	31.9
10	At1g47500	RBP47C'	Polyadenylate-binding protein RBP47C	AtRBP	0	0	1	8	9	10	47	3.518	6.907	Non	0.537	1.962	0	0	0	1	3	3	15.5
11	At2g34160	-	Alba DNA/RNA-binding protein	Candidate	2	2	1	12	13	11	66.9	3.110	6.721	Oui	2.028	4.442	1	1	0	8	9	9	60
12	At1g49760	PAB8	Polyadenylate-binding protein 8	AtRBP	15	12	10	33	36	35	54.8	4.499	6.441	Oui	2.118	4.412	5	8	4	20	22	20	46.5
13	At1g11650	RBP45B	Polyadenylate-binding protein RBP45B	AtRBP	4	4	3	11	10	10	42	4.269	6.196	Oui	1.688	3.961	0	4	2	6	8	7	32.3
14	At4g26650	T15N24	-	AtRBP	0	0	0	11	13	13	41.8	3.466	6.192	Non	0.589	1.789	0	0	0	1	4	4	13.5
15	At1g17370	UBP1B	Oligouridylate-binding protein 1B	AtRBP	1	0	3	8	10	10	31.5	3.457	6.192	Non	0.985	2.093	0	0	2	4	4	3	10.3
16	At1g5500	ECT4	Evolutionarily conserved C-terminal region 4	AtRBP	2	1	1	20	21	21	44.6	4.052	6.078		ND								
17	At1g79270	ECT8	Evolutionarily conserved C-terminal region 8	AtRBP	1	1	0	10	11	11	22.9	3.355	6.054	Non	0.256	1.044	2	1	1	2	4	3	9.5
18	At5g47010	UPF1	Regulator of nonsense transcripts 1	AtRBP	0	0	0	16	26	27	34.3	3.614	5.998	Oui	2.775	4.393	0	0	0	11	20	13	25.2
19	At1g29250	F28N24.7	Alba DNA/RNA-binding protein	AtRBP	1	5	1	11	12	11	66.9	2.003	5.996	Oui	2.797	5.000	2	1	0	8	9	8	53.8
20	At3g14100	UBP1C	Oligouridylate-binding protein 1C	AtRBP	1	0	2	11	13	11	50.4	2.078	5.939	Oui	1.830	4.099	0	0	1	4	6	6	21.3
21	At1g48410	AGO1	Protein Argonaute 1	AtRBP	4	8	3	18	24	23	28.6	4.059	5.924	Non	1.609	3.264	3	2	3	16	20	13	23.1
22	At5g61020	ECT3	Evolutionarily conserved C-terminal region 3	Candidate	1	2	2	18	21	18	51.9	2.008	5.856	Oui	2.714	3.266	0	0	2	7	8	7	24.5
23	At3g60240	eIF4G	Eukaryotic translation initiation factor 4G	AtRBP	1	2	2	23	28	31	28.9	1.962	5.851	Non	1.336	2.454	0	0	0	3	12	4	11.8
24	At4g00660	RH8 : DHH2	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 8	AtRBP	4	4	3	7	9	11	25.9	3.852	5.845	Non	0.425	1.116	0	1	0	1	4	4	10.3
25	At2g32080	PURA1	Transcription factor Pur-alpha 1	AtRBP	5	4	5	13	12	12	51.4	4.376	5.831	Oui	2.210	4.026	4	5	3	6	11	10	44.3
26	At1g32790	CID11	Poly(A)-binding protein-interacting protein 11	AtRBP	0	0	0	8	8	9	33.5	3.691	5.796	Non	0.011	-0.041	0	0	0	1	2	1	7.8
27	At1g20880	F9H16.14	-	AtRBP	0	0	0	8	7	8	40.9	4.566	5.767	Non	1.793	2.144	0	0	0	2	4	3	18.2
28	At5g18550	AtC3H58 / PNT4	Zinc finger CCCH domain-containing protein 58	AtRBP	0	0	0	7	7	5	25.2	3.114	5.597	Non	0.757	1.879	0	0	0	2	2	1	8.8
29	At5g04430	BTR1	Binding to TOMV RNA 1	AtRBP	6	9	7	19	19	19	73.8	4.488	5.529	Oui	3.189	5.439	5	5	1	10	14	10	55.9
30	At5g60980	-	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	AtRBP	4	4	2	11	14	14	42.7	4.050	5.447	Oui	4.248	5.575	0	0	0	7	7	7	22.9
31	At1g76010	-	Alba DNA/RNA-binding protein	AtRBP	4	3	3	13	14	14	55.4	4.055	5.427	Oui	1.663	4.397	1	4	2	8	10	9	44.9
32	At4g25880	APUM6	Pumilio homolog 6, chloroplastic	AtRBP	1	0	0	12	15	15	20.8	3.400	5.392		ND								
33	At3g19130	RBP47B	Polyadenylate-binding protein RBP47B	AtRBP	3	1	1	8	8	9	32.4	2.151	5.391	Non	0.095	-0.203	0	0	0	0	2	2	7.8
34	At4g02940	ALKBH10B	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	Candidate	0	0	1	8	8	8	18.5	3.443	5.385	Non	0.257	0.757	1	0	0	1	2	2	5.4
35	At1g01320	REC1	Reduced chloroplast coverage 1	Candidate	6	8	7	30	40	40	31.7	3.844	5.334	Oui	3.170	4.793	1	3	0	14	24	13	20.3
36	At3g20250	APUM5	Pumilio homolog 5	AtRBP	0	2	1	10	15	12	19.9	4.114	5.315	Non	0.614	1.541	0	0	0	3	6	1	9.2
37	At1g20220	T20H2.2	Alba DNA/RNA-binding protein	AtRBP	3	0	1	8	7	8	33	1.547	5.267	Non	0.625	2.365	1	1	0	3	3	3	22.2
38	At1g78260	-	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	AtRBP	0	0	0	7	6	7	28.8	2.869	5.200		ND								
39	At2g47850	AtC3H32 / PNT5	Zinc finger CCCH domain-containing protein 32	AtRBP	2	0	1	5	6	7	23.8	1.799	5.182	Non	0.725	1.473	0	0	0	2	3	1	8.8
40	At4g24680	MOS1	Protein MODIFIER OF SNC1 1	AtRBP	0	2	1	22	27	26	30.7	1.705	5.100	Oui	2.220	3.403	0	0	1	4	7	5	8.9
41	At4g27000	RBP45C	Polyadenylate-binding protein RBP45C	AtRBP	1	1	4	5	6	5	24.3	2.050	5.077	Non	0.958	2.048	0	1	2	2	2	2	4.8
42	At5g54900	RBP45A	Polyadenylate-binding protein RBP45A	AtRBP	0	0	0	8	8	7	33.9	3.247	5.032		ND								
43	At5g58190	ECT10	Evolutionarily conserved C-terminal region 10	AtRBP	0	0	0	6	8	8	20.5	2.855	4.916	Non	0.332	0.774	0	0	0	1	1	1	2.7



**Tableau 3 : Classification des partenaires d'ECT2 suivant leur rôle moléculaire**

Les facteurs sont classés en fonction de leur rôle décrit ou prédit selon la banque de données TAIR ou UniProtKB.

**20°C (83 partenaires)**

➤ **Cytoplasmique**

<b>Contrôle de la stabilité et de la traduction</b> <b>Facteurs canoniques</b> PAB2 / PAB4 / PAB8 eIF4G <b>Contrôle négatif de la stabilité</b> BRN1 APUM1/2/3 + APUM5			<b>Répresseur de traduction → Voie du decapping</b> LARP1 ZNF1 (PNT1) APUM1/2/3 + APUM5 <b>Non-sens Mediated Decay</b> UPF1 / UPF2	<b>Voie du decapping</b> DCP5 DHH1/2/3 PAT1 <b>RNA silencing</b> AGO1 / AGO2	<b>Activité hélicase</b> DHH1/2/3 DExH1 RH37
			<b>Formation des granules cytoplasmiques</b> Tudor2		
<b>Fonctions non renseignées</b> - Domaine YTH : ECT3 à 10 sans ECT9 - Domaine Alba : 5 protéines - Domaine KH : 4 protéines				- Domaine RRM : 7 protéines - Nuclear transport factor 2 (NTF2) : 4 protéines - Motif TPR : 2 protéines - Autres : 5 facteurs + ALKBH10B + LARP6b	

➤ **Nucléaire**

<b>Maturation des ARN</b> UBP1a/b/c HPL1 / RNP1 RBP45 A/B/C RBP47 A/B/C/C' MAGO	<b>Fonctions non renseignées</b> PNT3 / PNT4 / PNT5 (Zinc finger) CID4 / CID7 / CID11 (partenaires des PABP)	<b>Chloroplastique</b> APUM6 ATS1 LURP1-Related 15
	<b>Modification de la chromatine</b> MOS1	<b>Facteurs de transcription?</b> PURA1 NFXL1

➤ **Autres**

**30 min 38°C (27 partenaires)**

➤ **Cytoplasmique**

<b>Contrôle de la stabilité et de la traduction</b> <b>Facteurs canoniques</b> PAB2 / PAB4 / PAB8 <b>Contrôle négatif de la stabilité</b> BRN1			<b>Répresseur de traduction → Voie du decapping</b> LARP1 ZNF1 (PNT1) <b>Non-sens Mediated Decay</b> UPF1	<b>Voie du decapping</b> DCP5 (Tudor2)	<b>Formation des granules cytoplasmiques</b> UBP1c RBP45b Tudor2
			<b>Microtubules</b> WDL4		
<b>Fonctions non renseignées</b> - Domaine YTH : ECT3, 5 et 7 - Domaine Alba : 3 protéines - Domaine KH : 2 protéines				- Domaine RRM : 3 protéines - Nuclear transport factor 2 (NTF2) : 1 protéine - Motif TPR : 1 protéine	

➤ **Nucléaire ? (pas d'évidences expérimentales en stress)**

<b>Modification de la chromatine</b> MOS1	<b>Facteurs de transcription ?</b> PURA1
--	---

canoniques, des protéines évolutivement conservées et impliquées dans la voie du decapping sont identifiées comme DCP5, l'orthologue du répresseur de traduction Scd6 de levure (Rajyaguru et al., 2012), mais aussi les protéines DHH1, 2 et 3, orthologues à la protéine DHH1 de levure (Sweet et al., 2012) ou encore PAT1 (Marnef and Standart, 2010). Chez les eucaryotes, les orthologues de ces facteurs font partie d'un même complexe qui inhibe la traduction des ARNm et enclenche la suppression de la coiffe en 5' entraînant alors les cibles vers les voies de dégradation. La liste des partenaires d'ECT2 montre d'autres facteurs impliqués dans le contrôle négatif de la traduction et de la stabilité comme la protéine BRN1. Ce facteur fait partie de la famille des protéines Bruno dont de nombreux membres sont identifiés chez les eucaryotes. Chez la mouche *Drosophila melanogaster*, le facteur Bruno réprime la traduction de l'ARNm *oskar* en bloquant l'assemblage du complexe d'initiation de traduction (Nakamura et al., 2004; Chekulaeva et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, BRN1 stimule la dégradation du transcrite *SOC1* en interagissant avec sa région 3'-UTR mais le mécanisme de déstabilisation n'est pas connu (Kim et al., 2013). Il y a également les facteurs APUM qui sont les orthologues des protéines PUF ou Pumilio. Chez les mammifères et les levures, ces facteurs sont également capables d'exercer un contrôle négatif sur la traduction et la stabilité des ARNm en recrutant le complexe de déadénylation CCR4/POP2/NOT (Quenault et al., 2011). On retrouve ensuite la protéine ZNF1, acteur plus spécifique de la plante possédant des motifs doigts de zinc. Ce facteur interagit avec la région 5'UTR du transcrite *PORA* et recrute le phytochrome B pour inhiber sa traduction (Paik et al., 2012). Le mécanisme de répression est inconnu mais les auteurs de l'étude suggèrent que le phytochrome B pourrait inactiver les facteurs d'initiation eIF en les phosphorylant. Les partenaires d'ECT2 permettent également de faire un lien avec le contrôle qualité des ARNm puisqu'on retrouve les facteurs UPF1 et 2 largement documentés pour leur rôle dans le « Non-sens mediated decay » (Arciga-Reyes et al., 2006) mais également un lien avec le silencing des ARNm avec les partenaires AGO1 et 2. Outre les partenaires cytoplasmiques dont les fonctions sont documentées, il y a d'autres protéines de liaison à l'ARN moins connues mais prédites cytoplasmiques (selon la banque de données de TAIR, The Arabidopsis Information Resource). Même si leurs fonctions sont peu documentées, ces protéines possèdent néanmoins des domaines évolutivement conservés incluant 7 protéines à domaine RRM, 5 à domaine Alba (Goyal et al., 2016), 4 avec des domaines KH (Valverde et al., 2008) ou encore 2 protéines à motifs TPR (Roberts et al., 2015). Parmi celles avec un domaine KH, des travaux sur le facteur BTR1 ont été publiés pour montrer qu'il participe à bloquer la multiplication du virus de tomate (ToMV) en exerçant un contrôle négatif sur l'ARN du virus (Fujisaki and Ishikawa, 2008). Curieusement, 7 protéines ECT sur les 11 à domaine YTH de type F



sont identifiées comme des partenaires d'ECT2, à savoir d'ECT3 à 10 en excluant ECT9. Ceci suggère que les lecteurs de m<sup>6</sup>A pourraient agir dans les mêmes complexes. Chez l'homme, il a également été montré que les protéines YTHDF1 à 3 interagissent entre elles de façon directe et que YTHDF3 semble coopérer avec les deux autres (Shi et al., 2017).

D'autre part, parmi ces partenaires, une minorité est prédite ou présente des évidences de localisation nucléaire. Ces partenaires sont surtout impliqués dans les étapes de maturation des ARNm comme HLP1 (Zhang et al., 2015), UBP1 et les RBP45 et 47 (Lorković et al., 2000). Ces dernières sont les plus proches orthologues de la famille TIA-1 (T-cell Intracellular Antigen 1) et TIAR (TIA-1-related). Chez l'humain, en condition normale ces facteurs sont à la fois cytoplasmiques et nucléaires, où ils participent à l'épissage de certains transcrits (Waris et al., 2014). Néanmoins, leur rôle est plus connu en situation de stress où ils sont majoritairement cytoplasmiques et répriment la traduction de leurs cibles en participant directement à la formation de granules de stress cytoplasmiques (Mazan-mamczarz et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, UBP1c participe à la séquestration de certains transcrits dans les granules de stress en réponse à un stress hypoxique (Sorenson and Bailey-Serres, 2014). Puisqu'il s'agit ici d'un partenaire en condition normale, il est difficile de dire si ECT2 interagit avec la version cytoplasmique ou nucléaire des homologues de TIA-1 et TIAR. Cependant, de façon plus étonnante le facteur MOS1 est retrouvé et celui-ci est exclusivement nucléaire (Li et al., 2011). Ce facteur agit dans le contrôle de la transcription de certains gènes d'immunité en contrôlant la structure chromatinienne (Li et al., 2010). On note aussi des facteurs dont les fonctions ne sont pas renseignées mais dont les localisations sont prédites nucléaires comme les facteurs CID4, 7 et 11 (CTC-Interacting Domain). Les seules données publiées sur ces facteurs montrent qu'ils interagissent avec le domaine C-terminal des PAB en système double hybride (Bravo et al., 2005). Finalement, d'autres facteurs PNT à doigts de zinc de la même famille que le partenaire cytoplasmique ZNF1 sont retrouvés mais leurs fonctions sont inconnues (Paik et al., 2012). L'observation de ces facteurs nucléaires suggère qu'une portion d'ECT2 pourrait être nucléaire.

En résumé pour les partenaires d'ECT2 en condition normale, il apparaît clairement que la grande majorité des candidats est impliquée dans le contrôle de la traduction et/ou de la stabilité des ARNm et laisse supposer qu'ECT2 pourrait agir dans les mêmes voies. Plus précisément, une tendance semble apparaître vers un contrôle négatif au vu des nombreux facteurs qui sont impliqués dans la répression de la traduction ou dans le contrôle négatif de la stabilité des ARNm.

### ➤ Les partenaires en situation de stress

Concernant ensuite les partenaires en condition de stress, le premier constat est la diminution majeure du nombre d'interactants. Alors que 83 partenaires sont recensés en condition normale, en situation de stress thermique seulement 27 partenaires significatifs ont été identifiés alors que l'efficacité d'immunoprécipitation de YFP-ECT2 est similaire entre les deux conditions (Figure 22-B et Tableau 3). À l'exception d'un seul, tous les facteurs interagissant avec ECT2 en condition de stress sont également des interactants en condition normale. En comparant l'enrichissement de chaque partenaire identifié dans les deux conditions, une réduction globale est observée en situation de stress (Tableau 2). Ceci semble indiquer que l'exposition au stress thermique a pour conséquence de diminuer la plupart des interactions d'ECT2. Les résultats du chapitre précédent ont pu montrer qu'ECT2 s'agrège dans les granules de stress. En ce sens, les interactions avec les PAB2, 4 et 8, LARP1, RBP45b, UBP1c et Tudor2 sont maintenues. Tous ces facteurs sont connus pour être accumulés dans les granules de stress. Chez *Arabidopsis*, Tudor 2 participe également à la formation des granules cytoplasmiques et semble requise pour le decapping en situation de stress (Gutierrez-Beltran et al., 2015). Au vu de la localisation d'ECT2 dans les granules de stress, cela pouvait impliquer de retrouver une quantité importante de complexes et de facteurs connus pour s'agréger dans ces corpuscules d'autant plus que des tissus crosslinkés ont été utilisés. Néanmoins, pour garantir la dissolution des agrégats cytoplasmiques, la méthode de purification des partenaires a été très stringente en combinant des étapes de sonication et des conditions de lyse avec 1 % de SDS mais aussi une capture des complexes en présence de 0,5% de SDS et 0,5 % de Triton X-100. En situation de stress il n'y a pas de nouveau partenaire d'ECT2 qui est connu pour être associé aux granules de stress (facteurs d'initiation par exemple), ce qui peut supposer que les complexes des granules cytoplasmiques ont pu être séparés. Par ailleurs, la majorité des interactions avec les acteurs du decapping et de la dégradation est perdue hormis DCP5 et UPF1. La présence de DCP5 a été démontré dans les p-bodies chez *Arabidopsis* mais les orthologues Scd6 de levure et RAP55 humaine sont retrouvées à la fois dans les granules de stress et les p-bodies (Rajyaguru et al., 2012; Yang et al., 2006). Le facteur UPF1 est quant à lui prédominant dans les p-bodies chez les eucaryotes (Sheth and Parker, 2007). Enfin, ECT2 interagit toujours avec BTR1, BRN1 et ZNF1 mais aussi les autres facteurs dont les rôles ne sont pas connus comme les protéines à domaines Alba, KH ou RRM mais aussi trois ECT (ECT3, 5 et 7).

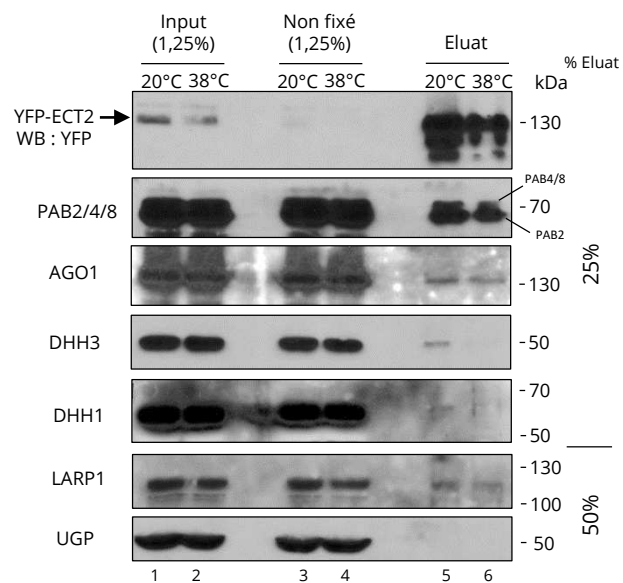
**Tableau 4 : Comparaison des partenaires définis par protéomique pour YTHDF1, YTHDF3 et ECT2**  
 Les facteurs sont regroupés selon leurs fonctions et s'ils sont spécifiques des YTHDF, communs avec ECT2 ou spécifiques à ECT2. Les partenaires de YTHDF1 ont été définis dans Wang *et al.* 2015 et ceux de YTHDF3 dans Shi *et al.* 2017.

Classes des partenaires	YTHDF1	YTHDF3	Communs YTHDF1/3	ECT2
<b>Facteurs spécifiques des YTHDF</b>				
<b>Protéines ribosomales</b>				
40S	27	29	27	-
60S	23	16	13	-
<b>Facteur d'initiation eIF</b>				
eIF3	6	3	1	-
eIF2	-	1	-	-
eIF4	-	1 (eIF4A1)	-	1 (eIF4G)
<b>Facteur d'élongation de traduction</b>				
eEF1A1	1	1	1	-
<b>Structure cellulaire</b>				
Chaines tubulines	4	6	4	-
Chaines kératines	7	12	6	-
Actines	2	1	1	-
Vimentine	1	1	1	-
<b>Déadénylation</b>				
PAN3	-	1	-	-
CNOT1	-	1	-	-
<b>Chaperonnes</b>				
Protéines HSP	4	5	2	-
Sous-famille DnaJ	2	1	-	-
<b>Facteurs d'épissage</b>				
Protéines SRSF	1	5	1	-
Protéines U2AF	-	2	-	-
<b>Autres</b>				
Sous-unités Histones	3	1	1	-
Protéines de liaison Y-Box	2	2	2	-
Protéines à répétitions ankyrines	1	1	-	-
Autres	33	39	14	-
<b>Facteurs communs avec ECT2</b>				
Protéines HNRNP	6	6	5	2
ARN Hélicases ATP-dépendantes	4	7	4	5
Protéines à doigts de zinc	-	1	-	4
Protéines à domaine YTH	-	1	-	7
LARP1	1	1	1	1
PABP	2	2	2	3
PURA-alpha	-	1	-	1
<b>Facteurs spécifiques pour ECT2</b>				
<b>Répresseurs de traduction</b>				
Co-facteurs du decapping	-	-	-	4
Autres répresseurs	-	-	-	3
<b>Contrôle négatif de la stabilité</b>				
Complexe NMD	-	-	-	2
RNA silencing	-	-	-	2
<b>Autres</b>				
	-	-	-	44
<b>Total</b>	<b>130</b>	<b>148</b>	<b>86</b>	<b>83</b>

Le seul interactant spécifique de la condition 38°C est WDL4. Très peu connu, ce facteur fait partie d'une famille de protéines pouvant s'associer aux réseaux de microtubules (Liu et al., 2013). Néanmoins, ce facteur est également recensé comme une protéine candidate de liaison à l'ARN selon une étude protéomique (Reichel et al., 2016). Les seules données publiées de cette protéine n'établissent aucun lien avec un stress environnemental. Cependant, on peut émettre l'hypothèse que cette protéine puisse aider ECT2 à s'agrèger dans les granules cytoplasmiques par le biais des réseaux de microtubules. Il est en effet publié que ce type de réseau gouverne la dynamique des granules de stress (Nadezhdina et al., 2010; Chernov et al., 2009) et des p-bodies (Sweet et al., 2007).

## **II – COMPARAISON AVEC LES DONNÉES DES PROTÉINES À DOMAINE YTH DE MAMMIFÈRES**

Pour faire le lien avec les protéines à domaine YTH de mammifères, les données d'interactome d'ECT2 ont été comparées avec les partenaires identifiés en complexe avec les protéines à domaine YTH des mammifères. Néanmoins, comme ECT2 fait partie des lecteurs de type YTHDF, la comparaison a été concentrée sur les partenaires des YTHDF plutôt que les YTHDC. Seuls les partenaires de YTHDF1 et YTHDF3 ont été définis par une approche similaire de purification en tandem par affinité suivi d'une analyse de spectrométrie de masse (Shi et al., 2017; Wang et al., 2015). Ainsi, 130 partenaires pour YTHDF1 et 148 pour YTHDF3 ont été identifiés dont 86 en commun. En lien avec la fonction commune de YTHDF1 et 3 comme stimulateur de traduction, leurs partenaires communs sont majoritairement des protéines ribosomales (sous-unités 40S et 60S) et des facteurs d'initiation de traduction (principalement eIF3). D'autres partenaires communs concernent également des fonctions liées à la structure cellulaire comme des chaînes de tubulines ou de kératines. Très majoritairement, les partenaires de YTHDF1 et 3 sont différents de ceux définis pour ECT2 (Tableau 4). Le premier constat est qu'aucune protéine ribosomale n'a été identifiée parmi les partenaires d'ECT2 alors qu'une quarantaine est retrouvée en association avec les YTHDF. De même, aucun facteur d'initiation eIF3 n'est retrouvé parmi les partenaires d'ECT2. Seul le facteur eIF4G du complexe de coiffe a été identifié avec ECT2 mais l'orthologue n'est pas retrouvé parmi les interactants de YTHDF1 et 3. À l'inverse, de nombreux partenaires d'ECT2 sont impliqués dans le contrôle négatif de la traduction et de la stabilité des ARNm. Aucun répresseur de traduction n'est retrouvé parmi les partenaires des YTHDF1 et 3. YTHDF3 interagit avec deux acteurs de la déstabilisation des transcrits liés à la déadénylation



**Figure 23 : Interaction *in vivo* entre ECT2 et certains candidats par co-immunoprécipitation**

Expérience d'immunoprécipitation contre une étiquette YFP menée à partir d'extraits natifs de plantes de 14 jours exprimant YFP-ECT2 (130 kDa) et incubées 30 min à 38°C ou 20°C. A l'aide d'anticorps spécifiques, la présence des protéines PAB, AGO1, DHH1 et 3 ainsi que LARP1 est testée dans les fractions éluées avec YFP-ECT2. L'approche a été réalisée avec des billes magnétiques couplées à un anticorps monoclonal contre la GFP (Miltenyi). Un anticorps contre l'UGP est utilisé comme contrôle négatif d'interaction avec ECT2. La quantité déposée de chaque fraction (input, non fixée et éluat) est indiquée ainsi que le poids moléculaire des protéines en kilodalton (kDa).

(PAN3 et CNOT1) mais l'orthologue de CNOT1 n'a pas été retrouvé avec ECT2 et aucun orthologue de PAN3 n'est recensé chez la plante. Les interactants de YTHDF2 ne sont pas connus dans leur ensemble mais au moins une interaction avec CNOT1 a été démontrée (Du et al., 2016), qui n'est donc pas retrouvée avec ECT2.

Certaines classes de partenaires sont néanmoins similaires entre ECT2 et les YTHDF comme des protéines hnRNP, des hélicases ATP-dépendante, des protéines à doigts de zinc (dont une est retrouvée avec YTHDF3) et les protéines à domaine YTH (YTHDF2 est identifiée avec YTHDF3). Bien que des hélicases ATP-dépendante soient identifiés avec les YTHDF, l'orthologue de DHH1 ne figure pas parmi les candidats à l'inverse d'ECT2 qui interagit avec les trois homologues de DHH1 codés par le génome d'*Arabidopsis*. Le facteur PURA est également retrouvé en association avec YTHDF3 comme ECT2. Un point commun concerne la présence de LARP1 et de protéines PABP parmi les interactants de ces trois protéines à domaine YTH. Néanmoins, le nombre de peptides de LARP1 reste très faible dans les données de protéomique de YTHDF1 (1 peptide) et YTHDF3 (3 peptides). Dans l'ensemble, le nombre de facteurs communs entre ECT2 et ces deux YTHDF reste minoritaire. Au vu des différences majeures, ces résultats supportent qu'ECT2 ait un rôle distinct par rapport à YTHDF1 et 3 et ne soutiennent pas un rôle stimulateur de traduction pour ECT2.

### III – VALIDATION DE CERTAINES INTERACTIONS

L'analyse de protéomique a permis d'identifier un grand nombre d'interactants protéiques d'ECT2 en condition normale et en situation de stress thermique permettant de faire des hypothèses quant aux fonctions moléculaires de la protéine ECT2. Toutefois, l'analyse a été réalisée à partir de tissus fixés au formaldéhyde et sans traitement RNase impliquant que certaines interactions pourraient être non spécifiques ou médiées par l'ARN. Il est donc nécessaire de démontrer par une autre approche l'existence de ces interactions.

Ainsi, pour valider certaines interactions, des expériences de co-immunoprécipitation ont été répétées sans tenir compte de la présence de l'ARN dans un premier temps. La lignée transgénique exprimant YFP-ECT2 a été utilisée et les fractions immunoprécipitées avec cette protéine ont été analysées par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre des partenaires candidats d'ECT2. Dans ces expériences, l'efficacité d'immunoprécipitation est déterminée par l'appauvrissement du signal correspondant à YFP-ECT2 (130 kDa) dans les fractions non retenues par rapport aux fractions de départ (Figure 23, comparer les puits 3 et 4 aux puits 1 et 2). En condition normale, des interactions sont retrouvées pour les protéines PAB2, PAB4 et PAB8,

AGO1, DHH1, DHH3 et LARP1 (Figure 23, puits 5). À noter que l'anticorps utilisé contre les PAB permet de reconnaître les trois protéines PAB2, 4 et 8 (Dufresne et al., 2008). En comparaison, aucun signal n'est détecté pour la protéine UGP qui n'a pas été identifiée comme interagant d'ECT2 d'après la spectrométrie de masse. D'autre part, les interactions avec les PAB et LARP1 sont maintenues après 30 min de stress à 38°C alors que l'interaction est perdue avec DHH1 et DHH3 (Figure 23, puits 6), ce qui rejoint les données de protéomique. L'interaction avec AGO1 est néanmoins toujours visible après un stress thermique alors qu'elle n'est pas significative dans les données de protéomique. Cette différence pourrait s'expliquer par des conditions moins stringentes dans cette expérience d'immunoprécipitation. Ainsi, les interactions avec certains des candidats identifiés par l'approche de protéomique ont pu être validées par cette autre approche et sans utiliser de tissus fixés au formaldéhyde.

Néanmoins, ces expériences ne permettent pas de déterminer si les interactions sont dépendantes de la présence d'ARN. Pour cela, il est nécessaire de répéter les expériences en ajoutant une étape supplémentaire de traitement RNase pour définir si l'interaction est toujours détectable en l'absence d'ARN. À ce jour, seuls les facteurs LARP1, DCP5 et les PABP ont été testés par cette approche (voir Chapitre suivant - Partie I).

### **Conclusions du chapitre :**

L'identification des partenaires protéiques avait pour but de déterminer les réseaux de protéines dans lesquels ECT2 prend part pour émettre des hypothèses sur sa fonction moléculaire. Les résultats ont montré qu'ECT2 interagit majoritairement avec des facteurs cytoplasmiques impliqués dans le contrôle de la traduction et/ou de la stabilité des ARNm. Ces deux voies sont donc cohérentes avec les fonctions connues des protéines à domaine YTH humaines. Néanmoins, une tendance semble montrer un rôle négatif puisque les partenaires d'ECT2 sont majoritairement orientés dans un contrôle répressif de la traduction chez la plante ou chez d'autres organismes. C'est ainsi le cas de LARP1, DCP5, PAT1, DHH1/2/3, AGO, UPF1/2, APUM ou encore ZNF1. Ces résultats pourraient suggérer qu'ECT2 exerce une action répressive sur la traduction des ARNm méthylés en recrutant ces facteurs. Chez les mammifères, YTHDF1 et 3 ont une action positive sur la traduction des ARNm méthylés en interagissant avec de nombreux facteurs d'initiation et des sous-unités ribosomales (Li et al., 2017; Shi et al., 2017; Wang et al., 2015). Aucune de ces protéines n'est retrouvée comme partenaire d'ECT2. Ceci soutient qu'ECT2 agirait différemment sur le contrôle de la traduction des ARNm méthylés par rapport aux protéines à domaine YTH des mammifères et n'agirait pas avec une action de stimulateur de traduction.

Cependant, parmi les partenaires d'ECT2, les PAB et le facteur eIF4G sont des acteurs connus chez les eucaryotes pour avoir un rôle positif dans l'initiation de traduction. Néanmoins, au moins eIF4G est une cible récurrente pour les facteurs répresseurs de traduction. C'est notamment le cas de plusieurs orthologues des partenaires d'ECT2 incluant Scd6, orthologue de DCP5 chez la levure, qui exerce son rôle inhibiteur en bloquant eIF4G et l'assemblage du complexe de pré-initiation de traduction (Rajyaguru et al., 2012; Poornima et al., 2016). Ainsi, dans l'hypothèse où l'interaction d'ECT2 avec eIF4G est indépendante de l'ARN, cela pourrait également aller dans le sens d'un rôle répresseur sur l'initiation de traduction par un blocage du complexe de coiffe. Finalement, même si le rôle d'ECT2 dans le contrôle de la traduction semble différent des protéines YTH humaines, on peut penser que comme elles, ECT2 agit principalement pour recruter d'autres facteurs sur les ARNm méthylés et influencer leur devenir. À partir de ces conclusions, le rôle d'ECT2 dans le contrôle répressif de la traduction se doit d'être précisé et fait l'objet du prochain chapitre.





# **CHAPITRE III – QUEL EST LE LIEN FONCTIONNEL ENTRE LA PROTÉINE ECT2 ET SES PARTENAIRES LARP1 ET DCP5 DANS LE CONTRÔLE DE LA TRADUCTION ?**

Au vu des résultats de protéomique, mon hypothèse est qu'ECT2 joue un rôle de répresseur de traduction en recrutant certains facteurs impliqués dans ce processus. Pour cela, j'ai choisi d'explorer plus en détails le lien avec deux partenaires particuliers que sont LARP1 et DCP5 pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ces deux facteurs sont conservés chez les eucaryotes et leurs fonctions sont largement documentées dans le contrôle de la traduction (Voir introduction). Le choix pour ces deux facteurs pourrait permettre de rapprocher les fonctions d'ECT2 de LARP1 et/ou DCP5 afin de préciser son rôle négatif sur le contrôle de la traduction. De plus, à l'opposé d'autres partenaires, plusieurs outils étaient déjà disponibles pour LARP1 avec notamment des lignées mutantes et un anticorps spécifique tout comme DCP5 avec la disponibilité d'un mutant hypomorphe (Xu & Chua, 2009) et de lignées transgéniques issues d'une collaboration avec l'équipe de Dominique Gagliardi (IBMP, Strasbourg).

## **I – CARACTÉRISATION DES INTERACTIONS ENTRE ECT2, LARP1 ET DCP5**

### **I.1 – Nature de l'interaction entre ECT2 et LARP1**

Pour étudier plus spécifiquement le lien entre ECT2, LARP1 et DCP5, l'interaction entre ces protéines a d'abord été étudiée. Les résultats du chapitre I ont démontré que la mutation de trois tryptophanes essentiels du domaine YTH d'ECT2 abolit sa capacité à fixer des ARN méthylés. Le premier l'objectif a donc été de déterminer si les interactions sont toujours valables dans un contexte où ECT2 ne lie plus d'ARN méthylé. Néanmoins, seul le facteur LARP1 a été testé avec cette approche. Les résultats montrent qu'au moins en condition normale, la purification de la version normale ou mutée d'ECT2 permet de co-immunoprécipiter LARP1 (Figure 24-A). Il reste néanmoins difficile d'évaluer si les interactions varient subtilement entre les deux versions d'ECT2 puisque le signal est saturant dans les éluats. Cependant, au niveau qualitatif, ceci semble indiquer que la capacité de liaison à la méthylation d'ECT2 n'est pas un prérequis pour interagir avec LARP1 ce qui pourrait suggérer une interaction non dépendante de l'ARN. Pour déterminer ce point, l'expérience a été répétée avec une étape supplémentaire de traitement RNase à partir de plantes de 14 jours exprimant YFP-ECT2 et exposées ou non à un stress thermique. Les résultats de

western blot montrent tout d'abord que le traitement RNase n'affecte pas l'efficacité d'immunoprécipitation d'YFP-ECT2 puisque l'intensité du signal correspondant dans les éluats est relativement similaire entre les différentes conditions testées (Figure 24-B, puits 3 à 6). L'interaction avec LARP1 est bien détectée dans les échantillons non traités en condition normale et en stress thermique (Figure 24-B, puits 3 et 5). Dans les échantillons traités, l'intensité de l'interaction avec LARP1 est similaire par rapport aux échantillons non traités en condition normale ou en situation de stress thermique (Figure 24-B, puits 4 et 6, signal LARP1). L'efficacité du traitement RNase a été vérifiée et aucun ARN n'est visible dans les échantillons incubés avec le mix de RNase comprenant des RNases A/T1, qui hydrolysent les ARN après les C, G et U, et une RNase I qui hydrolyse les ARN simple brin (Figure 24-C). Ceci indique que le traitement n'affecte pas l'interaction entre ECT2 et LARP1 qui suppose une interaction non dépendante de la présence d'ARN. En lien avec les données préliminaires de double hybride démontrant une interaction LARP1-ECT2, ces résultats vont dans le sens d'une interaction directe.

En comparaison, l'interaction entre ECT2 et les PAB2 a également été testée dans ces conditions. En condition normale comme en situation de stress thermique, l'interaction avec les protéines PAB diminue significativement avec le traitement RNase mais ne disparaît pas complètement (Figure 24-B, puits 4 et 6, signal PAB). Puisqu'aucun ARN n'a été retrouvé cela suggère que les interactions avec les PABP sont principalement dépendantes de l'ARN mais curieusement qu'une partie est toujours maintenue même sans ARN.

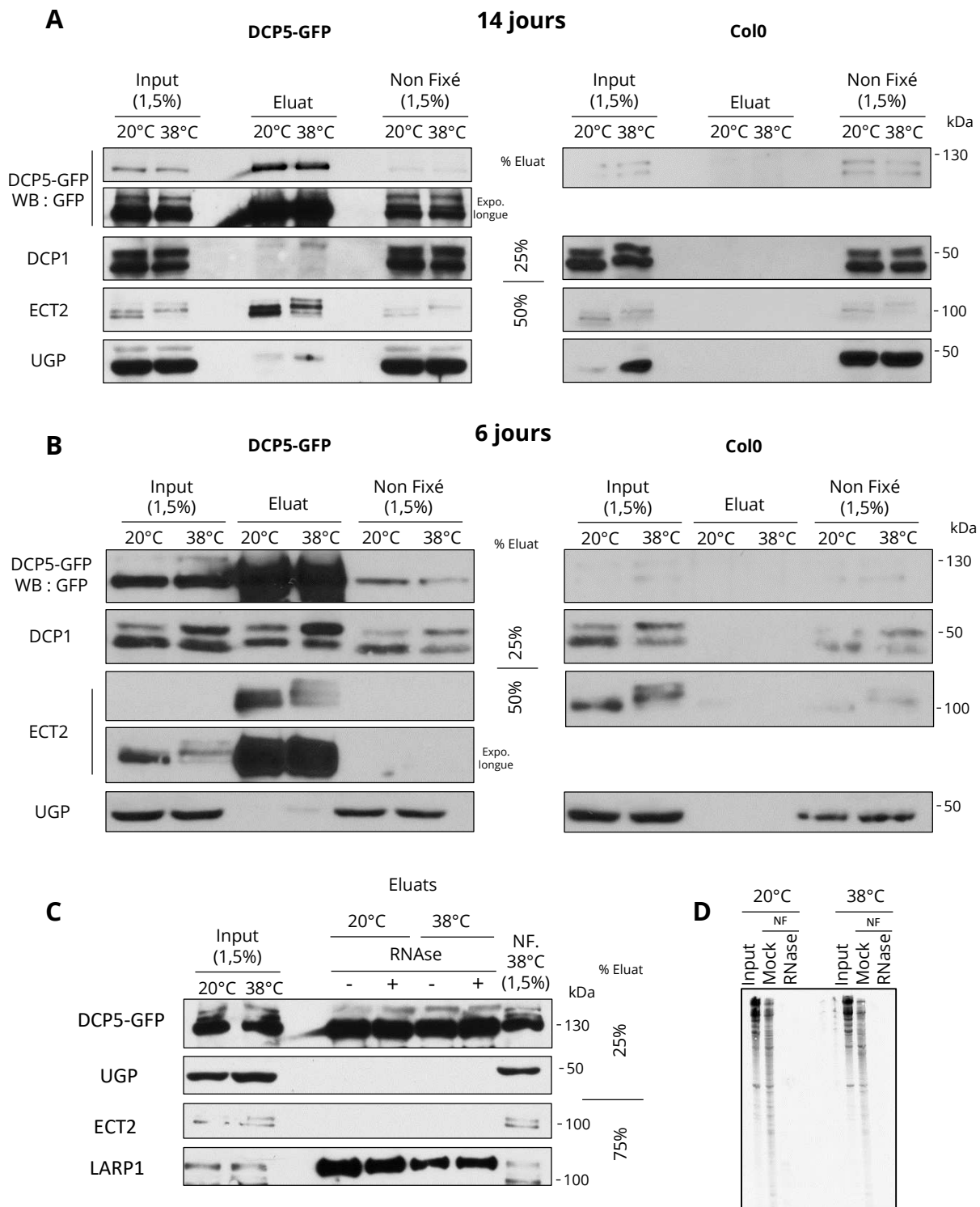
## **1.2 – Nature de l'interaction entre ECT2 et DCP5**

Concernant ECT2 et DCP5, l'interaction n'a pas été étudiée précédemment avec les expériences menées sur les plantes YFP-ECT2 en raison de l'absence d'un anticorps spécifiquement dirigé contre DCP5. Pour résoudre ce problème, des approches de co-immunoprécipitation réciproques ont été faites à partir d'une lignée transgénique exprimant DCP5-GFP. Ces analyses ont été faites dans un premier temps sur des plantes de 14 jours cultivées en condition normale ou exposées 30 min à 38°C sans tenir compte de la présence d'ARN. Les résultats de western blot montre qu'en purifiant la protéine de fusion DCP5-GFP, le signal à 100 kDa correspondant à ECT2 est retrouvé dans les fractions éluées, en condition normale comme en situation de stress thermique (Figure 25-A). On peut alors remarquer que ce signal est différent entre la condition normale et la situation de stress. En effet, plusieurs formes d'ECT2 sont détectées et leurs intensités semblent varier entre les deux conditions expérimentales. Ces observations seront plus amplement détaillées au cours du chapitre IV pour étudier la régulation

d'ECT2 en situation de stress thermique. Néanmoins, cela démontre que DCP5 interagit avec toutes les formes d'ECT2 détectées par western blot. En comparaison aucun signal n'est détecté pour le facteur UGP, utilisé comme témoin négatif. En répétant l'expérience à partir de plantes Col0 exprimant une version non étiquetée de DCP5, aucun signal n'est détecté dans les fractions éluées pour chacun des facteurs testés, soutenant la spécificité de l'interaction détectée pour ECT2. Pour valider l'immunoprécipitation, l'interaction entre DCP5 et le facteur DCP1 a également été testée. En effet, il est publié qu'au moins dans des tissus de 6 jours, DCP5 interagit préférentiellement avec une forme phosphorylée de DCP1, qui augmente en condition de stress hydrique (Xu & Chua, 2012). Dans les plantes de 14 jours, deux formes sont bien détectées pour DCP1 dans les fractions de départ mais il est difficile de distinguer un changement d'intensité vers la forme supérieure entre la condition normale et le stress thermique puisque le signal est saturé (Figure 25-A, signal DCP1). Dans les fractions éluées, aucun signal correspondant aux deux formes de DCP1 n'est retrouvé. Seul un faible signal est détecté à un poids supérieur aux deux formes de DCP1 et donc probablement non spécifique. Ceci semble indiquer que dans des plantes de 2 semaines, l'interaction entre DCP5 et DCP1 est inexistante au moins dans ces conditions expérimentales contrairement à celle entre DCP5 et ECT2.

Puisque l'interaction entre DCP1 et DCP5 a au moins été démontrée dans des tissus de 6 jours (Xu & Chua, 2009), les expériences ont été répétées à ce stade développemental. Cette fois, l'interaction entre DCP5 et DCP1 est clairement détectable en condition normale ou en situation de stress pour les mêmes conditions de réaction (Figure 25-B, signal DCP1). De plus, cette fois l'augmentation de la quantité de la forme phosphorylée de DCP1 en situation de stress est très distincte dans les fractions de départ tout comme dans les fractions éluées. L'interaction entre DCP5 et ECT2 est également détectée à ce stade développemental (Figure 25-B, signal ECT2). Comme à 14 jours, on retrouve également plusieurs formes d'ECT2 dans les fractions éluées ce qui suggère encore une fois que DCP5 interagit avec toutes ces formes. Pour rappel, il a été montré dans le chapitre 1 que la protéine ECT2 est plus fortement exprimée dans les plantes de 2 et 7 jours. Cette observation pourrait proposer un rôle pour ECT2 dans les étapes précoces du développement potentiellement en lien avec cette interaction avec DCP5.

Dans un second temps, pour déterminer si l'interaction entre ECT2 et DCP5 est dépendante de la présence d'ARN, les expériences ont été répétées avec ou sans traitement RNase. Les expériences ont été menées à partir de tissus de 14 jours pour faire le lien avec les données de protéomique et le stade où l'interaction entre ECT2 et LARP1 a été validée. Les résultats de



**Figure 25 : Caractérisation de l'interaction entre ECT2 et DCP5 par co-immunoprécipitation**

**(A-B)** Expériences d'immunoprécipitation contre une étiquette GFP menées à partir d'extraits natifs de plantes de 14 jours **(A)** ou 6 jours **(B)** exprimant DCP5-GFP (130 kDa) et incubées 30 min à 38°C ou 20°C. La lignée Col0 est utilisée comme contrôle négatif d'immunoprécipitation. La protéine UGP est utilisée comme contrôle négatif d'interaction avec DCP5. La quantité déposée sur gel de chaque fraction (input, non fixé et éluat) est indiquée ainsi que la taille des protéines en kilodalton (kDa). L'approche a été réalisée avec des billes magnétiques couplées à un anticorps monoclonal contre la GFP (Miltenyi). **(C)** Analyses des co-immunoprécipitations avec DCP5-GFP menées avec des extraits natifs non traités ou traités avec un mix de RNase (150 µg RNase A, 5000u RNase T1 et 100u RNase I) sur des plantes de 14 jours. L'approche a été réalisée avec des billes magnétiques nanotrap dirigées contre la GFP (Chromotek). **(D)** Vérification de l'efficacité du traitement RNase de l'expérience **(C)** par migration des ARN totaux sur gel de polyacrylamide (8M Urée – 6% Acryl-bisacrylamide). Une portion correspondant à 12% de l'input ou des fractions non fixées (NF) est déposée.

l'analyse par western blot montrent qu'aucun signal correspondant à ECT2 n'est détecté dans les fractions éluées avec DCP5-GFP et cela même dans les échantillons non traités à la RNase en condition normale ou en situation de stress (Figure 25-C). L'absence d'interaction par rapport aux résultats précédents pourrait s'expliquer par les conditions expérimentales différentes. En effet, les expériences présentées dans la figure 25-A et B ont été menées avec des billes couplées à un anticorps contre la GFP et des conditions de lavage peu stringentes (3 fois avec un tampon contenant 50 mM Tris-HCl et 0,1 % de Triton X-100). À l'inverse, dans l'expérience présentée dans la figure 25-C, ce sont des billes nanotrap (sans intermédiaire protéine A ou IgG entre les billes et l'anticorps) qui ont été utilisées et les conditions de lavages ont été plus stringentes (6 fois 5 min avec un tampon contenant notamment 0,5 % d'Igepal et 150 mM de NaCl). Dans ces conditions stringentes, il semble donc que l'interaction entre ECT2 et DCP5 ne soit pas maintenue et ce malgré la présence d'ARN dans les échantillons non traités. En résumé, ces expériences ont confirmé que des complexes ECT2-DCP5 existent mais la dépendance de l'ARN vis-à-vis de leur formation reste toujours à être déterminée. Par manque de temps, les expériences n'ont pas été répétées pour mettre au point de nouvelles conditions expérimentales.

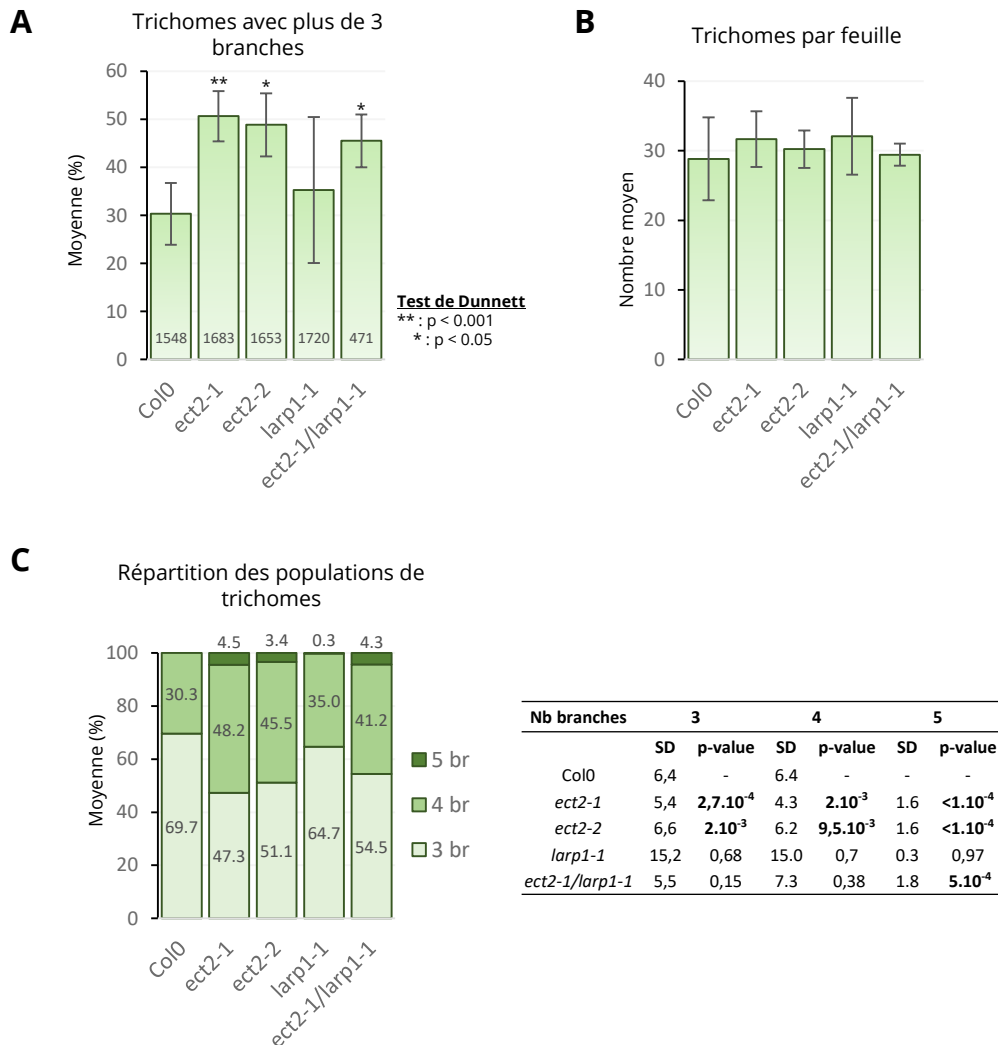
### **II.3 – Nature de l'interaction entre LARP1 et DCP5**

Concernant LARP1 et DCP5, l'interaction a seulement été testée dans l'expérience précédente avec un traitement RNase dans des tissus à 14 jours. Dans ces conditions où l'interaction ECT2-DCP5 n'a pas été détectée, un signal correspondant à LARP1 est détecté dans les éluats immunoprécipités avec DCP5-GFP et de façon similaire entre les échantillons traités ou non avec le mix de RNase (Figure 25-C, signal LARP1). Ce résultat indique que DCP5 interagit avec LARP1 en condition normale et en situation de stress thermique indépendamment de la présence d'ARN et que l'interaction DCP5-LARP1 semble plus résistante que l'interaction DCP5-ECT2. Une hypothèse à considérer serait que LARP1 puisse agir comme intermédiaire dans l'interaction entre ECT2 et DCP5. Ces résultats proposent donc une relation entre DCP5 et LARP1 qui n'a pas été documentée à ce jour chez les eucaryotes.

## **II- ÉTUDE D'UN LIEN DÉVELOPPEMENTAL ENTRE ECT2, LARP1 ET DCP5**

### **II.1 – Analyse du phénotype des trichomes**

Au cours du chapitre I, j'ai pu démontrer qu'ECT2 est directement impliquée dans le développement des trichomes de façon dépendante à sa capacité de lecteur de méthylation.



**Figure 26 : Observation des trichomes sur des plantes mutantes pour ECT2 et/ou LARP1**

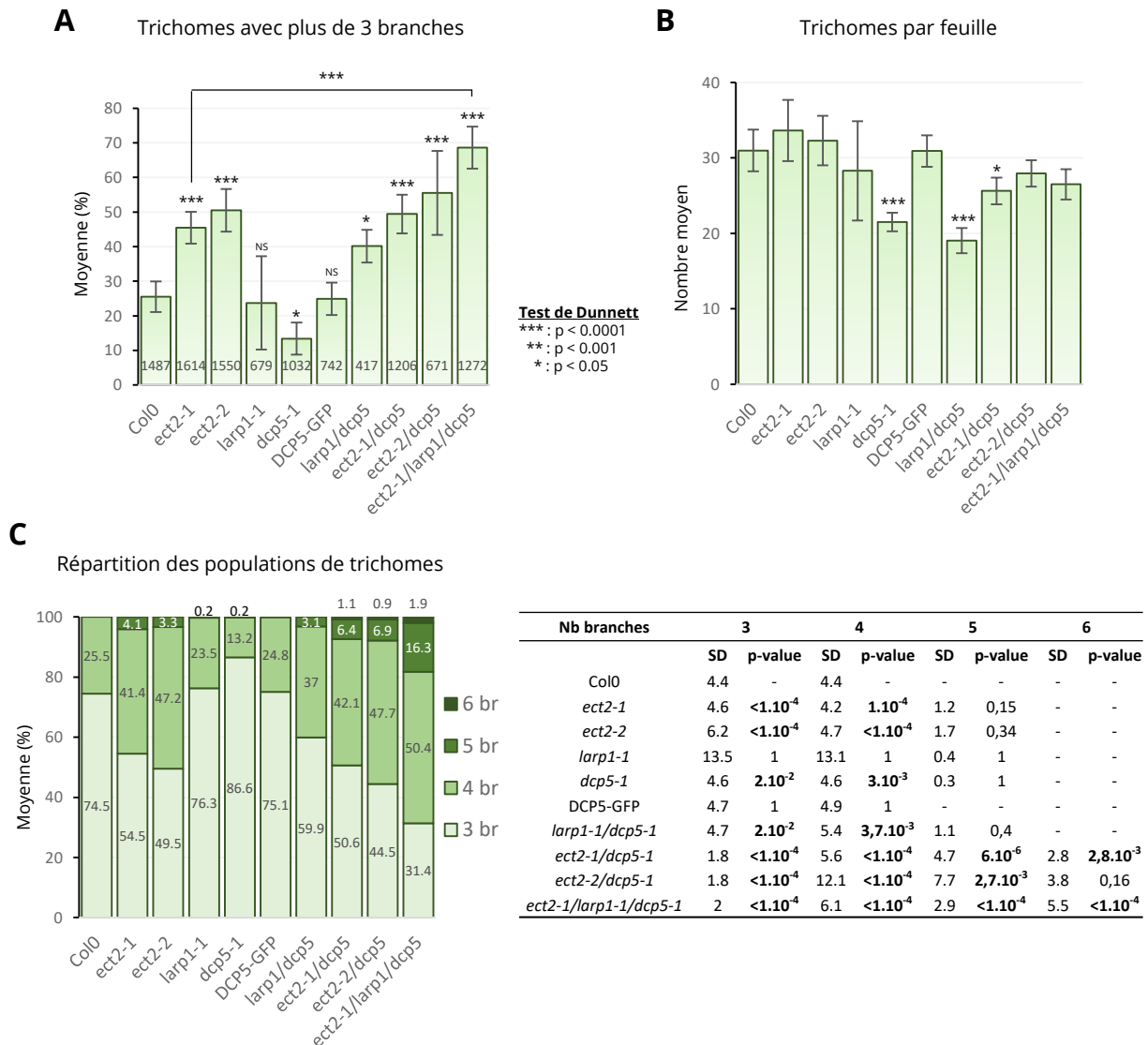
Pour chaque observation, les trichomes ont été observés sur la première paire de feuilles de 4 plantules de 3 semaines pour chaque génotype. Les données représentées proviennent de n=8 observations indépendantes hormis *ect2-1/larp1-1* où seulement 2 observations ont été faites. **(A)** Représentation de la moyenne des trichomes avec plus de 3 branches. Les astérisques désignent la significativité par rapport à Col0, selon le test de Dunnett. Le nombre total de trichomes observé (quel que soit le nombre de branches) pour chaque génotype est indiqué dans l'histogramme. **(B)** Représentation de la moyenne de trichomes par feuille dans chaque génotype. **(C)** Répartition des différentes populations de trichomes selon le nombre de branches (3, 4 ou 5) dans chaque génotype. Le pourcentage de chaque population provient de la moyenne de toutes les observations. Un tableau à droite indique les écart-types mesurés pour chaque population ainsi que la significativité selon le test de Dunnett.

Puisque ECT2 semble interagir de façon directe avec LARP1 qui elle-même interagit avec DCP5, j'ai ensuite cherché à savoir si ces deux autres facteurs pourraient également être impliqués dans ce même aspect développemental. Ainsi, des mutants *larp1-1* et une lignée hypomorphe *dcp5-1* ont été utilisés pour y observer les trichomes en comparaison des mutants pour ECT2.

Dans le simple mutant *larp1-1*, le ratio des trichomes à plus de 3 branches n'est pas significativement différent des plantes Col0, contrairement aux mutant *ect2* pour lesquels il y a une augmentation (Figure 26-A). Pour déterminer si des effets pourraient être cumulatifs en l'absence d'ECT2 et LARP1, un double mutant *ect2-1/larp1* a été généré. Dans ces plantes, le niveau de trichomes avec plus de 3 branches est proche de celui observé dans les mutants *ect2*. Ceci semble indiquer que l'absence de LARP1 ne conduit pas à des défauts supplémentaires et qu'ici les défauts observés dans un double mutant *ect2-1/larp1-1* sont majoritairement causés par l'absence d'ECT2. Dans chacun des cas, le nombre moyen de trichomes par feuille ne change pas significativement excluant un problème de densité (Figure 26-B). En s'intéressant à la répartition des populations de trichomes en fonction du nombre de branches, le mutant *larp1-1* présente néanmoins des trichomes à 5 branches (Figure 26-C). Cependant, ils représentent seulement 0,3 % des trichomes, c'est-à-dire que seulement 5 trichomes à 5 branches ont été observés sur un total de 1 720 trichomes. Statistiquement, cette population n'est pas significativement différente des plantes Col0 même si aucun trichome à 5 branches n'a été recensé sur plus de 3 500 trichomes observés dans Col0. En comparaison, la portion de trichomes à 5 branches dans les plantes *ect2-1/larp1-1* est équivalente à celle observée dans les mutants *ect2-1* et *ect2-2*. Ces premières observations supportent donc que contrairement à ECT2, l'absence de LARP1 ne conduit pas à des défauts de branchage des trichomes.

La même analyse des trichomes a ensuite été effectuée sur des plantes *dcp5-1* présentant une réduction par 5 de la quantité de protéine DCP5 (Xu and Chua, 2009)(Figure 4 de l'introduction et Xu and Chua, 2009). Dans ces plantes, curieusement les trichomes à plus de 3 branches diminuent par rapport aux plantes sauvages (Figure 27-A). Ainsi, environ 14 % des trichomes de *dcp5-1* ont plus de 3 branches contre 25 % dans Col0 pour ces observations. Avec 6 observations différentes, cette diminution apparaît significative. Néanmoins, cette réduction pourrait être une conséquence de la diminution globale de trichomes sur les feuilles du mutant *dcp5-1*. En effet, en moyenne 21 trichomes sont comptés sur chaque feuille des mutants *dcp5-1* contre 31 pour les plantes Col0 (Figure 27-B). À noter que le mutant *dcp5-1* présente une très faible portion de trichomes à 5 branches (0,2%) de façon similaire au mutant *larp1-1* (Figure 27-C)





**Figure 27 : Observation des trichomes dans des plantes mutantes impliquant ECT2 et/ou LARP1 et/ou DCP5**

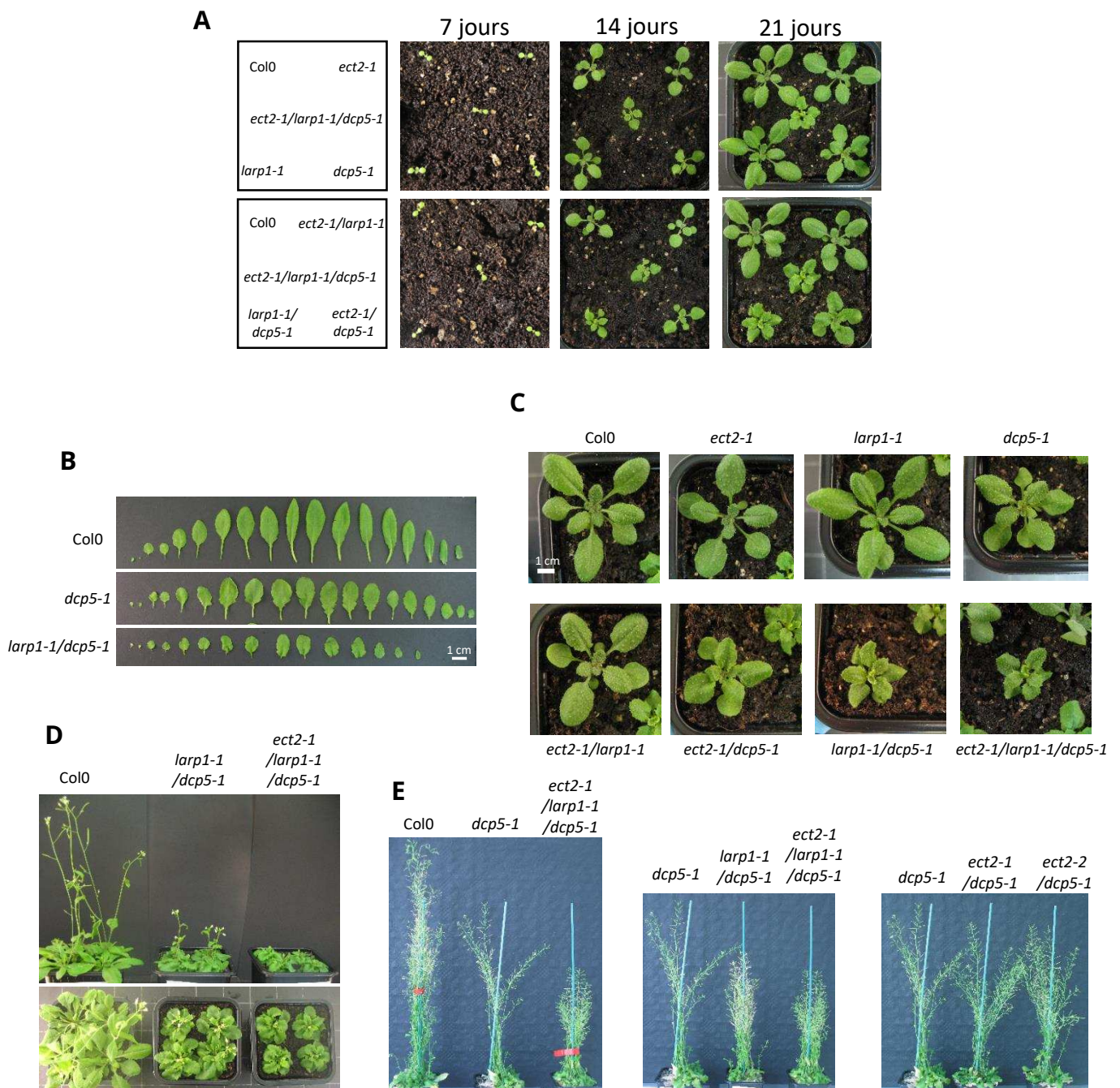
Pour chaque observation, les trichomes ont été observés sur la première paire de feuilles de 4 plantules de 3 semaines pour chaque génotype. Les données représentées proviennent de n=6 observations indépendantes hormis les génotypes *larp1-1*, *ect2-2/dcp5-1*, *larp1-1/dcp5-1* et DCP5-GFP où 3 observations ont été faites.

**(A)** Représentation de la moyenne des trichomes avec plus de 3 branches. Les astérisques désignent la significativité par rapport à Col0, selon le test de Dunnett. Le nombre total de trichomes observé (quel que soit le nombre de branches) pour chaque génotype est indiqué dans l'histogramme. **(B)** Représentation de la moyenne de trichomes par feuille dans chaque génotype. **(C)** Répartition des différentes populations de trichomes selon le nombre de branches (3, 4 ou 5) dans chaque génotype. Le pourcentage de chaque population provient de la moyenne de toutes les observations. Un tableau à droite indique les écart-types mesurés pour chaque population ainsi que la significativité selon le test de Dunnett. NS : non significatif.

mais qui n'est pas significativement différent de Col0. Lorsque les plantes mutantes *dcp5-1* sont complémentées du transgène DCP5-GFP, aucune différence du nombre de trichomes à plus de 3 branches n'est observé tout comme le nombre moyen de trichomes par feuille (Figure 27-A et B). Ceci supporte que les défauts observés dans les mutants *dcp5-1* sont bien une conséquence de la réduction d'expression de DCP5.

Par ailleurs, les trichomes ont été observés sur plusieurs mutants multiples impliquant ECT2, LARP1 et DCP5. Curieusement, alors que le mutant *larp1-1* ne présente pas de défaut significatif et que *dcp5-1* affiche une réduction de trichomes, le double mutant *larp1-1/dcp5-1* montre une augmentation du nombre de trichomes à plus de 3 branches (Figure 27-A). De plus, comme *dcp5-1*, ce double mutant possède également moins de trichomes (Figure 27-B). Ainsi, même si les plantes *dcp5-1* et *larp1-1/dcp5-1* affichent une réduction similaire du nombre de trichomes, les deux présentent des effets différents sur le ratio des trichomes à plus de 3 branches. Une portion de trichomes à 5 branches est également détectée sur les plantes *larp1-1/dcp5-1* dans un niveau équivalent aux mutants *ect2*. L'absence de LARP1 cumulée à la faible expression de DCP5 affecte donc davantage et différemment le développement des trichomes par rapport aux mutants simples *larp1-1* et *dcp5-1*. Puisque LARP1 et DCP5 interagissent de façon probablement directe, ces observations supportent que ces deux facteurs puissent agir dans une même voie développementale.

D'autre part, des doubles mutants pour ECT2 et DCP5 ont été générés et observés. Dans les plantes *ect2-1/dcp5-1* et *ect2-2/dcp5-1*, le niveau de trichomes à plus de 3 branches est relativement similaire aux simples mutants *ect2-1* et *ect2-2* (Figure 27-A). Néanmoins, même si aucune différence significative n'est observée sur le ratio des trichomes par rapport aux lignées *ect2-1* et *ect2-2*, la répartition des populations de trichomes est différente. En effet, dans ces lignées, une nouvelle population de trichomes à 6 branches est observée et n'a été recensée dans aucune des autres lignées précédentes (Figure 27-C). Cette population représente une faible portion d'environ 1 % des trichomes. En parallèle, des trichomes à 5 branches sont également retrouvés dans une portion de 6.4 et 6.9 % pour *ect2-1/dcp5-1* et *ect2-2/dcp5-1* respectivement, c'est-à-dire légèrement plus important que dans les simples mutants *ect2-1* et *ect2-2*. Ainsi, l'absence d'ECT2 et la réduction de DCP5 semble conduire à des modifications subtiles dans la répartition des populations des trichomes. Cette observation suggère qu'ECT2 et DCP5 pourraient agir dans des voies distinctes dans le développement des trichomes puisque dans le cas d'un rôle épistatique, il ne devrait pas y avoir de différence de pénétrance du phénotype.



**Figure 28 : Comparaison développementale de lignées mutantes multiples concernant ECT2, LARP1 et DCP5**  
**(A)** Croissance de différents génotypes à 7, 14 et 21 jours après semis sur terre. **(B)** Comparaison de toutes les feuilles de rosettes portées par des plantes de 24 jours. **(C)** Rosette de 21 jours. **(D)** Plantes adultes de 5 semaines. Vue de profil (panneau supérieur) et vue aérienne (panneau inférieur). **(E)** Plantes adultes de 8 semaines.

Finalement, un triple mutant *ect2-1/larp1-1/dcp5-1* a été étudié. Dans ces plantes, près de 65 % de trichomes ont plus de 3 branches (Figure 27-A) ce qui est significativement différent de Col0 mais aussi de la lignée *ect2-1*. Curieusement, le nombre moyen de trichomes par feuille n'est pas significativement différent des plantes Col0 alors que les mutants *dcp5-1* et *larp1-1/dcp5* affichaient une réduction (Figure 27-B). Dans ces plantes c'est donc uniquement le nombre de branches qui est affectée et qui montre une aggravation générale par rapport aux lignées simples *ect2-1*, *larp1-1* et *dcp5-1*. De même, des trichomes à 6 branches sont également observés dans cette lignée et la population des trichomes à 5 branches augmente considérablement (Figure 27-C). Dans chacun des cas, l'enrichissement des trichomes à 4, 5 et 6 branches semble se faire au détriment des trichomes à 3 branches qui eux diminuent pour atteindre environ 31 % des trichomes totaux. Ainsi, la triple mutation provoque des effets additionnels sur le nombre de branches des trichomes et suggère que les trois facteurs pourraient agir dans ce même aspect développemental avec néanmoins des implications différentes. En effet, au vu des résultats, il est clair qu'ECT2 est le facteur avec l'impact le plus important dans ce phénotype. Par ailleurs, les défauts du double mutant *larp1-1/ect2-1* sont similaires à ceux dans *ect2-1* alors que les doubles mutants *ect2/dcp5-1* présentent une population de 6 branches qui n'est pas observée dans les mutants *ect2*. Ceci pourrait donc indiquer que DCP5 a une fonction plus importante que LARP1 dans le trichome. Même si les rôles de LARP1 ou DCP5 semblent différents dans ce processus développemental, ces résultats soutiennent qu'ils sont reliés à l'action d'ECT2.

## II.2 – Comparaison développementale des mutants multiples

Les observations précédentes suggèrent un lien entre ECT2 et LARP1/DCP5 dans le développement des trichomes. Pour s'intéresser à un aspect plus général, le développement des mutants multiples impliquant ECT2, LARP1 et DCP5 a été étudié. Concernant les mutants simples, aucun problème développemental flagrant n'est induit en l'absence d'ECT2 comme l'attestent les données du chapitre I. De même, à ce jour aucun phénotype n'a été documenté dans un mutant *larp1*. À l'inverse, un mutant RNAi « knockout » pour DCP5 conduit à un arrêt dans le développement post-embryonnaire des plantes (Xu & Chua, 2009). Dans le cas de la lignée hypomorphe *dcp5-1*, les plantes présentent un développement racinaire réduit (Figure 4 de l'introduction) et les feuilles sont plus courtes et plus dentelées que les plantes sauvages (Figure 28-A et B, plantes *dcp5-1*).

Concernant les doubles mutants, les plantes *ect2-1/larp1-1* se développent de façon similaire aux mutants simples *ect2-1* et *larp1-1* et ne présentent pas de différence par rapport aux

plantes Col0. Leur développement est illustré dans la figure 28 A et B jusqu'à 3 semaines mais au-delà aucune différence n'est observée jusqu'à la fin de vie des plantes. D'autre part, le double mutant *ect2-1/dcp5-1* présente un développement post-embryonnaire similaire à *dcp5-1* avec des feuilles plus courtes et plus dentelées que des feuilles de plantes Col0. Ceci semble indiquer que l'absence d'ECT2 dans ces plantes *dcp5-1* n'affecte pas davantage le phénotype induit par la réduction d'expression de DCP5. Néanmoins, de façon flagrante, il apparaît que les plantes *larp1-1/dcp5-1* présentent un développement très affecté par rapport aux plantes Col0 mais aussi par rapport à la lignée *dcp5-1* (Figure 28-A, B et C). Dans ces plantes, les feuilles sont encore plus petites que celles de plantes *dcp5-1* et les serrations (dentelures) y sont plus prononcées (Figure 28-B). La morphologie générale de ces plantes apparaît très « compacte » dû au raccourcissement des feuilles qui ont également tendance à être plus recourbées. Sachant que LARP1 et DCP5 interagissent entre eux de façon ARN-indépendante, ce phénotype renforce le lien entre ces deux facteurs et suggère que la coopération entre LARP1 et DCP5 a une fonction essentielle dans le développement de la plante. Ceci supporte également que LARP1 et DCP5 puissent réguler des transcrits liés au développement.

Finalement, le triple mutant *ect2-1/larp1-1/dcp5-1* présente également les mêmes défauts développementaux mais semble être légèrement plus affecté que les plantes *larp1-1/dcp5-1* (Figure 28-D et E). En effet, le développement des rosettes apparaît plus réduit en raison des feuilles plus petites que les plantes *larp1-1/dcp5-1*. En conséquence, le développement apical du triple mutant est réduit par rapport au double *larp1-1/dcp5-1*. Cette observation suggère alors que l'absence d'ECT2 aggrave encore davantage le phénotype induit par l'absence de LARP1 et DCP5. Curieusement, comme aucun défaut supplémentaire n'a été retrouvé dans les doubles mutants *ect2-1/larp1-1* et *ect2-1/dcp5-1*, ceci semble indiquer qu'ECT2 est probablement impliquée dans des fonctions où à la fois LARP1 et DCP5 sont requises. Ce phénotype suggère qu'ECT2 prend part au moins en partie au réseau de transcrits régulés par LARP1 et DCP5.

### III – IMPACT MOLÉCULAIRE SUR LE TRANSLATOME

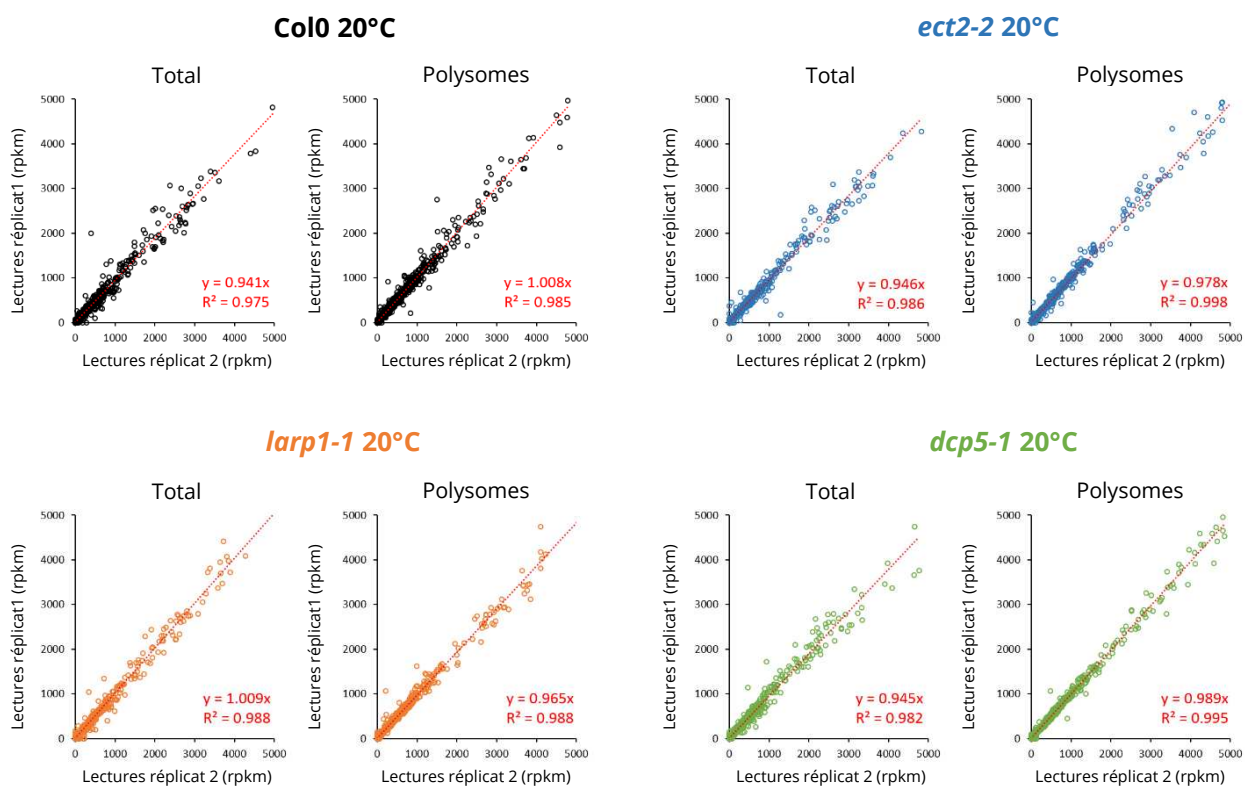
À la suite de l'approche de protéomique, j'ai proposé l'hypothèse qu'ECT2 pourrait avoir un rôle répressif sur la traduction en recrutant des partenaires impliqués dans cette fonction comme DCP5 et potentiellement LARP1. Même si l'interaction directe entre ECT2 et DCP5 n'a pas été démontrée, il est clair qu'ECT2 interagit de façon ARN-indépendante avec LARP1 qui elle-même interagit de la même façon avec DCP5. L'observation du phénotype des plantes *larp1-1/dcp5-1*

suggère fortement que des transcrits clés sont régulés par LARP1 et DCP5. Il apparaît donc indispensable de déterminer quels transcrits sont affectés par LARP1 et/ou DCP5 afin d'expliquer les défauts développementaux observés. Par ailleurs, le phénotype engendré dans le triple mutant *ect2-1/larp1-dcp5-1* est légèrement plus sévère que celui observé dans *larp1-1/dcp5-1* ce qui suggère qu'ECT2 pourrait prendre part au moins en partie au réseau de transcrits régulés par LARP1 et DCP5. Ces observations supposent alors qu'il existe au moins une population de transcrits régulée spécifiquement par LARP1 et DCP5 et une autre population régulée par ECT2, LARP1 et DCP5.

### III.1 – Stratégie de séquençage et qualité des données

Pour étudier ces hypothèses, une approche de transcriptomique a été développée pour déterminer l'impact d'ECT2 sur la quantité d'ARNm à l'équilibre tout comme l'impact de LARP1 et DCP5. Dans l'hypothèse où ECT2 et ces facteurs agiraient sur l'engagement traductionnel des ARNm, la stratégie développée a été de mener l'approche à partir de populations d'ARN totaux mais également à partir d'ARN associés aux fractions des polysomes qui sont représentatifs de transcrits en cours de traduction active. Les ARN totaux ont été extraits à partir de plantes mutantes pour les facteurs d'intérêt en parallèle de plantes sauvages Col0 et des gradients de sucrose ont été réalisés pour séparer les ARNm associés aux fractions des polysomes. Puisque les mutants multiples n'étaient pas encore achevés avant la mise en place de cette approche, l'analyse a ainsi été conduite sur les mutants simples *ect2-2* et *larp1-1* et la lignée hypomorphe *dcp5-1* pour y déterminer les effets respectifs de chacun de ces facteurs. Dans le cadre de cette analyse, d'autres mutants ont été inclus comme notamment un mutant pour l'exoribonucléase XRN4 qui sera exploité dans le chapitre IV.

Techniquement, pour chaque mutant considéré, l'analyse a été effectuée en 2 réplicats biologiques à partir de lots différents de plantes âgées de 17 jours exposées ou non à un stress thermique (15 min à 38°C). Pour le mutant *larp1-1*, seule la condition normale a été considérée. Le séquençage a été effectué avec des banques orientées en utilisant des lectures simples de 50 nucléotides (single read 50) et a permis d'obtenir entre 19 et 38 millions de lectures brutes en fonction de l'échantillon. Après un contrôle de qualité et un filtrage, seuls les transcrits présentant une valeur d'au moins 5 rpkm (read per kilobase per million) dans au moins une librairie ont été considérés afin de se concentrer sur les gènes significativement accumulés. Avec ce seuil relativement élevé, ce sont 16 699 transcrits qui ont pu être identifiés soit plus de 60 % du nombre de transcrits codants prédits chez *Arabidopsis*. À noter qu'en considérant un seuil classique (> 1



**Figure 29 : Fiabilité des réplicats des données de transcriptomique**

Droites de régression établies à partir des deux réplicats biologiques pour les ARN de la fraction totale ou associés aux polysomes dans Col0 et les mutants *ect2-2*, *larp1-1* et *dcp5-1*. La pente Y de la courbe de tendance ainsi que le coefficient de détermination  $R^2$  sont indiqués dans chacun des graphiques. En ordonnées : valeurs en rpkm des lectures du réplicat 1. En abscisses : valeurs en rpkm des lectures du réplicat 2.

rpk), on retrouve 21 065 transcrits, soit plus de 76 % des transcrits prédits, ce qui est comparable aux dernières données publiées de l'équipe (Merret et al., 2015, 2013).

Pour vérifier la fiabilité des réplicats biologiques, les jeux de données de chaque réplicat ont été comparés entre eux en construisant des droites de régression. Les droites obtenues pour l'ensemble des réplicats des génotypes et des populations d'ARN affichent des pentes qui varient entre 0,945 et 1,008 pour des coefficients de détermination  $R^2$  compris entre 0,975 et 0,998 (Figure 29). Les réplicats présentent donc peu de variabilité entre eux, ce qui soutient la fiabilité de l'analyse. En conséquence, le jeu de données a été simplifié en prenant pour chaque valeur en rpk la moyenne des deux réplicats.

### **III.2 – Identification des transcrits réprimés en traduction potentiellement cibles d'ECT2**

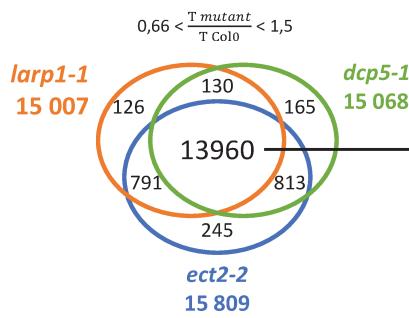
Dans un premier temps, l'impact d'ECT2 sur la quantité d'ARNm à l'équilibre a été défini à partir des données du mutant *ect2-2*. Une hypothèse développée initialement concernait l'implication d'ECT2 dans le mécanisme de dégradation des ARNm en situation de thermique, en lien avec son interaction avec LARP1. Ce point sera traité plus tard (Chapitre IV – Partie I.2) et seul l'impact d'ECT2 sur l'engagement traductionnel des transcrits sera ici étudié. Dans l'hypothèse où ECT2 agirait comme répresseur de traduction en condition normale, cela suppose que ces cibles aient un engagement traductionnel différent en l'absence d'ECT2. En effet, les facteurs ayant une action d'inhibiteur de traduction peuvent exercer leur rôle sur plusieurs étapes : avant ou pendant l'initiation en bloquant l'assemblage du complexe d'initiation à l'image de Scd6 chez la levure (Rajyaguru et al., 2012) ou encore au cours de l'élongation pour ralentir la progression des ribosomes comme pour le facteur Dhh1 de levure (Sweet et al., 2012). Dans chacun des cas, l'absence du facteur répresseur permet aux transcrits cibles d'être mieux traduits et donc potentiellement plus abondants dans les fractions des polysomes. Ainsi, si ECT2 agit de façon similaire, cela suppose que ses transcrits cibles aient une quantité à l'équilibre plus importante dans les polysomes en l'absence d'ECT2.

Dans cette démarche, les valeurs en rpk obtenues pour chaque transcrit dans les mutants *ect2-2*, *larp1-1* et *dcp5-1* ont été comparées à celles obtenues dans les plantes sauvages Col0 (les données concernant *larp1-1* et *dcp5-1* seront utilisées par la suite dans la partie III.3). Néanmoins, pour se concentrer uniquement sur l'effet dans le contrôle traductionnel des transcrits, seuls les transcrits ne variant pas significativement dans la fraction totale entre Col0 et les différents

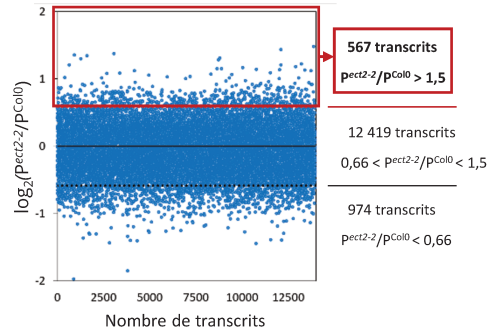


**A**

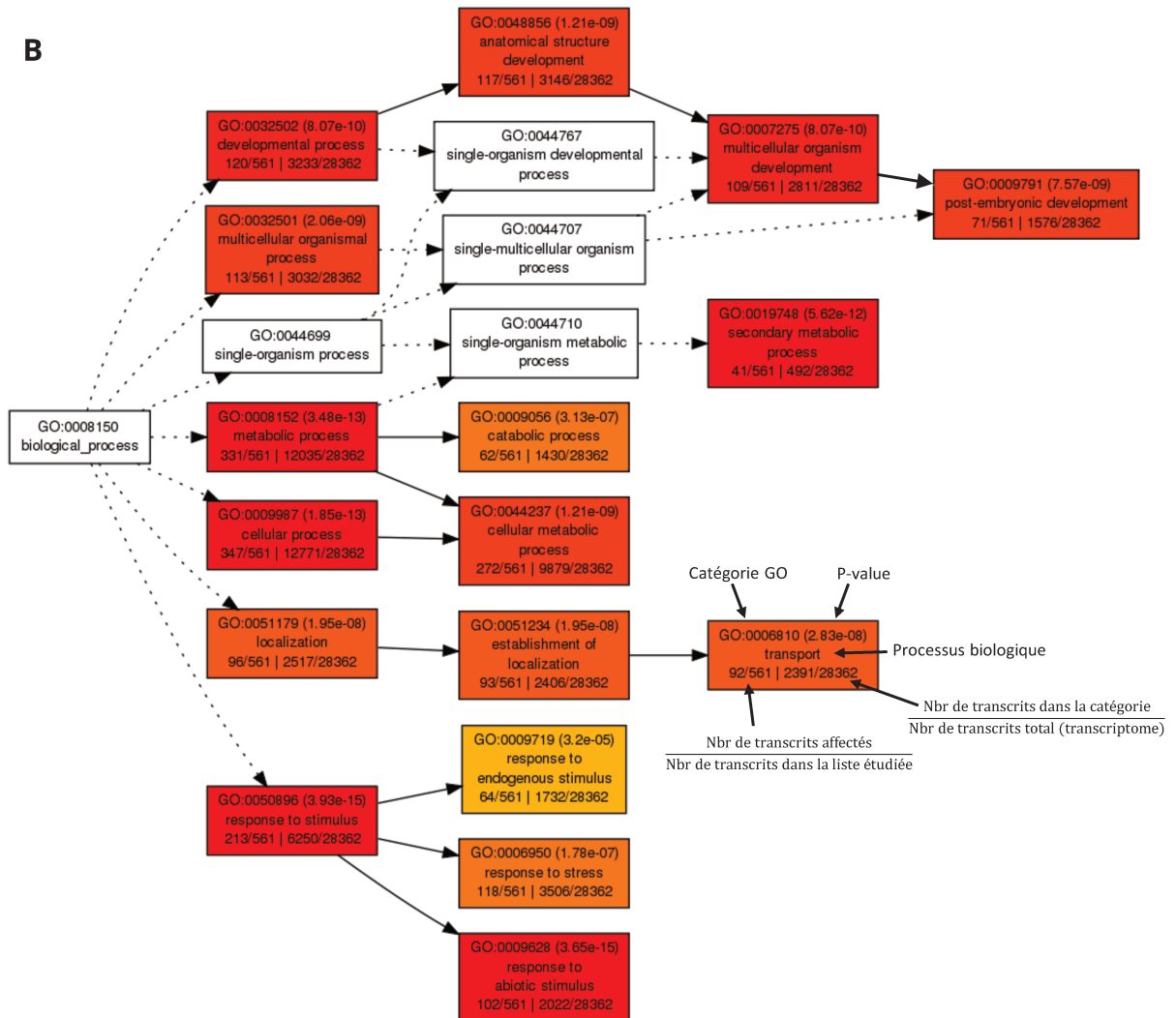
**Transcrits stables dans la fraction totale**



**Accumulation dans les polysomes d'ect2-2**



**B**



**Figure 30 : Identification des transcrits plus abondants dans les polysomes en l'absence d'ECT2**

(A) Présentation de la démarche pour identifier les transcrits dont la quantité à l'équilibre augmente dans les polysomes en l'absence d'ECT2. Les transcrits ont été sélectionnés avec des quantités à l'équilibre comprise entre 0,66 et 1,5 dans la fraction totale entre *ect2-2* et Col0; *larp1-1* et Col0; *dcp5-1* et Col0. Parmi ces 13 960 transcrits sélectionnés, seuls ceux présentant une variation supérieure d'un facteur 1,5 dans la fraction associée aux polysomes du mutant *ect2-2* par rapport à Col0 ont été considérés. (B) Catégories des processus biologiques enrichis parmi les 567 transcrits sélectionnés. Seules les catégories présentant une p-value et un FDR inférieurs à  $1.10^{-5}$  ont été considérées. Analyse GO réalisée à partir de l'outil AgriGo V2 ([systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2](http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2)).

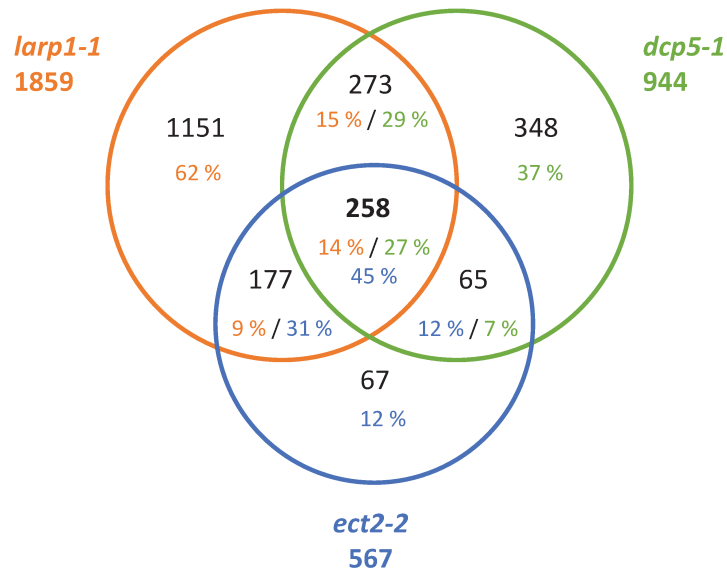
mutants ont été retenus permettant d'écarter les effets liés à une accumulation différentielle initiale. En ce sens, seuls les transcrits dans la fraction totale présentant un rapport *mutant/Col0* compris entre 0,66 et 1,5 pour les trois mutants à la fois ont été considérés (différence inférieure d'un facteur 1,5). Avec ces critères, le jeu de données a été restreint à 13 960 transcrits, définis comme ayant une quantité à l'équilibre stable entre tous les génotypes. Pour définir d'abord les cibles majeures d'un rôle répressif d'ECT2, les transcrits affichant un rapport *ect2-2/Col0* supérieur à 1,5 dans la fraction des polysomes ont été sélectionnés (Figure 30-A). Avec ce seuil, 567 transcrits ont été définis comme cibles potentielles majeures d'ECT2 puisque leur engagement traductionnel augmente en l'absence d'ECT2.

Pour évaluer les fonctions de ces transcrits sur-accumulés dans les polysomes en l'absence d'ECT2, une analyse GO (Gene Ontology) de catégories de gènes a été menée à l'aide de la plateforme AgriGo V2 (Tian et al., 2017). Parmi ces 567 transcrits, la catégorie des processus biologiques la plus enrichie concerne la réponse aux stimuli (p-value :  $3,93 \cdot 10^{-15}$ ) qui comprend des facteurs impliqués dans la réponse au stress abiotiques, aux stimuli externes et endogènes (Figure 30-B). D'autres catégories concernent des processus métaboliques (p-value :  $3,48 \cdot 10^{-13}$ ) ou cellulaires (p-value :  $1,85 \cdot 10^{-13}$ ), des fonctions de localisation et de transport de protéines (p-value :  $1,95 \cdot 10^{-8}$ ) mais également des processus développementaux liés au développement post-embryonnaires (p-value :  $7,57 \cdot 10^{-9}$ ). Ceci suggère qu'ECT2 pourrait réprimer la traduction de transcrits assurant des fonctions constitutives mais également des transcrits des voies de réponses aux stress. Dans cette approche de translatomique, j'ai décidé de me concentrer uniquement sur les transcrits sur-accumulés dans les polysomes pour étudier le rôle potentiel d'ECT2 comme répresseur de traduction. Néanmoins, 974 transcrits sont également sous-accumulés dans les polysomes en l'absence d'ECT2 (Figure 30-A), soit presque le double par rapport aux transcrits sur-accumulés. Cependant, pour les mêmes critères d'analyse GO (test hypergéométrique, p-value < 0,01), aucune catégorie de processus biologique n'est significativement enrichie dans ces 974 transcrits. Ceci soutient que ces transcrits sur-accumulés pourraient plutôt être une conséquence indirecte de l'absence d'ECT2 puisqu'aucune fonction particulière n'est affectée.

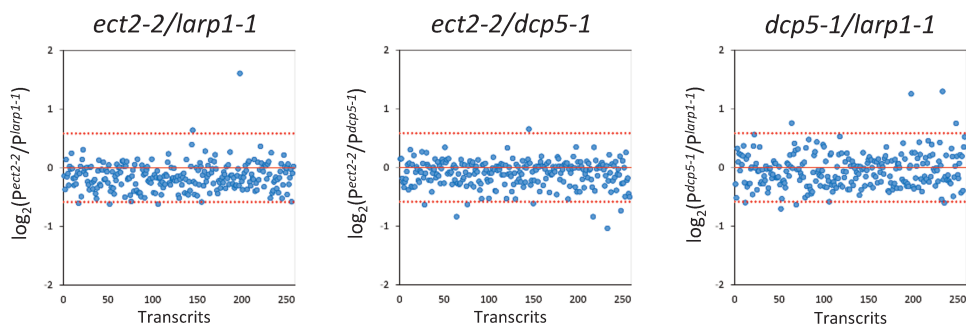
Sachant qu'ECT2 est un lecteur de méthylation *in vivo* (Chapitre I), la question suivante a été de déterminer si ces 567 transcrits définis comme cibles majeures d'ECT2 sont préférentiellement méthylés. Trois études ont établi un profil de méthylome chez *Arabidopsis thaliana* (Luo et al., 2014; Shen et al., 2016; Wan et al., 2015) mais aucune ne peut être exploitée en corrélation de notre analyse pour plusieurs raisons. Tout d'abord, aucune n'a été faite dans le

**A**

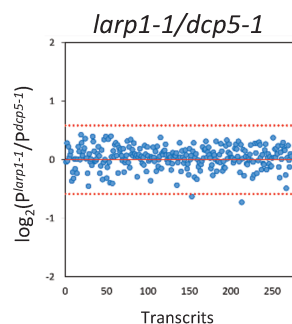
Gènes sur-accumulés dans les polysomes  
(mutant/Col0 >1,5)

**B**

258 transcrits communément sur-accumulés dans les trois mutants

**C**

273 transcrits spécifiquement sur-accumulés dans *larp1-1* et *dcp5-1*



**Figure 31 : Identification des transcrits co-régulés par ECT2, LARP1 et DCP5 et impact respectif sur leur accumulation**

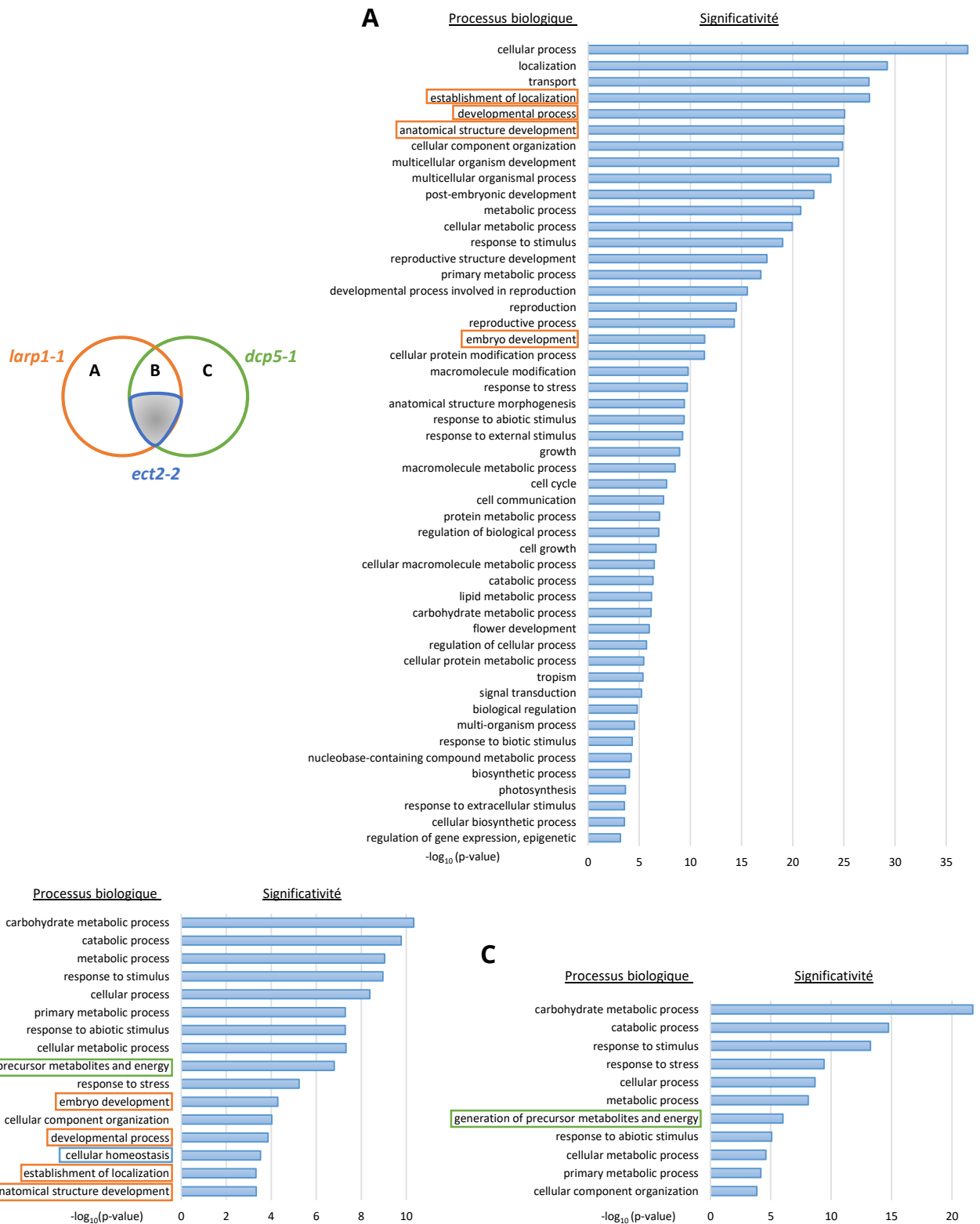
**(A)** Diagramme de Venn représentant les transcrits sur-accumulés d'un facteur 1,5 par rapport à Col0 dans les polysomes des mutants *larp1-1*, *dcp5-1* et *ect2-2*. Le pourcentage de chaque portion par rapport aux cibles majeures totales de ECT2 (bleu), LARP1 (orange) et DCP5 (vert) est indiqué. **(B)** Comparaison deux à deux de la quantité à l'équilibre des 258 transcrits communs dans les polysomes des trois mutants respectifs. En ordonnées : valeurs du rapport  $\log_2(\text{génétype 1/génétype 2})$ . En abscisses : index des transcrits. Les lignes rouges en pointillées délimitent le seuil de différence d'un facteur  $\pm 1,5$ . **(C)** Comparaison de la quantité à l'équilibre dans les polysomes des 273 transcrits communs entre *larp1-1* et *dcp5-1*.

stade développemental considéré dans notre analyse. Les données ne sont donc directement pas comparables avec notre jeu de données puisque certains transcrits pourraient ne pas être exprimés ou même ne pas être méthylés au stade de notre analyse. Ensuite, les nombres de transcrits méthylés définis dans chaque étude est relativement différent, allant jusqu'à 19 000 pour Wan et al. (2015), supposant que les pics de méthylation n'ont pas été définis avec la même stringence. Enfin, seuls les travaux de Shen *et al.* ont permis d'établir le profil de méthylome en comparaison d'un mutant du complexe de méthyltransférase (FIP37) pour éliminer les faux positifs mais les données transcriptomiques disponibles sont de très faible profondeur. Il est donc impossible actuellement d'estimer réellement la part de transcrits méthylés parmi les 567 cibles définies d'ECT2.

### **III.3 – Identification des transcrits traductionnellement réprimés et potentiellement co-régulés par ECT2, LARP1 et DCP5**

Après avoir étudié plus spécifiquement les transcrits qui sont cibles majeures d'ECT2, l'idée suivante a été d'identifier de la même façon l'ensemble des cibles majeures des facteurs LARP1 et DCP5 pour définir les transcrits communs aux trois facteurs. Ainsi, avec une différence d'accumulation fixée à un seuil de 1,5 fois dans les polysomes par rapport à Col0, 1 859 transcrits ont été définis comme cibles potentielles de LARP1 et 944 de DCP5 (Figure 31-A). Bien que seul le facteur DCP5 soit caractérisé comme inhibiteur de traduction chez la plante, on remarque que la mutation de LARP1 entraîne une accumulation de deux fois plus de transcrits dans les polysomes par rapport à la lignée *dcp5-1* ce qui supporte également un rôle de répresseur de traduction pour LARP1. La lignée *dcp5-1* est néanmoins hypomorphe ce qui implique donc qu'un certain nombre de transcrits sont toujours réprimés par la faible présence de DCP5. En confrontant ces transcrits avec les cibles majeures définies pour ECT2, on remarque que 435 sont communes entre LARP1 et ECT2, représentant 76 % des cibles majeures d'ECT2, et 323 sont communes entre DCP5 et ECT2, soit environ 57 % des cibles d'ECT2. Ainsi seule une portion de 67 transcrits, soit environ 12 % des cibles d'ECT2, est affectée spécifiquement dans le mutant *ect2-2*. Parmi l'ensemble des cibles majeures, 258 transcrits sont communs aux trois facteurs (Figure 31-A), ce qui suggère qu'ECT2 pourrait agir de concert avec LARP1 et/ou DCP5 pour réprimer leur traduction.

Pour évaluer quel facteur possède l'impact le plus fort sur l'accumulation de ces 258 transcrits, les quantités à l'équilibre ont été comparées deux à deux dans chacun des mutants (Figure 31-B). Majoritairement, les différences entre les mutants ne dépassent pas un facteur supérieur à 1,5. Néanmoins il semble y avoir une légère tendance montrant un effet moins



**Figure 32 : Analyse GO des catégories de processus biologiques parmi les cibles définies pour LARP1 et/ou DCP5**  
 Représentation des catégories de processus biologiques enrichies parmi les transcrits sur-accumulés dans les polysomes de façon spécifique dans *larp1-1* (A), communément dans *larp1-1* et *dcp5-1* (B) et spécifique dans *dcp5-1* (C). Un diagramme de Venn présente les populations concernées de transcrits. Les cadres oranges désignent des catégories non retrouvées parmi les cibles spécifiques de DCP5 (affectées dans la portion A spécifique de *larp1-1* et B commune à *larp1-1* et *dcp5-1*); les cadres verts des catégories non retrouvées parmi les cibles spécifiques de LARP1 (affectées dans la portion C spécifique à *dcp5-1* et la portion B commune à *larp1-1* et *dcp5-1*); le cadre bleu désigne la catégorie uniquement retrouvée dans la portion B commune entre *larp1-1* et *dcp5-1*. Les catégories sont classées selon leur significativité (-log<sub>10</sub>(p-value)) d'après un test hypergéométrique avec une valeur seuil de p-value inférieure à 0,01. Analyse GO réalisée à partir de l'outil AgriGo V2 (systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2).

important d'ECT2 par rapport à LARP1 et DCP5. En effet, les valeurs des rapports  $\log_2(p^{ect2-2}/p^{lar1-1})$  et  $\log_2(p^{ect2-2}/p^{dcp5-1})$  sont majoritairement négatives. À l'inverse, la variation entre le mutant *lar1-1* par rapport à la lignée hypomorphe *dcp5-1* ne montre pas de tendance particulière. Bien que les trois facteurs semblent contribuer à réprimer la traduction de ces transcrits, le fait qu'ECT2 ait un effet légèrement moins important suggère qu'elle agirait plutôt comme cofacteur de LARP1 et DCP5.

Concernant les fonctions de ces 258 transcrits communément affectés dans les polysomes des trois mutants, une analyse GO a permis de montrer un enrichissement pour 23 catégories de processus biologiques (test hypergéométrique, p-value < 0,01). Ces catégories sont représentatives des mêmes fonctions affectées parmi les cibles majeures d'ECT2, c'est-à-dire que les premières catégories concernent la réponse aux stimuli abiotiques (p-value :  $1,1 \cdot 10^{-9}$ ), les processus cellulaires (p-value :  $5,8 \cdot 10^{-9}$ ) et des processus développementaux (p-value :  $1,4 \cdot 10^{-7}$ ) incluant le développement post-embryonnaire (p-value :  $8,6 \cdot 10^{-6}$ ). La présence de transcrits liés au développement parmi les cibles communes pourrait donc contribuer à expliquer les défauts développementaux dans le triple mutant *ect2-1/lar1-1/dcp5-1* puisque l'absence cumulée des trois facteurs pourrait augmenter leur dérégulation.

### **III.4 – Identification des transcrits spécifiquement réprimés par LARP1 et DCP5**

Le phénotype des plantes *ect2-1/lar1-1/dcp5-1* démontre que l'absence de LARP1 et ECT2 additionnée à la version hypomorphe de DCP5 conduit à de sévères défauts développementaux. Néanmoins, la majorité du phénotype est résumée dans les plantes *lar1-1/dcp5-1* supposant que déjà LARP1 et DCP5 régulent des fonctions essentielles au moins en partie de façon indépendante à ECT2 puisque le triple mutant n'est que légèrement plus affecté. En ce sens, 273 transcrits sont spécifiquement sur-accumulés dans les polysomes de *lar1-1* et *dcp5-1* sans l'être dans *ect2-2* (Figure 31-A), c'est-à-dire une portion équivalente à celle qui semble régulée par les trois acteurs. Cette observation soutient donc que LARP1 et DCP5 pourraient agir comme répresseurs de traduction sur une population de transcrits sans faire intervenir ECT2. L'accumulation de ces transcrits est similaire dans les polysomes des deux mutants (Figure 31-C), supportant que LARP1 et DCP5 ont le même effet sur l'engagement traductionnel de ces cibles majeures.

Ces 273 transcrits communément sur-accumulés dans les polysomes dans *lar1-1* et *dcp5-1* ne représentent néanmoins que 15 % des cibles définies de LARP1 et 29 % de celles de DCP5. Le

**Tableau 5 : Variation de la quantité à l'équilibre des cibles connues de DCP5 dans notre analyse**

Les données issues de Xu & Chua 2009 ont été déterminées par qRT-PCR et montrent l'enrichissement des transcrits dans *dcp5-1* par rapport à Col0. Cette variation est indiquée pour nos données générées à partir de plantes de 17 jours et à partir des valeurs en rpkm des transcrits considérés dans la fraction totale. Les valeurs en gras montrent une accumulation dans *dcp5-1* supérieure à 2 par rapport à Col0.

Gène	Nom	6 jours	17 jours		Description
		(Xu & Chua 2009)	(cette étude)	Col0 (rpkm)	
		<i>dcp5-1/Col0</i>	<i>dcp5-1/Col0</i>		
AT4G25140	OLEO1	97.6	<b>2.12</b>	0.0178	Oleosin
AT5G40420	OLEO2	14.2	<b>3.17</b>	0.1041	Oleosin
AT3G27660	OLEO4	15.1	1.15	4.8983	Oleosin
AT3G01570	OLEO2L	42.3	1.62	1.0312	Oleosin
AT4G27140		43.5	-	0	2S seed storage protein 1
AT4G27150		251.2	-	0	2S seed storage protein 2
AT4G27160		389.2	-	0	2S seed storage protein 3
AT4G27170		305.2	-	0	2S seed storage protein 4
AT5G44120	CRA1	259.5	<b>11.96</b>	0.2174	12S seed storage protein
AT1G03880	CRB	149.1	-	0	12S seed storage protein
AT4G28520	CRC	1377	<b>6.37</b>	0.0817	12S seed storage protein
AT1G32560		8.5	0.89	0.4561	Late embryogenesis abundant
AT2G35300		9.8	<b>2.04</b>	0.3505	Late embryogenesis abundant
AT1G48130		10.7	-	0	Rehydrin
AT2G41260		33.8	<b>6.85</b>	0.8629	Late embryogenesis abundant
AT3G17520		6.7	0.56	0.6968	Late embryogenesis abundant
AT3G15670		6.1	1.46	0.3883	Late embryogenesis abundant

phénotype engendré dans le double mutant *larp1-1/dcp5-1* pourrait donc être une conséquence de la dérégulation de ces 273 communes et/ou de la dérégulation des transcrits spécifiques à chaque protéine. Pour relier les transcrits affectés à leur fonction, une analyse GO a été menée. Parmi les 1 328 transcrits spécifiques de LARP1 par rapport à DCP5, 50 catégories sont enrichies dans des fonctions diverses concernant les processus cellulaires, les réponses à différents stimuli mais également plusieurs catégories liées au développement (Figure 32-A). À partir des 413 transcrits spécifiquement affectés dans *dcp5-1*, seulement 11 catégories sont enrichies mais curieusement aucune n'est liée au développement (Figure 32-C). Néanmoins, parmi les 273 cibles communes entre LARP1 et DCP5, trois catégories sont spécifiquement liées au développement (Figure 32-B). Cette observation indique que les transcrits réprimés en traduction par DCP5 et liés au développement sont également régulés par LARP1. La dérégulation de ces transcrits en l'absence de LARP1 et DCP5 pourrait donc contribuer au phénotype des plantes *larp1-1/dcp5-1*. Il est néanmoins étonnant de voir que LARP1 et DCP5 ont des effets similaires sur la quantité à l'équilibre de ces transcrits dans les polysomes alors que le mutant *larp1-1* ne présente pas de phénotype à l'inverse des plantes *dcp5-1*. Il faut cependant considérer que le rôle de DCP5 a surtout été démontré dans les étapes du développement post-embryonnaire (Xu & Chua, 2009) et que la quantité de DCP5 diminue au cours de la germination. Ainsi, cette étude propose que le phénotype des plantes *dcp5-1* s'explique principalement par une levée de l'inhibition sur certains transcrits liés au stockage des lipides au cours du développement post-embryonnaire. Parmi les cibles connues de DCP5, plusieurs sont également sur-accumulées dans les ARNm de la fraction totale de notre jeu de données comme *OLEO1*, *OLEO2* ou *CRA1* mais dans un moindre effet par rapport aux données publiées à 6 jours (Tableau 5). Dans l'ensemble ces transcrits sont très faiblement exprimés dans Col0 à 17 jours et certains ne sont même pas détectés. Ces observations supportent donc que les dérégulations pouvant contribuer au phénotype des plantes *larp1-1/dcp5-1* ne sont pas toutes détectables dans le stade développemental considéré pour l'analyse, à savoir 17 jours. Il est donc probable que la dérégulation traductionnelle des 273 transcrits identifiés ici ne reflète pas la totalité des transcrits affectés liés à l'apparition du phénotype des plantes *larp1-1/dcp5-1* mais qu'ils peuvent y contribuer au moins en partie.



## Conclusion du chapitre :

Au travers de ce chapitre, le lien entre ECT2, LARP1 et DCP5 a été étudié dans le but de préciser un rôle répressif d'ECT2 sur la traduction. Le lien moléculaire entre les facteurs a d'abord été déterminé en identifiant que les interactions entre ECT2 et LARP1 et entre LARP1 et DCP5 sont indépendantes de la présence d'ARN supposant des interactions directes d'autant plus que l'interaction LARP1-ECT2 est détectée en double hybride. Par la suite, un premier lien développemental a été exploré au travers des trichomes. Il a ainsi été montré que les défauts induits dans des plantes dépourvues des trois facteurs sont plus prononcés que dans chacun des mutants respectifs, appuyant qu'ECT2, LARP1 et DCP5 ont un lien physiologique. Dans un aspect plus général, il a été montré que l'absence de LARP1 et DCP5 induit des défauts de développement sévères avec une réduction de croissance générale et des défauts morphologiques. En comparaison les doubles mutants *ect2/dcp5* ou *ect2/larp1* ne montrent pas de phénotype plus prononcé suggérant que le lien entre LARP1 et DCP5 est prépondérant. En revanche, l'absence supplémentaire d'ECT2 dans le double mutant *larp/dcp5* réduit encore la croissance des plantes soutenant que les fonctions d'ECT2 sont liées à LARP1 et DCP5 au moins en partie et pourrait donc s'intégrer dans les réseaux de transcrits régulés par ces deux facteurs. Dans l'hypothèse où ECT2 agirait comme répresseur de traduction en coopération avec LARP1 et DCP5, une analyse translatomique a été menée pour mesurer l'impact de ces facteurs sur le contrôle traductionnel des ARNm. Les cibles majeures de l'action répressive d'ECT2 ont été identifiées et la plupart codent des facteurs impliqués dans le développement et les réponses au stress. En considérant ensuite les cibles potentielles de DCP5 et LARP1, il a été montré que la grande majorité est commune avec celles définies pour ECT2, supportant davantage que ces trois facteurs pourraient agir de façon similaire ou en coopération pour inhiber la traduction de mêmes transcrits. Finalement, une population régulée par LARP1 et DCP5 indépendamment d'ECT2 a également été identifiée et concerne aussi des transcrits liés au développement. Cette observation est donc cohérente avec les défauts physiologiques engendrés dans le double mutant.

## **CHAPITRE IV – FONCTION ET RÉGULATION DE LA PROTÉINE ECT2 EN SITUATION DE STRESS THERMIQUE**

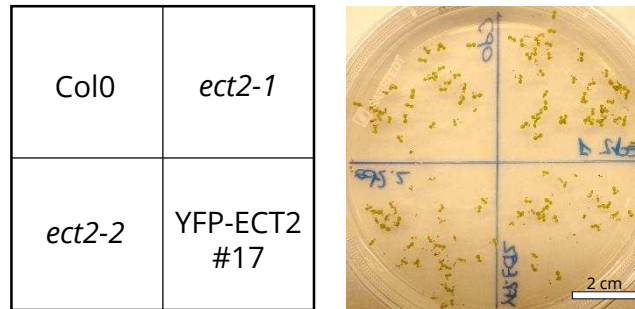
Après avoir documenté le rôle d'ECT2 en condition normale, dans un second temps je me suis intéressé à la fonction et la régulation d'ECT2 dans la réponse des plantes face au stress thermique. En effet, il a été montré qu'ECT2 interagit avec LARP1 en condition normale mais également en situation de stress. Sachant que LARP1 est impliquée dans un phénomène massif de dégradation cytoplasmique d'ARNm en stress thermique (Merret et al., 2013), j'ai cherché à déterminer si ECT2 pourrait également prendre part à ce mécanisme. Par ailleurs, plusieurs points relatifs aux chapitres précédents supportent que l'activité d'ECT2 pourrait être régulée en situation de stress thermique. En effet, les données préliminaires de colonne d'affinité à un ARN méthylé montrent une plus faible identification d'ECT2 à 38°C, ce qui pourrait supposer une capacité modifiée de liaison à la méthylation. De même, en situation de stress thermique, la localisation subcellulaire d'ECT2 est modifiée puisqu'elle s'agrège dans les granules de stress. Finalement, avec l'approche de protéomique quantitative, j'ai montré que le stress thermique modifie considérablement à la baisse le nombre de partenaires potentiels d'ECT2. Même si certaines interactions peuvent être médiées par la présence d'ARN, la réduction globale de partenaires suggère qu'il y a moins de complexes impliquant ECT2 qui sont formés en situation de stress alors que l'accumulation d'ECT2 en condition de stress n'est pas modifiée. Ainsi, dans un premier temps, l'implication d'ECT2 dans les voies de réponses au stress thermique a été étudiée puis des travaux ont été menés afin de déterminer si et comment ECT2 est régulée au cours du stress thermique.

### **I – QUEL EST LE RÔLE D'ECT2 DANS LA RÉPONSE AU STRESS THERMIQUE ?**

Des travaux antérieurs de l'équipe ont mis en évidence un phénomène massif de dégradation d'ARNm dans les premières réponses moléculaires d'un stress thermique, faisant intervenir la protéine LARP1 et l'exoribonucléase XRN4 (Merret et al., 2013 et 2015). Sachant qu'ECT2 interagit avec LARP1, on pourrait alors envisager un modèle où ECT2 participerait à ce mécanisme en adressant les complexes LARP1-XRN4 vers les transcrits méthylés à dégrader.

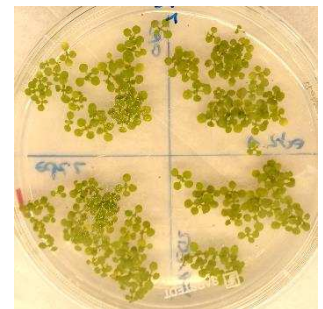
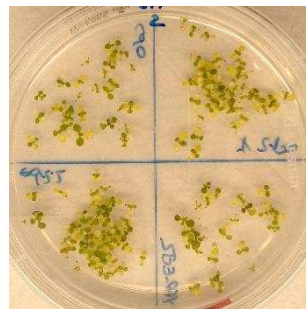
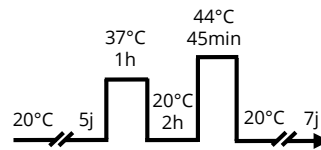
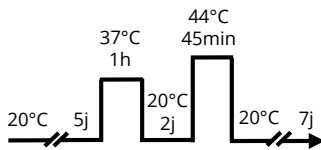
**A**

Avant le stress

**B**LATSAT

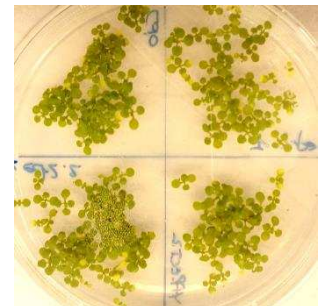
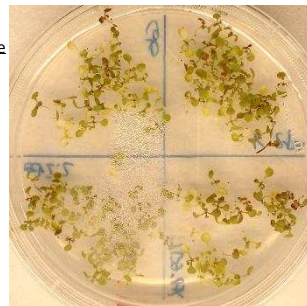
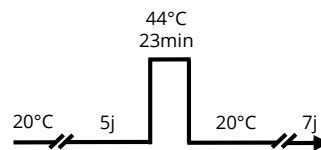
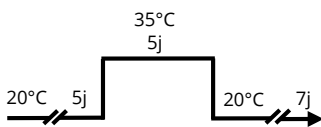
Long-term Acquired Thermotolerance

Short-term Acquired Thermotolerance

TMHTBT

Thermotolerance to Moderately High Temperature

Basale Thermotolerance

**Figure 33 : Les mutants *ect2* ne semblent pas avoir de défaut de thermotolérance**

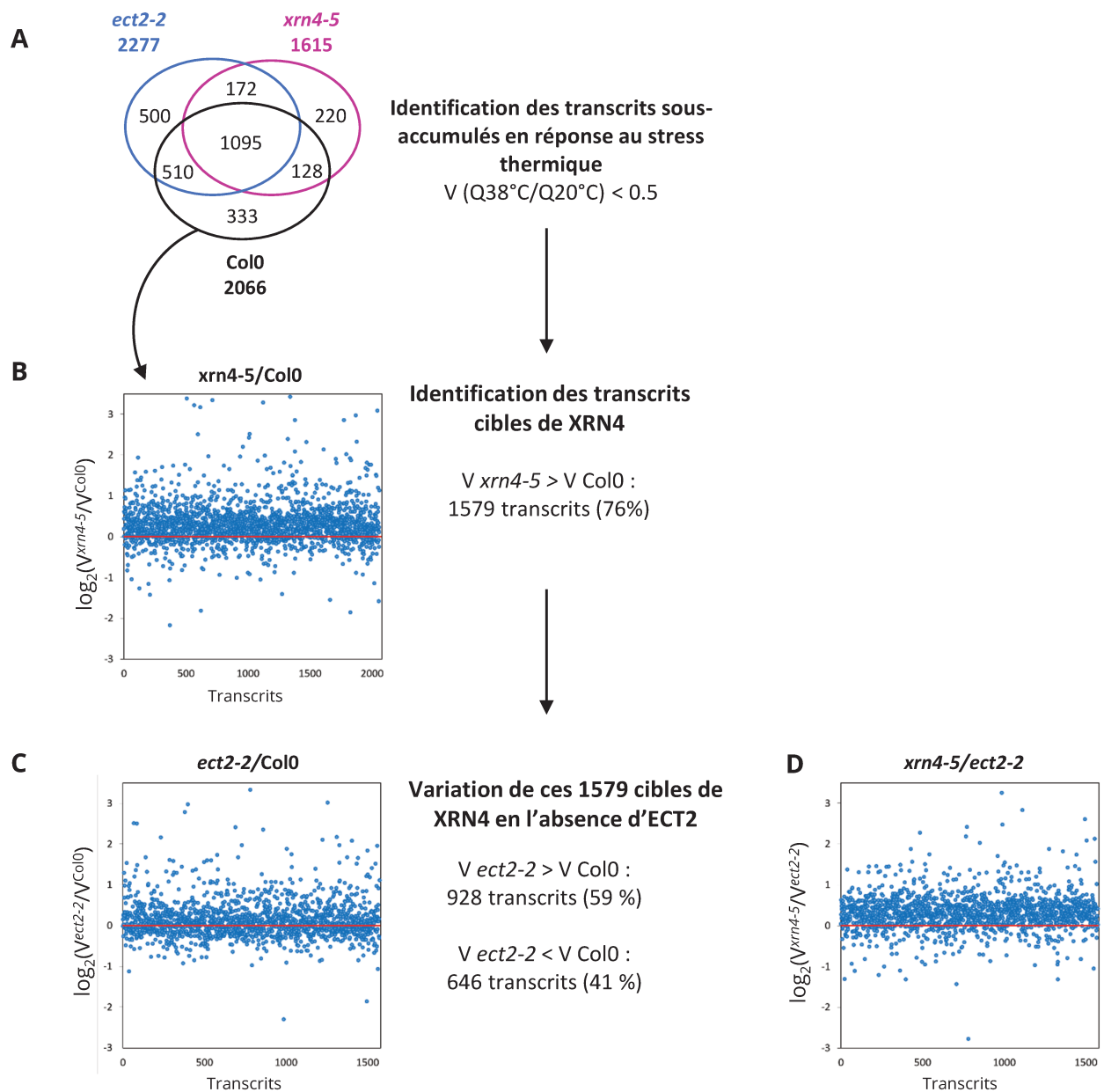
(A) Plantules de 5 jours de génotype Col0, des mutants *ect2-1*, *ect2-2* et de la lignée transgénique YFP-ECT2 #17, cultivées sur milieu MS (1% Sucrose pour LAT, SAT et BT ou 0,1% sucrose pour TMHT). (B) Phénotype des plantules après 7 jours de récupération suivant quatre régimes de thermotolérance différents. Les détails des différent régimes sont schématisés à gauche de chaque photographie.

## **I.1 – ECT2 ne semble pas requise pour la thermotolérance des plantes**

Pour vérifier tout d'abord l'importance physiologique de la protéine ECT2 au cours d'une exposition à un stress thermique, des tests de thermotolérance ont été réalisés. Quatre régimes différents de thermotolérance (définis selon Liu et al., 2011) ont été choisis permettant d'étudier la réponse des plantes : au cours d'un stress de forte intensité après une première exposition à un stress modéré dans une fenêtre de temps courte (SAT : Short-term Acquired Thermotolerance) ou longue (LAT : Long-term Acquired thermotolerance) mais aussi la réponse basale en situation de stress de forte intensité (BT : Basale Thermotolerance) ou encore la réponse après un stress modéré d'une durée longue (TMHT : Thermotolerance to moderately high temperature). Il a notamment été montré que des plantes mutantes XRN4 survivent beaucoup moins bien que des plantes Col0 dans des régimes de stress thermique comme la TMHT ce qui supporte l'importance de ce facteur dans le mécanisme d'acclimatation au stress thermique (Merret et al., 2013). Pour cela, les tests ont été réalisés sur des plantules de 5 jours en comparant des plantes sauvages Col0 aux deux lignées mutantes *ect2-1* et *ect2-2* ainsi que des plantes complémentées avec la version YFP-ECT2 (Figure 33-A). Après 7 jours de récupération, aucune différence flagrante de survie n'a été observée entre les mutants et Col0 dans les 4 régimes de thermotolérance testés (Figure 33-B). Bien que les expériences n'aient pas été répétées avec un aspect quantitatif, cette première observation semble exclure l'implication d'ECT2 dans les mécanismes de thermotolérance. Néanmoins, il est difficile de pouvoir conclure sachant qu'il existe 11 protéines ECT avec un domaine YTH de type F. Il est possible qu'une autre protéine ECT puisse compenser l'absence d'ECT2 ne permettant pas de faire apparaître de défauts physiologiques.

## **I.2 – ECT2 ne semble pas impliquée dans la dégradation des ARNm en réponse au stress thermique**

Pour s'intéresser ensuite à un aspect moléculaire, les données de transcriptomiques établies précédemment ont été exploitées pour la condition stressée afin de déterminer si ECT2 pourrait prendre part à la dégradation des transcrits en situation de stress thermique. Pour cela, l'objectif a été d'identifier les transcrits cibles de la dégradation dans un Col0 dont la quantité à l'équilibre est dépendante de la présence d'XRN4 à l'aide des données du mutant *xrn4-5* puis de déterminer leur comportement dans le mutant *ect2-2*. Dans chacun des cas, la fiabilité des données de transcriptomique de chaque réplicat du mutant *xrn4-5* ainsi que les réplicats de Col0 et *ect2-2* en situation de stress a été vérifiée en construisant des droites de régression. Les droites



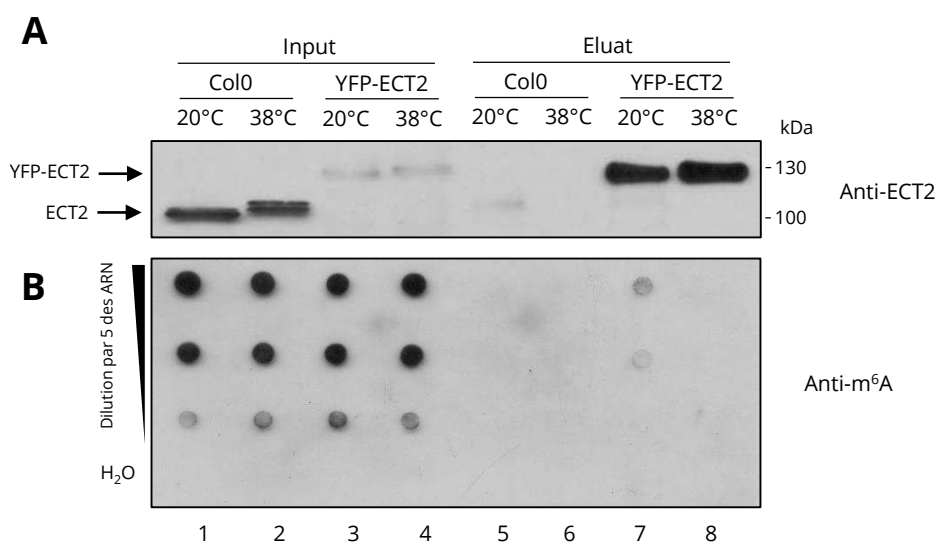
**Figure 34 : Analyse des données transcriptomiques en condition de stress pour déterminer l'implication d'ECT2 dans le mécanisme de dégradation des ARNm**

(A) Diagramme de Venn représentant les ARNm sous accumulés dans la fraction totale des plantes Col0, *ect2-2* et *xrn4-5* en réponse au stress. Une diminution d'au moins 2 fois dans la condition stressée par rapport à la condition normale ( $V=Q38^{\circ}C/Q20^{\circ}C < 0,5$ ) a été considérée. (B) Représentation logarithmique du rapport  $V^{xrn4-5}/V^{Col0}$  pour les 2 066 transcrits sous-accumulés dans Col0 en réponse au stress. (C-D) Représentation logarithmique du rapport  $V^{ect2-2}/V^{Col0}$  (C) et  $V^{xrn4-5}/V^{ect2-2}$  (D) pour les 1 579 transcrits sous-accumulés dans Col0 et dont la variation est dépendante de XRN4.

obtenues ont montré une pente et un coefficient de détermination proche de 1 (données non montrées). Comme il y a peu d'écart entre les valeurs des réplicats, la moyenne des deux a donc été utilisée pour l'analyse.

L'impact du stress thermique sur l'accumulation des transcrits a été mesuré en calculant un indice de variation (V) obtenu en divisant le nombre de lectures à 38°C (Q38°C) par celui à 20°C (Q20°C) pour chaque transcrit. Pour faire un lien avec les données précédentes de l'équipe, seuls les transcrits avec une variation inférieure (sous-accumulation) d'un facteur 2 ont été considérés, c'est-à-dire présentant un indice V (Q38°C/Q20°C) inférieur à 0,5. Avec ce critère, dans la fraction totale du génotype Col0, le stress provoque la sous-accumulation de 2 066 transcrits. Il faut noter que ce chiffre est bien inférieur aux travaux précédents de l'équipe où environ 4 500 transcrits ont été identifiés comme sous-accumulés (Merret et al., 2013, 2015) car seuls les transcrits avec au minimum 5 rpk dans au moins une librairie ont été considérés. À noter qu'en considérant un seuil classique d'au moins 1 rpk dans au moins une librairie, ce sont 3 440 transcrits qui sont sous-accumulés en condition de stress. Néanmoins, dans cette analyse, le temps de stress (15 min) est différent des analyses précédentes (30 min) ce qui peut expliquer que moins de transcrits sont affectés. Parmi les 2 066 transcrits sous-accumulés avec le stress thermique, plus de 70 % d'entre eux voient leur indice de variation évoluer entre 0,5 et 0,33, c'est-à-dire une diminution de 2 à 3 fois inférieure par rapport à la condition normale. En s'intéressant aux catégories GO de ces transcrits sous-accumulés, on retrouve dans les premières catégories les gènes associés aux voies de signalisations des protéines réceptrices (GO:0007167, p-value :  $1,6 \cdot 10^{-18}$ , 44 facteurs/140), à la réponse aux stimuli liés à l'auxine (GO:0009733, p-value :  $1,8 \cdot 10^{-13}$ , 60 facteurs/360) mais aussi à la réponse aux stimuli hormonaux (GO:0009725, p-value :  $3,1 \cdot 10^{-12}$ , 109 facteurs/982). De nombreuses autres catégories sont associées à la régulation de processus métaboliques, ce qui suggère comme précédemment que le stress thermique affecte majoritairement l'expression de gènes de ménage.

En parallèle, 1 615 transcrits sont sous-accumulés dans *xrn4-5* et 2 277 dans *ect2-2* (Figure 34-A). Une grande majorité des cibles, 1 095 transcrits pour être exact, est commune entre les trois génotypes illustrant que le stress affecte qualitativement la sous-accumulation des mêmes groupes de transcrits. Ceci est en accord avec les données publiées de l'équipe où il avait été mis en avant qu'XRN4 était impliquée dans un contrôle quantitatif des cibles du stress plutôt que qualitatif. Ainsi, 60 % de transcrits sous-accumulés dans la fraction totale de Col0 (1 223 sur 2 066) sont également sous-accumulés dans la fraction totale du fond mutant *xrn4-5*. Néanmoins, sur un



**Figure 35 : L'interaction d'ECT2 avec des ARN méthylés est modifiée en situation de stress thermique**

**(A)** Analyse par western blot de l'immunoprécipitation de la protéine YFP-ECT2 à partir d'extraits natifs de plantes de 14 jours cultivées en condition normale ou exposées 30 min à 38°C. La lignée Col0 est utilisée comme contrôle négatif. L'anticorps dirigé contre ECT2 permet de distinguer la protéine endogène à 100 kDa de la protéine de fusion YFP-ECT2 à 130 kDa qui est exprimée dans un fond mutant *ect2-2*. **(B)** Analyse par dot-blot de la présence de m<sup>6</sup>A dans les ARN des fractions de départ (Input) ou immunoprécipitées avec YFP-ECT2 ou Col0 comme témoin négatif.

aspect quantitatif, 1 579 (76,4 %) des 2 066 transcrits sous-accumulés sont plus abondants dans le mutant *xrn4-5* par rapport à Col0 (Figure 34-B). Puisque la quantité à l'équilibre de ces transcrits augmente en l'absence de XRN4, ils ont été définis comme les cibles de XRN4. On remarque néanmoins que l'absence d'XRN4 ne permet pas de restaurer totalement la quantité à l'équilibre de ces transcrits ce qui laisse penser qu'il existe au moins une autre voie de dégradation complémentaire encore inconnue à ce jour.

Pour se concentrer uniquement sur les cibles majeures de XRN4, la quantité à l'équilibre de ces 1 579 transcrits a été étudiée dans le mutant *ect2-2*. Par rapport à *xrn4-5* où tous ces transcrits sont plus abondants que dans Col0, ce sont ici 928 (60 %) transcrits qui ont une accumulation plus forte dans *ect2-2* par rapport à Col0 ( $\log_2(\text{ect2-2}/\text{Col0}) > 0$ ) (Figure 34-C). Il ne semble donc pas y avoir un effet général de réaccumulation des transcrits en l'absence d'ECT2 puisque 40 % est également moins abondant dans *ect2-2* par rapport à Col0. De plus, en considérant les 1 579 transcrits, il apparaît clairement que leur quantité à l'équilibre est plus abondante dans le mutant *xrn4-5* par rapport à *ect2-2* (Figure 34-D) soutenant qu'ECT2 a un très peu d'effet par rapport à XRN4 sur ces transcrits en situation de stress. Ces résultats semblent donc exclure l'implication d'ECT2 dans le contrôle de la stabilité des transcrits en réponse au stress thermique.

## **II – INFLUENCE DU STRESS THERMIQUE SUR L'INTERACTION D'ECT2 AVEC LES ARN MÉTHYLÉS**

Les premières observations n'ont pas permis de montrer qu'ECT2 pourrait être nécessaire aux mécanismes de thermotolérance ou de dégradation cytoplasmique induit par le stress thermique. Néanmoins, pour en revenir aux résultats préliminaires sur l'identification des protéines de liaison aux ARNm méthylés, il avait été observé que le nombre de peptides ECT2 était réduit en situation de stress thermique (Résultats préalables II). Ainsi, j'ai cherché à déterminer si le stress thermique pouvait influencer la capacité d'ECT2 à interagir avec des ARNm méthylés sachant que la quantité de la protéine n'apparaît pas régulée avec le stress (Figure 25 et 35-A). Pour cela, des expériences de RIP ont été répétées à partir des plantes exprimant la protéine YFP-ECT2 et exposées ou non à un stress thermique (30 min à 38°C). Après immunoprécipitation de la protéine de fusion en conditions natives, les ARN associés sont extraits et la présence de résidu m<sup>6</sup>A est étudiée par dot-blot à l'aide d'un anticorps spécifique anti-m<sup>6</sup>A (Figure 35). En parallèle, l'approche a été réalisée sur des plantes Col0 utilisées comme contrôle négatif puisqu'elles n'expriment pas de version étiquetée d'ECT2. La condition de stress n'influence pas



l'immunoprécipitation de la protéine de fusion puisque la protéine YFP-ECT2 est bien purifiée dans les deux conditions environnementales différentes (Figure 35-A). À l'inverse, aucun signal n'est enrichi dans les fractions éluées des plantes Col0. Lorsqu'on s'intéresse ensuite aux ARN immunoprécipités, les résultats du dot-blot montrent que la présence de m<sup>6</sup>A est bien détectée en condition normale parmi les ARN purifiés avec YFP-ECT2 (Figure 35-B, puits 7). En comparaison aucun signal n'est détecté pour les éluats issus des plantes Col0 (Figure 35-B, puits 5 et 6). En situation de stress, curieusement aucun signal attestant de la présence de m<sup>6</sup>A n'est visible dans les ARN élués avec YFP-ECT2 (Figure 35-B, puits 8). La différence par rapport à la condition normale ne s'explique pas par une diminution globale du niveau de m<sup>6</sup>A puisque la présence de m<sup>6</sup>A est relativement équivalente dans les ARN issus des fractions de départ (Figure 35-B, puits 3 et 4). L'efficacité d'immunoprécipitation de la protéine YFP-ECT2 est également similaire entre les deux conditions, excluant également un problème technique lié à cette étape. Ces résultats montrent donc qu'avec l'exposition à un stress thermique, ECT2 ne semble plus interagir avec des ARN méthylés. Cette différence entre les conditions environnementales pourrait s'expliquer par deux hypothèses : soit que les cibles endogènes d'ECT2 ont une stabilité ou un niveau de méthylation réduit en situation de stress, soit que la capacité de fixation au m<sup>6</sup>A d'ECT2 est revue à la baisse avec le stress. Cette deuxième hypothèse serait un fait totalement inédit puisque jusqu'à présent rien n'indique chez les eucaryotes qu'une protéine à domaine YTH puisse avoir une capacité lectrice de m<sup>6</sup>A modifiée en fonction de facteurs externes.

### **III – MODIFICATION CHIMIQUE DE LA PROTÉINE ECT2**

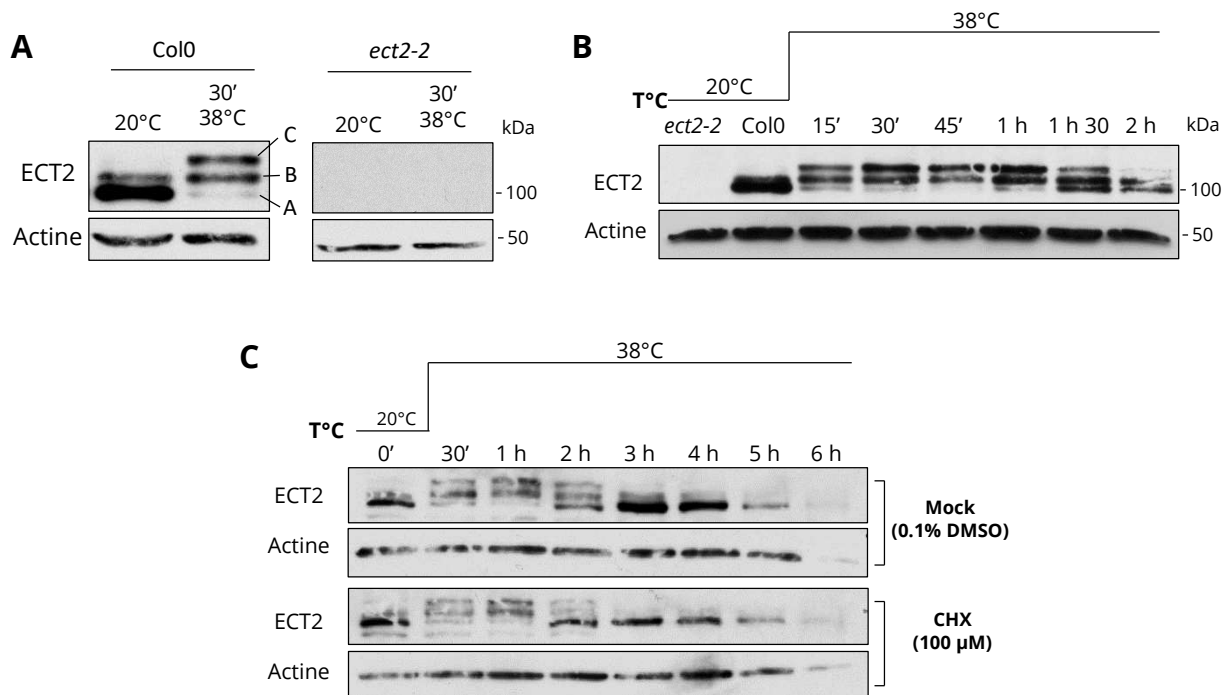
Ainsi, dans la mesure où la capacité de liaison aux ARNm méthylés d'ECT2 pourrait être modifiée au cours d'un stress thermique, l'étape suivante a été de déterminer comment une telle régulation pouvait être mise en place. Les analyses précédentes de western blot ont révélé que le profil de la protéine ECT2 semble modifié au cours du stress thermique (Figure 25 et 35-A). Les travaux suivants ont donc eu pour objectif de mieux caractériser le profil de la protéine ECT2 au cours d'un stress thermique.

#### **III.1 – Le profil dynamique de la protéine ECT2 au cours d'un stress thermique**

Pour étudier cette question, des plantes exposées ou non à un stress thermique de 30 min à 38°C ont été utilisées pour étudier le profil d'ECT2 par western blot. Les résultats obtenus montrent que le signal à 100 kDa correspondant à ECT2 est différent entre la condition normale et

le stress (Figure 36-A). En condition normale, le signal ECT2 forme un doublet avec une bande basse plus intense, que l'on nommera « forme A », et une bande plus haute moins abondante que l'on nommera « forme B ». L'exposition des plantes à 38°C pendant 30 min modifie le profil en diminuant drastiquement la quantité de la forme A tout en faisant apparaître une troisième forme (« forme C ») migrant plus lentement que les précédentes. En parallèle, la quantité de la forme B augmente également par rapport à la condition normale. Il y a donc un changement majeur de quantité avec une augmentation des signaux associés aux formes retardées (B et C) qui s'opère au détriment de la forme A, pourtant majoritaire en condition normale. Dans le but de mieux caractériser l'apparition de ces différentes formes, le profil d'ECT2 a été déterminé au cours d'une cinétique en exposant les plantes de 15 min à 2 h à 38°C (Figure 36-B). La modification du profil vers les formes retardées s'opère de façon très rapide et est visible dès 15 min d'exposition à 38°C. L'intensité des formes B et C reste relativement constante jusqu'à au moins 1 h de stress alors que la forme A disparaît presque complètement après 45 min de stress. Curieusement, à partir d'une heure et demi de stress, la forme A commence à se réaccumuler de façon croissante jusqu'à 2 h de stress. En parallèle, les deux formes B et C diminuent progressivement et après 2 h de stress, la forme C est presque sous le seuil de détection. Ainsi, après 2 h de stress, le profil d'ECT2 est pratiquement revenu à un niveau proche de la condition normale alors même que le stress demeure. Ces observations démontrent que le profil de la protéine ECT2 est très fortement modifié et répond de façon dynamique dans les premières étapes de réponse au stress thermique.

L'apparition des différents signaux d'ECT2 pourrait s'expliquer par la présence de nouvelles formes de la protéine traduites spécifiquement en réponse au stress, à la présence d'isoformes issus de variants d'épissage ou encore pourrait être la conséquence de modifications post-traductionnelles. Pour distinguer ces possibilités, les plantes ont été exposées à la même dynamique de stress thermique avec ou sans un traitement à la cycloheximide, une drogue utilisée pour bloquer l'élongation de traduction. Visiblement, ce traitement n'affecte pas le profil de réponse d'ECT2 au cours du stress (Figure 36-C). En effet, l'apparition des formes B et C est visible dès 30 min de stress dans les plantes traitées ou non. Ces formes persistent jusqu'à 2 h d'exposition au stress où ensuite la forme A s'accumule à nouveau au détriment des autres formes. Au-delà de 3 h, la forme A redevient la forme la plus intense. À noter qu'après 5 h d'exposition à 38°C, le signal ECT2 diminue drastiquement, ce qui constitue probablement une durée létale pour des plantes de 14 jours puisque même la quantité d'actine diminue considérablement. Comme aucune différence de profil n'est observée dans des plantes où la traduction est inhibée, cela démontre que les formes B et C d'ECT2 ne sont pas des formes



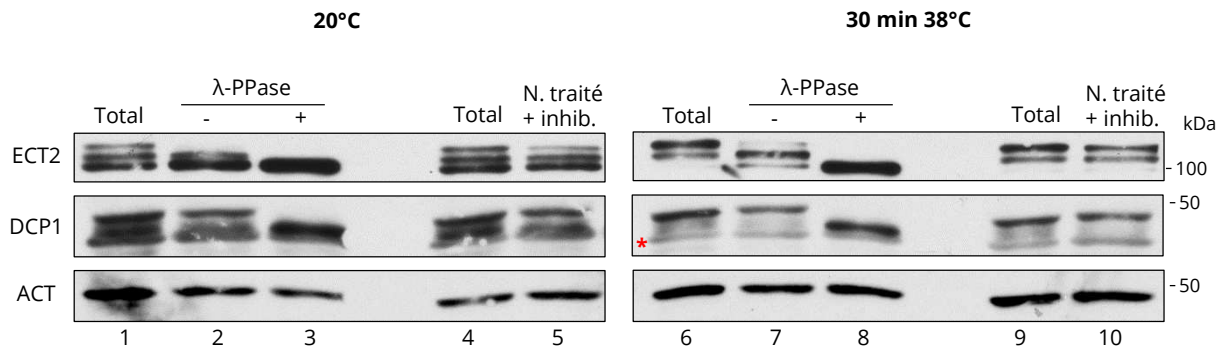
**Figure 36 : ECT2 est dynamiquement modifiée en réponse à un stress thermique**

Analyses par du profil d'ECT2 par western blot à partir d'extraits totaux de protéines extraites en condition dénaturantes sur des plantules entières de 14 jours. **(A)** Profil d'ECT2 en condition normale (20°C) et après exposition des plantes 30 min à 38°C. Les trois formes d'ECT2 sont désignées par A, B et C. Des extraits du mutant *ect2-2* ont été utilisés comme contrôle négatif dans une expérience parallèle. **(B)** Profil d'ECT2 dans des plantes incubées entre 15 min et 2 h à 38°C. **(C)** Profil d'ECT2 dans des plantes incubées entre 30 min et 6 h à 38°C avec un traitement en présence de 100 μM de cycloheximide (CHX) ou 0.1% de DMSO comme contrôle (Mock). L'actine est utilisée dans chacun des cas comme contrôle de charge. Uniquement pour la figure **(B)**, l'actine a été testée sur une autre membrane traitée dans les mêmes conditions et avec la même quantité déposée que pour la membrane incubée avec l'anti-ECT2. Des gels avec 6.5% d'acryl/bis-acrylamide sont utilisés pour résoudre les différents signaux d'ECT2.

néosynthétisées au cours du stress. Ces formes d'ECT2 semblent donc être le résultat de la modification de la forme A préexistante. Après 2 h de stress, la forme A s'accumule à nouveau au détriment des formes B et C supposant que ces formes sont réversibles puisque la production de protéines est inhibée. Il est important de souligner qu'après 2 h à 38°C, la cycloheximide est toujours active puisqu'aucun granule cytoplasmique n'est détecté même après 3 h de traitement (voir Figure 41). Ces résultats suggèrent fortement que des modifications post-traductionnelles s'installent de façon dynamique sur la protéine ECT2 au cours du stress thermique dans un système de vases communicants entre les différentes formes et sans nécessité de traduction active.

### III.2 – Nature des modifications post-traductionnelles d'ECT2

Comme les résultats suggèrent l'ajout de modifications post-traductionnelles sur ECT2 en réponse au stress, l'étape suivante a été d'identifier la nature de ces modifications. Selon les données de littérature, plusieurs types de modifications peuvent induire un changement de migration sur gel d'électrophorèse. C'est notamment le cas de la phosphorylation avec des démonstrations notamment pour le facteur VCS (Soma et al., 2017) et DCP1 chez *Arabidopsis* (Xu & Chua, 2012) ou ERK2 chez l'homme (Lahiri et al., 2016); de la sumoylation concernant par exemple le facteur humain p53 (Wu & Chiang, 2009) et MK2 (Chang et al., 2011) ou encore même de l'acétylation sur la protéine SOD1 humaine (Shi et al., 2012). Néanmoins, parmi les modifications post-traductionnelles, la phosphorylation s'avère être une des plus abondantes. De ce fait, la présence de résidus phosphorylés sur ECT2 a été étudiée en premier lieu sachant également que la différence de migration entre les formes d'ECT2 est faible. Dans cette optique, des extraits natifs de plantes cultivées en condition normale ou exposées 30 min à 38°C ont été incubées avec une phosphatase. Le signal obtenu dans les plantes stressées et non soumises au traitement montre bien la présence des trois formes caractéristiques d'ECT2 en réponse au stress avec une intensité plus forte pour les formes B et C (Figure 37, puits 7). Suite au traitement phosphatase, seule la forme A est détectée (Figure 37, puits 8). En condition normale, un doublet est également visible dans l'extrait non traité alors que seule la forme A est visible avec le traitement à la phosphatase (Figure 37, puits 2 et 3). Ce résultat indique clairement que les deux formes B et C d'ECT2 sont des formes phosphorylées. En parallèle, le facteur DCP1 a été testé dans les mêmes conditions. En effet, il est documenté que DCP1 existe en deux formes dont une version phosphorylée qui augmente en situation de stress hydrique (Xu & Chua, 2012) ou thermique (Motomura et al., 2015). En condition normale et en réponse au stress, la forme



**Figure 37 : Les formes modifiées d'ECT2 sont le résultat d'évènements de phosphorylation**

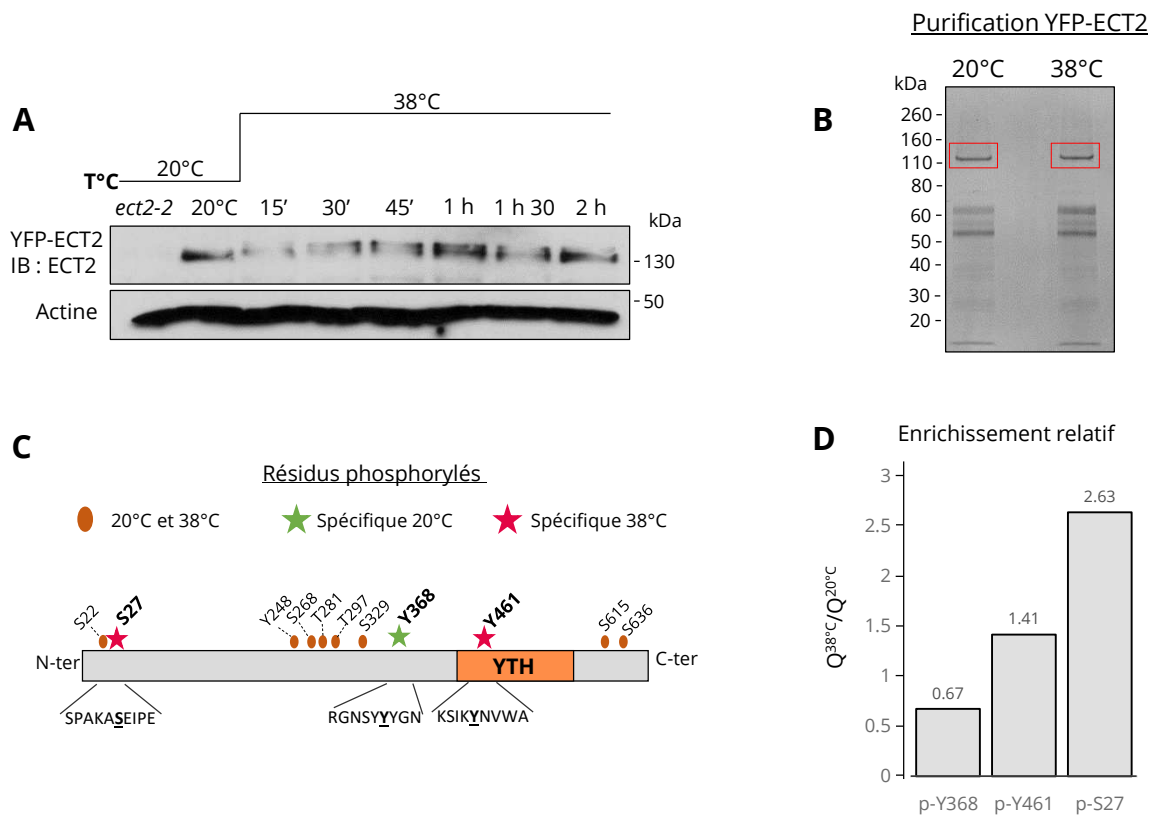
Analyse par western blot d'extraits natifs de protéines non traitées, traitées avec une phosphatase ( $\lambda$ -PPase; 400u) ou avec un mix d'inhibiteurs de phosphatase (50 mM EDTA, 50 mM NaF, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Les échantillons sont issus de plantules Col0 de 14 jours cultivées en condition normale et incubées 30 min à 38°C ou 20°C. DCP1 est utilisée comme contrôle de positif au traitement et l'actine comme contrôle de charge. Total : échantillon issu d'une extraction dénaturante. N. traité : non traité. L'astérisque rouge désigne un bruit de fond reconnu par l'anticorps contre DCP1. Ces données sont représentatives d'un triplicat biologique.

supérieure de DCP1 disparaît avec le traitement à la phosphatase (Figure 37 signal DCP1), démontrant l'efficacité du traitement.

Il est néanmoins étonnant de constater une différence de profil pour ECT2 entre un extrait natif non traité et un extrait total de protéines dans la condition normale et la condition de stress (Figure 37, comparer le puits 2 à 1 et le puits 7 à 6). En effet, l'abondance des formes B et/ou C est plus faible dans les extraits natifs non traités par rapport aux échantillons de protéines extraites en conditions dénaturantes sur les mêmes plantes. Cette différence pourrait suggérer une déphosphorylation partielle d'ECT2 dans l'extrait natif d'autant plus que les échantillons non traités à la phosphatase sont soumis à une incubation de 30 min à 30°C en présence d'un excès d'ions  $Mn^{2+}$ , nécessaire à l'activité de la majorité des phosphatases. J'ai donc réalisé une expérience parallèle en ajoutant un mélange d'inhibiteurs de phosphatase (EDTA, NaF,  $Na_3VO_4$ ) à un extrait natif non traité. Dans ce contexte, les trois formes sont bien détectées et aucune différence n'est visible avec les échantillons obtenus par extraction dénaturante (Figure 37, comparer le puits 4 à 5 et le puits 9 à 10). Ceci supporte l'hypothèse que les différences précédemment observées sont la conséquence de phosphatase(s) endogène(s). En parallèle, aucune différence n'a été observée pour le profil de DCP1 dans ces deux conditions témoignant que le mécanisme de déphosphorylation de DCP1 est différent de celui d'ECT2 et fait intervenir des acteurs moins sensibles à la présence d'ions  $Mn^{2+}$ . À ce jour, la ou les phosphatase(s) agissant sur ECT2 demeure(nt) inconnue(s) (voir partie IV.1).

### **III.3 – Recherche des positions phosphorylées par spectrométrie de masse**

Puisque les résultats ont démontré l'existence d'au moins deux formes phosphorylées d'ECT2 dont l'abondance est modifiée avec le stress thermique, la question suivante a été de déterminer la position des acides aminés phosphorylés. Pour cela, à l'aide d'une lignée transgénique exprimant YFP-ECT2, une approche de purification par immunoprécipitation couplée à une spectrométrie de masse a été choisie. Cette approche implique que la protéine de fusion YFP-ECT2 soit également phosphorylée en réponse au stress. Ainsi, dans un premier temps les plantes exprimant YFP-ECT2 ont donc été exposées à une cinétique de stress à 38°C pour y étudier le profil de la protéine. De façon similaire aux observations précédentes avec la protéine endogène, le signal autour de 130kDA correspondant à la protéine YFP-ECT2 montre l'accumulation de formes retardées en réponse au stress (Figure 38-A). La différence est néanmoins moins marquée par rapport à la protéine endogène en raison d'une plus faible résolution à la taille de migration de la protéine de fusion. Cependant, ceci indique que la version



**Figure 38 : Identification des résidus phosphorylés de la protéine ECT2**

**(A)** Profil d'ECT2 dans des plantes transgéniques de 14 jours exprimant YFP-ECT2 et exposées entre 15 min et 2 h à 38°C. Un extrait issu de la lignée mutante *ect2-2* est utilisé comme contrôle négatif et l'actine comme contrôle de charge. **(B)** Coloration au bleu de Coomassie des produits de purification par immunoprécipitation obtenus à partir de plantes exprimant YFP-ECT2 exposées ou non à un stress thermique (30 min 38°C). La cadre rouge délimite la bande excisée pour l'analyse de spectrométrie de masse. **(C)** Représentation de la position des résidus phosphorylés sur la protéine ECT2 en condition normale ou après un stress thermique de 30 min à 38°C. **(D)** Enrichissement relatif (Quantité 38°C/Quantité 20°C) de l'intensité totale de trois phosphopeptides sélectionnés (normalisé à partir d'un enrichissement Q<sup>38°C</sup>/Q<sup>20°C</sup> de 6 peptides non phosphorylés aléatoires). Trois peptides à 20°C et six à 38°C contenant phospho-S27 ont été identifiés, alors qu'un peptide par condition a été compté pour les deux autres positions (phospho-Y368 et phospho-Y461). La valeur de l'intensité est basée sur la surface du spectre m/z de chacun des peptides considérés.

étiquetée d'ECT2 est également phosphorylée. Pour identifier les résidus phosphorylés, la purification par affinité d'YFP-ECT2 a donc été faite à partir de plantes de 14 jours exposées ou non à un stress de 30 min à 38°C. La quantité obtenue de protéines YFP-ECT2 immunoprécipitées a pu être détectée par coloration au bleu de Coomassie (Figure 38-B), remplissant le critère de quantité demandé pour avoir suffisamment de phosphopeptides à identifier.

Les résultats de spectrométrie de masse obtenus ont permis d'identifier 9 sites de phosphorylation différents en condition normale et 10 en situation de stress thermique (Figure 38-C). Parmi ceux-ci, 8 positions sont communes entre les deux conditions. La position de ces 8 positions est majoritairement centrale et en amont du domaine YTH pour 5 d'entre-elles, une est retrouvée en extrémité N-terminale et 2 en extrémité C-terminale. En dehors de ces 8 positions communes, on remarque donc une position spécifique de la condition normale, la tyrosine 368 (Y368), mais surtout 2 résidus préférentiellement phosphorylés en réponse au stress : la sérine 27 (S27) en position N-terminale et la tyrosine 461 (Y461) dans le domaine YTH. Les formes modifiées d'ECT2 induites en réponse au stress ont été attribuées précédemment comme la conséquence d'au moins 2 événements de phosphorylation différents, il est donc très intéressant de retrouver dans cette approche 2 résidus spécifiquement phosphorylés pour la condition stressée. La phosphorylation de la sérine 27 et/ou de la tyrosine 461 pourrait donc être responsable de l'apparition des formes modifiées d'ECT2. De même, il a été démontré qu'ECT2 s'associe moins avec les ARN méthylés en situation de stress, ainsi il est donc intrigant de voir qu'une phosphorylation s'installe dans le domaine YTH qui est le module d'interaction avec les ARN méthylés. Une hypothèse à considérer serait donc que la phosphorylation de ce résidu pourrait être responsable de la modification d'affinité d'ECT2 pour un ARN méthylé (voir Discussion - Partie II).

Pour étudier plus en détails ces deux positions préférentiellement phosphorylées en situation de stress, une analyse bio-informatique basée sur les données d'intensité de chaque peptide a été menée pour mesurer l'enrichissement des phosphopeptides en fonction de la condition (Figure 38-D). D'après cette analyse, les peptides contenant un résidu Y461 phosphorylé augmentent d'environ 1,4 fois par rapport à la condition normale et ceux avec une phospho-S27 plus de 2,6 fois. En parallèle, avec le stress, les résidus avec une phospho-Y368 diminuent presque de moitié par rapport à la condition normale. Au vu de ces valeurs d'enrichissement pour les résidus phospho-S27 et phospho-Y461, il est tentant d'attribuer la forme B intermédiaire d'ECT2 à une forme contenant une phospho-Y461 et la forme C la plus retardée à celle contenant la



**Tableau 6 : Listes des différentes modifications post-traductionnelles identifiées sur YFP-ECT2**

**(A)** Liste totale des modifications post-traductionnelles identifiées à 20°C et 38°C. **(B)** Liste des modifications spécifiquement retrouvées à 20°C ou 38°C. Nb : nombre.

**A**

Types de modifications	Nombre	
	20°C	38°C
Déamination	21	18
Acétylation	15	15
Phosphorylation	9	10
Carbamidométhylation	3	3
Gln -> pyro-glu	2	2
Di-/oxydation	2	2
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>50</b>

**B**

Types de modifications	Spécifique à 20°C		Spécifique à 38°C	
	Nb	Position	Nb	Position
<b>Phosphorylation</b>	1	Y368	2	S27; Y461
Déamination	6	N371; N382; N420 Q429; N441; N560	3	N293; N347; Q479
Acétylation	2	G364; V648	2	L18; Y461

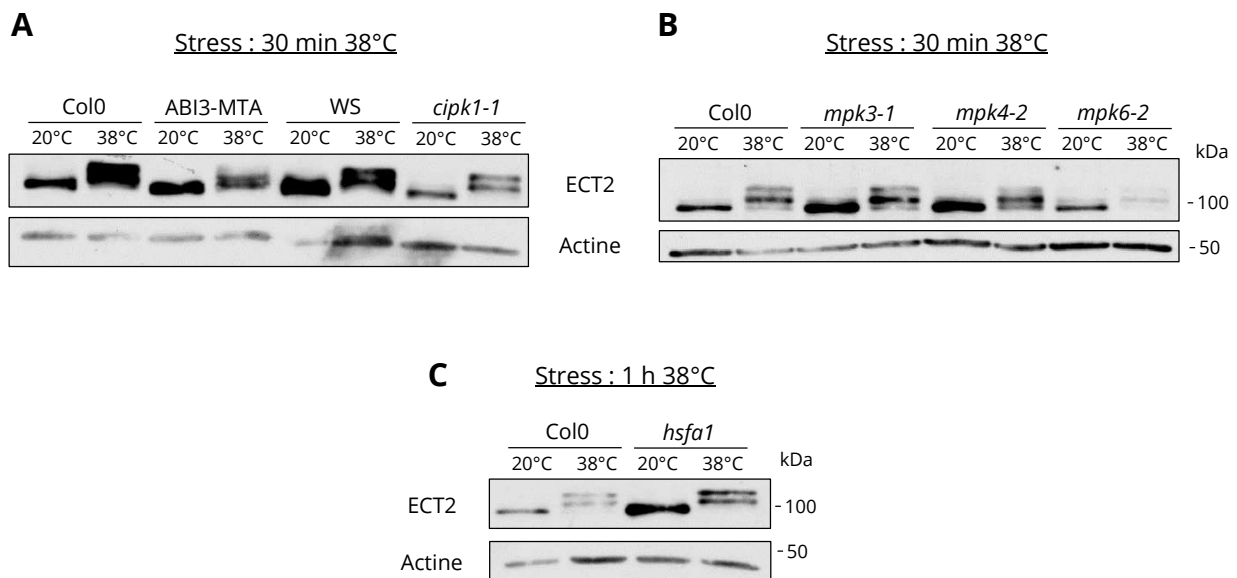
phospho-27, ce qui va de sens avec le changement d'intensité visible en western blot. Néanmoins, cela n'exclut pas que les formes supérieures détectées en western blot soient issues de plusieurs combinaisons de phosphorylations.

L'analyse de spectrométrie de masse pour l'identification des phosphopeptides a également permis d'identifier d'autres modifications post-traductionnelles sur la protéine ECT2. Même si l'approche a été uniquement focalisée sur les phosphopeptides, on remarque qu'au total environ 50 modifications différentes ont pu être identifiées dans les deux conditions (Tableau 6-A). Ainsi, en dehors des phosphorylations s'installant sur une dizaine de sites différents, on retrouve majoritairement des événements de désamination (perte de groupement amine) ou d'acétylation et plus minoritairement des carbamidométhylations, des conversions de glutamine en pyroglutamine et des oxydations. La plupart de ces modifications sont regroupées en position centrale, en amont du domaine YTH ou en extrémité C-terminale. Comme les phosphorylations précédentes, certaines désaminations ou acétylations surviennent spécifiquement dans une condition environnementale (Tableau 6-B). Même si les formes retardées ont été attribuées à de la phosphorylation, il est intéressant de voir que d'autres types de modifications post-traductionnelles varient en réponse au stress pouvant également participer à réguler ECT2.

## **IV – COMMENT LA PHOSPHORYLATION D'ECT2 EST-ELLE RÉGULÉE ?**

### **IV.1 – Recherche de facteurs impliqués dans la phosphorylation d'ECT2**

Puisqu'ECT2 est dynamiquement phosphorylée, l'implication de certaines kinases d'intérêt dans ces événements a été testée. Tout d'abord, les seules données antérieurement publiées sur ECT2 indiquent qu'au moins en système double hybride, elle interagit avec CIPK1, un membre de la famille des sérines/thréonines kinases impliquées dans les voies de signalisation au calcium (Ok et al., 2005). Ce premier candidat a donc été étudié dans la recherche de kinase d'ECT2. Ainsi, des plantes mutantes *cipk1-1* ont été soumises à un stress thermique pour déterminer si ECT2 y est toujours phosphorylée. Après 30 min d'exposition à 38°C, il s'avère que le profil d'ECT2 dans le mutant *cipk1-1* est identique à celui observé dans Col0 ou des plantes d'écotype Wassilewskija (WS) qui est l'écotype utilisé dans le mutant *cipk1-1* (Figure 39-A). Dans chacun des cas, l'intensité des formes B et C augmente au détriment de la forme A. Cette observation démontre que la kinase CIPK1 n'est pas responsable de la phosphorylation induite sur ECT2 en situation de stress thermique. Néanmoins, cela n'exclut pas que CIPK1 pourrait être une kinase d'ECT2 puisque 8 positions phosphorylées ont été communément détectées entre la condition normale et la

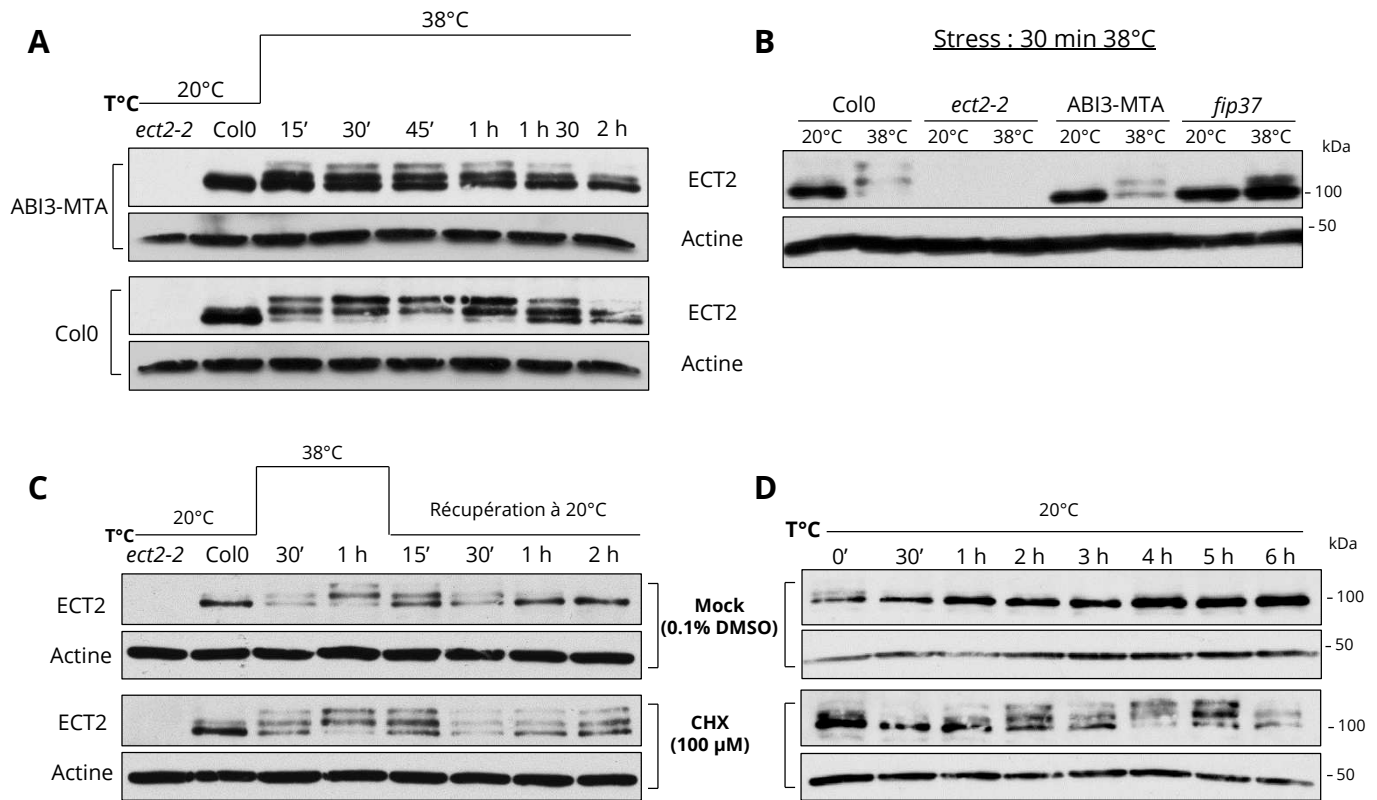


**Figure 39 : Profil d'ECT2 en condition normale et après un stress thermique dans différentes lignées mutantes**  
 L'état de phosphorylation d'ECT2 est testé par western blot à partir d'extraits totaux de protéines issues de plantes de 14 jours incubées à 20°C ou à 38°C. Tous les extraits ont été réalisés à partir de plantes homozygotes pour chacune des mutations considérées. **(A)** Profil d'ECT2 dans le mutant *cipk1-1* en comparaison de plantes sauvage d'écotype Col0 ou WS (Wassilewskija, écotype de la mutation *cipk1-1*) et de la lignée transgénique ABI3-MTA. **(B)** Profil d'ECT2 dans des mutants de kinase MPK3, 4 et 6 en comparaison de Col0. **(C)** Profil d'ECT2 dans un mutant *hsfa1* (quadruple mutant *hsfa1a/b/d/e*) en comparaison de Col0. Dans chacun des cas, L'actine est utilisée comme contrôle de charge. Le temps de stress est spécifié dans chacune des figures.

situation de stress, supportant que des événements de phosphorylation peuvent être présent sans affecter la migration de la protéine. Dans tous les cas si CIPK1 phosphoryle ECT2, ce résultat montre qu'elle n'induit pas l'apparition des formes modifiées détectables sur gel d'électrophorèse.

Par ailleurs, sachant que la phosphorylation d'ECT2 est stimulée en réponse au stress, cela implique l'intervention de kinase(s) régulée(s) par les conditions environnementales. En ce sens, certaines MAPK kinases sont activées par différents stress environnementaux (pour revue Colcombet & Hirt, 2008) comme par exemple MPK3 par le stress osmotique (Droillard et al., 2002); MPK6 par le stress thermique (Evrard et al., 2013), la sécheresse (Xu & Chua, 2012) ou le stress osmotique (Droillard et al., 2002); et MPK4 par différents stress abiotiques (Ichimura et al., 2000). Ces MAPK sont connues pour être actives dans les premières minutes d'exposition au stress, ce qui serait cohérent avec l'observation que les formes phosphorylées d'ECT2 sont déjà majoritaires dès 15 minutes de stress. De plus, parmi les cibles connues de ces kinases, on retrouve la protéine PAT1, un des partenaires potentiel d'ECT2 détecté par spectrométrie de masse, qui est phosphorylée par MPK4 (Roux et al., 2015), mais aussi DCP1, un interactant de DCP5, qui est phosphorylée par MPK6 (Xu & Chua, 2012). Ainsi, des mutants pour les facteurs MPK3, 4 et 6 ont donc été utilisés pour y étudier le profil d'ECT2 en réponse au stress thermique. Dans chaque mutant, les résultats de western blot montrent que le profil d'ECT2 et le ratio des différentes formes phosphorylées sont similaires à ceux observés dans des plantes Col0 (Figure 39-B). Ce résultat exclut également les MAPK kinases des événements de phosphorylation sur ECT2 induits en situation de stress. Néanmoins, des travaux suggèrent que certaines MPK pourraient avoir des cibles communes notamment MPK3 et MPK6 qui font partie du même groupe évolutif (Wang et al., 2007). Le profil d'ECT2 ne peut cependant pas être testé dans un double mutant puisque des plantes *mpk3/mpk6* ne sont pas viables.

Finalement, comme aucune des kinases testées ne semblent être impliquées dans la phosphorylation d'ECT2 en réponse au stress, un registre plus large a été considéré pour s'intéresser à la voie de réponse au stress potentiellement impliquée. En effet, la phosphorylation d'ECT2 en réponse au stress implique l'intervention d'une voie de réponse spécifique. Parmi les voies de réponse au stress thermique, la plus documentée repose sur l'action des « Heat Shock Factors » (HSF) qui vont servir de facteurs de transcription pour exprimer des protéines de réponses au stress incluant des « Heat Shock Proteins » (HSP). Parmi les 21 HSF différentes chez *Arabidopsis*, les 4 homologues HSFA1 (a, b, d, e) sont caractérisés comme les régulateurs centraux



**Figure 40 : La phosphorylation d'ECT2 semble être influencée par la présence d'ARN méthylés et l'état général de la traduction**

Analyses par western blot réalisées à partir d'extraits totaux de protéines extraites en condition dénaturantes sur des plantules entières de 14 jours. **(A)** Comparaison du profil d'ECT2 dans des plantes transgéniques ABI3-MTA et des plantes sauvages Col0 incubées entre 15 min et 2 h à 38°C. Un extrait de plantes non stressée est utilisé comme contrôle négatif. Le profil Col0 est identique à la figure 36-B et provient d'une expérience menée en parallèle avec les plantes ABI3-MTA. **(B)** Profil d'ECT2 en condition normale ou après 30 min de stress à 38°C dans des plantes Col0, *ect2-2*, ABI3-MTA et *fip37*. **(C)** Profil d'ECT2 dans des plantes incubées jusqu'à 1 h à 38°C suivi d'une cinétique de récupération à 20°C jusqu'à 2 h avec un traitement CHX (100 μM) ou contrôle (0.1% DMSO). **(D)** Profil d'ECT2 dans des plantes incubées entre 30 min et 6 h à 20°C traitées avec un traitement CHX (100 μM) ou contrôle (0.1% DMSO). L'actine est utilisée dans chacun des cas comme contrôle de charge. Un extrait de protéines issues de la lignée mutante *ect2-2* est utilisé comme contrôle négatif en **(A)**, **(B)** et **(C)**.

de la réponse au stress thermique en enclenchant des cascades d'activation de gènes nécessaires à la thermotolérance (Liu et al., 2011; Yoshida et al., 2011). En utilisant un quadruple mutant *hsfa1a/b/d/e*, le même profil de phosphorylation est détecté sur ECT2 en réponse au stress par rapport aux plantes sauvages (Figure 39-C). Curieusement, cela indique que la voie modifiant ECT2 est indépendante de la voie majoritaire activée par les facteurs HSFA1. On peut alors supposer l'intervention d'autres voies comme par exemple celle médiée par HSFA2, qui est distincte de celle impliquant HSFA1 (Liu & Charng, 2013). Dans tous les cas, la ou les kinase(s) ainsi que la ou les phosphatase(s) endogène(s) d'ECT2 restent toujours à être identifiées.

## IV.2 – Conditions d'installation de la phosphorylation

Comme aucun facteur n'a pu être rapproché de la mise en place de la phosphorylation d'ECT2, les conditions de phosphorylation ont été étudiées dans d'autres contextes. Premièrement, puisqu'ECT2 s'associe à des ARN méthylés, comment la protéine répond-elle au stress dans un contexte réduit en m<sup>6</sup>A ? Cette question a été étudiée à l'aide de la lignée transgénique ABI3-MTA présentant une réduction du niveau de m<sup>6</sup>A (Bodi et al., 2012). Ces plantes ont été exposées à différents temps de stress thermique pour y comparer le profil de phosphorylation d'ECT2 par rapport à des plantes Col0. Les résultats de western blot indiquent que la vitesse d'apparition des formes phosphorylées B et C n'est pas modifiée dans les plantes ABI3-MTA (Figure 40-A). En effet, ces formes modifiées d'ECT2 apparaissent dès 15 min d'exposition au stress et comme dans les plantes Col0, elles commencent à diminuer en abondance à partir d'une heure et demi de stress thermique. Néanmoins, la quantité des formes phosphorylées d'ECT2 induites en réponse au stress est très différente dans les plantes ABI3-MTA. En effet, l'accumulation de la forme C est relativement faible par rapport à Col0 et la forme A reste majoritaire tout au long du stress alors qu'elle disparaît presque complètement après 45 min à 38°C dans une lignée Col0. Il y a donc une grande partie de la quantité disponible d'ECT2 qui n'est pas phosphorylée au cours de l'exposition à 38°C. Par ailleurs, cette différence est également observée dans un mutant hypomorphe *fip37* (Figure 40-B), un autre facteur impliqué dans l'installation de m<sup>6</sup>A (orthologue à la protéine humaine WTAP) (Shen et al., 2016). Il est difficile d'imaginer que les facteurs MTA ou FIP37 soient directement responsables de la phosphorylation d'ECT2 puisqu'ils ne présentent pas de domaine associé à une activité kinase. Ces résultats pourraient donc suggérer que la quantité de phosphorylation installée sur ECT2 en réponse au stress est dépendante de la présence de m<sup>6</sup>A, paramètre réduit à la baisse dans les lignées ABI3-MTA et *fip37*. Il a été montré précédemment qu'avec le stress thermique, aucun ARN méthylé

n'est retrouvé en association avec ECT2. Une hypothèse à considérer serait que la phosphorylation régulerait ou pourrait être régulée par la capacité de lecteur de méthylation d'ECT2. Ainsi, en se plaçant dans un contexte faible en m<sup>6</sup>A (ABI3-MTA ou *fip37*), on peut penser que moins de phosphorylation est installée sur ECT2 en situation de stress puisqu'elle lie déjà moins de cibles méthylées en condition normale. Cette suggestion pourrait expliquer pourquoi les formes phosphorylées restent minoritaires dans les lignées ABI3-MTA et *fip37* au cours du stress thermique.

Dans un autre contexte, le mécanisme de traduction est majoritairement inhibé en situation de stress thermique. Une hypothèse envisagée serait que l'apparition de formes phosphorylées d'ECT2 en réponse au stress thermique pourrait être liée à l'inhibition de traduction s'opérant dans les premières étapes de réponse au stress. Pour étudier ce point, le profil d'ECT2 a été défini au cours d'une phase de récupération avec ou sans blocage de traduction. En effet, les travaux de l'équipe ont démontré que le mécanisme de traduction redémarre progressivement avec le retour aux températures normales (Merret et al., 2017). Ainsi, des plantes ont été incubées 1 h à 38°C avant d'être replacées jusqu'à 2 h en condition normale. En l'absence de traitement bloquant la traduction, les phosphorylations d'ECT2 sont bien installées au cours du stress thermique et sont ensuite rapidement enlevées au cours de la phase de récupération (Figure 40-C, panneau supérieur). Dès 15 min de récupération à 20°C la forme C diminue au profit de la forme A qui s'accumule à nouveau. Après 1 h de récupération, le profil d'ECT2 est similaire à la condition normale antérieure au stress thermique. Ce profil réversible peut faire écho au mécanisme de traduction qui redémarre progressivement avec le retour aux températures normales. Dans l'expérience parallèle où la traduction est inhibée chimiquement, les formes phosphorylées s'accumulent de façon similaire au cours du stress supportant encore une fois que la traduction n'est pas nécessaire pour la mise en place des phosphorylations (Figure 40-C, panneau inférieur). Néanmoins, au cours de la phase de récupération à 20°C, l'abondance des formes phosphorylées reste constante et ne montre pas de diminution dans la fenêtre de temps considérée. Ainsi, la forme C est toujours détectée après 2 h de récupération alors qu'elle est presque sous le seuil de détection après seulement 30 min de récupération dans les plantes non traitées à la cycloheximide. Ceci suppose que le blocage de la traduction maintient les formes modifiées d'ECT2 même avec un retour à la condition normale. De plus, ceci suggère que les phosphorylations d'ECT2 pourraient être liées à l'état général de la traduction et qu'elles seraient favorisées dans une situation où la traduction est compromise.

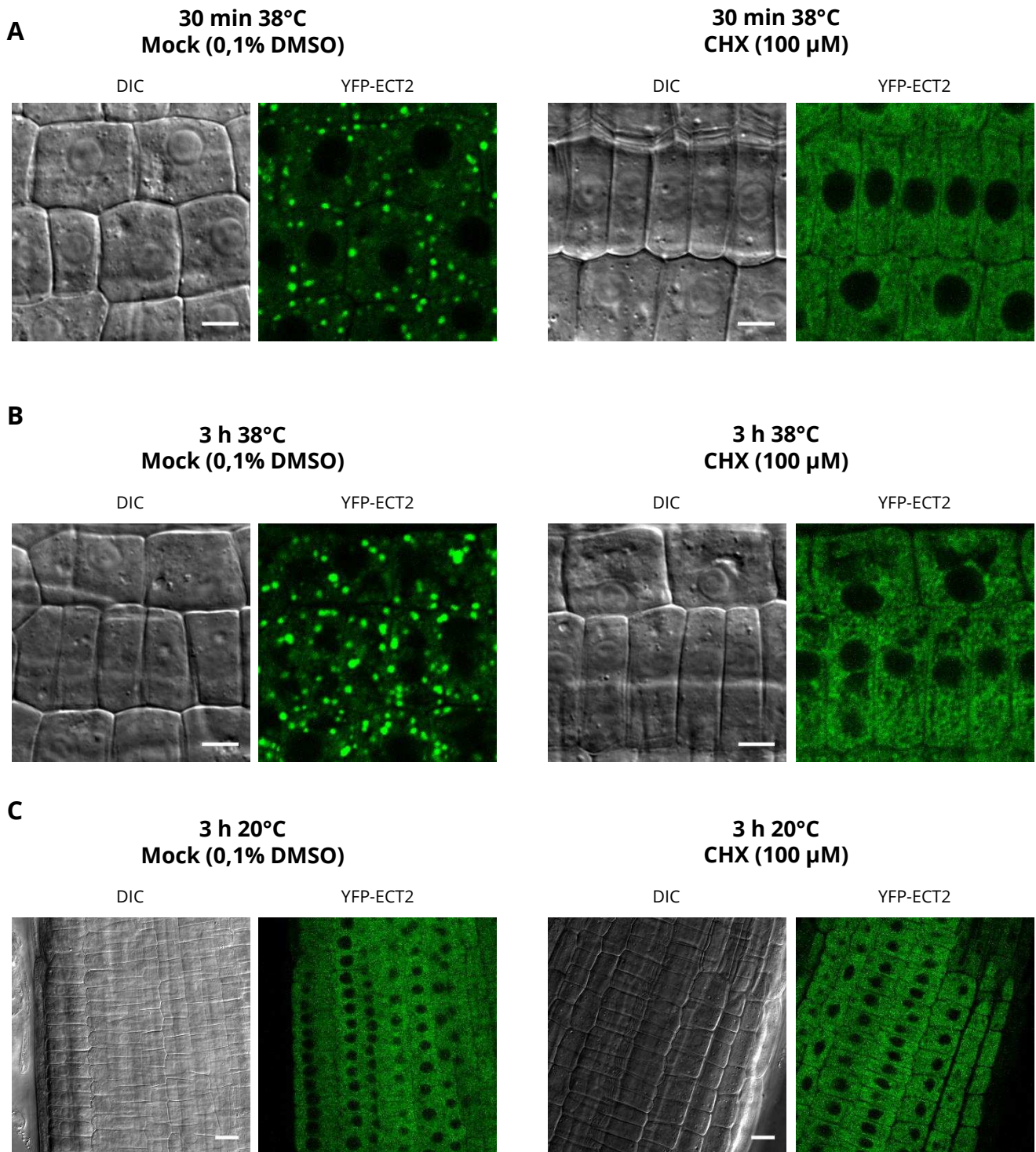
Dans cette hypothèse, le profil d'ECT2 a été étudié en condition normale mais dans des plantes soumises ou non au traitement chimique bloquant la traduction. Dans les plantes non traitées, ECT2 est surtout présente dans la forme A qui affiche une abondance relativement constante voire croissante dans une fenêtre de temps de 6 h (Figure 40-D, panneau supérieur). À l'inverse lorsque la traduction est bloquée, le profil est relativement différent. En effet, la forme A d'ECT2 n'est pas uniquement détectée et les formes phosphorylées B et C apparaissent clairement à partir de 2 h d'exposition à la cycloheximide et sont encore visibles après 6 h d'exposition. Il est difficile d'estimer si la stabilité d'ECT2 est affectée par la phosphorylation sur cette fenêtre de temps mais ce résultat indique clairement que le blocage de la traduction est suffisant pour induire des modifications post-traductionnelles sur ECT2. Au final, ces résultats soutiennent que l'inhibition de la traduction soit de façon endogène par la réponse au stress thermique soit de façon exogène par l'action d'un traitement chimique provoque l'installation de modifications post-traductionnelles sur ECT2. Il est néanmoins intrigant de constater que les modifications finissent par disparaître après 2 h d'exposition à 38°C (Figure 40-A) alors même que la traduction est normalement toujours réduite. Ceci pourrait par exemple s'expliquer par le fait qu'une exposition à 38°C supérieure à 2 h serait une durée létale pour la plante qui enclencherait alors un mécanisme de mort cellulaire où les régulations sur ECT2 ne seraient plus maintenues.

## **V – IMPACT DE LA PHOSPHORYLATION SUR LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE D'ECT2**

Les données de littérature indiquent que la phosphorylation affecte de nombreuses étapes dans le métabolisme des protéines en régulant des aspects comme l'activité, la localisation subcellulaire, les interactions protéines-protéines, la stabilité, la structure, etc. (Humphrey et al., 2015). En accord avec ceci, plusieurs paramètres d'ECT2 sont affectés au cours d'un stress thermique où elle est majoritairement phosphorylée. Tout d'abord, la protéine est majoritairement agrégée dans les granules de stress. De plus, le nombre de partenaires potentiels d'ECT2 est revu à la baisse avec le stress. Finalement, aucun ARNm méthylé n'est retrouvé en association avec la protéine en situation de stress thermique. La question se pose alors si la phosphorylation pourrait être un moyen de réguler l'ensemble de ces paramètres.

Plusieurs travaux démontrent que des modifications post-traductionnelles facilitent ou sont nécessaires pour l'agrégation de certains facteurs caractéristiques dans les granules de stress ou les p-bodies (Ohn and Anderson, 2010). C'est notamment le cas de la phosphorylation avec le





**Figure 41 : La phosphorylation n'enclenche pas directement la formation des agrégats cytoplasmiques d'ECT2**  
Observation par microscopie confocale de la localisation subcellulaire de la protéine YFP-ECT2 dans des pointes de racines de 7 jours issues de plantes transgéniques proECT2:YFP-ECT2 #17. Les observations ont été menées sur des plantes soumises à un traitement témoin (Mock, 0,1% DMSO) ou un traitement à la cycloheximide (CHX, 100  $\mu$ M) et incubées 30 min à 38°C (**A**), 3 h à 38°C (**B**) ou 3 h à 20°C (**C**). Barre d'échelle : 5  $\mu$ m en A et B, 10  $\mu$ m en C.

facteur DCP2 chez la levure qui est requise pour sa localisation dans les granules de stress (Yoon et al., 2010) ou encore du facteur Tudor-SN chez l'homme pour qui la phosphorylation facilite le recrutement dans les granules de stress (Su et al., 2017). Dans cette optique, j'ai cherché à savoir si la phosphorylation pourrait être responsable de l'agrégation d'ECT2 dans les granules de stress. Pour cela, la localisation subcellulaire de la protéine transgénique YFP-ECT2 a été étudiée dans différentes conditions ou temps de stress pour lesquels le profil de phosphorylation est modifié. Dans un premier temps, il a été montré qu'ECT2 est largement présente dans des formes phosphorylées après 30 min de stress à 38°C alors qu'après 3 h, la forme A redevient majoritaire (Figure 36-B). Malgré ce profil différent, la localisation de la protéine YFP-ECT2 est similaire entre ces deux temps de stress et des agrégats cytoplasmiques sont visibles après 30 min et 3 h de stress à 38°C (Figure 41-A et B, panneau de gauche). Par ailleurs, alors que le même profil de phosphorylation avait été observé entre les plantes traitées ou non à la cycloheximide, la localisation de YFP-ECT2 est pourtant différente avec le traitement puisqu'aucun granule n'est visible (Figure 41-A et B, panneau de droite). Ceci indique que la phosphorylation est indépendante de la formation des granules et qu'elle n'est pas suffisante pour enclencher la formation des agrégats en condition de stress. Finalement, il a été montré qu'un traitement prolongé à la cycloheximide en condition normale est suffisant pour induire les formes phosphorylées d'ECT2. Néanmoins, aucune différence de localisation n'est observée pour YFP-ECT2 dans des plantes exposées 3 h au traitement à la cycloheximide par rapport aux plantes non traitées (Figure 41-C). Aucun agrégat n'est visible et la protéine est majoritairement diffuse dans le cytoplasme. Cependant, dans chacun des cas, il faut rappeler que la cycloheximide bloque la formation des granules de stress puisque les ARNm en cours de traduction ne sont pas désengagés des polysomes. Dans un sens, il est donc cohérent de ne pas retrouver d'agrégats cytoplasmiques puisqu'il a été montré que leur formation est induite par le désengagement de populations d'ARNm depuis les polysomes.

En résumé, ces résultats montrent qu'ECT2 peut être phosphorylée sans être présente dans les granules de stress suggérant que la phosphorylation d'ECT2 est antérieure à la formation des granules de stress. De plus, une version non phosphorylée d'ECT2 peut toujours être présente dans les granules de stress, suggérant que la déphosphorylation d'ECT2 ne dissocie pas la protéine des granules de stress.

## Conclusions du chapitre :

Les travaux antérieurs à ce chapitre ont pu montrer qu'en condition de stress, la protéine ECT2 est relocalisée dans les granules de stress et que la majorité des partenaires protéiques d'ECT2 diminue. De même, il avait été suggéré que la capacité de liaison aux ARN méthylés peut être régulée au travers d'expériences préliminaires de colonne d'affinité à un ARN méthylé. Ce chapitre avait pour objectif d'étudier plus précisément le rôle d'ECT2 au cours du stress thermique et sa régulation. Au travers d'analyse de thermotolérance et en étudiant des données de transcriptomique, l'implication d'ECT2 dans les mécanismes de réponse au stress thermique n'est pas apparue évidente mais pourrait s'expliquer par une redondance fonctionnelle avec une ou d'autres protéines ECT. Ensuite, il a été montré que la protéine ne s'associe effectivement plus avec les ARN méthylés en situation de stress. En parallèle, il a été montré que la protéine ECT2 est dynamiquement phosphorylée en réponse au stress thermique. Bien qu'aucune kinase n'ait pu être identifiée, l'apparition des formes phosphorylées semble être liée d'une part à une perturbation de la traduction induite en condition de stress thermique ou par blocage chimique. D'autre part, dans des plantes réduites en m<sup>6</sup>A, la quantité de phosphorylation diminue sur ECT2, confortant un lien entre la fonction de lecteur de m<sup>6</sup>A d'ECT2 et sa régulation post-traductionnelle. Finalement, deux positions préférentiellement phosphorylées avec le stress ont été identifiées dont une, la tyrosine 461, est incluse dans le domaine YTH et pourrait potentiellement influencer la conformation de la poche de liaison aux résidus m<sup>6</sup>A. Cette hypothèse serait alors un paramètre totalement inédit pour une protéine à domaine YTH.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

---

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

## I – ECT2, UN LECTEUR DE m<sup>6</sup>A IMPLIQUÉ DANS LA RÉPRESSION DE LA TRADUCTION DES ARNm ?

### I.1 – La protéine ECT2 est-elle un lecteur de méthylation m<sup>6</sup>A ?

Les travaux de cette thèse avaient pour objectif de caractériser la fonction du facteur ECT2 en tant que protéine de liaison à la N<sup>6</sup>-méthyladénosine des ARNm chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Les premiers travaux ont été dédiés à confirmer sa capacité de liaison aux ARN méthylés. Par une approche *in vivo* de RIP, permettant de purifier les ARN associés à une version étiquetée d'ECT2, il a ainsi été démontré la présence de méthylation sur ces ARN. Bien que cette approche ne démontre pas une interaction directe entre le domaine YTH d'ECT2 et les résidus m<sup>6</sup>A, ceci supporte qu'ECT2 lie des ARN méthylés. En répétant l'analyse à partir d'une version d'ECT2 présentant des mutations sur les trois tryptophanes essentiels à la liaison au m<sup>6</sup>A, aucun ARN méthylé n'est détecté dans les fractions éluées. Ceci n'exclut pas que la version mutée d'ECT2 lie toujours des ARN mais démontre que l'affinité pour les ARN méthylés est grandement réduite. Au vu de l'importance de ces trois tryptophanes dans la reconnaissance des résidus m<sup>6</sup>A pour les protéines à domaine YTH des animaux et des levures (Luo and Tong, 2014; Xu et al., 2015; Zhu et al., 2014), ce résultat supporte ECT2 comme un lecteur de méthylation chez la plante avec un mode d'interaction conservé pour les ARN méthylés. De même, l'observation que l'expression de la version mutée d'ECT2 pour les trois tryptophanes dans une plante déficiente pour ECT2 (ECT2\*\*\* dans *ect2-2*) ne peut restaurer un phénotype trichome sauvage, alors que l'expression d'une protéine ECT2 non-mutée le permet, supporte l'hypothèse qu'ECT2 est bien un lecteur de m<sup>6</sup>A *in vivo*. Néanmoins, ces résultats ne permettent pas d'affirmer qu'ECT2 lie uniquement des résidus m<sup>6</sup>A d'ARNm puisque des extraits d'ARN totaux ont été utilisés pour les expériences de RIP. Une partie des cibles d'ECT2 pourrait donc concerner des ARN non codants comme le démontre les données chez les mammifères pour les YTHDF et YTHDC (Patil et al., 2016).

Pour compléter ces résultats par une autre approche, des analyses *in vitro* ont été initiées dans l'équipe visant à étudier l'association entre le domaine YTH recombinant d'ECT2 et des ARN synthétiques porteurs ou non de résidus m<sup>6</sup>A. Grâce à des expériences de gel retard, l'objectif sera de déterminer la différence d'affinité du domaine YTH pour les deux types de cibles. De même, les

expériences seront répétées à partir de la version mutée du domaine YTH pour confirmer l'implication des trois résidus tryptophanes pour l'interaction directe avec la cible méthylée.

## **1.2 – Les partenaires protéiques d'ECT2 sont majoritairement différents de ceux des protéines YTHDF de mammifères**

Une approche de protéomique quantitative a permis d'identifier 83 facteurs interagissant avec ECT2 en condition normale. En faisant un lien avec les données concernant les partenaires des protéines YTHDF1 et 3, une différence conséquente dans les fonctions des partenaires est apparue. Il a été montré que YTHDF1 agit comme stimulateur de traduction en interagissant avec de nombreuses protéines ribosomales et de facteurs d'initiation de traduction (Wang et al., 2015). De même, YTHDF3 est proposée pour agir en coopération avec YTHDF1 pour stimuler la traduction et partage ainsi de nombreux partenaires communs de cette voie d'initiation (Shi et al., 2017). En revanche, aucune protéine ribosomale ni aucun facteur d'initiation (hormis eIF4G) n'ont été identifiés comme partenaire potentiel d'ECT2. À l'opposé, plusieurs partenaires d'ECT2 : DCP5, LARP1, PAT1, DHH1 ou encore les facteurs APUM (pumilio) sont démontrés comme inhibiteurs de traduction chez les orthologues de mammifères (Goldstrohm et al., 2006; Nissan et al., 2010; Hong et al., 2017) ou chez *Arabidopsis* pour certains, incluant également ZNF1 (Paik et al., 2012; Xu & Chua, 2009). Hormis LARP1, aucun de ces facteurs n'est retrouvé en association avec YTHDF1 et 3, soutenant que le rôle d'ECT2 dans le contrôle de la traduction des ARNm méthylés est différent. De ce fait, ces résultats proposent ECT2 comme un répresseur de traduction, une fonction qui pour le moment n'a été documentée pour aucun lecteur de méthylation chez les eucaryotes. Concernant YTHDF2 qui est impliquée dans la déstabilisation des transcrits méthylés, ses partenaires n'ont pas été définis dans l'ensemble mais elle interagit au moins avec NOT1, un composant du complexe de déadénylation (Du et al., 2016). Malgré le fait que plusieurs partenaires d'ECT2 ont une action négative sur la stabilité des transcrits, aucun facteur du complexe CCR4/POP2/NOT n'est retrouvé ce qui ne rapproche pas directement ECT2 du mécanisme d'action de YTHDF2. De plus, au niveau de la localisation subcellulaire YTHDF2 s'accumule dans les p-bodies (Wang et al., 2014b) alors qu'aucune évidence ne montre une localisation similaire pour ECT2 en condition normale. Actuellement, il reste encore difficile de rapprocher la fonction d'ECT2 de celle de YTHDF2.

Comment pourrait-on expliquer cette différence d'action par rapport aux YTHDF de mammifères ? De façon récurrente, il a été montré que c'est surtout la partie N-terminale des YTHDF qui contribue aux rôles de ces protéines dans la stimulation de la dégradation ou de la

traduction puisqu'elle constitue la zone d'interaction avec leurs partenaires (Du et al., 2016; Shi et al., 2017; Wang et al., 2015). La partie C-terminale contenant le domaine YTH est proposée comme un simple module de reconnaissance de la méthylation permettant la sélection des cibles méthylées. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que les divergences entre les parties N-terminales d'ECT2 et des YTHDF ont pu contribuer à modifier le répertoire de leurs partenaires protéiques et ainsi leurs fonctions de lecteur.

La présence conservée de LARP1 comme partenaire des protéines YTHDF1 et 3 reste tout de même intrigante. Néanmoins, contrairement à la situation pour ECT2, le facteur LARP1 n'apparaît pas parmi les partenaires les plus enrichis avec YTHDF1 et 3 puisqu'un faible nombre de peptides y a été identifié (Shi et al., 2017; Wang et al., 2015). De plus, chez les mammifères LARP1 joue un rôle différent sur le contrôle de la traduction en fonction de son état de phosphorylation (Hong et al., 2017). Même si la version phosphorylée qui joue le rôle de stimulateur de traduction est la plus abondante en condition normale, il n'est pas connu avec quelle(s) forme(s) interagissent les YTHDF. On peut très bien imaginer que les YTHDF liées sur la méthylation des transcrits en région 3'-UTR puissent recruter la forme phosphorylée de LARP1, agissant indirectement comme stimulateur de traduction en favorisant le recrutement et l'activité de mTORC1 sur 4E-BP. Cette interaction pourrait donc également contribuer au rôle de stimulateur de traduction de YTHDF1 et 3. À l'inverse, dans le cas où les YTHDF recruteraient une forme non phosphorylée de LARP1 agissant comme répresseur de traduction, on peut supposer un moyen pour réguler subtilement l'activité stimulatrice des YTHDF1 et 3. Finalement, une troisième hypothèse pourrait concerner une association LARP1-YTHDF sur des transcrits non dépendants de la phosphorylation de LARP1. En effet, une population de cibles est liée par LARP1 indépendamment de son état de phosphorylation mais l'impact de cette association sur le contrôle de la traduction des ARNm n'est pas documenté (Hong et al., 2017).

### **1.3 – Le rôle d'ECT2 comme répresseur de traduction par une coopération avec LARP1 et DCP5**

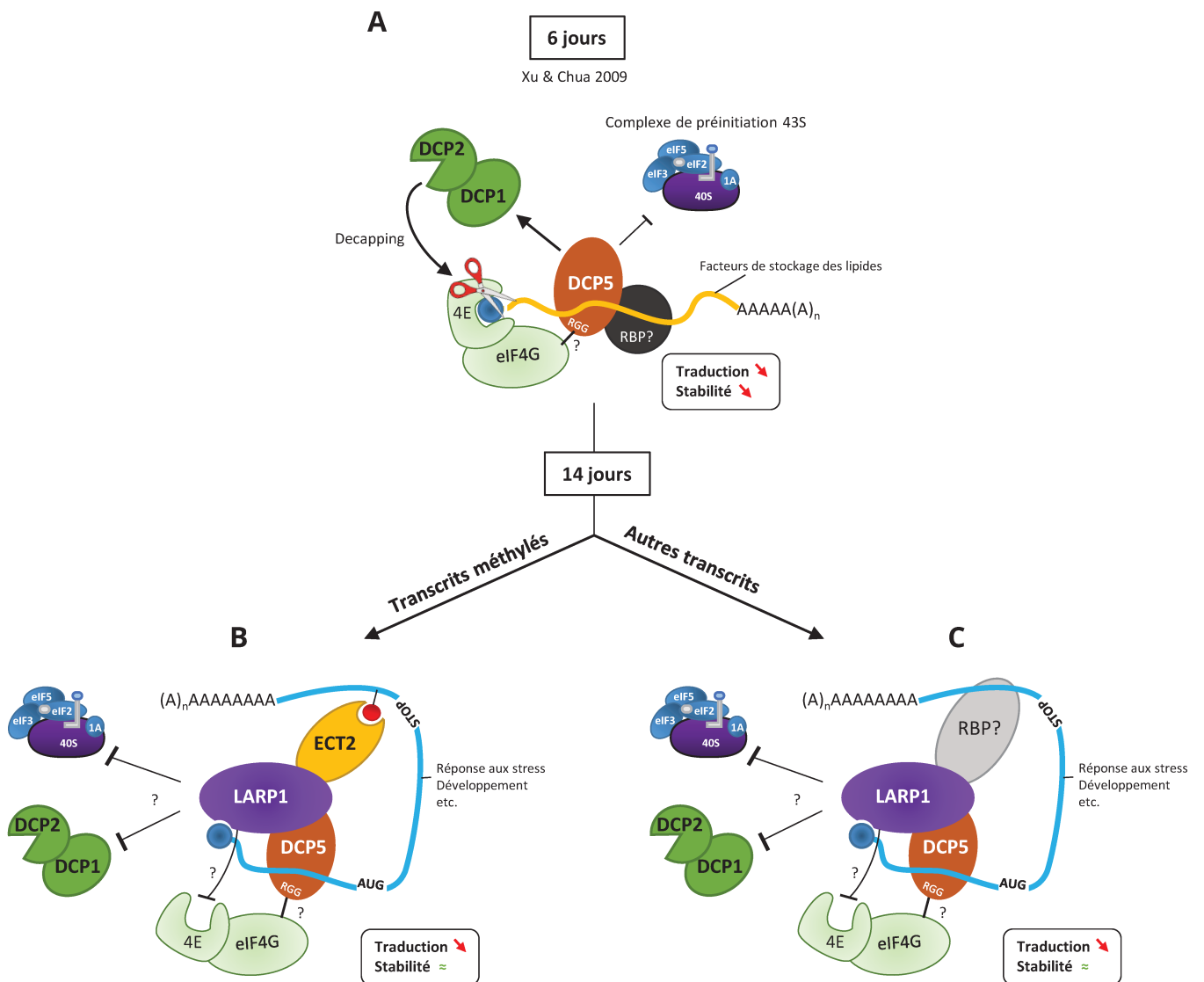
Les travaux menés sur les lecteurs de méthylation des mammifères démontrent qu'ils exercent leur fonction sur les ARNm méthylés *via* le recrutement de facteurs effecteurs (Wang et al., 2015; Shi et al., 2017; Xiao et al., 2016). Ainsi, dans un modèle où la protéine ECT2 agirait comme un répresseur de traduction, cela suppose que cette fonction est établie par les facteurs qu'elle recrute sur les transcrits méthylés. Pour étudier cette question, un lien a été plus amplement développé avec les facteurs LARP1 et DCP5, deux acteurs connus pour leur rôle

évolutivement conservé dans le contrôle de la traduction (Hong et al., 2017; Rajyaguru et al., 2012; Xu and Chua, 2009). Il a ainsi été découvert que l'interaction entre LARP1 et ECT2 ainsi que celle entre LARP1 et DCP5 est indépendante de la présence d'ARN, supposant dans les deux cas une interaction directe. Pour les mêmes conditions expérimentales, aucune interaction n'a été retrouvée entre ECT2 et DCP5 témoignant que si cette interaction existe, elle est plus faible que les deux autres ou que LARP1 pourrait agir comme intermédiaire dans l'interaction entre ECT2 et DCP5.

Au niveau physiologique, les phénotypes de croissance observés dans les plantes mutantes *larp1-1/dcp5-1* suggèrent une fonction essentielle pour LARP1 et DCP5 supposant qu'elles régulent une population de transcrits clés pour le développement. L'absence supplémentaire d'ECT2 aggrave encore les défauts développementaux ce qui supporte le lien entre ECT2, LARP1 et DCP5 et laisse supposer qu'une autre population de transcrits est régulée par les trois facteurs. En ce sens, une analyse de translatomique à partir des mutants simples a permis d'identifier des cibles potentielles dont la traduction serait inhibée par les trois facteurs. Pour faire le lien avec les phénotypes, deux populations différentes ont été mises en avant : 258 transcrits dont l'engagement traductionnel est affecté de façon similaire par ECT2, LARP1 et DCP5 et 273 autres dont la traduction est affectée par LARP1 et DCP5 indépendamment d'ECT2. À noter que très peu de transcrits sont spécifiquement affectés dans *dcp5-1* et *ect2-2* sans l'être dans le mutant *larp1-1*, ce qui supporte que lorsqu'ECT2 agit avec DCP5, LARP1 est aussi majoritairement impliquée et soutient sa présence comme intermédiaire de l'interaction ECT2-DCP5. Dans chacun des cas, il apparaît que les transcrits affectés codent majoritairement des facteurs du développement, pouvant contribuer à expliquer le phénotype développemental des plantes mutantes. De même, de nombreux transcrits affectés codent des facteurs de réponses aux stimuli et d'autres stress abiotiques pouvant supporter une implication coopérative des trois facteurs dans les voies de réponses aux stress.

En supposant un rôle d'inhibiteur de traduction pour ECT2, LARP1 et DCP5, comment agiraient-ils ? Un modèle général dans la répression de la traduction propose l'intervention de plusieurs facteurs pour configurer les transcrits réprimés en « boucle fermée » ne permettant pas l'assemblage du complexe de pré-initiation (Jackson et al., 2010). Classiquement, un premier facteur se lie en extrémité 3'UTR grâce à la présence de motifs particuliers et d'autres facteurs agissent comme intermédiaires pour un faire un lien avec le complexe de coiffe et inhiber l'initiation. Il est donc proposé que la sélectivité des transcrits s'opère principalement par le





**Figure 42 : Modèles d'inhibition de traduction impliquant DCP5, LARP1 et DCP5 ou ECT2, LARP1 et DCP5**

**(A)** Mode d'action de DCP5 dans le contrôle de la traduction et de la stabilité des ARNm. Au cours du développement post-embryonnaire, DCP5 agit comme répresseur de traduction et déstabilise ses cibles *via* une interaction avec DCP1 qui agit avec DCP2 pour cliver la coiffe (Xu & Chua, 2009). Puisque DCP5 ne semble pas cibler une séquence particulière, cela peut supposer l'intervention d'autres RBP en interaction avec DCP5 pour agir sur la sélection des cibles. **(B)** À 14 jours, dans un modèle impliquant ECT2, LARP1 et DCP5, les transcrits méthylés seraient liés par ECT2 qui recruterait le complexe LARP1-DCP5 par une interaction directe avec LARP1. La présence de motifs RGG dans la séquence de DCP5 laisse supposer une interaction avec eIF4G pour bloquer la traduction. De même, par homologie avec l'orthologue des mammifères, on peut supposer que LARP1 puisse se fixer sur la coiffe de certains transcrits présentant un C+1 en agissant en compétition avec eIF4E. Une fois fixée sur la coiffe, LARP1 inhiberait alors le recrutement de DCP1/DCP2 pour stabiliser le transcrit réprimé, expliquant qu'aucune interaction DCP5-DCP1 n'a été détectée à 14 jours (Chapitre III de ce manuscrit). **(C)** Dans un modèle impliquant LARP1 et DCP5 sans ECT2, on peut imaginer un mode d'action similaire faisant intervenir un autre facteur lié en 3'UTR sur des transcrits et interagissant avec LARP1 et/ou DCP5 pour cibler d'autres transcrits spécifiques non méthylés. Au vu des données de translatomique, on peut également supposer une voie d'action pour DCP5 ne faisant pas intervenir LARP1 mais dont les acteurs restent encore inconnus.

facteur lié en 3'UTR alors que les autres facteurs servent plutôt de médiateurs avec l'extrémité 5' et la coiffe. Plusieurs exemples de ce cas de figure ont ainsi été démontrés pour des transcrits chez la drosophile (Nakamura et al., 2004; Chekulaeva et al., 2006; Nelson et al., 2004) et le xénope (Stebbins-Boaz et al., 1999). Chez la mouche par exemple, le facteur BRUNO qui lie la région 3'UTR du transcrit *oskar* interagit avec la protéine CUP qui elle-même lie eIF4E pour inhiber l'assemblage du complexe de coiffe (Nakamura et al., 2004). Plus récemment, il a été proposé que les protéines à motifs RGG agissent dans un modèle similaire où elles servent comme facteurs de liaison à eIF4G, grâce aux motifs RGG, pour bloquer l'assemblage du complexe de pré-initiation (Rajyaguru et al., 2012). Chez la levure, plusieurs de ces protéines ont ainsi été démontrées comme inhibiteurs de traduction dont le facteur Sbp1, Npl3 et Scd6, l'orthologue de DCP5. Ce mode d'action implique un mécanisme où l'inhibition de la traduction interviendrait sur des ARNm déjà liés par le complexe de coiffe. Selon Rajyaguru et al. (2012), ce genre de mécanisme répressif présente l'avantage d'inhiber la traduction sans affecter directement la stabilité puisque la présence du complexe eIF4F protège de l'activité des enzymes de decapping. Néanmoins, chez la plante, DCP5 est un répresseur de traduction qui agit également dans la déstabilisation de ses cibles en favorisant leur decapping *via* une interaction avec DCP1 (Xu & Chua, 2009). Les quantités de protéines DCP1 et DCP5 diminuent immédiatement après la germination et jusqu'à l'apparition de la première paire de feuille supposant un rôle plus important au cours du développement embryonnaire et de façon précoce au niveau post-embryonnaire. DCP5 a été montrée essentielle dans la répression et la dégradation de certains transcrits codant des facteurs de stockage des lipides incluant *OLEO1* et *OLEO2* qui sont majoritairement exprimés au cours du développement post-embryonnaire précoce (6 jours). Le mécanisme d'action de DCP5 dans la déstabilisation des transcrits s'explique par son interaction avec DCP1 mais son action en tant que répresseur de traduction n'est pas documentée. Néanmoins, la présence de motifs RGG en extrémité C-terminale de sa séquence protéique suggère un mécanisme conservé en ciblant eIF4G. Par ailleurs, bien que les transcrits cibles de DCP5 à 6 jours codent pour des fonctions similaires, aucune séquence ou motif particulier n'a été identifié supposant l'intervention d'autres RBP pour faciliter l'ancrage de DCP5 sur ses cibles. Ces données illustrent ainsi un modèle où dans les étapes du développement post-embryonnaire précoce, DCP5 agirait en coopération avec des RBP particulières sur un sous-ensemble d'ARNm conduisant au blocage de leur traduction en interagissant avec eIF4G et à leur déstabilisation en interagissant avec DCP1 (Figure 42-A). Les résultats du chapitre III ont montré que l'interaction entre DCP5 et DCP1 n'est plus détectée dans des plantes de 14 jours à l'inverse d'un stade 6 jours. En accord avec cette observation, cela

pourrait suggérer qu'à un stade de développement plus tardif, DCP5 n'aurait plus la capacité de déstabiliser ses transcrits cibles en perdant l'interaction avec DCP1 mais pourrait toujours réprimer leur traduction. Par ailleurs, puisque les facteurs de stockage des lipides ne sont majoritairement plus exprimés à ce stade de développement, cela suppose également que DCP5 agit sur d'autres cibles.

En me basant sur ces observations, j'envisage alors deux mécanismes pour expliquer le rôle de répression établi par LARP1 et DCP5 de façon dépendante ou indépendante d'ECT2 dans un stade de développement tardif (>14 jours). Dans un premier cas, une coopération entre les trois facteurs serait nécessaire pour une action principale sur des ARNm méthylés (Figure 42-B). C'est donc ECT2 qui, une fois fixée sur les ARNm méthylés, pourrait recruter les complexes LARP1-DCP5 *via* une interaction directe avec LARP1. Dans ce modèle, ECT2 assurerait donc en partie la sélectivité des cibles par son rôle de lecteur de méthylation. DCP5 et LARP1 auraient une action double sur l'extrémité 5' et/ou le complexe de coiffe pour empêcher le recrutement du complexe de pré-initiation tout en stabilisant le transcrit réprimé. Chez les végétaux, le mode d'interaction de LARP1 avec les ARNm est peu connu mais on peut émettre l'hypothèse d'un mécanisme conservé avec l'orthologue des mammifères, c'est-à-dire une interaction sur la coiffe de certains transcrits présentant un résidu C en +1. C'est en effet sur ces coiffes que, chez les mammifères, LARP1 peut se lier *via* le motif DM15 pour y déplacer eIF4E et inhiber la traduction (Lahr et al., 2017). Hormis la coiffe et le résidu C en +1, ces travaux montrent qu'il n'y pas de préférence pour les nucléotides suivants ce qui suggère que les séquences 5'TOP ne serait pas un déterminant pour la liaison du motif DM15. Ainsi, la préférence de substrat de LARP1 pour les coiffes présentant un C en +1 n'est probablement pas exclusif aux ARNm 5'TOP. Chez les plantes, il n'est pas documenté si l'action de LARP1 est dépendante de la voie TOR et d'après les résultats de translatomique il n'y a pas d'enrichissement significatif des transcrits codant la machinerie de traduction parmi les cibles potentiellement réprimés en traduction par LARP1. Avec cette observation, le modèle développé ici est que chez la plante, LARP1 pourrait avoir un rôle de répresseur de traduction en se fixant sur les coiffes avec un C en +1 et bloquer la liaison d'eIF4E. Pour rejoindre cette hypothèse, des données préliminaires issues d'une collaboration ont montré par une analyse *in vitro* que le motif DM15 de LARP1 de plante est capable de lier la coiffe avec une préférence pour un C en +1 sans être influencé par les séquences suivantes (Dr. Conte M.R., King's College London, données non publiées). Dans la mesure où LARP1 pourrait lier la coiffe, cette interaction pourrait stabiliser le transcrit réprimé en inhibant par exemple l'interaction entre DCP5 et DCP1 pour empêcher la suppression de la coiffe.

Finalement, sans ECT2, on peut très bien imaginer un mécanisme similaire faisant intervenir une autre RBP qui reconnaîtrait un motif particulier en 3'UTR et pourrait recruter les complexes LARP1-DCP5 pour inhiber l'initiation de traduction d'autres transcrits (Figure 42-C). Au final, les deux systèmes permettraient de réguler le flux traductionnel de certains transcrits en contrôlant leur engagement traductionnel *via* LARP1/DCP5 ou ECT2/LARP1/DCP5. Puisque les trois semblent réguler des transcrits codant des facteurs du développement ou de la réponse aux stress, cela suppose qu'en condition basale les transcrits sont majoritairement réprimés mais lors de certaines conditions (croissance, variations environnementales), on peut imaginer que l'activité d'ECT2 et/ou LARP1 et/ou DCP5 pourrait être régulée. Un tel mécanisme diminuerait alors la répression de ces transcrits spécifiques pour permettre leur traduction lors de certaines conditions. Ce modèle coopératif pourrait cependant être différent dans le trichome puisque les observations des branches montrent que les lignées *dcp5-1* ont un phénotype opposé à celui des mutants *ect2*. Le modèle d'action en trichome sera discuté dans la partie III de la discussion. De même, au vu des données de translatic, on peut supposer également que DCP5 cible certains groupes de transcrits sans LARP1 et pourrait donc faire appel à d'autres RBP.

#### **1.4 – Perspectives**

Pour consolider le modèle d'action faisant intervenir ECT2, LARP1 et DCP5 pour réprimer la traduction des transcrits méthylés, plusieurs points restent à être étudiés. Le premier sera de déterminer si LARP1 est effectivement un intermédiaire à l'interaction entre ECT2 et DCP5. Pour tester cette hypothèse, des expériences de co-immunoprécipitation pourront être menées à partir de différentes combinaisons de lignées mutantes et transgéniques permettant de tester l'interaction entre deux facteurs en l'absence du troisième. Ainsi, dans des plantes mutées pour LARP1 et exprimant une version étiquetée de DCP5, une interaction entre ECT2 et DCP5 ne devrait pas être retrouvée si LARP1 agit comme intermédiaire. À l'inverse il faudrait démontrer que l'interaction ECT2-LARP1 est détectable en l'absence de DCP5 tout comme l'interaction entre LARP1-DCP5 en l'absence d'ECT2.

Par la suite, l'étape indispensable sera de définir le rôle des trois facteurs sur la traduction et démontrer leur coopération dans la répression et la stabilisation des transcrits méthylés. Dans cette optique, la première étape sera déjà de confirmer les résultats de translatic à partir d'expériences de PCR quantitative sur les mutants respectifs pour ECT2, LARP1 et DCP5 afin de démontrer la sur-accumulation dans les polysomes de transcrits cibles des trois facteurs à la fois. De même, l'expérience pourra être menée à partir du triple mutant *ect2-1/larp1-1/dcp5-1* pour

déterminer si l'effet est plus fort en l'absence des trois facteurs. D'autre part, un système de traduction *in vitro* préparé à partir d'extraits de germe de blé pourrait être envisageable pour mesurer l'effet de ces facteurs sur la traduction. Ces extraits contiennent les composants nécessaires pour la synthèse de protéines (ARNt, ribosomes, facteurs d'initiation, élongation et traduction) et sont couramment utilisés pour tester l'impact de facteurs d'intérêt sur le contrôle de la traduction. C'est notamment par ce système que DCP5 a pu être montrée comme un répresseur de la traduction des transcrits *OLEO1* et *OLEO2* (Xu & Chua, 2009). Avec ce système, l'objectif serait de tester différentes combinaisons en apportant ECT2 et/ou LARP1 et/ou DCP5 produits par système recombinant pour déterminer leur impact respectif sur la synthèse de protéines. Néanmoins, cette approche présente deux inconvénients. Le premier est qu'elle nécessite la production des protéines ECT2, LARP1 et DCP5 par un système recombinant qui reste une tâche difficile selon certaines protéines. Le deuxième est qu'elle implique la synthèse de plusieurs transcrits cibles des trois facteurs qui devront être méthylés selon l'hypothèse qu'ECT2 exerce son rôle répresseur de traduction en recrutant les complexes LARP1-DCP5 sur les transcrits méthylés. Or, il n'est pas possible de diriger la méthylation d'un transcrit produit par transcription *in vitro*, ce qui nécessiterait une synthèse complète du transcrit de façon artificielle avec des résidus m<sup>6</sup>A et donc très coûteuse.

Une alternative serait d'envisager une expérience de « tethering » c'est-à-dire de forcer la fixation d'ECT2 sur un transcrit rapporteur et mesurer la quantité produite de la protéine associée au transcrit. C'est notamment par cette approche que les rôles de YTHDF1 comme stimulateur de traduction et de YTHDF2 comme stimulateur de la dégradation ont pu être illustrés (Wang et al., 2014b, 2015). L'idée est d'utiliser un transcrit rapporteur codant une protéine quantifiable (luciférase par exemple) et qui porte des séquences d'affinité (BoxB ou MS2-binding sites) pour une étiquette fusionnée à ECT2 ( $\lambda$  ou MS2). Dans cette optique, la fixation d'ECT2 sur le transcrit est induite même s'il ne constitue pas une cible naturelle. Puisqu'il a été montré que les protéines à domaine YTH exercent principalement leur rôle de régulation *via* leur partie N-terminale, des versions tronquées d'ECT2 possédant uniquement la partie N-terminale ou C-terminale avec le domaine YTH pourraient être utilisées. Finalement, dans l'hypothèse où ECT2 recrute LARP1 et DCP5 pour réprimer la traduction, ces approches pourront être réalisées dans des mutants *larp1-1*, *dcp5-1* ou *larp1-1/dcp5-1* afin de démontrer l'intervention de ces protéines dans le mécanisme d'action d'ECT2. On peut s'attendre à avoir un effet mineur en l'absence de DCP5, LARP1 ou des deux si ECT2 régule effectivement la traduction par le biais de ces partenaires. De même, l'association de LARP1 et/ou DCP5 sur ce transcrit pourrait être mesurée par RIP en l'absence

d'ECT2 pour démontrer qu'ECT2 est nécessaire au recrutement des complexes LARP1-DCP5. Ensuite, pour démontrer le mode d'action de LARP1 et DCP5, les expériences pourraient être répétées avec des plantes exprimant de versions tronquées de ces deux facteurs. Concernant LARP1, l'hypothèse est qu'elle pourrait lier la coiffe des transcrits présentant un C en +1 et c'est au moins *via* le domaine DM15 que cette interaction s'opère chez les mammifères. Dans cette optique, une version tronquée de LARP1 sans motif DM15 pourrait être utilisée et ces plantes transgéniques sont actuellement en construction. Concernant DCP5, après avoir testé son interaction avec eIF4G, une version sans motifs RGG pourrait être utilisée sur le même principe pour démontrer l'importance de ces motifs dans cette interaction et le pouvoir répresseur de DCP5.

Par ailleurs, dans le modèle développé l'hypothèse est que LARP1 pourrait stabiliser les transcrits en inhibant le decapping. Puisque l'interaction DCP5-DCP1 diminue à 14 jours on peut se demander si LARP1 pourrait intervenir ici en bloquant cette interaction. Pour déterminer ce point, l'interaction entre DCP5 et DCP1 pourrait être testée dans un mutant *larp1-1* à 14 jours. Si LARP1 joue un rôle négatif pour cette interaction, on devrait alors maintenir les complexes DCP5-DCP1 à 14 jours. Dans ce contexte, on peut alors émettre l'hypothèse que les cibles de DCP5 seraient traductionnellement réprimées mais également encore déstabilisées puisque LARP1 n'inhiberait plus le decapping. Des analyses de la quantité à l'équilibre de cibles communes entre DCP5 et LARP1 pourront donc être effectuées par PCR quantitative pour étudier cette hypothèse en comparant leur évolution dans un mutant *larp1-1* par rapport aux plantes sauvages. Dans la même idée, l'interaction entre LARP1 et DCP5 pourra être testée dans des plantes Col0 à 6 jours pour déterminer si l'affinité entre les deux facteurs pourrait être modifiée au cours du développement. Les résultats du chapitre III ont néanmoins démontré l'existence de complexe ECT2-DCP5 à 6 jours laissant supposer que l'interaction LARP1-DCP5 existe également à ce stade si LARP1 agit effectivement comme intermédiaire entre ECT2 et DCP5. Cela pourrait suggérer qu'au moins dans le développement post-embryonnaire précoce, LARP1 n'aurait pas un impact majeur sur l'interaction DCP5-DCP1 ce qui reste tout de même à être démontré expérimentalement. Cependant, cela n'exclut pas qu'à 6 jours l'interaction ECT2-DCP5 soit différente et ne nécessite pas LARP1. Au cours du développement post-embryonnaire, ECT2 pourrait par exemple participer au ciblage des transcrits méthylés en interagissant avec DCP5 pour faciliter leur dégradation. Dans un stade plus tardif, LARP1 se placerait alors comme intermédiaire entre DCP5-ECT2 pour bloquer le mécanisme de dégradation et stabiliser les transcrits réprimés. Pour tester cette hypothèse, cela implique de mieux caractériser les interactions entre ECT2, LARP1 et DCP5 à 6 jours. De même, les

expériences de tethering détaillées précédemment pourront être répétées dans un stade post-embryonnaire précoce pour déterminer l'effet des trois facteurs sur la traduction et la stabilité d'un transcrit rapporteur.

Par la suite, les cibles directes d'ECT2, LARP1 et DCP5 devront être définies dans leur ensemble par une approche de RIP-seq. Dans l'hypothèse où l'action des trois facteurs pourrait être différente en fonction du stade développemental, les cibles pourront être définies dans un stade post-embryonnaire précoce (6 jours) mais également dans un stade plus tardif (14 – 17 jours). Bien que des données aient été générées par RNA-seq sur des plantes de 17 jours pour l'impact de chacun de ces facteurs sur le transcriptome et le translatome, les transcrits affectés pourraient être une conséquence indirecte d'une dérégulation liée à l'absence de ces protéines. L'analyse de RIP-seq permettrait donc d'identifier uniquement les cibles liées par ECT2, LARP1 et DCP5 et ainsi distinguer les populations de transcrits communes entre chacun de ces facteurs. Dans l'hypothèse où ECT2 permettrait principalement le ciblage des transcrits méthylés, il serait nécessaire d'identifier à l'échelle du transcriptome les ARNm porteurs de m<sup>6</sup>A par une approche de m<sup>6</sup>A-seq. En ce sens, des travaux menés dans l'équipe visent à établir le profil de méthylation chez *Arabidopsis thaliana* (Berlivet et al, données non publiées). Une fois établies, ces données pourront donc être comparées aux transcrits définis comme cibles d'ECT2, LARP1 et DCP5 pour y distinguer les ARNm méthylés. Dans l'hypothèse où ECT2 serait nécessaire pour adresser LARP1 et DCP5 sur les ARNm méthylés, des analyses de PCR quantitative pourront être répétées à partir de plantes mutantes *ect2-2* exprimant une version mutée d'ECT2 dans le domaine YTH (ECT2-YTH<sup>\*\*\*</sup>) pour mesurer la quantité à l'équilibre dans les polysomes des cibles des trois facteurs identifiées comme méthylées. Sans le ciblage par ECT2, l'engagement traductionnel de ces transcrits devrait alors être favorisé.

## II – QUEL EST LE RÔLE DE LA PHOSPHORYLATION D'ECT2 ?

En dehors des conditions basales, la fonction des lecteurs de méthylation est très peu documentée en situation de stress abiotiques. Seuls des travaux ont été menés sur YTHDF2 en réponse au stress thermique (Zhou et al., 2015) et ont montré que sa localisation subcellulaire est reprogrammée en passant du cytoplasme vers le noyau en réponse au stress. Alors que YTHDF2 est surtout impliquée dans la déstabilisation des transcrits méthylés en condition normale, en situation de stress les données recueillies supportent que dans le noyau YTHDF2 protège les ARNm méthylés en 5'UTR de l'action déméthylase de FTO. Concernant ECT2, les premiers résultats de

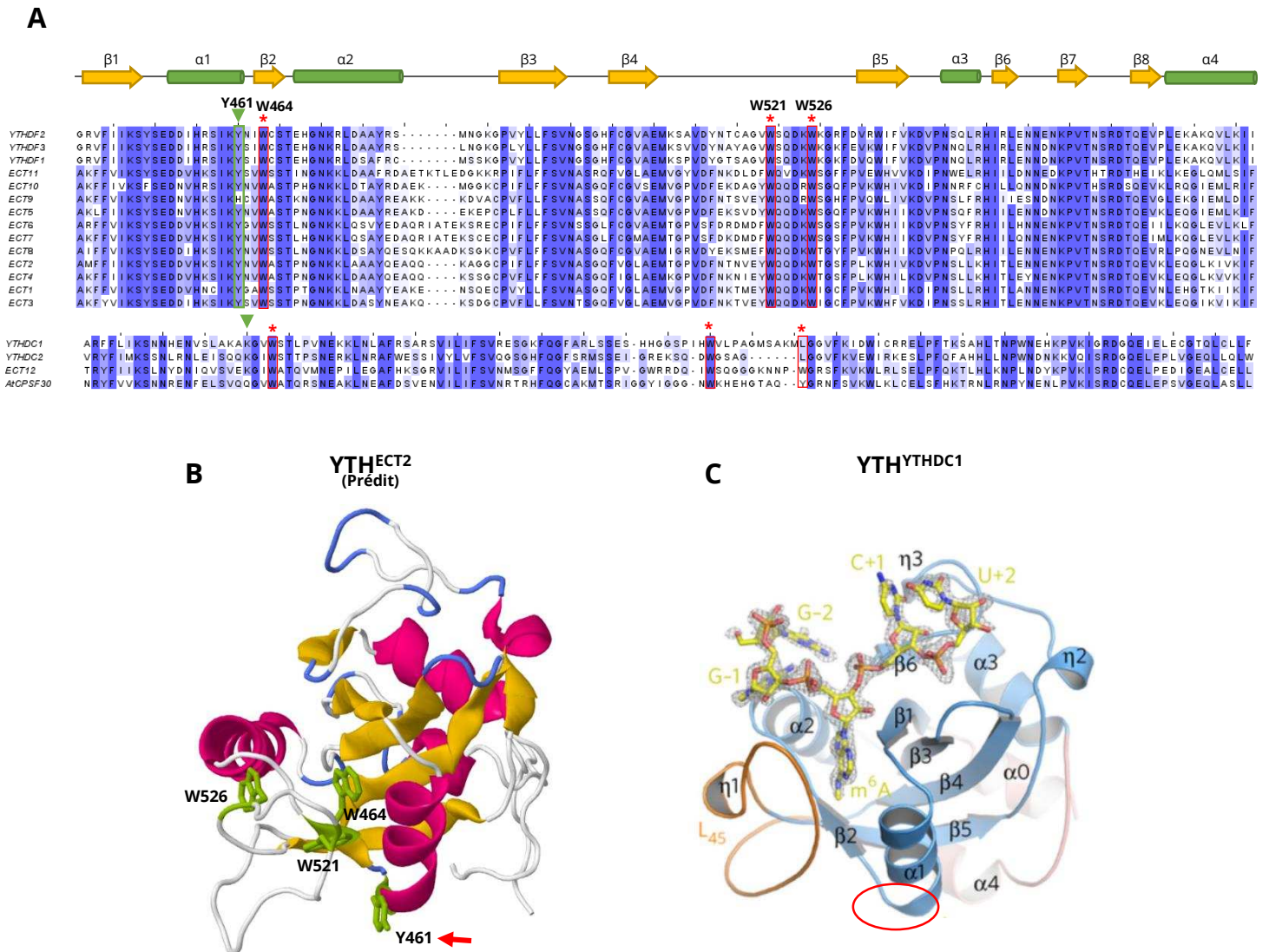
colonne d'affinité pour un ARNm méthylé ont suggéré qu'elle s'associe moins à une cible méthylée lors d'un stress thermique. En plus du fait qu'ECT2 interagit avec LARP1, un acteur impliqué dans la réponse au stress thermique chez la plante, ces données ont orienté mes travaux vers la fonction et la régulation d'ECT2 en condition de stress thermique.

## II.1 – Vers une inactivation des fonctions en situation de stress ?

### II.1.1 – Régulation de la capacité d'ECT2 à lier les ARN méthylés

Pour faire le lien avec les résultats préliminaires de colonne d'affinité à un ARN méthylé, il a été démontré par une approche de RIP qu'aucun ARN méthylé n'est retrouvé en association avec ECT2 lors d'un stress thermique. Cette observation suggère fortement que la capacité de lecteur de méthylation d'ECT2 est régulée négativement en situation de stress. Pour explorer comment une telle régulation pourrait s'opérer, il a été découvert qu'ECT2 est dynamiquement phosphorylée au cours d'un stress thermique. Deux formes phosphorylées différentes induisant un changement de migration de la protéine sur gel d'électrophorèse ont ainsi été identifiées. En recherchant les positions des phosphorésidus par spectrométrie de masse, une dizaine de sites phosphorylés a été recensée dont deux spécifiques au stress thermique : la sérine 27 et la tyrosine 461. Visiblement, la première position s'intègre dans une zone N-terminale non conservée et ne présente pas de prédiction particulière pour un quelconque motif. À l'opposé, la tyrosine 461, est quant à elle positionnée dans le domaine YTH. Plus précisément, cette position se trouve séparée par seulement 2 résidus d'un tryptophane essentiel pour la liaison à la méthylation, à savoir la position W464 (Figure 43-A). Un modèle de prédiction de la structure du domaine YTH d'ECT2 permet d'illustrer que la tyrosine 461 fait face à la poche aromatique de liaison à la méthylation, à la fin d'une structure en hélice (Figure 43-B). En se reportant à la structure publiée du domaine YTH de la protéine humaine YTHDC1 dans le même plan, cette position n'est *a priori* pas en contact direct avec l'ARN ni avec l'adénosine méthylée (Figure 43-C, cercle rouge). Les études de structures du domaine YTH chez les mammifères ont démontré que les ARNm méthylés interagissant avec la cage aromatique sont inclus dans une large surface chargée positivement (Zhu et al., 2014; Xu et al., 2014b, 2015). Bien que la tyrosine 461 ne semble pas impliquée directement dans l'interaction avec les résidus N<sup>6</sup>-méthyladénosines, l'ajout de phosphorylation, c'est-à-dire d'un groupement PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, introduit une charge négative aux alentours de la cage aromatique. La différence de migration des formes phosphorylées d'ECT2 sur gel d'électrophorèse ne peut pas s'expliquer seulement par le poids d'un groupement phosphate (80 Da) et suppose ainsi une modification de la charge résiduelle de la protéine. Dans l'hypothèse où la





**Figure 43 : Visualisation de la position de la tyrosine 461 dans le domaine YTH d'ECT2**

**(A)** Alignement des séquences des domaines YTH d'Arabidopsis (ECT et CPSF30) et humaines (YTHDF1-3 / YTHDC1-2). Les acides aminés essentiels pour la liaison au m<sup>6</sup>A sont marqués d'un astérisque rouge, les numéros des positions étant basés sur la séquence d'ECT2. La position phosphorylée dans ECT2 est marquée d'un triangle vert. La conservation des acides aminés est illustrée en fond bleu. **(B)** Modélisation du domaine YTH de la protéine ECT2 générée à partir de l'outil Molecule Viewer ([bar.utoronto.ca/eplant](http://bar.utoronto.ca/eplant), Waese et al. 2016). Les feuillettes- $\beta$  sont représentés en jaune et les hélices- $\alpha$  en rouge clair. Les trois tryptophanes nécessaires à la liaison à la m<sup>6</sup>A sont colorés en vert (W464, W521 et W526). La position de la tyrosine 461 phosphorylée chez ECT2 est pointée par une flèche rouge. **(C)** Structure générale du domaine YTH de la protéine YTHDC1 humaine en complexe avec un ARN GG(m<sup>6</sup>A)CU. Le rond rouge indique la position théorique de l'acide aminé phosphorylé chez ECT2. Extrait de Xuo et al. 2014.

phosphorylation de la position Y461 induit à elle seule au moins une des deux formes B ou C visibles sur gel, c'est-à-dire qu'elle modifie significativement la charge de la protéine et le nombre de molécule SDS recouvrant ECT2 en gel d'électrophorèse, on peut supposer qu'elle a le potentiel de diminuer l'appariement des ARNm méthylés. Ces résultats suggèrent donc pour la première fois chez un eucaryote, que l'activité de liaison à la méthylation des protéines à domaine YTH pourrait être régulée par la présence de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. Cela est d'autant plus intéressant sachant que cette tyrosine est évolutivement conservée chez les protéines à domaine YTH de type F chez l'homme et *Arabidopsis*, excepté pour ECT9 (Figure 43-A) et pourrait témoigner d'un mécanisme de régulation conservé.

La phosphorylation d'un lecteur de méthylation n'est pas un fait inédit puisque YTHDC1 (YT521-B) est également régulée par des événements de phosphorylation. Il a été démontré que sa version non phosphorylée s'accumule dans des corpuscules nucléaires (YT-bodies/nuclear speckles) regroupant également des facteurs d'épissage alors qu'à l'inverse la version phosphorylée ne s'accumule plus dans ces agrégats (Rafalska et al., 2004). En accord avec ces différences, l'épissage alternatif des cibles de YTHDC1 est modifié selon l'état de phosphorylation de la protéine. En fonction des cibles testées, YTHDC1 favorise ou exclut certains exons suivant son état de phosphorylation, témoignant d'une régulation de sa fonction par la phosphorylation. Par ailleurs, bien que YTHDF2 apparaît régulée en situation de stress thermique, les auteurs n'ont pas étudié comment un tel mécanisme est mis en place et la capacité de YTHDF2 à lier les ARNm méthylés en situation de stress n'a pas été démontrée directement. Ceci n'exclut donc pas la possibilité d'une régulation de YTHDF2 par des phosphorylations. En résumé, bien que des données aient déjà montré qu'une protéine à domaine YTH pouvait être régulée en fonction d'un stress environnemental ou par phosphorylation, les résultats obtenus avec ECT2 suggèrent pour la première fois que la capacité de liaison à la méthylation d'une protéine à domaine YTH pourrait être régulée en situation de stress par une modification post-traductionnelle.

### **II.1.2 – La localisation dans les granules de stress et la régulation des complexes protéiques**

En dehors de sa capacité de lecteur qui semble être régulée avec le stress, la localisation subcellulaire d'ECT2 est également modifiée au cours d'un stress thermique et elle s'accumule dans des agrégats cytoplasmiques. Cette observation est une caractéristique partagée avec les protéines YTHDF humaines. En effet, YTHDF1 et 3 sont également retrouvées parmi les facteurs identifiés dans les granules de stress (Jain et al., 2016) et YTHDF2 s'accumule dans les p-bodies

(Wang et al., 2014b). Tous ces lecteurs de méthylation y compris ECT2 possèdent des régions de faible complexité en partie N-terminale, une caractéristique retrouvée dans les facteurs formant des phases de séparation liquide-liquide à l'origine des granules cellulaires sans membrane (Kato et al., 2012). Les trois YTHDF humaines sont d'ailleurs capables de s'agréger dans des granules d'ARN formés artificiellement par hydrogel (Kato et al., 2012). Dans le cas d'ECT2, tous les agrégats formés avec un stress thermique se colocalisent avec ceux formés par PAB2, un facteur classiquement et exclusivement retrouvé en granules de stress de par sa fonction dans l'initiation de traduction (Anderson and Kedersha, 2008). Bien que la colocalisation avec les p-bodies n'ait pas été testée, les résultats n'ont pas fait apparaître d'agrégats ECT2 en condition normale ni d'agrégats distincts de ceux formés par PAB2 en situation de stress soutenant une localisation majoritaire voire exclusive d'ECT2 dans les granules de stress. De plus, des travaux menés par un groupe de recherche n'ont pas identifié de colocalisation significative entre ECT2 et un marqueur de p-bodies (VCS, orthologue de Hedls/Edc4) en situation normale ou en stress hydrique, supportant une localisation majoritairement exclue des p-bodies (Arribas-Hernández L., Brodersen P., Université de Copenhague, communications personnelles).

En identifiant les partenaires protéiques d'ECT2 par une approche globale de protéomique, il a été découvert que le stress thermique diminue par trois le nombre de partenaires par rapport à la condition normale. À l'exception d'un seul facteur, tous les partenaires en situation de stress sont également des interactants en situation normale supposant une simple réduction des réseaux protéiques. Puisqu'ECT2 n'interagit plus avec des ARNm méthylés en situation de stress thermique, cela pourrait supposer que les interactions ARN-dépendantes soient majoritairement perdues lors du stress et pourrait ainsi expliquer la diminution du nombre de partenaires identifiés à 38°C. Des résultats ont mis en avant que la version mutée d'ECT2 dans le domaine YTH s'accumule toujours dans des granules cytoplasmiques (données non montrées). Ainsi, dans la mesure où la phosphorylation de la tyrosine 461 diminuerait la capacité d'ECT2 à lier la méthylation, on peut néanmoins en déduire que cela n'influence pas l'agrégation de la protéine dans les granules de stress. La fonction de lecteur de m<sup>6</sup>A d'ECT2 n'est donc pas requise pour la localisation dans les granules de stress. Une hypothèse pourrait donc être que certains partenaires non ARN-dépendant puissent participer à l'agrégation d'ECT2 dans les granules de stress comme UBP1c ou RBP45b qui sont orthologues des protéines TIAR des mammifères impliquées dans la formation des granules cytoplasmiques (Waris et al., 2014). On ne peut néanmoins pas exclure qu'ECT2 puisse toujours lier des ARN non méthylés ce qui ne permet pas d'avancer que les interactants maintenus à 38°C soient uniquement des partenaires directs. En effet, chez les

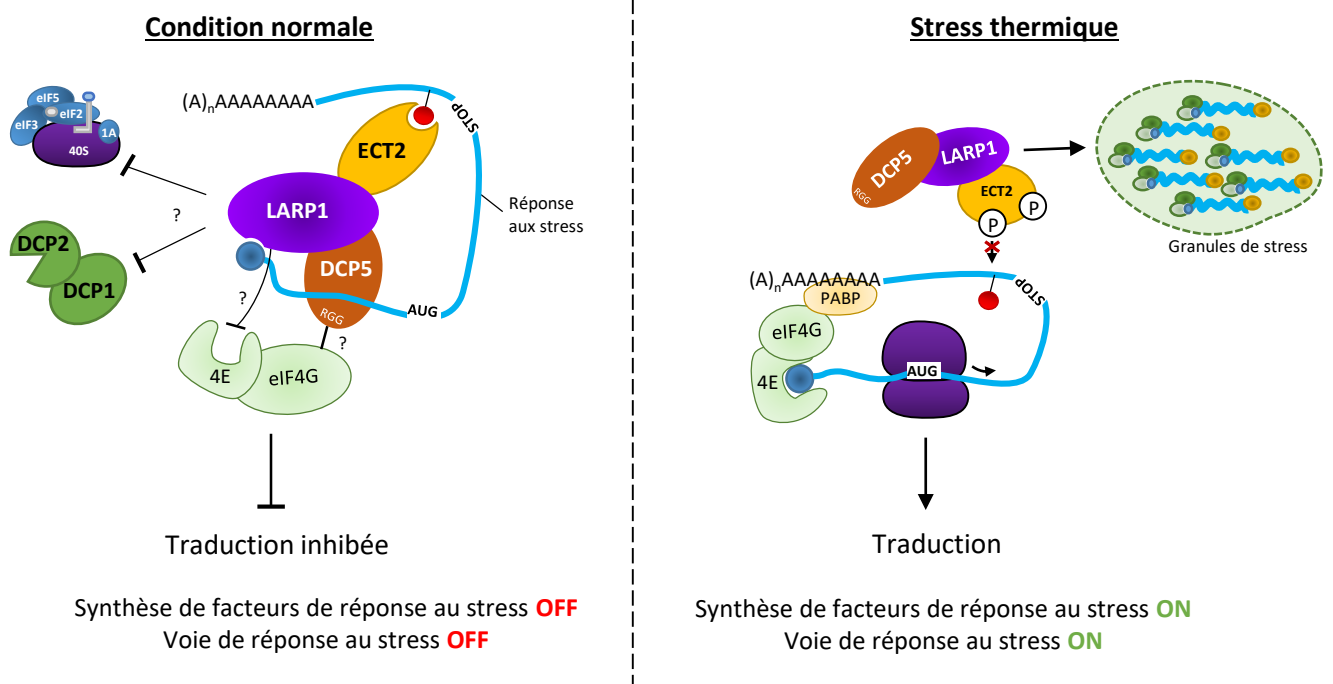
mammifères le domaine YTH possède également la capacité de lier des ARN non méthylés même si l'affinité est 50 fois plus réduite par rapport aux ARN méthylés (Theler et al., 2014).

Finalement, pour en revenir au mode d'action d'ECT2, si elle agit en situation normale comme un répresseur de traduction sur les ARNm méthylés en lien avec LARP1 et DCP5, pourquoi faut-il inactiver sa fonction de liaison aux ARNm méthylés en situation de stress ? En supposant qu'il s'agit là d'un mécanisme pour lever l'inhibition sur ses cibles méthylées, cela impliquerait-il que ces transcrits soient alors traduits en situation de stress ? Pour aller dans ce sens, les cibles majeures d'ECT2 en condition normale codent en partie des facteurs de réponse aux stress. On pourrait alors imaginer un modèle où lorsque qu'ECT2 devient phosphorylée, l'interaction avec l'ARNm méthylé est compromise et peut provoquer soit le décrochage d'ECT2 seule, soit le décrochage du complexe entier ECT2-LARP1-DCP5. Dans les deux cas, les transcrits méthylés seraient alors libérés de l'action répressive et pourraient être traduits pour faciliter la production des facteurs de réponses au stress et l'activation des voies de réponses spécifiques (Figure 44). Dans ce contexte, l'agrégation d'ECT2 et/ou LARP1-DCP5 dans les granules de stress serait un moyen supplémentaire pour séquestrer et inhiber la ou les protéines. Il est notamment publié chez la plante que LARP1 est également majoritairement accumulée dans les granules de stress en réponse au stress thermique pouvant rejoindre ce modèle (Merret et al., 2013). De même, la localisation de DCP5 dans les granules de stress n'a pas été étudiée mais l'orthologue Scd6p de levure s'accumule à la fois dans les granules de stress et les p-bodies (Rajyaguru et al., 2012).

Ce modèle suppose donc une traduction des cibles communes d'ECT2, LARP1 et DCP5 en situation de stress. Par manque de temps, les données de translatomiques n'ont pas été traitées dans les résultats pour rejoindre cette hypothèse. Néanmoins, les premières analyses montrent que les quantités à l'équilibre dans les polysomes de Col0 pour les cibles communes d'ECT2, LARP1 et DCP5 sont majoritairement plus importantes en situation de stress qu'en condition normale (données non montrées). Pour aller plus loin dans ce modèle, il serait donc crucial de définir les cibles directes d'ECT2, LARP1 et DCP5 en condition normale, rejoignant les perspectives proposées précédemment, mais également en condition de stress thermique. Une fois identifiées, l'objectif sera de déterminer si en situation de stress, l'engagement traductionnel de ces transcrits pourrait être facilité témoignant de la levée de l'inhibition opérée par les trois facteurs.

### **III.2 – Perspectives et utilisation de versions phosphorésistantes d'ECT2**

Pour étudier l'impact de la phosphorylation sur la fonction d'ECT2, la meilleure approche consiste à construire des versions d'ECT2 où les résidus S27 et/ou Y461 sont remplacés par des



**Figure 44 : Modèle de la régulation d'ECT2 en situation de stress thermique**

En condition normale, la version non phosphorylée d'ECT2 agirait en coopération avec LARP1 et DCP5 pour réprimer la traduction des transcrits méthylés codant des facteurs de réponse aux stress. Une fois en situation de stress thermique, la phosphorylation d'ECT2 inhiberait alors sa capacité à interagir avec les ARNm méthylés et favoriserait son agrégation dans les granules de stress. LARP1 et DCP5 ne pourraient plus cibler ces transcrits méthylés en l'absence d'ECT2 et pourraient également être entraînés vers les granules de stress avec ECT2. Ces transcrits pourraient alors être traduits pour produire les facteurs de réponses au stress thermique et faciliter l'activation des voies de réponses physiologiques.

résidus non phosphorylables (phosphorésistants). Pour cela, des constructions ont été menées pour remplacer la sérine 27 par une alanine et la tyrosine 461 par une phénylalanine, tous deux étant des résidus non phosphorylables. Au moment de l'écriture de ce manuscrit, les plantes exprimant soit ECT2 S27→A, soit ECT2 Y461→F ou les deux ECT2 S27→A/Y461→F, sont toujours en cours d'établissement. La première étape sera de déterminer par des analyses de western blot si ces positions sont effectivement responsables de l'apparition des formes modifiées en conditions de stress. Dans un second temps, puisque le modèle développé est que la phosphorylation de la tyrosine 461 pourrait inhiber la capacité de lecteur d'ECT2, on peut alors imaginer qu'une version phosphorésistante d'ECT2 pourrait toujours lier les ARN méthylés en situation de stress. Ce point pourra être étudié en répétant les analyses de RIP et de dot blot anti-m<sup>6</sup>A à partir de ces plantes transgéniques en situation de stress thermique. Par la suite, l'objectif sera alors d'étudier les fonctions d'ECT2 en stress thermique lorsqu'elle n'est plus phosphorylable. En postulant que la phosphorylation d'ECT2 réprime son interaction avec les ARN méthylés et lève son rôle répresseur, on peut imaginer que dans un contexte où ECT2 ne serait plus phosphorylée en réponse au stress thermique, les complexes ECT2-LARP1-DCP5 seraient alors maintenus sur les transcrits. Dans ce contexte, les transcrits codant les facteurs de réponse au stress seraient toujours réprimés et la voie de réponse serait compromise. Pour aller dans cette hypothèse, une fois que les cibles d'ECT2, LARP1 et DCP5 auront été identifiées par RIP-seq, leur comportement pourra alors être étudié dans les plantes exprimant ECT2 Y461→F à l'aide d'approche de PCR quantitative à partir d'ARN issus de fractions polysomales en condition normale et en situation de stress. On s'attendrait alors à voir les transcrits toujours réprimés en situation de stress. De même, pour démontrer encore une fois l'importance de LARP1 et/ou DCP5 dans ce mécanisme, cette expérience pourra être répétée en intégrant la version phosphorésistante d'ECT2 dans les mutants *larp1-1*, *dcp5-1* ou *larp1-1/dcp5-1*. Ici, même si ECT2 serait toujours liée aux ARN méthylés, l'absence de LARP1 et/ou DCP5 ne permettrait plus de réprimer ces cibles.

D'après les données de translatomique, en l'absence d'ECT2 certains facteurs de réponse au stress échappent à la répression et sont déjà traduits en situation normale supposant une quantité plus importante des acteurs produits par ces transcrits. Cette quantité plus importante pourrait fournir aux plantes privées d'ECT2 un meilleur potentiel de résistance aux stress par rapport aux plantes sauvages. En effet, dans un contexte de stress, les mutants *ect2* auraient déjà un niveau de réponse basal plus efficace que des plantes Col0 pour lesquelles ces facteurs de réponses devraient d'abord être produits de façon spécifique au stress. Les premiers tests de thermotolérance mesurant le taux de survie des plantes n'ont pas démontré une différence

majeure entre les plantes Col0 et les mutants *ect2* dans les régimes testés. Néanmoins, pour tester si les mutants *ect2* présenteraient une meilleure reprise de croissance par rapport à Col0, il conviendrait de répéter ces expériences en incluant des mesures quantitatives de croissance. Une autre possibilité serait de reprendre les mesures de survie mais cette fois en appliquant un stress d'une intensité plus forte où les plantes Col0 ne survivent pas en majorité. Dans ce contexte, il pourra être déterminé si les plantes mutantes *ect2* présentent un meilleur taux de survie par rapport aux plantes Col0. De même, puisque dans le modèle développée, la phosphorylation d'ECT2 serait essentielle pour lever la répression d'ECT2 sur ces transcrits de réponse au stress, les plantes exprimant la version phosphorésistante de Y461 devraient alors moins bien s'acclimater aux régimes de thermotolérance.

Par ailleurs, au cours du stress thermique où ECT2 est majoritairement phosphorylée, on constate une réduction des partenaires en complexe avec ECT2. Cette observation pourrait supposer que certaines interactions pourraient être influencées négativement par la modification post-traductionnelle d'ECT2. Cette diminution de partenaires pourrait ainsi s'expliquer soit par une conséquence directe de la phosphorylation qui pourrait réduire la liaison de certains partenaires soit par une conséquence indirecte dû à la réduction de fixation d'ECT2 aux ARN méthylés, réduisant les partenaires ARN-dépendants. Dans ces hypothèses, cela supposerait que sans phosphorylation, ECT2 serait toujours capable d'interagir avec les partenaires dont l'interaction n'est plus détectée en situation de stress thermique. En ce sens, des tests de co-immunoprécipitations pourront être menés à partir des versions phosphorésistantes pour déterminer si les interactions des partenaires d'ECT2 spécifiques de la condition normale pourraient être maintenues au cours d'un stress thermique dans un contexte où ECT2 ne serait pas phosphorylée. Si les interactions sont maintenues cela pourrait démontrer que la phosphorylation d'ECT2 pourrait effectivement contribuer à inhiber certaines interactions protéiques.

Finalement, un autre type d'outil adéquat serait l'utilisation de versions d'ECT2 mimant des résidus phosphorylés constitutivement (phosphomimétique). Avec un tel outil, on pourrait notamment déterminer si effectivement une version phosphorylée d'ECT2 ne pourrait plus agir comme répresseur de traduction ou servirait également à déterminer si la phosphorylation de la tyrosine 461 empêche la liaison à la méthylation. Cependant, substituer un résidu équivalent à une phospho-tyrosine reste une tâche difficile puisqu'aucun autre acide aminé ne possède une structure équivalente. Classiquement, un acide aspartique ou un glutamate est utilisé en substitut

des versions phosphorylées des sérines, thréonines ou tyrosines. Néanmoins remplacer la tyrosine, qui est un résidu aromatique, par un résidu aliphatique pourrait déjà affecter le repliement du domaine YTH. Dans le cas où un phosphomimétique présenterait une diminution de la capacité à lier la méthylation, il serait donc difficile de distinguer si l'effet provient intrinsèquement de la substitution d'acide aminé ou de l'équivalent d'une phosphorylation.

### **II.3 – Quels sont les acteurs impliqués dans la phosphorylation d'ECT2 ?**

Le contexte des séquences autour des résidus sérine 27 et tyrosine 461 ne correspond pas aux séquences consensus de protéines kinases communes comme les CDK, CK (Casein kinase) ou MAPK (Ubersax and Ferrell Jr, 2007) supposant l'intervention d'autres kinases. Les données d'interactome d'ECT2 n'ont identifié aucun facteur connu pour agir en tant que kinase ou phosphatase suggérant que l'interaction avec ces acteurs est très transitoire. De façon générale, la phosphorylation intervient majoritairement sur les résidus sérines, thréonines et tyrosines. La phosphorylation des tyrosines est néanmoins classifiée comme un évènement rare puisque une étude en cellules humaines a quantifiée à l'échelle du protéome que les phospho-tyrosines représentent 2% des cas contre 86 % et 12 % pour les phospho-sérines et phospho-thréonines respectivement (Olsen et al., 2006). L'installation de ces phosphorylations est ainsi assurée par des Sérine/thréonine kinases et des tyrosines kinases. À titre d'exemple, le lecteur de méthylation YTHDC1 (YT521-B) est connu pour être phosphorylé sur des tyrosines par les tyrosines kinases c-Src, c-Abl et p59<sup>lyn</sup> (Rafalska et al., 2004). Chez *A. thaliana*, la distribution de la phosphorylation sur les sérines, thréonines et tyrosines apparaît dans un ratio de 85, 11 et 4% respectivement (Sugiyama et al., 2008). Curieusement, bien que les tyrosines sont phosphorylées chez la plante dans des proportions similaires aux mammifères, il n'existe pas d'équivalents aux motifs spécifiques des tyrosines kinases des animaux (Rudrabhatla et al., 2006; Shankar et al., 2015). Il est donc proposé que les tyrosines soient phosphorylées par des kinases à double spécificité ciblant à la fois les sérines/thréonines et les tyrosines. Ainsi, c'est probablement un acteur de cette classe qui est impliqué dans la phosphorylation de la tyrosine 461 sur ECT2.

Par ailleurs, il a été observé que l'installation de phosphorylation sur ECT2 en situation de stress est compromise dans un contexte où la quantité de m<sup>6</sup>A est réduite, c'est-à-dire dans des mutants du complexe de méthyltransférase. À l'inverse, lorsque l'élongation de traduction est inhibée chimiquement en condition normale, l'installation de phosphorylation sur ECT2 est favorisée. Ces résultats supportent que la dynamique de modifications d'ECT2 est étroitement liée à la présence de transcrits méthylés et à l'état général de la traduction et implique donc qu'une ou



des kinase(s) soi(en)t reliée(s) à ces caractéristiques. Une hypothèse pourrait être l'implication de kinases liées à la phosphorylation d'eIF2 comme GCN2 ou également des kinases de la voie TOR, également impliquée dans le contrôle de la traduction (Sesma et al., 2017). Pour aller dans cette hypothèse, le profil d'ECT2 pourrait être déterminé dans un mutant pour GCN2 ou par une inhibition de la voie TOR *via* des agents chimiques.

### **III – LE RÔLE D'ECT2 DANS LE TRICHOME : UN INDICATEUR D'UN DÉFAUT DE CYCLE CELLULAIRE ?**

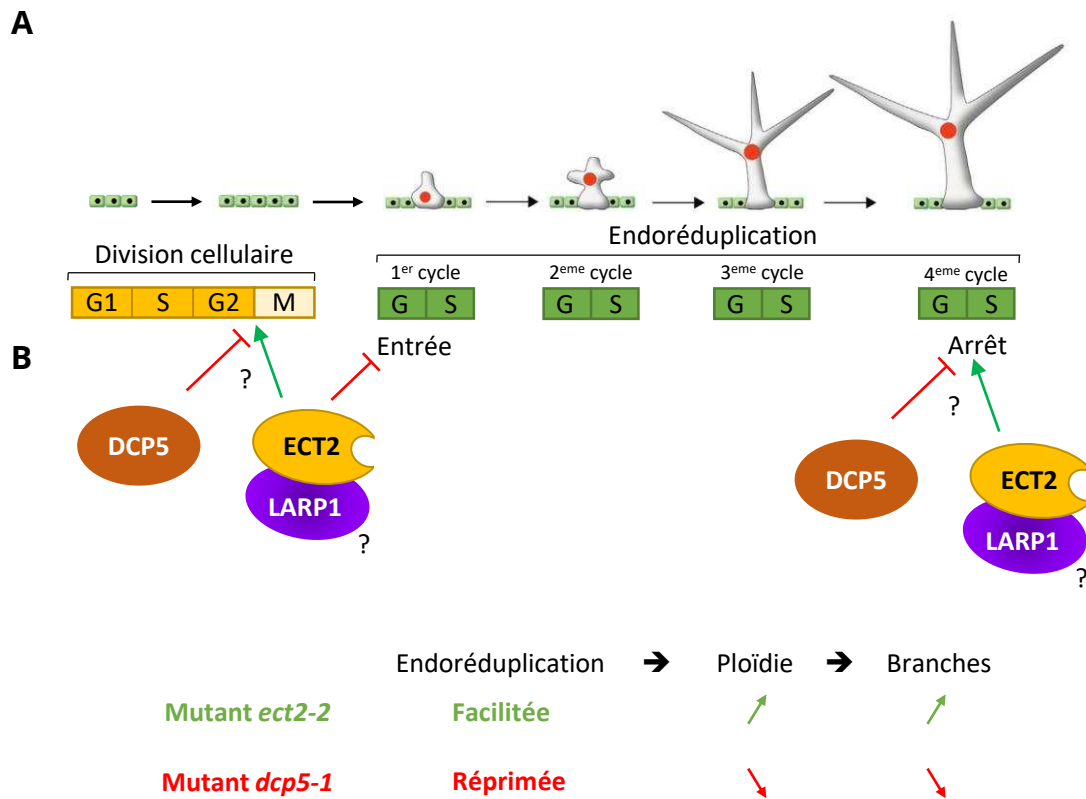
Aucun défaut de croissance n'a été observé en l'absence d'ECT2. Néanmoins, sachant qu'ECT2 fait partie d'une famille multigénique de 11 membres, une redondance fonctionnelle entre des facteurs ECT est fortement envisageable pouvant expliquer l'absence de phénotype en l'absence de seulement ECT2. Cependant, il a été découvert que l'absence d'ECT2 conduit à des défauts morphologiques des trichomes en augmentant de façon générale le nombre de branches. De façon intéressante, ce défaut n'a pas été retrouvé dans d'autres mutants pour des ECT (ECT4, 5 et 8) pouvant supporter un rôle spécifique d'ECT2 dans le développement du trichome. De plus, ce défaut a été directement relié à la capacité de lecteur de méthylation d'ECT2 permettant pour la première fois chez *Arabidopsis* d'attribuer la fonction d'un lecteur de m<sup>6</sup>A à un aspect développemental déjà connu pour être induit en dérégulant l'expression de facteurs du complexe de méthylation (Bodi et al., 2012; Vespa et al., 2004). Finalement, bien que l'impact de toutes les ECT n'est pas été mesuré, la similarité des défauts engendrés dans les plantes ABI3-MTA et ceux dans les mutants *ect2* propose qu'ECT2 serait le lecteur de méthylation principal dans cette voie du développement.

Au niveau structurel, deux aspects contrôlent la formation des branches des trichomes : la régulation du cycle cellulaire et la structure du cytosquelette (Ishida et al., 2008). Ainsi, c'est notamment les réseaux de microtubules et d'actines qui contribuent à la formation et l'élongation des branches (Tian et al., 2015). Concernant le cycle cellulaire, ce mécanisme est classiquement divisé en 4 grandes étapes : une phase G1 de préparation à la réplication, une phase S où l'ADN est répliqué, une phase G2 de croissance et de préparation de la mitose et enfin une phase M de mitose permettant la division cellulaire. Les cellules de trichomes se développent en sortant d'un cycle mitotique pour entrer dans un cycle d'endoréduplication, c'est-à-dire que l'ADN est répliqué sans subir de division cellulaire. Les cellules passent alors d'une phase G2 à S sans passer par une phase M. Une fois entrée en endoréduplication, en moyenne 4 cycles (G/S) successifs sont achevés

jusqu'à la maturité du trichome, donnant une quantité d'ADN moyenne de 32 C. Le premier cycle contribue à différencier la cellule de trichome, les deuxièmes et troisièmes cycles coïncident avec l'apparition des deuxièmes et troisièmes embranchements alors que le dernier sert de maturation du trichome par expansion cellulaire (Figure 45-A). Le nombre de branches est donc directement relié à la quantité d'ADN de la cellule de trichome et au nombre de cycles d'endoréduplication subis (Schnittger and Hulskamp, 2002). De nombreux gènes ont été identifiés dans la formation du trichome constituant un ensemble de facteurs de transcription dont certains régulent les phases de transitions du cycle cellulaire (Pattanaik et al., 2014). Dans le cas d'une surexpression de FIP37, il a été montré que l'augmentation du nombre de branches sur les trichomes est associée à une quantité plus importante en ADN dans les trichomes (Vespa et al., 2004). La ploïdie des cellules atteint jusqu'à 256 C suggérant au moins 3 cycles d'endoréduplication supplémentaires. Le défaut de branchages des trichomes dans ces plantes pourrait donc être lié à une dérégulation du cycle cellulaire en lien avec une perturbation du niveau de m<sup>6</sup>A cellulaire. En effet, même si le niveau de m<sup>6</sup>A n'a pas été mesuré dans ces plantes, on peut supposer que la surexpression de FIP37 pourrait affecter qualitativement et/ou quantitativement le dépôt de méthylation sur les ARNm. De même, l'étude des plantes ABI3-MTA montre que la diminution de MTA entraînant une baisse de m<sup>6</sup>A conduit également à des défauts similaires d'augmentation de branches (Bodi et al., 2012). Au vu de ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que des transcrits impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et/ou de l'endoréduplication sont possiblement régulés par la méthylation m<sup>6</sup>A chez *Arabidopsis thaliana*.

## **II.1 – Lien entre la méthylation et le cycle cellulaire**

De nombreux liens ont déjà été faits entre la méthylation des transcrits et la régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes. Tout d'abord, les transcrits possédant le plus de méthylation dans de nombreux types de cellules souches de mammifères (ESC, iPSC, NSC, SC) sont enrichis dans des fonctions biologiques associées au cycle cellulaire (Batista et al., 2014; Chen et al., 2015). D'autre part, en diminuant l'expression de ALKBH5 par siRNA en cellules humaines qui entraîne une augmentation de m<sup>6</sup>A, de nombreux transcrits associés au cycle cellulaire sont affectés (Zheng et al., 2013). De même, en ciblant WTAP par siRNA, de nombreux transcrits liés au cycle cellulaire ont une expression réduite (Horiuchi et al., 2006). Il a ainsi été montré plus précisément que WTAP stimule la transition G2/M en stabilisant notamment le transcrit de la cycline A2, un facteur clé dans cette étape du cycle cellulaire. Le ciblage de WTAP par siRNA conduit ainsi à une accumulation de cellules en phase G2. Le lien avec l'activité de WTAP dans le complexe de



**Figure 45 : Modèle du rôle d'ECT2, LARP1 et DCP5 dans le contrôle du cycle cellulaire**

**(A)** Représentation de la formation des trichomes. Au cours des 4 grandes étapes du cycle cellulaire (G1, S, G2, M), une cellule se différencie en trichomes par une entrée en endoreduplication en contournant la phase M de division. Le premier cycle d'endoreduplication coïncide avec la différenciation et l'émergence du trichome, les seconds et troisièmes cycles coïncident avec l'apparition des branches et le quatrième cycle sert de maturation. Adapté de Breuer et al., 2014. **(B)** Représentation de l'action de DCP5 et ECT2 sur la formation des trichomes. Une première hypothèse serait qu'ECT2 agirait comme stimulateur de la transition G2/M (défavorable à l'entrée en endoreduplication) et que DCP5 réprimerait cette transition (favorable à l'entrée en endoreduplication). Une seconde hypothèse concerne une action plus tardive d'ECT2 qui stimulerait l'arrêt de l'endoreduplication une fois les quatre premiers cycles achevés à l'inverse de DCP5 qui réprimerait cet arrêt. Dans chacun des cas, l'absence d'ECT2 faciliterait l'endoreduplication à l'inverse de la réduction de DCP5 qui réprimerait l'endoreduplication. Bien que le mutant *larp1-1* ne présente pas de phénotype, les multiples mutants impliquant LARP1 et ECT2 et/ou DCP5 suppose son intervention avec un effet rejoignant celui d'ECT2. Ce modèle suppose néanmoins que les phénotypes des trichomes soient liés à un défaut d'endoreduplication plutôt qu'un défaut du cytosquelette des trichomes.

méthylation n'a pas été étudié mais l'accumulation de cellules en phase G2 est également visible en diminuant l'expression d'autres partenaires du complexe de méthylation comme HAKAI, VIR ou RBM15 (Horiuchi et al., 2013). Ceci va dans le sens que la méthylation des transcrits jouerait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et potentiellement dans la phase de transition vers la division cellulaire, c'est-à-dire précisément l'étape qui doit être réprimée lors des événements d'endoréduplication. De façon intéressante, ceci impliquerait que les lecteurs de méthylation puissent agir dans le contrôle de transcrits méthylés impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Dans cette optique, chez les mammifères les cibles directes de YTHDF2 ainsi que les cibles communes entre YTHDF1 et 3 sont enrichies pour des facteurs associés au cycle cellulaire (Wang et al., 2014b; Li et al., 2017). Plus particulièrement, chez le poisson zèbre, la mutation de *Ythdf2* conduit également à un défaut du cycle cellulaire au cours de la transition zygotique en bloquant tardivement la phase G2 (Zhao et al., 2017). En accord avec ce défaut, de nombreux transcrits du cycle cellulaire voient leur stabilité régulée par *Ythdf2*. Ces résultats suggèrent que la régulation du cycle cellulaire par les protéines YTH puisse être une caractéristique conservée chez les eucaryotes.

## **II.2 – Le rôle d'ECT2 dans le développement du trichome et le lien avec LARP1 et DCP5**

Au vu du lien entre la méthylation m6A et la régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes, l'hypothèse la plus probable pour expliquer l'augmentation du nombre de branches sur les trichomes des mutants *ect2* serait qu'ECT2 est également impliquée dans la régulation du cycle cellulaire en tant que lecteur de méthylation. Néanmoins, deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ces défauts.

Premièrement, puisque que la mutation de WTAP chez les mammifères (Horiuchi et al., 2006) ou de *Ythdf2* chez le poisson zèbre (Zhao et al., 2017) conduit à un blocage de la transition G2/M, cela suppose la méthylation et les lecteurs comme des stimulateurs de cette transition. En postulant pour un mécanisme évolutivement conservé, on peut émettre l'hypothèse qu'ECT2 pourrait également faciliter cette transition en régulant certains transcrits clés. Dans les trichomes, la transition G2/M doit être réprimée pour faciliter l'entrée dans les cycles d'endoréduplication (Breuer et al., 2014). Ainsi, en l'absence d'ECT2, les cellules seraient plus facilement bloquées en phase G2 et l'entrée en endoréduplication serait facilitée dans les trichomes (Figure 45-B). Dans cette hypothèse, cela peut supposer que l'entrée en endoréduplication serait plus précoce par rapport aux plantes sauvages, expliquant un nombre de

cycles plus importants qui par conséquence augmenterait le niveau de ploïdie et le nombre de branches sur les trichomes. Concernant DCP5, il a été observé dans le mutant *dcp5-1* que le nombre de branches est en revanche réduit par rapport aux plantes sauvages. Au vu de cette différence avec les mutants *ect2*, cela laisse penser que DCP5 pourrait réguler un groupe de transcrits différents et avec un rôle opposé à ceux régulés par ECT2. Dans ce modèle cela pourrait supposer que DCP5 régulerait positivement l'entrée en endoreduplication, par exemple en réprimant la transition G2/M de division cellulaire (Figure 45-B). Ainsi, dans le mutant *dcp5-1*, l'entrée dans les cycles d'endoreduplication serait retardée et la ploïdie ainsi que le nombre de branches diminueraient en conséquence par rapport aux plantes sauvages. À ma connaissance il n'existe pas de lien direct entre le rôle de DCP5 et la régulation du cycle cellulaire. Néanmoins, chez la levure la protéine Scd6p est méthylée sur les motifs RGG par l'arginine méthyltransférase Hmt1 (Lien et al., 2016) et cette enzyme est connue pour réguler le cycle cellulaire en favorisant la stabilisation de certains transcrits cyclines (Messier et al., 2013). Il pourrait donc exister un lien qui n'a pas été étudié entre la méthylation de Scd6 par Hmt1 et la progression du cycle cellulaire. Dans un sens, l'effet différent de DCP5 dans les trichomes pourrait également être une conséquence de son interaction avec DCP1 et de son rôle déstabilisateur. En effet, les trichomes ont été observés sur la première paire de feuilles qui émerge des cotylédons moins de 10 jours suivant la germination. Les trichomes sont formés très précocement puisqu'ils sont issus de cellules différenciées dans les primordia des feuilles (Hülkamp et al., 1994). À ce stade, il est donc envisageable que l'interaction DCP5-DCP1 soit maintenue et DCP5 agirait comme répresseur et déstabilisateur de ses cibles.

Le premier modèle postule pour une différence d'action d'ECT2 et DCP5 dans l'entrée en endoreduplication, néanmoins, un second modèle pourrait concerner un rôle plus tardif dans le développement des trichomes. En effet, certains autres acteurs sont impliqués dans l'arrêt des cycles d'endoreduplication une fois le trichome arrivé à maturité (Breuer et al., 2014). ECT2 pourrait donc être impliquée dans ce processus en favorisant l'arrêt des cycles d'endoreduplication après les 4 cycles achevés en moyenne dans les trichomes normaux. En l'absence d'ECT2, l'arrêt de l'endoreduplication serait compromis qui pourrait alors poursuivre pour des cycles supplémentaires expliquant l'augmentation du nombre de branches. De même, DCP5 pourrait avoir l'effet opposé en inhibant l'arrêt de l'endoreduplication (Figure 45-B). La réduction du niveau de DCP5 contribuerait alors à favoriser le blocage des cycles d'endoreduplication expliquant la réduction des trichomes à 4 branches dans le mutant *dcp5-1*.

Le mutant simple *larp1-1* ne présente pas de défaut de nombre de branches de trichomes. Néanmoins, l'observation des multiples mutants suggère que LARP1 aurait un effet dans la même voie qu'ECT2. Ainsi dans les deux modèles précédents, LARP1 pourrait être associée avec ECT2 pour contribuer aux mêmes effets, à savoir stimuler dans une moindre échelle la division cellulaire et inhiber l'entrée en endoreduplication. Pour faire le lien avec cette hypothèse, chez les mammifères, au moins deux études ont recensé que la diminution d'expression de LARP1 par siRNA provoque un arrêt dans le cycle cellulaire supportant LARP1 comme un stimulateur positif du cycle cellulaire (Burrows et al., 2010; Tcherkezian et al., 2014).

En accord avec ces modèles, il serait nécessaire dans un premier temps de déterminer le niveau de ploïdie des trichomes des différents mutants pour déterminer si le phénotype observé est relié au niveau de ploïdie. Concernant ECT2, au vu de l'augmentation du nombre de branches, on s'attend à observer une augmentation du niveau de ploïdie, de façon similaire aux données obtenues avec la surexpression de FIP37 (Vespa et al., 2004). Ce défaut de ploïdie pourrait ne pas être seulement restreint dans le trichome et être représentatif d'un défaut global de cycle cellulaire. Le niveau de ploïdie pourra donc être déterminé de façon générale dans les feuilles par exemple. En accord avec cette hypothèse, une collaboration a été initiée avec Dr. BENHAMED M. (MdC Université Paris sud - Institut of Plant Sciences Paris-Saclay) pour mesurer le niveau de ploïdie dans les trichomes, les feuilles et les racines de mutant *ect2* et des versions complémentées avec YFP-ECT2 ou YFP-ECT2\*\*\* en comparaison de plantes Col0. De même, certains gènes impliqués dans le développement du trichome sont également requis pour la différenciation des poils racinaires (Ishida et al., 2008). Il serait donc intéressant de voir si l'action d'ECT2, LARP1 ou DCP5 pourrait également être requise dans d'autres sites d'endoreduplication comme les racines secondaires ou l'hypocotyle (Gendreau et al., 1998). En ce sens, des premiers tests concerneront l'étude de la croissance racinaire des mutants *ect2* et l'émergence des racines secondaires en collaboration avec Dr. BELIN C. et TRUJILLO A. (LGDP, Perpignan). Finalement, un moyen de distinguer les deux modèles différents serait par l'étude des cibles directes des trois facteurs pour identifier si certaines ont un impact plutôt sur l'entrée ou l'arrêt en endoreduplication. Il apparaît donc indispensable sur plusieurs points de déterminer les cibles directes des trois facteurs et l'effet d'ECT2, LARP1 et DCP5 sur ces transcrits. L'établissement du méthylome développé dans l'équipe pourrait également identifier si ces transcrits sont des cibles méthylées pour expliquer l'intervention d'ECT2 puisque le défaut a été directement relié à sa capacité de lecteur de méthylation.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

---

Récemment, de nouvelles voies de régulation de l'expression des gènes ont émergé faisant intervenir des modifications post-transcriptionnelles comme la N<sup>6</sup>-méthyladenosine. Cette dernière permet d'apporter un niveau supplémentaire de régulation des ARNm *via* l'action de lecteurs de méthylation notamment. Avant ces travaux de thèse, aucun lecteur de méthylation n'avait été identifié chez les végétaux et même si des protéines à domaine YTH sont présentes, leurs fonctions restent majoritairement inconnues dans la régulation des ARNm méthylés. Ainsi, cette étude a permis de caractériser pour la première fois les fonctions d'ECT2, une protéine à domaine YTH, chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Les résultats obtenus démontrent que la fonction de lecteur de méthylation d'ECT2 est impliquée dans le développement et plus précisément au niveau des trichomes. Au niveau moléculaire, les travaux menés permettent de proposer ECT2 comme un répresseur de traduction des ARNm méthylés. Bien que des expériences soient encore nécessaires pour valider ce mode d'action, cela suggère un rôle différent et inédit par rapport aux protéines à domaine YTH de mammifères. Finalement, un aspect régulateur de la fonction d'ECT2 a été mis en avant au travers de modifications post-traductionnelles dont l'installation semble liée au mécanisme de traduction et aux facteurs environnementaux. Ces résultats permettent de suggérer pour la première fois qu'un lecteur de méthylation puisse avoir une capacité de liaison aux ARNm méthylés régulée par des facteurs externes. Au final, cette étude renforce encore une fois le rôle essentiel de la méthylation des ARNm dans le contrôle de l'expression des gènes au travers de l'action d'un lecteur de méthylation.

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**



**Tableau 7 : Récapitulatif des lignées mutantes caractérisées et utilisées**

Lignées caractérisées dans cette étude (ND : Non déterminé)

Gène	Identifiant	Lignée	Allèle	Position de l'insertion après l'ATG		Insertion du T-DNA
ECT2	At3g13460	SALK_002225	<i>ect2-1</i>	+524	Exon 3	Sens
		SAIL_11_D07	<i>ect2-2</i>	+2402	Exon 7	Anti-sens
ECT4	At1g55500	SALK_151516	<i>ect4-1</i>	+1200	Exon 5	Sens
		SALK_112012	<i>ect4-2</i>	+2168	Exon 7	Anti-sens
ECT5	At3g13060	SALK_030184	<i>ect5-1</i>	ND	-	-
		SAIL_816_E02	<i>ect5-2</i>	+1090	Intron 4	Sens
		SALK_131549	<i>ect5-3</i>	+1742	Intron 5	Anti-sens
ECT8	At1g79270	SALK_206162	<i>ect8-1</i>	+676	Exon 3	Sens
		SALK_260710	<i>ect8-2</i>	+1070	Exon 5	Sens

Autres lignées utilisées (NP : Non précisé)

Gène	Identifiant	Lignée	Allèle	Provenance	Référence
LARP1	At5g21160	SALK_151251	<i>larp1-1</i>	Equipe	Merret et al, 2013
DCP5	At1g26110	SALK_008881	<i>dcp5-1</i>	Xu & Chua, 2009	
XRN4	At1g54490	SAIL_6811E01	<i>xrn4-5</i>	Souret et al, 2004	
MPK3	At3g45640	SALK_151594	<i>mpk3-1</i>	Colcombet J., IPS2, Orsay	Frei dit Frey et al, 2014
MPK4	At4g01370	SALK_056245	<i>mpk4-2</i> (HE)		
MPK6	At2g43790	SALK_073907	<i>mpk6-2</i>		
FIP37	At3g54170	SALK_018636	<i>fip37-4</i>	R. Fray, Nottingham	Růžička et al, 2017
CIPK1	At3g17510	NP	<i>cipk1-1</i>	Kudla J., Allemagne	D'angelo et al, 2006
HSFA1	Quadruple mutant (hsfa1a, b, d, e)		<i>hsfa1</i>	Charng Y-Y., Taiwan	Liu et al, 2011

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

## I – MATÉRIELS BIOLOGIQUES

### I.1 – Souches bactériennes

Les étapes de clonage moléculaire ont nécessité l'utilisation de deux souches d'*Escherichia coli* différentes. La souche DB3.1™ a été utilisée pour construire ou modifier les vecteurs donneurs et destinations relatifs au système de clonage par Gateway®. En effet, cette souche est modifiée génétiquement pour résister à la toxicité de la cassette *CcdB* présente dans ces vecteurs. Pour toutes les autres applications, la souche DH5α™ a été classiquement utilisée. Dans les deux cas, les souches bactériennes ont été cultivées à 38°C en milieu LB (Lysogeny Broth) liquide (25 g/L LB) ou solide (35 g/L LB-agar).

La génération de plantes transgéniques a nécessité l'utilisation de bactéries *Agrobacterium tumefaciens* de souche GV3101. Cette souche porte une résistance à l'antibiotique rifampicine et gentamicine et est cultivée à 28°C en milieu LB liquide ou solide.

### I.2 – Lignées végétales d'*Arabidopsis thaliana* et mutants d'insertion ADN-T

L'écotype Columbia-0 (Col0) a été utilisé comme écotype sauvage. En parallèle, la majorité des lignées mutantes provient du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) qui dispose d'un stock d'au moins 800 000 lots différents de graines avec des mutations pour la quasi-totalité des gènes d'*Arabidopsis*. Ces mutants sont construits sur la base d'une insertion unique et aléatoire d'une séquence d'ADN de transfert dans le génome de la plante par le biais d'organisme bactérien comme *Agrobacterium sp.* Les lignées mutantes établies ou utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 7.

## II – MÉTHODES RELATIVES À LA CULTURE VÉGÉTALE

### II.1 – Stérilisation de graines et culture in vitro

Pour les cultures sur milieu gélosé, les graines sont stérilisées dans une solution d'éthanol 70 % et de SDS 0,05 % pendant 3 min avec agitation puis rincées 3 fois pendant 1 min dans une solution d'éthanol 95 %. Après séchage sous une hôte à flux laminaire, les graines sont semées sur boîtes contenant du milieu MS (Murashige & Skoog, Duchefa Biochimie). Ce milieu est préparé

dans les proportions de 4,41 g par litre de solution (ajustée à un pH de 5,7) et additionné de 4 g d'agar. Les boîtes sont ensuite scellées et placées 48 h à l'obscurité en chambre froide avant d'être mises en culture *in vitro*. Les conditions de cultures sont fixées à une température constante de 20°C pour une alternance de 16 h de jour avec une intensité lumineuse de 130  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et 8 h d'obscurité. Selon les utilisations, les plantes peuvent être replantées individuellement en terre après 2 semaines de culture pour terminer leur cycle de développement.

## **II.2 – Culture en terre**

Les graines sont directement semées sur un mélange contenant 4 volumes de terreau pour un volume de vermiculite sans étape de stérilisation ni de vernalisation. Les pots sont ensuite placés en chambre de culture avec une alternance de 16 h de jour avec une intensité lumineuse de 100  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et 8 h d'obscurité, une température constante de 20°C et un taux d'humidité entre 60 et 75%. Après 2 semaines, les plantes sont repiquées individuellement dans de nouveaux pots en disposant de une à quatre plantes par pot selon les besoins. À la fin du cycle de développement, les plantes sont séchées une dizaine de jours dans une chambre de séchage puis les graines sont récoltées à l'aide d'un tamis.

## **II.3 – Transformation de plantes par *Agrobacterium tumefaciens***

L'obtention de plantes transgéniques a été effectuée par agro-infiltration avec la méthode de « floral dip » (adaptée de Clough & Bent, 1999; Zhang et al., 2006). Après transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* (voir méthode partie III.2.3) et vérification de la présence du transgène d'intérêt par criblage PCR, une colonie positive est inoculée dans 5 mL de milieu (LB liquide 25 g/L) supplémenté d'antibiotiques de sélection de la souche (rifampicine 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , gentamicine 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ainsi que du vecteur binaire inséré. Après une incubation à 28°C pendant une nuit avec agitation, 500  $\mu\text{L}$  de la culture est ajouté à 200 mL de milieu sélectif (LB liquide 25 g/L, 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , gentamicine 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , antibiotique de sélection du vecteur binaire). La culture est incubée à 28°C pendant 16 à 20 h jusqu'à atteindre une phase stationnaire avec une D.O. à 600 nm comprise entre 0,8 et 1. La culture est ensuite centrifugée à 4 000 g pendant 10 min et le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 100 mL de milieu d'infiltration (5 % sucrose, 0,1 M  $\text{MgCl}_2$ , 0,05 % Silwet L-77 (Lehle seeds)). Avant infiltration, les plantes sont préparées en enlevant les siliques vertes avec un ciseau pour limiter la transformation aux bourgeons floraux en cours de fécondation qui sont susceptibles de transmettre le transgène à la descendance. L'agro-infiltration est réalisée en trempant les plantes par inversion dans la solution d'agro-bactéries

pendant 15 à 20 sec. Les plantes sont ensuite ensachées pendant 24 h pour augmenter le taux d'humidité puis leur développement est achevé classiquement en chambre de culture jusqu'à récolte des graines.

## **II.4 – Établissement de lignées transgéniques stables**

Les graines obtenues des plantes transformées par *Agrobacterium tumefaciens* (génération F1) sont mises en culture *in vitro* sur du milieu MS supplémenté d'un antibiotique de sélection afin de sélectionner les plantes ayant intégrées le transgène. L'antibiotique, spécifique selon le vecteur utilisé pour la transformation, est utilisé dans les concentrations suivantes : gentamicine 25 µg/mL, glufosinate 15 µg/mL. Les plantes résistantes au crible sont ensuite repiquées individuellement. La présence du transgène est éventuellement vérifiée par PCR et l'expression de la protéine de fusion est testée par western blot sur chacune des plantes. Les plantes exprimant la protéine concernée à des niveaux équivalents à l'expression endogène des plantes Col0 sont conservées. Les graines F2 obtenues sont ensuite soumises à un nouveau crible antibiotique pour déterminer les lignées mono-insertionnelles qui présenteront une proportion de 75 % de résistance pour 25 % de sensible. Au-delà de 75 % témoignant d'une insertion multiple du transgène, les lots de graines ne sont pas conservés. De ces lignées mono-insertionnelles, 20 plantules différentes sont repiquées individuellement pour disposer de 20 lots de graines F3 individuels. Enfin, un dernier crible sur antibiotique est effectué sur les graines F3 pour ne conserver que les lots affichant 100% de résistance, c'est-à-dire présentant des plantes homozygotes pour le transgène. Les lignées transgéniques construites ou utilisées au cours de cette étude sont listées dans le tableau 8.

## **III – TECHNIQUES COURANTES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

### **III.1 – Méthodes relatives à l'ADN**

#### **III.1.1 – Extraction d'ADN génomique végétal**

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de 50 mg de feuilles broyées à l'azote liquide et la poudre est resuspendue dans 100 µL de tampon d'extraction (200 mM Tris-HCl [pH 7,5], 250 mM NaCl, 25 mM EDTA [pH 8], 0,5 % SDS) préchauffé à 65°C. La solution est mélangée au vortex puis 400 µL de tampon d'extraction est ajouté avant une incubation à 65°C pendant 10 min. Ensuite, 300 µL d'isopropanol 100 % est ajouté et la solution est centrifugée à 16 000 g pendant 20 min à température ambiante. Le culot obtenu est rincé avec 300 µL d'éthanol 70 % et une

**Tableau 8 : Récapitulatif des lignées transgéniques construites et utilisées**

	Nom de la lignée	Promoteur utilisé	Fusion	Position de l'étiquette	Transformation dans	Fond génétique utilisé	n° lignée	F2 résistance antibiotique	Signal western
ECT2 endogène	proECT2:ECT2	ECT2 Endogène (-2000pb av. ATG)	+ECT2 (CDS)	-	Col0, <i>ect2-1</i> , <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>	#10	67% (gentamicine)	Très faible X
							#13	69% (gentamicine)	Très faible X
	proECT2:YFP-ECT2	ECT2 Endogène	+YFP-ECT2	N-terminal	Col0, <i>ect2-1</i> , <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>	#5	74.6% (gentamicine)	Correct
							#15	62.3% (gentamicine)	Correct
							#16	52.3% (gentamicine)	Correct
							#17	51.4% (gentamicine)	Correct
	proECT2:ECT2-GFP	ECT2 Endogène	+ECT2-GFP	C-terminal	Col0, <i>ect2-1</i> , <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>	#50	72% (gentamicine)	Correct
#53							67% (gentamicine)	Correct	
ECT2 YTH muté (W464/W521/W526->A)	proECT2:ECT2***	ECT2 Endogène	+ ECT2***	-	Col0, <i>ect2-1</i> , <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>	#76	74% (gentamicine)	Correct
							#80	75% (gentamicine)	Correct
							#83	74% (gentamicine)	Correct
	proECT2:YFP-ECT2***	ECT2 Endogène	+YFP-ECT2***	N-terminal	Col0, <i>ect2-1</i> , <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>	#46	75% (gentamicine)	Correct
							#47	78.5% (gentamicine)	Correct
#52	76.3% (gentamicine)	Correct							
ECT2 phosphorésistante	proECT2:ECT2 S27A	ECT2 Endogène	+ECT2 S27A	-	Col0, <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>	En cours		
	proECT2:YFP-ECT2 S27A	ECT2 Endogène	+YFP-ECT2 S27A	N-terminal	Col0, <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>			
	proECT2:ECT2 Y461F	ECT2 Endogène	+ECT2 Y461F	-	Col0, <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>			
	proECT2:YFP+ECT2 Y461F	ECT2 Endogène	+YFP-ECT2 Y461F	N-terminal	Col0, <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>			
	proECT2:ECT2 S27A/Y461F	ECT2 Endogène	+ECT2 S27A/Y461F	-	Col0, <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>			
	proECT2:YFP+ECT2 S27A/Y461F	ECT2 Endogène	+YFP-ECT2 S27A/Y461F	N-terminal	Col0, <i>ect2-2</i>	<i>ect2-2</i>			

**Autres lignées utilisées**

Nom de la lignée	Promoteur utilisé	Fusion	Position de l'étiquette	Transformation dans	Provenance
proABI3:MTA	ABI3	+MTA	-	mutant <i>mta</i> (SALK_074069)	R. Fray, School of life sciences, Nottingham
proPAB2:RFP-PAB2	PAB2	+RFP-PAB2	N-terminal	Col0	Equipe (LGDP, Perpignan)
proUBI:DCP5-GFP	Ubiquitine 10	+DCP5-GFP	C-terminal	mutant <i>dcp5-1</i> (SAIL_008881)	D. Gagliardi, IBMP, Strasbourg

**Tableau 9 : Liste des amorces utilisées**

Les amorces sont classées en fonction de leur utilisation : géotypage, clonage, séquençage de plasmide (clonage) et RT-PCR. Les numéros après le symbole # dans la description des amorces utilisées en RT-PCR correspondent aux amorces schématisées en figure 20 pour les transcrits *ECT4*, *ECT5* et *ECT8*.

Numéro amorce	Description	Séquence 5'-3'	Utilisation
1150	RP ECT2-1	CCCTTCTCCTTCTTGCGGCT	Géotypage
1151	LP ECT2-1	GGGTCCTGATAACCAGCAGCCAA	Géotypage
1046	LP ECT2-2	CGCTCAAGTCTTCCAAATTG	Géotypage
1047	RP ECT2-2	GTCTTGCTGCTATGCTCCTTG	Géotypage
1048	RP ECT4-1	GCCTTGGATCCTTCTGTTTTC	Géotypage
1049	LP ECT4-1	CTTCCCCGGCTTCTATATTTG	Géotypage
1050	RP ECT4-2	AAAACGAAAAACAACCCAACC	Géotypage
1051	LP ECT4-2	AAGGCCACAGAAGAGGTTAGC	Géotypage
1181	LP ECT5-2	TTTGCAATTAGGATCTGCTTTTGTGCTG	Géotypage
1182	RP ECT5-2	ATGATCCATGAGCCGAGTGGCT	Géotypage
1173	RP ECT5-3	TATGAAAACCCACAGGCCAATGG	Géotypage
1174	LP ECT5-3	CTTCCATAGTTAGAACCCTGGCCA	Géotypage
1052	RP ECT8-1	GCCATTACCATTTCTTCTCCC	Géotypage
1053	LP ECT8-1	TCCAACGAACCATCAAGACC	Géotypage
1054	RP ECT8-2	AATCTGATCTCTCGGGAACG	Géotypage
1055	LP ECT8-2	TTCATCCCGATTTAAAGCTCC	Géotypage
358	LB SAIL	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	Géotypage
253	LB1.3 SALK	ATTTTGCCGATTTGCGAAC	Géotypage
1152	For CDS ECT2 (+ 5' SpeI Site)	CCCCACTAGTATGGCTACCGTTGCTCCTCCTG	Clonage
1153	Rev CDS ECT2 (+ 5' EcoRV site)	CCCCGATATCTTAGCAACCATTTGCCACCACATCG	Clonage
1179	Rev CDS ECT2 w/ STOP (+ 5' EcoRV site)	CCCCGATATCGCAACCATTTGCCACCACATCGC	Clonage
1156	For prom ECT2 (+5' EcoRV site)	CCCCGATATCGCTTTGCACCAATGTTCTCAACCG	Clonage
1157	Rev prom ECT2 (+5' KpnI site)	CCCCGGTACCGAGAGGAGATTCGACAAACAAGATTTGG	Clonage
1160	Seq For CDS ECT2 #1	TCTCTGCAAAACAACCTGCTGGTGT	Séq. plasmide
1161	Seq For CDS ECT2 #2	AGCGTGCCAGCCTTCATCAG	Séq. plasmide
1162	Seq For CDS ECT2 #3	GCGGATAACACATGTGTTGTTCTCTG	Séq. plasmide
1163	Seq For CDS ECT2 #4	GTGAAGGATGTGCCAAACAGTTTACTG	Séq. plasmide
1165	Seq Rev CDS ECT2 #5	TCATTCAAACCATCTACATTGTTCTCATTTCC	Séq. plasmide
1166	Seq Rev CDS ECT2 #6	AAACAGGTCTCTGCACATCAGAGTAC	Séq. plasmide
1216	Seq For prom ECT2 #1	GCAAGCAACGAACCAAGGGAAGA	Séq. plasmide
1217	Seq For prom ECT2 #2	AATATAAAGCGATATGAGCCTTTAGCTCT	Séq. plasmide
1218	Seq For prom ECT2 #3	AAACACACCTATAATAGAAAGCATGCCCT	Séq. plasmide
1219	Seq Rev prom ECT2 #4	TCCCTCTGATCAAATAGATCCACTAATC	Séq. plasmide
1220	Seq Rev prom ECT2 #5	TTACCTTTAGGATAAAAGGAAGTAAATTACCTTAG	Séq. plasmide
1221	Seq Rev prom ECT2 #6	CAATTGAGCTACAATGTTGGCGC	Séq. plasmide
1222	Seq Rev prom ECT2 #7	CTGATTACTCGTTTTGTTATTAGACTGGTGT	Séq. plasmide
1106	RT-PCR ECT2 For #1	TCTGTTGCAGAACTATCCTTGGAC	RT-PCR
1108	RT-PCR ECT2 For #2	TTGACACCAATGCTTCCCAGTG	RT-PCR
1164	RT-PCR ECT2 Rev #3	GAAAGATGGGACAGCCGCCAG	RT-PCR
1130	RT-PCR ECT2 Rev #4	TCGCCTGTGACTGGTTTAGC	RT-PCR
1109	RT-PCR ECT4 For #1	TCAAAGCTAGGACTTTGGAGATCCC	RT-PCR
1112	RT-PCR ECT4 Rev #2	CATACAGTCACTCTGATTCAATGGT	RT-PCR
1111	RT-PCR ECT4 For #3	CAGCCTGCATCCATGACAGG	RT-PCR
1110	RT-PCR ECT4 Rev #4	CGTTTTCTTCTCTTGCCTGCTTCT	RT-PCR
1171	RT-PCR ECT5 For #1	ATGGCAACGACTCAATCACACCT	RT-PCR
1232	RT-PCR ECT5 For #2	GTGGTCGTGGCCAGGGTCT	RT-PCR
1230	RT-PCR ECT5 Rev #3	CTGCCTGCAAAGATAAATGAGGCCA	RT-PCR
1114	RT-PCR ECT8 For #1	CTTCTCATGTTCCAAAACATCCTCGT	RT-PCR
1116	RT-PCR ECT8 For #2	GAGCAAGAACTCCTTCACGGG	RT-PCR
1115	RT-PCR ECT8 Rev #3	TTAACTCTGTGTTTCCCTCTTCTGACT	RT-PCR
1214	Actin7 RT-PCR For	CCAGGAATTGCTGACCGTAT	RT-PCR
1215	Actin7 RT-PCR Rev	GATTGATCCTCCGATCCAGA	RT-PCR

centrifugation de 5 min à 16 000 g. Après séchage, le culot est finalement repris dans 25 à 50 µL d'eau ultrapure ou dans une solution de 10 mM de Tris-HCl à pH 7,5. La solution d'ADN est stockée à 4°C avant utilisation.

### **III.1.2 – Amplification d'ADN par PCR**

Pour des applications de génotypage ou de criblage de colonies bactériennes, les amplifications d'ADN sont réalisées avec l'ADN polymérase GoTaq® G2 (Promega©). Les réactions sont effectuées dans un volume final de 20 µL contenant 1 µL d'une matrice ADN (50 à 200 ng) et 19 µL d'un mix de PCR (4 µL de tampon Green GoTaq® 5 X, 0,4 µL de mix dNTPs à 10 mM, 1 µL d'amorces sens et anti-sens à 10 µM, 0,2 µL de GoTaq® G2 à 5u/µL et de l'eau). Les amplifications ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur avec une première étape de dénaturation à 95°C pendant 3 min suivie de 25 à 30 cycles de dénaturation (30 sec à 95°C), d'hybridation (30 sec à T<sub>m</sub>) et d'élongation (72°C à 1 kb/min).

Pour des applications de clonage, les amplifications d'ADN ont été réalisées avec l'enzyme ADN polymérase Phusion® High-Fidelity (Thermo Scientific™). Les réactions sont effectuées dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant le tampon de réaction de l'enzyme Phusion® High-Fidelity et en appliquant des températures de 98°C aux étapes de dénaturation. Le temps d'élongation est calculé sur la base de 1 kb par 30 sec. Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 9.

### **III.1.3 – Électrophorèse sur gel et purification d'ADN en agarose**

Les produits PCR obtenus sont déposés sur gel d'agarose (1 X TAE, 0,8 % à 2 % Agarose) avant d'appliquer un courant de 100 V pendant 20 à 35 min. La taille des fragments est estimée à l'aide d'un marqueur de taille (1 Kb Plus DNA ladder, Invitrogen™). Selon les cas, la révélation des fragments d'ADN se fait soit en ajoutant 1 X d'agent GelRed™ (Interchim®) dans la solution d'agarose soit de façon post-migratoire en incubant le gel 20 min avec agitation dans une solution de révélation (100 mM NaCl, 3 X GelRed™). Les fragments sont ensuite visualisés sous banc UV (U:genius, Syngene). Pour les applications de clonage, les fragments d'intérêts sont découpés sur agarose à l'aide d'un rasoir. L'ADN y est ensuite purifié à l'aide du kit GENECLEAN® Turbo (MP Biomedicals™) selon les recommandations du fournisseur.

### **III.1.4 – Séquençage**

Pour vérifier la séquence des fragments amplifiés au cours d'étape de clonage ou pour identifier le site d'insertion de l'ADN-T de lignées mutantes à partir d'un produit PCR de

génotypage, des analyses de séquençage ont été réalisées. Pour chaque réaction, environ 150 ng d'ADN matrice et 2 µL d'amorce à 2 µM sont utilisés dans un volume de 10 µL. Le séquençage est ensuite réalisé par la plateforme du laboratoire (Michèle Laudié, LGDP, Perpignan) à l'aide du séquenceur ABI3130x1 Genetic Analyser (Applied Biosystems™). Les séquences obtenues sont visualisées et traitées à partir du logiciel GENEIOUS® (Biomatters Ltd).

### **III.2 – Méthodes relatives au clonage**

Les étapes de clonage moléculaire ont permis l'établissement de vecteurs binaires nécessaires à l'établissement des lignées transgéniques exprimant une protéine ECT2 dans sa version normale, une version mutée (ECT2<sup>\*\*\*</sup>) sur les trois tryptophanes de la cage aromatique du domaine YTH ainsi que des versions phosphorésistantes des résidus S27 et/ou Y461. Les séquences codantes des versions mutées d'ECT2 ont été directement synthétisées auprès de la société Biomatik (Canada) et reçues dans un vecteur pBlueScript II SK (+). Les codons TGG des tryptophanes 464, 521 et 526 ont été remplacés par des codons GCT codant une alanine. De même, le codon TCA de la sérine 27 a été remplacé par GCT et le codon TAT de la tyrosine 461 a été modifié en TTC codant une phénylalanine. Les vecteurs binaires ont été établis à partir d'un système Gateway nécessitant la construction de vecteurs receveurs et donneurs. Dans chacun des cas, les vecteurs receveurs ont été construits pour contenir la séquence d'un promoteur d'intérêt (ECT2 ou UBI) en amont de la cassette AttR de recombinaison alors que les vecteurs donneurs sont façonnés pour inclure entre les deux cassettes AttL, la séquence codante d'intérêt fusionnée ou non à la séquence d'une étiquette d'affinité ou de fluorescence. L'ensemble des vecteurs construits est présenté dans le tableau 10.

#### **III.2.1 – Digestion d'ADN par enzyme de restriction**

Les digestions enzymatiques ont été réalisées à partir de matrice ADN provenant de produits PCR (5 µL) ou d'ADN plasmidique (3 µg). Les réactions sont faites dans un volume final de 50 µL selon les recommandations du fournisseur des enzymes (New England BioLabs®) et contenant la matrice ADN, du tampon de digestion 1 X, 5 U d'enzyme et 0,1 µg/µL de BSA si nécessaire. La digestion se fait en 2 étapes de 45 min à 37°C où un mix de 10 µL, contenant l'autre moitié de la quantité d'enzyme ainsi que du tampon de digestion, est ajouté après la première incubation de 45 min. Les produits de digestion sont ensuite analysés sur gel d'agarose où des fragments peuvent y être purifiés à l'aide du kit GENE CLEAN® Turbo (MP Biomedicals™) selon les recommandations du fournisseur.



**Tableau 10 : Liste des vecteurs plasmidiques construits**

Insert	Source ADN	Plasmide d'insertion			Vecteur construit par ligation		
		Nom	Site de restriction 5'/3'	Etiquette et position	Numéro	Description	Résistance bactérie
<b>Vecteurs donneurs</b>							
CDS ECT2 (2 004 pb)	PCR (#1152-1153) sur ADNc	p326-donneur <sup>1</sup>	SpeI / EcoRV	-	p817	Donneur ECT2	Chloramphénicol
CDS ECT2	PCR (#1152-1153) sur ADNc	p686-donneur <sup>2</sup>	SpeI / EcoRV	YFP en 5'	p819	Donneur YFP-ECT2	Chloramphénicol
CDS ECT2 sans stop	PCR (#1152-1179) sur ADNc	p762-donneur <sup>3</sup>	SpeI / EcoRV	GFP en 3'	p827	Donneur ECT2-GFP	Chloramphénicol
CDS ECT2 muté YTH ***	Biomatik *	pBlueScript II SK(+)	-	-	p882	pBlueScript II SK(+) ECT2	Ampiciline
CDS ECT2 muté YTH ***	p888	p326-donneur <sup>1</sup>	SpeI / EcoRV	-	p883	Donneur ECT2***	Chloramphénicol
CDS ECT2 muté YTH ***	p888	p686-donneur <sup>2</sup>	SpeI / EcoRV	YFP en 5'	p885	Donneur YFP-ECT2***	Chloramphénicol
CDS ECT2 S27->A	Biomatik *	pBlueScript II SK(+)	-	-	p892	pBlueScript II SK(+) ECT2 S27->A	Ampiciline
CDS ECT2 S27->A	p892	p326-donneur <sup>1</sup>	SpeI / EcoRV	-	p895	Donneur ECT2 S27->A	Chloramphénicol
CDS ECT2 S27->A	p892	p686-donneur <sup>2</sup>	SpeI / EcoRV	YFP en 5'	p896	Donneur YFP-ECT2 S27->A	Chloramphénicol
CDS ECT2 Y461->F	Biomatik *	pBlueScript II SK(+)	-	-	p893	pBlueScript II SK(+) ECT2 Y461->F	Ampiciline
CDS ECT2 Y461->F	p893	p326-donneur <sup>1</sup>	SpeI / EcoRV	-	p897	Donneur ECT2 Y461->F	Chloramphénicol
CDS ECT2 Y461->F	p893	p686-donneur <sup>2</sup>	SpeI / EcoRV	YFP en 5'	p898	Donneur YFP-ECT2 Y461->F	Chloramphénicol
CDS ECT2 S27->A/Y461->F	Biomatik *	pBlueScript II SK(+)	-	-	p894	pBlueScript II SK(+) ECT2 S27->A/Y461->F	Ampiciline
CDS ECT2 S27->A/Y461->F	p894	p326-donneur <sup>1</sup>	SpeI / EcoRV	-	p899	Donneur ECT2 S27->A/Y461->F	Chloramphénicol
CDS ECT2 S27->A/Y461->F	p894	p686-donneur <sup>2</sup>	SpeI / EcoRV	YFP en 5'	p900	Donneur YFP- ECT2 S27->A/Y461->F	Chloramphénicol
<b>Vecteur receveur</b>							
Promoteur ECT2 (-2 000 pb av. ATG)	PCR (#1156-1157) sur ADNg + digestion EcoRV/KpnI	p770 <sup>4</sup>	Ecl136II / KpnI	-	p825	Receveur ProECT2-Gateway™	Spectinomycine

**Légende :**

\* : Synthèse auprès de la société Biomatik (Canada).

<sup>1</sup> : Plasmide dérivé d'un vecteur pBlueScript dans lequel une résistance au chloramphénicol a été insérée.

<sup>2</sup> : Plasmide dérivé de p326 dans lequel une étiquette YFP a été insérée entre les sites AttL1 et AttL2.

<sup>3</sup> : Plasmide dérivé de p326 dans lequel une étiquette GFP a été insérée entre les sites AttL1 et AttL2.

<sup>4</sup> : Plasmide dérivé d'un vecteur pPZP221 dans lequel un gène de résistance à la gentamicine et des cassettes de recombinaison AttR ont été insérés.

Plasmides		Vecteurs finaux obtenus par Gateway™			
Donneur	Receveur	Numéro	Nom	Resistance Bactérie / plante	
p817	p825	p829	ProECT2+ECT2	Spectinomycine / gentamicine	
p819	p825	p831	ProECT2+YFP-ECT2	Spectinomycine / gentamicine	
p827	p825	p833	ProECT2+ECT2-GFP	Spectinomycine / gentamicine	
p883	p825	p886	ProECT2+ECT2***	Spectinomycine / gentamicine	
p885	p825	p888	ProECT2+YFP-ECT2***	Spectinomycine / gentamicine	
p895	p825	p901	ProECT2+ECT2 S27->A	Spectinomycine / gentamicine	
p896	p825	p902	ProECT2+YFP-ECT2 S27->A	Spectinomycine / gentamicine	
p897	p825	p903	ProECT2+ECT2 Y461->F	Spectinomycine / gentamicine	
p898	p825	p904	ProECT2+YFP-ECT2 Y461->F	Spectinomycine / gentamicine	
p899	p825	p905	ProECT2+ECT2 S27->A/Y461->F	Spectinomycine / gentamicine	
p900	p825	p906	ProECT2+YFP-ECT2 S27->A/Y461->F	Spectinomycine / gentamicine	

### III.2.2 – Ligation d'ADN

Des fragments d'ADN digérés sont insérés par ligation dans des vecteurs plasmidiques préalablement digérés par les mêmes enzymes de restriction. La ligation s'effectue dans un volume de 10 µL contenant 1 µL d'ADN ligase T4 (Promega©) à 3 U/µL, 1 µL de tampon de ligation 10 X, l'ADN à insérer et d'ADN plasmidique. La quantité d'ADN à insérer est définie selon le calcul :  $\frac{Qv \times Ti}{Tv} \times 3$  (Qv : quantité en ng de vecteur plasmidique, Ti : taille de l'insert en kb, Tv : taille du vecteur en kb). Le mélange est incubé à 4°C pendant une nuit et un témoin sans ligase est effectué en parallèle.

### III.2.3 - Réaction de recombinaison par système Gateway

Des vecteurs plasmidiques binaires sont obtenus par recombinaison entre un plasmide dit donneur et un autre plasmide dit receveur. La recombinaison a lieu entre la zone définie par les bornes attL, délimitant le fragment d'intérêt dans le vecteur donneur, et la zone délimitée par les bornes attR contenant la cassette toxique *ccdB* dans le vecteur receveur. Les réactions de LR clonase sont effectuées dans un volume de 10 µL contenant 150 ng de vecteur receveur, 50 ng de vecteur donneur, 2 µL de LR Clonase™ II (Invitrogen™) et du tampon TE 1 X (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA). La solution est incubée 1 h à 25°C puis 1 µL de protéinase K (2 µg/µL) est ajouté avant une incubation de 10 min à 37°C. Le produit de réaction est ensuite utilisé pour la transformation bactérienne.

### III.2.4 – Transformation bactérienne et culture de sélection

Les produits de ligation ou de réaction Gateway sont insérés en système procaryote par transformation bactérienne. Les 10 µL des réactions de ligation ou de LR clonase sont ajoutées à 90 µL de solution de bactéries compétentes. Pour la souche d'*Escherichia coli* DH5α™, la solution est incubée 5 min sur glace avant être directement étalée sur milieu sélectif. Concernant la souche DB3.1™, la solution est incubée 5 min sur glace puis un choc thermique est appliqué par incubation à 42°C pendant 40 sec avant d'être de nouveau mis sur glace pendant 2 min. Après avoir ajouté 900 µL de LB liquide (25 g/L de LB) sans antibiotique de sélection, la solution est incubée 1 h à 37°C avec agitation (100 rpm). La culture est ensuite centrifugée 2 min à 2 000 g et le culot est repris dans 100 µL de LB liquide pour être étalé sur milieu sélectif. Dans tous les cas, la solution bactérienne est étalée sur deux boîtes en deux volumes différents (20 µL et 80 µL) pour éviter le développement d'un tapis bactérien. La sélection se fait sur milieu LB solide (35 g/L de LB-agar) supplémenté de l'antibiotique de sélection du vecteur utilisé. Les antibiotiques ont été

utilisés selon les concentrations suivantes : spectinomycine 100 µg/mL, chloramphénicol 50 µg/mL, ampicilline 100 µg/mL. Les boîtes sont ensuite incubées à 38°C pendant une nuit.

Les transformations dans *Agrobacterium tumefaciens* sont réalisées de la manière suivante : 500 ng d'ADN plasmidique est ajouté à 100 µL de solution bactérienne compétente. Un choc thermique est pratiqué en incubant la solution 5 min sur glace puis 5 min à 37°C. La solution est ensuite incubée 2 h à 28°C avec agitation rapide (100 rpm) en présence de 1 mL de LB liquide. Après une étape de centrifugation de 2 min à 6 000 g, le culot est repris dans 100 µL de LB liquide et la solution est étalée sur milieu sélectif. La sélection est faite avec deux anticorps de sélection de la souche (rifampicilline à 50 µg/mL, gentamicine à 25 µg/mL) ainsi qu'un antibiotique dépendant du vecteur inséré. Les boîtes sont finalement incubées à 28°C pendant 48h.

### **III.2.5 – Vérification des colonies positives et culture « minipreps »**

Après culture sur milieu sélectif, la présence du vecteur plasmique d'intérêt dans les souches bactériennes est vérifiée par crible PCR sur une dizaine de colonies. Une partie de chaque colonie est prélevée à l'aide d'un embout de pipette et est mélangée dans 20 µL d'eau stérile. La PCR est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (Partie III.1.2) avec 19 µL d'un mix de réactif PCR et 1 µL du mélange précédent. Les colonies positives sont ensuite mises en culture dans un petit volume (« miniprep ») en prélevant une autre partie de la colonie avec un embout de pipette qui sera plongé dans 5 mL de LB liquide supplémenté d'un antibiotique de sélection. La culture se fait avec agitation rapide (100 rpm) à 38°C pendant une nuit.

Avant de lancer une culture sur grand volume, une autre étape de vérification est effectuée à partir d'un profil de restriction à partir d'ADN bactérien des cultures minipreps. Pour cela, l'ADN bactérien est isolé de la manière suivante : 2 mL de miniculture est centrifugé 5 min à 5 000 g et le culot est repris dans 250 µL de tampon GTE (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM EDTA, 25 µg RNase A). La solution est ensuite incubée 3 min avec 250 µL de tampon de lyse (0,2 N NaOH, 0,2 % SDS) puis 250 µL de tampon High-Salt (3 M KAc, 1,8 M Acide formique) est ajouté et la solution est retournée plusieurs fois. À ce mélange, 750 µL de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) est ajouté puis la solution est centrifugée 5 min à 14 000 g. La phase supérieure est récupérée dans un nouveau tube et 700 µL d'isopropanol y est ajouté avant une centrifugation de 15 min à 14 000 g. Le culot est rincé dans 200 µL d'éthanol 70 % par une centrifugation de 5 min. Après séchage, le culot est repris dans 25 µL d'eau stérile. Finalement 5 µL de cette solution d'ADN est utilisée pour effectuer une digestion enzymatique (selon la méthode en III.2.1) en

sélectionnant des enzymes présentant des sites de coupures spécifiquement présents dans le vecteur d'intérêt.

### **III.2.6 – Culture « midipreps » et purification d'ADN plasmidique**

Les colonies avec des profils de restriction montrant l'insertion du vecteur plasmidique d'intérêt sont ensuite mises en cultures en grands volumes (« midipreps »). Pour cela, 1 mL de miniculture est ajouté dans 120 mL de LB liquide supplémenté de l'antibiotique de sélection adéquate. La culture est incubée une nuit à 38°C avec agitation rapide (140 rpm). L'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega©) selon les instructions du fournisseur. L'ADN contenu dans les 600 µL obtenu à l'étape finale est précipité 2 h à -20°C dans 2 volumes d'éthanol 100 % et 1/20<sup>e</sup> de volume d'acétate de sodium d'acétate de sodium (NaAc 3 M, pH 5,2). Après une centrifugation à 16 000 g pendant 20 min à 4°C, le culot est rincé 2 fois avec 500 µL d'éthanol 70 % avec une centrifugation pendant 5 min à 4°C puis finalement repris dans 100 µL de 10 mM de Tris-HCl à pH 8. La pureté et la concentration de l'ADN extrait sont vérifiées par dosage au spectrophotomètre Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific™).

## **III.3 – Méthodes relatives à l'ARN**

### **III.3.1 – Extraction d'ARN total et analyse sur gel d'électrophorèse**

La méthode d'extraction des ARN totaux est réalisée selon un protocole modifié de (Logemann et al., 1987) utilisant un tampon de guanidium (8 M Guanidium-HCl, 20 mM MES, 20 mM EDTA [pH 7], 5 % β-mercapto-éthanol ajouté au dernier moment). À partir d'environ 200 mg de poudre de tissus broyés, 700 µL de tampon de guanidium est ajouté et la solution est incubée 10 min sur la glace. Un volume d'une solution de phénol (pH 8)/Chloroforme/alcool isoamylique dans les proportions (25:24:1) est ajouté et la solution est mélangé au vortex pendant 30 sec. La solution est ensuite centrifugée à 16 000 g pendant 10 min à 16°C et la phase supérieure est récupérée pour une deuxième étape d'extraction avec un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique. La phase supérieure obtenue est alors récupérée et un volume de chloroforme est ajouté avant centrifugation à 16 000 g pendant 10 min à 16°C. Les ARN de la phase supérieure sont précipités pendant 20 min (ou une nuit) à -20°C avec 1 volume d'isopropanol et 1/20<sup>e</sup> de volume d'acide acétique 1M. Le mélange est finalement centrifugé à 16 000 g pendant 30 min à 4°C. Les culots obtenus sont rincés 2 fois avec 500 µL d'éthanol 70 % et par centrifugation à 16 000 g pendant 5 min à 4°C. Les ARN sont repris dans 30 à 50 µL d'eau RNase-free et sont dosés au spectrophotomètre Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific™).

La qualité des ARN extraits est vérifiée par migration sur gel d'électrophorèse (1,2 % Agarose, tampon MOPS 1X, 5,5% formaldéhyde). Le tampon MOPS est préparé initialement à 10X avec 0,2 M MOPS, 80 mM acétate de sodium, 10 mM EDTA ajusté à pH 7. Pour le dépôt, 1 µg d'ARN est dilué dans un volume de 10 µL final auquel 10 µL de tampon de charge est ajouté (50 % formamide, 6 % formaldéhyde, tampon MOPS 1 X, 10 % glycérol, 50X GelRed™, 0,025% xylène cyanol, 0,025 % bleu de bromophénol). Le mélange est incubé 5 min à 65 °C puis 5 min sur glace avant d'être déposé sur gel. La migration est effectuée dans du tampon MOPS 1 X à 130 V pendant 20 min.

### **III.3.2 – Traitement DNase**

Pour chaque réaction de DNase, jusqu'à 10 µg d'ARN total est traité à la fois. La réaction est effectuée dans un volume de 50 µL final comprenant les ARN extraits, 5 µL de tampon DNase 10 X et 1 µL (2 unités) de Turbo™ DNase (Invitrogen™). Le mélange est incubé 2 fois 30 min à 37°C en ajoutant 1 µL de Turbo™ DNase après la première étape de 30 min. Les ARN sont ensuite extraits comme précédemment (Partie III.3.1) en réalisant une seule étape de phénol/chloroforme/alcool isoamylique et une étape de chloroforme. Les ARN sont précipités avec 3 volumes d'éthanol 100 % et 0,3 M final d'acétate de sodium.

### **III.3.3 – Transcription inverse en ADNc et PCR (RT-PCR)**

Les réactions de transcription inverse (RT) ont été réalisées avec le kit SuperScript™ III (Invitrogen™) dans un volume final de 20 µL selon les instructions du fournisseur et pour chaque réaction 500 ng d'ARN traités DNase et 500 ng d'un oligo d(T)18 (Thermo Scientific™) sont utilisés. Pour tester la présence l'expression de certains transcrits dans des lignées mutantes ou pour amplifier un ADNc particulier, des réactions de PCR sont ensuite effectuées à partir de 1 µL de produit de RT comme matrice ADN et selon la méthode décrite en partie III.1.2.

## **III.4 – Méthodes relatives aux protéines**

### **III.4.1 – Extraction de protéines totales en conditions dénaturantes**

Le matériel biologique est préalablement broyé à l'azote liquide à l'aide d'un mortier, au Silamat S6 (Ivoclar Vivadent®) avec quatre billes de verre ou à l'aide d'un vibro-broyeur (MM400, Retsch®). La poudre obtenue est resuspendue dans du tampon Laemmli 4X (250 mM Tris-HCl [pH 6,8], 8 % SDS, 20 % glycérol, bleu de bromophénol, 5 % β-mercapto-éthanol ajouté au dernier moment) dans les proportions de 100 µL pour 300 mg de poudre. L'extrait est ensuite incubé 5

min à 95°C, 5 min sur glace puis 10 min à température ambiante avant d'être centrifugé 5 min à 16 000 g. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et conservé à -20°C avant utilisation.

### III.4.2 – Western Blot

Des gels de polyacrylamide d'une épaisseur de 1,5 mm sont préalablement préparés en deux couches. La couche inférieure, dite résolutive, est préparée à partir de 7,5 mL d'une solution (375 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1 % SDS, Acryl-bisacrylamide 29:1 avec un % à ajuster, selon la résolution désirée, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED). Les analyses impliquant la détection de la protéine ECT2 ont été faites à partir de gels avec 6,5 % de polyacrylamide. La couche supérieure, dite concentratrice, est préparée avec 2,5 mL d'une solution (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], 0,1 % SDS, 5 % Acryl-bisacrylamide (29:1), 0,1 % APS et 0,1 % TEMED). Entre 5 et 40 µL de solution est déposé par puits selon les applications et la taille des puits utilisés. Le poids moléculaire des protéines est estimé à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, Thermo Scientific™). La migration des protéines est réalisée dans un tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycine, 0,1 % SDS) à 50 V pendant 15 min puis 90 V au maximum pendant environ 2 h pour que le front de migration atteigne la limite inférieure du gel. L'étape suivante consiste à transférer les protéines sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (Immobilon PVDF 0,45 µm, Merck Millipore™). Pour chaque gel, une membrane (8 cm de long pour 5,5 cm de large) est incubée 15 sec dans l'éthanol 95 % puis rincée 5 min à l'eau. Le gel et la membrane sont incubés pendant 20 min à température ambiante avec agitation dans un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 20 % éthanol ajouté extemporanément) avant d'être placés dans un système « sandwich » encadrés de part et d'autre par deux couches de papier Whatman™ (GE Healthcare Life Sciences) et en plaçant le gel du côté du pôle négatif et la membrane du pôle positif. Le transfert à froid est effectué dans le tampon de transfert à un ampérage constant de 150 mA pendant 2 h. La membrane est ensuite séchée à l'air libre pendant 30 min, de nouveau activée par incubation de 15 sec dans l'éthanol 95 % puis incubée au minimum 1 h 30 dans une solution de saturation (7 % lait, 1 X TBS, 1 % Tween-20). Ensuite, la membrane est incubée dans une solution d'anticorps primaire à la dilution adéquate pendant une nuit avec agitation lente à 4°C. La membrane est rincée trois fois 10 min dans une solution de lavage (1 X TBS, 1 % Tween-20) puis incubée 45 min dans une solution d'anticorps secondaire à température ambiante avec agitation lente. Après 4 autres lavages dont le dernier dans une solution sans Tween-20, la membrane est incubée 5 min à température ambiante dans un mélange révélateur (Immobilon Chemiluminescent HRP substrate, Merck Millipore™). Le signal est finalement révélé en chambre

**Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés**

\* Production auprès de la société Eurogentec (Liège Belgique). pos. : position du peptide. ND : Non déterminé.

Protéine	Gène correspondant	Reconnaissance	Utilisation	Organisme de production	Taille théorique (kDa)	Provenance
<b>Anticorps primaires</b>						
ECT2	At3g13460	Peptide 1 (TVPSSRNQNYRSNSH) pos. 281-295	1/100e	Lapin	72,4	Eurogentec*
		Peptide 2 (TSSDVKVAENGSVAK) pos. 642-656	1/2 000e			
DHH1	At2g45810	Peptide 1 (GDPDNFQSRNPNPQQ) pos. 21-35	1/1 000e	Lapin	60,4	Eurogentec*
DHH3	At3g61240	Peptide 2 (SRRPQLPGNASNANE) pos. 67-81	1/1 500e	Lapin	56,7	Eurogentec*
DCP1	At1g08370	Peptide 1 (VNQKPKASSSKSEFE) pos. 140-154	1/500e	Lapin	40,6	Eurogentec*
LARP1	At5g21160	Peptide 2 (MAETEGSVADDRELI) pos. 2-16	1/500e	Lapin	92,3	Eurogentec*
PAB2/4/8	AT4g34110 / At2g23350 / At1g49760	ND	1/30 000e	Lapin	68,7 / 71,7 / 72,8	Dufresne et al, 2008
<b>Commerciaux</b>						
AGO1	AT1g48410	Peptide N-terminal (polyclonal)	1/2 000e	Lapin	116,4	Agrisera (ref. AS09 527-HRP)
UGP	AT3g03250	Protéine entière (polyclonal)	1/10 000e	Lapin	51,2	Agrisera (ref. AS14 2813)
YFP/GFP	-	GFP ( <i>Aequorea victoria</i> ) entière (monoclonal)	1/2 000e	Souris	27	Clontech (ref. JL-8)
Actine	ND	Protéine entière	1/600 000e	Souris	ND	Affinity BioReagents (ref. MA1-744)
<b>Anticorps secondaires</b>						
		Anti-lapin	1/7 500e	Chèvre	-	Bio-Rad (ref. 1706515)
		Anti-souris	1/5 000e	Chèvre	-	Bio-Rad (ref. 1721011)

noire en exposant la membrane sur un film radiographique (Pierce CL-Xposure™, Thermo Scientific™) et à l'aide d'une développeuse (Hyperprocessor Amersham pharmacia, GE Healthcare Life Sciences). Selon les besoins, la membrane peut être déshybridée en l'incubant 20 min avec agitation rapide dans une solution de déshybridation (ReBlot Plus Strong, Merck Millipore™). Après rinçage et blocage, la membrane peut ensuite être incubée avec une autre solution d'anticorps primaire.

### **III.4.3 – Anticorps**

La provenance et les conditions d'utilisation de chacun des anticorps utilisés sont listées dans le tableau 11. À noter que la majorité a été produite auprès de la société Eurogentec (Liège, Belgique) dans une campagne de production d'anticorps dirigés contre des peptides spécifiques.

## **IV – TECHNIQUES DE BIOCHIMIE**

### **IV.1 – Immunoprécipitation d'ARN en complexe avec une protéine étiquetée**

Les immunoprécipitations d'ARN à partir de complexe RNP (RIP) ont été réalisées à partir de 700 mg de poudre de tissus broyés repris dans 5,25 mL de tampon de lyse (100 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 0,5 % Igepal, 1 % plant protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®)). La solution est incubée 10 min sur la glace avant d'être centrifugée à 3 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et 3,75 mL d'extrait natif est incubé avec 40 µL de billes magnétiques GFP-trap® (ChromoTek) pendant 1 h 30 à 4°C avec rotation. En parallèle pour vérifier l'efficacité d'immunoprécipitation, 750 µL d'extrait est également incubé avec 7,5 µL de billes magnétiques GFP-trap® et les extraits issus de cet échantillon seront analysés par western blot. Après incubation, les billes sont lavées 6 fois 5 min sur une roue à 4°C avec 1 mL de tampon de lyse. Pour les échantillons de contrôle d'immunoprécipitation, l'élution est réalisée en ajoutant 20 µL de tampon Laemmli 4X et en incubant la solution 5 min à 95°C. Le surnageant est ensuite récupéré et sera analysé par western blot. Pour les immunoprécipitations d'ARN, l'élution est réalisée avec 400 µL de tampon guanidium (8 M Guanidium-HCl, 20 mM MES, 20 mM EDTA, pH 7) pendant 20 min à 4°C avec agitation puis la solution est précipitée une nuit à -20°C avec 800 µL d'éthanol 100 %. En parallèle, 200 µL d'extrait natif est précipité avec 400 µL de tampon guanidium et 800 µL d'éthanol 100 %. Après 45 min de centrifugation à 16 000 g à 4°C, le culot est repris dans 350 µL de tampon RLT (RNeasy Micro Kit, Qiagen). L'extraction d'ARN est ensuite réalisée selon les



instructions du fournisseur et l'extrait final est concentré dans 6  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free à l'aide du kit RNA clean and Concentrator™-5 (Zymo Research, ref R1015).

De la solution finale précédente, 1  $\mu\text{L}$  est déposé sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N+, GE HealthCare Life Sciences) pour les expériences de dot blot. Après une étape d'auto-crosslink UV (Stratalinker® UV crosslinker 1800, Stratagene), la membrane est incubée 2 h à température ambiante dans une solution de saturation (5 % lait, 1 % Tween-20) puis une nuit à 4°C avec agitation dans une solution d'anticorps primaire contenant de l'anti-m<sup>6</sup>A (Synaptic Systems) dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans la solution de saturation. La membrane est ensuite traitée et révélée de la même façon que décrit précédemment dans la partie III.4.2.

## **IV.2 – Séparation des polysomes par gradient de sucrose**

### **IV.2.1 – Préparation des gradients de sucrose**

La séparation des polysomes a été effectuée selon une méthode adaptée de (Mustroph et al., 2009) à partir d'un gradient de sucrose 15% – 60%. Les gradients sont préparés dans des tubes de 13 mL (polypropylene tube 14 x 89 mm, Beckman Coulter®) pour un volume de 9 mL représentant 4 couches successives à différentes concentrations de sucrose : 60 % (1,5 mL), 45 % (3 mL), 30 % (3 mL) et 15 % (1,5 mL). Chaque couche est préparée individuellement avec une composition de 1 X sucrose salts, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  chloramphénicol, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cycloheximide et 1,76 M (60 %), 1,32 M (45 %), 0,88 M (30%) ou 0,44 M (15 %) de Sucrose. Le tampon sucrose salts est préparé à 10 X avec la composition suivante : 0,4 M Tris-HCl [pH 8,4], 0,2 M KCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>. Les couches sont déposées dans le tube en partant de la plus concentrée (60% sucrose) à la moins concentrée (15 %) et en incubant le tube 1 h à -80°C entre chaque couche. Avant utilisation, les gradients sont décongelés sur une nuit à 4°C.

### **IV.2.2 – Séparation des polysomes et analyse des fractions**

La séparation des polysomes est effectuée à partir de poudre de tissus broyés repris dans 3 volumes (équivalent mg/ $\mu\text{L}$ ) de tampon d'extraction (200 mM Tris-HCl [pH 9], 200 mM KCl, 25 mM EDTA, 1 % Brij-35, 2 % Triton X-100, 1 % Igepal, 1 % Tween-20, 1 % Deoxycholate, 2 % PTE, 5 mM DTT, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cycloheximide, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  chloramphenicol, 1/1000<sup>e</sup> Mg132, 1/100<sup>e</sup> plant protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®)). Le mélange est incubé 10 min sur glace avant d'être centrifugé à 17 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et clarifié avec un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ . De cet extrait, 600  $\mu\text{L}$  (200 mg équivalent biomasse) a été utilisé et délicatement déposé avec une pipette à la surface du gradient de sucrose. Les tubes sont équilibrés à 0,05 g près avant d'être

centrifugés à 38 000 rpm pendant 3 h à 4°C avec un rotor (SW41, Beckman Coulter®) préalablement incubé à 4°C. Les profils de polysomes sont ensuite obtenus par analyse de l'absorbance à 254 nm avec un détecteur d'absorbance ISCO (Teledyne Technologies). Les valeurs d'absorbance sont enregistrées à l'aide du logiciel Peak Track et représentées sous forme de graphe sur Excel (Microsoft). Pour l'analyse de la présence de protéines dans les fractions polysomales, l'ensemble du gradient est divisé en 7 fractions de 1,2 mL et les protéines sont précipitées avec 2 volumes d'éthanol 100 % pendant 6 h à 4°C. Les fractions sont ensuite centrifugées à 16 000 g pendant 45 min à 4°C. Les culots sont lavés 2 fois par centrifugation de 5 min avec de l'éthanol 70 % et finalement repris dans du tampon Laemmli 4X avant d'être analysés par western blot.

### **IV.3 – Immunoprécipitation de protéines étiquetées avec ou sans traitement RNase et analyse des ARN**

Pour les expériences d'immunoprécipitations sans traitement RNase, le kit  $\mu$ MACS anti-GFP (Miltenyi Biotec) a été utilisé. Pour chaque réaction 250 mg de tissus broyés est repris dans 750  $\mu$ L de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% plant protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®)). La solution est clarifiée par 2 centrifugations de 15 000 g pendant 15 min à 4°C. Une portion de 50  $\mu$ L est conservée comme fraction de départ (Input) et 50  $\mu$ L de billes magnétiques anti-GFP est ajouté à 600  $\mu$ L d'extrait natif avant une étape d'incubation de 30 min à 4°C sur une roue. Pour chaque échantillon, une colonne du kit positionnée sur un socle magnétique est préparée en faisant passer 200  $\mu$ L de tampon de lyse puis la totalité de l'extrait natif est déposé sur la colonne retenant les billes magnétiques. Une portion de 50  $\mu$ L est conservée comme fraction non fixée. Les billes sont ensuite lavées 4 fois en déposant sur la colonne 200  $\mu$ L de tampon de lavage (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0,1% Triton X-100). Une élution dénaturante est réalisée en déposant sur la colonne 20  $\mu$ L de tampon Laemmli 4X préchauffé à 95°C. Après 5 min d'incubation, 50  $\mu$ L de tampon Laemmli 4X supplémentaire est ajouté et les fractions éluées sont récupérées. Les fractions de départ et non fixées sont précipitées avec 3 volumes d'éthanol 100 % à -20°C pendant une nuit. Après une centrifugation à 16 000 g pendant 20 min à 4°C, les culots sont rincés une fois à l'éthanol 70 % et repris dans 50  $\mu$ L de tampon Laemmli 4X. Chaque fraction est ensuite analysée par western blot où une même quantité de biomasse équivalente est déposée pour les fractions de départ et non fixées.

Pour les expériences d'immunoprécipitations couplées à un traitement RNase, un protocole utilisant des billes GFP-Trap™ (ChromoTek) a été utilisé. Pour chaque réaction, 700 mg

de tissus broyés est repris dans 5,25 mL de tampon de lyse (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0,5% Igepal, 1% plant protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®)). La solution est incubée à 4°C pendant 10 min sur une roue avant d'être centrifugée à 3 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est clarifié avec un filtre de 0,45 µm et des portions de 250 et 300 µL sont conservées comme fraction de départ pour les protéines et les ARN respectivement. L'extrait est ensuite séparé en 2 portions de 1,5 mL et 2 µL de RNAsin® (Promega) est ajouté dans la portion destinée à servir de témoin négative au traitement RNase. 15 µL de billes magnétiques GFP-Trap™ est ajouté dans chaque portion et les solutions sont incubées 30 min sur une roue à 4°C. Le traitement RNase est réalisé sur une des deux portions en ajoutant 40 µL de RNase A (400 µg), 10 µL de RNase T1 (10 000 u) et 1 µL de RNase I (100 u). En parallèle, l'échantillon non traité est supplémenté de 50 µL de tampon de lyse. Les extraits sont ensuite incubés pendant 1 h à 4°C sur une roue. Les billes sont ensuite isolées en plaçant les tubes sur un support magnétique (Adem-mag MSV, Ademtech) et des portions de 250 et 300 µL du surnageant sont conservés comme fractions non fixées pour les protéines et les ARN respectivement. Les billes sont lavées 6 fois 5 min sur roue avec 1 mL de tampon de lyse. Une élution dénaturante est réalisée en ajoutant 20 µL de tampon Laemmli 4X et avec une incubation de 5 min à 95°C. Les fractions conservées pour l'analyse des protéines sont précipitées avec 3 volumes d'éthanol 100 % sur la nuit à -20°C. Chaque fraction est finalement analysée par western blot. En parallèle, les ARN des autres fractions conservées sont extraits selon la méthode décrite en partie III.3.1 à partir d'un volume de guanidium et une étape seule étape d'extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Les échantillons finaux sont repris dans 20 µL de tampon urée (7M Urée, 0,025% xylène cyanol, 0,025 % bleu de bromophénol).

L'efficacité du traitement RNase est vérifiée à partir de gels de polyacrylamide (8,3 M urée, 6 % acryl-bisacrylamide 19:1, 1 X TBE, 0,1% APS, 0,1% Temed) selon la méthode suivante : le gel est préchauffé dans une étape de migration sans échantillon dans du TBE 1X pendant 1 h à 450 V. Les échantillons d'ARN sont incubés 5 min à 65°C puis 5 min sur glace avant d'être déposés sur le gel. La migration est effectuée à 450 V pendant 1 h puis environ 3 h à 600 V. Le gel est finalement incubé 20 min dans une solution de révélation (0,1 M NaCl, 3 X GelRed™) et les ARN sont visualisés sur un banc UV (U:genius, Syngene).

#### **IV.4 – Traitement phosphatase *in vitro***

Les réactions de traitement phosphatase ont été réalisées selon une méthode décrite (Peck, 2006) avec l'enzyme recombinante « lambda protein phosphatase » (λ-PPase, New England BioLabs®). Un extrait natif est d'abord préparé de la façon suivante : 100 mg de poudre de tissus

broyés est repris dans 1,5 mL de tampon de lyse (200 mM Tris-HCl [pH 9], 110 mM potassium acetate, 0,5 % Triton X-100, 0,1 % Tween-20, 1 % plant protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®), 5 mM DTT). Après une étape de centrifugation de 1 500 g pendant 2 min à 4°C, le surnageant est filtré au travers d'une couche de miracloth (Merck Millipore™) et transféré dans un nouveau tube. Les traitements sont réalisés dans un volume final de 80 µL comprenant : 50 µL d'extrait natif (3,3 mg équivalent biomasse), 8 µL de tampon λ-PPase 10X, 8 µL de MnCl<sub>2</sub> à 10 mM, 1 µL (400 u) d'enzyme λ-PPase et de l'eau ultrapure. Le tampon λ-PPase (50 mM HEPES [pH 7,5], 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,01 % Brij 35) ainsi que le MnCl<sub>2</sub> sont directement fournis avec l'enzyme λ-PPase à des concentrations de 10 X. En parallèle, deux autres échantillons sont préparés, le premier sans enzyme λ-PPase comme témoin négatif et le second contenant l'enzyme λ-PPase et 8 µL d'un mix d'inhibiteur de phosphatase 10 X (500 mM EDTA, 500 mM sodium fluoride (NaF), 20 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)). Les échantillons sont ensuite incubés 30 min à 30°C avant d'être précipités avec 3 volumes d'éthanol 100 % pendant une nuit à -20°C. Après une centrifugation de 16 000 g pendant 20 min à 4°C, les culots sont rincés 2 fois à l'éthanol 70 % par centrifugation de 16 000 g pendant 5 min à 4°C et finalement repris dans 10 µL de tampon Laemmli 4X. La totalité est ensuite déposée sur un gel de polyacrylamide pour être analysée par western blot.

## **V – ANALYSES OMIQUES**

### **V.1- Identification de partenaires protéiques par spectrométrie de masse**

#### **IV.1.1 – Stress et fixation des tissus par un crosslink au formaldéhyde**

L'identification des partenaires protéiques d'ECT2 a été réalisée sur des plantules entières Col0 (témoin négatif) ou exprimant YFP-ECT2 (mélange équivalent des lignées avec promoteur naturel F2 #5, #15 et #17), âgées de 14 jours et cultivées *in vitro* en condition normale. Pour le stress, les boîtes ont été incubées en enceinte Percival® pendant 30 min à 38°C ou 20°C (contrôle) avec les mêmes conditions de lumière (110 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) et d'humidité (60 %). Jusqu'à 8 g de plantules (équivalent à 4 boîtes carrées de 12 cm<sup>2</sup>) est ensuite enveloppé dans une poche formée de miracloth (Merck Millipore™). Les plantes sont rincées 3 fois avec 500 mL d'eau ultrapure (préalablement incubée à 20°C ou 38°C) puis sont fixées pendant 15 min sous vide dans 1 L de solution de fixation (1 % formaldéhyde) fraîchement préparée. Le vide est ensuite doucement cassé et la réaction de crosslink est désactivée en ajoutant 70 mL de glycine 2 M au mélange (0,125 M final) et en appliquant de nouveau le vide pour 5 min supplémentaire. Les plantes sont

finalement rincées 3 fois avec 500 mL d'eau ultrapure puis récupérées hors du miracloth avec une pince en éliminant l'excès d'eau et congelées à l'azote liquide. Après broyage, les tissus sont conservés à -80°C avant utilisation.

Concernant l'identification des modifications post-traductionnelles d'ECT2, les expériences de co-immunoprécipitations ont été menées à partir de tissus YFP-ECT2 traités dans les mêmes conditions de culture et de stress (30 min à 38°C ou 20°C) mais non traités par crosslink au formaldéhyde.

#### **IV.1.2 – Expériences de co-immunoprécipitation pour la spectrométrie de masse**

Pour chaque réaction, environ 1,7 g de tissus (équivalent à 3 mL de poudre dans un falcon de 15 mL) est repris dans 7,5 mL de tampon de lyse à stringence élevée (50 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM EDTA [pH 8], 1% SDS, 1 mM PMSF, 1% plant protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®)). Le mélange est incubé sur roue à 4°C pendant 30 min avec rotation rapide avant d'être filtré au travers de 2 couches de miracloth (Merck Millipore™). Le filtrat est transféré dans 6 tubes de 1,5 mL (Low-protein binding tubes, Eppendorf) et centrifugé à 16 000 g pendant 20 min à 4°C. Les surnageants sont récupérés dans de nouveaux tubes et sont traités sur glace au sonicateur (BioRuptor® UCD-200, Diagenode) pour 4 cycles de 20 sec (low setting) et 1 min de repos. Après centrifugation à 16 000 g pendant 10 min à 4°C, les extraits natifs sont transférés dans un tube falcon de 15 mL et un volume de tampon 2 X de réaction est ajouté (16,7 mM Tris-HCl [pH 8], 1,2 mM EDTA [pH 8], 167 mM NaCl, 1,1 % Triton X-100, 1% plant protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®)). À ce mélange, 7,5 µL de billes agarose GFP-trap® (ChromoTek) est ajouté puis la solution est incubée 5 h à 4°C sur roue avec agitation lente. Les billes sont ensuite récupérées par centrifugation à 400 g pendant 3 min à 4°C. Le surnageant est délicatement enlevé pour laisser environ 1 mL d'extrait au fond du tube. Les billes sont finalement lavées 3 fois par centrifugation à 400 g pendant 2 min à 4°C avec 1 mL de tampon de lavage (20 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA [pH 8], 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 1 mM PMSF). Après le dernier lavage, un maximum de surnageant est éliminé puis le tube est congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C avant analyse.

L'identification des partenaires protéiques d'ECT2 a été conduite en triplicat biologique avec pour chaque réplicat 20 réactions (20 fois 1,7 g) de Co-IP à partir de tissus Col0 (10 en condition normale et 10 en situation de stress thermique) ainsi que 20 autres pour les tissus YFP-ECT2 (10 en condition normale, 10 en stress thermique). Les billes issues du même réplicat et de la même condition pour chacun des géotypes ont néanmoins été réunies avant l'analyse par

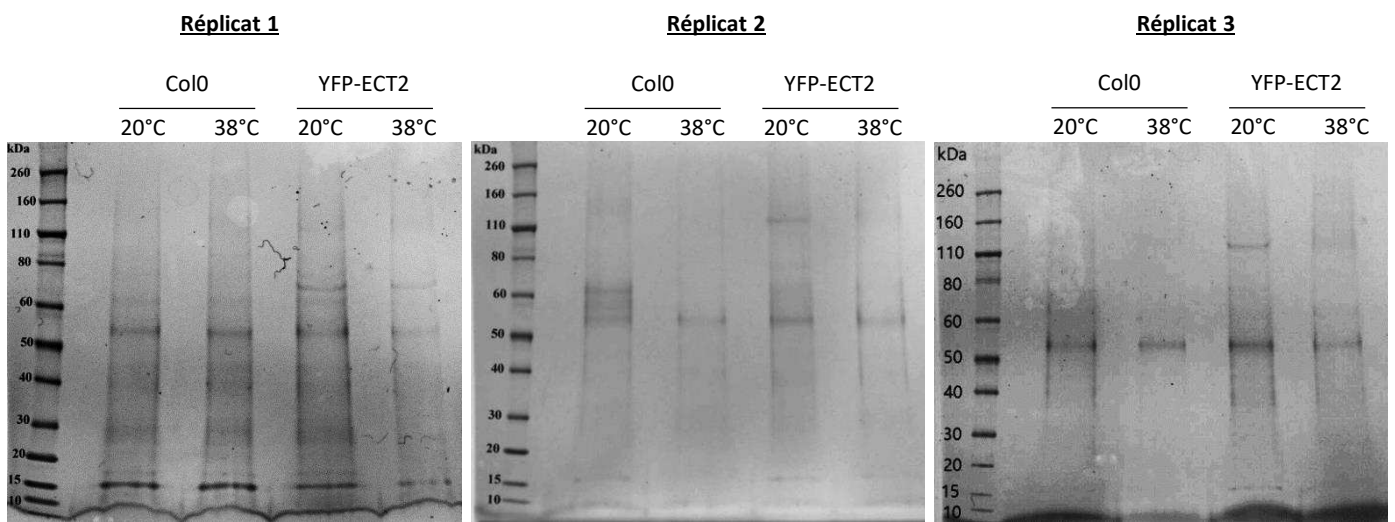
spectrométrie de masse. D'autre part, l'identification des modifications post-traductionnelles d'ECT2 a été menée à partir de 40 expériences indépendantes de Co-IP sur des tissus YFP-ECT2 en condition normale (20 réactions) ou après un stress thermique (20 réactions). Pour ces expériences, le tampon de lyse a été légèrement modifié pour contenir des inhibiteurs de phosphatase (10 mM d'EGTA [pH 8], 20 mM NaF et 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). De plus, les étapes finales de lavages des billes ont été réalisées avec un tampon dont la composition en NaCl a été respectivement de 500, 300 et 150 mM. Finalement, les billes issues de la même condition ont été réunies avant l'analyse de protéomique.

#### **IV.1.3 – Analyse de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)**

Les analyses ont été réalisées par la plateforme protéomique « FingerPrint Proteomic » (College of Life Science, Université de Dundee). Brièvement, pour isoler les protéines capturées sur les billes GFP-trap® et pour désactiver le crosslink au formaldéhyde, les billes sont incubées 20 min à 95°C avec du tampon dénaturant (SDS buffer = Laemmli). Les extraits sont ensuite migrés sur gel SDS-PAGE et le gel obtenu est coloré au bleu de Coomassie. Les gels obtenus des trois réplicats biologiques pour l'identification des partenaires d'ECT2 sont illustrés dans la figure 46. Chaque puits a été divisé en 5 parties qui ont été analysées indépendamment. Pour l'identification des modifications post-traductionnelles d'ECT2, seule la bande correspondant à YFP-ECT2 a été découpée (Figure 38-B). L'excès de sel et de détergent est ensuite éliminé par plusieurs séries de lavages puis les échantillons sont successivement réduits, alkylés et finalement digérés à la trypsine avant d'être analysés. Les analyses de spectrométrie de masse ont été conduites avec un LQT Orbitrap Velos Pro (Thermo Scientific™) et les données ont été générées en format raw.

#### **IV.1.4 – Traitement des données**

Les fichiers raw des 5 parties de chaque échantillon ont été regroupés et analysés à l'aide du logiciel MaxQuant (version 1.5.2.8) (Cox and Mann, 2008). L'identification des peptides a été réalisée à partir du protéome d'*Arabidopsis thaliana* issu de la base de données Uniprot.org. Les paramètres utilisés sur MaxQuant sont listés dans le tableau ci-après (p.223).



**Figure 46 : Gels d'électrophorèse obtenus des expériences de co-immunoprécipitations pour l'identification des partenaires d'ECT2**

Images des gels obtenus après migration des fractions immunoprécipitées avec des billes anti-GFP à partir d'extraits de plantes de 17 jours Col0 ou exprimant YFP-ECT2 et cultivées en condition normales ou incubées 30 min à 38°C. Les gels obtenus des 3 réplicats biologiques sont figurés. Les protéines sont visualisées par une coloration au bleu de Coomassie.

Paramètres	Sélection
Variable modifications	Oxidation (M), Acetyl (Potein N-term)
Fixed modifications	Carbamidomethyl
Maximum peptide charge	6
Max missed cleavage	4
Peptide FDR	0.01
Protein FDR	0.01
Minimum peptide length	6
Min. peptides	1
Min. unique peptides	0
Protein quantification	Use unique and razor peptides
Min. ratio count	2
I = L	Yes
Re-quantify	Yes
Label-free protein quantification	Yes (LFQ)
Match between runs	Yes

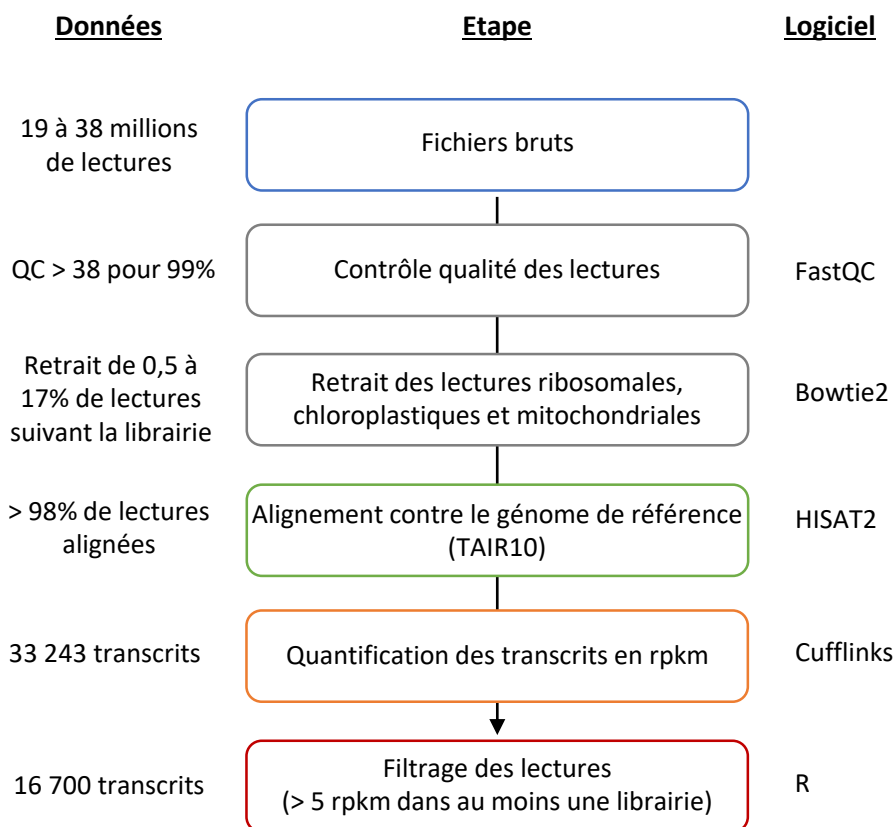
Dans un second temps, le fichier de sortie du logiciel MaxQuant regroupant les protéines identifiées a été analysé à l'aide du logiciel Perseus (version 1.5.3.1) (Tyanova et al., 2016). Une analyse statistique a été menée avec un test de Student à partir des données de quantification LFQ. Des graphes de type « volcano plot » ont été construits pour l'enrichissement de chaque protéine (par rapport à un échantillon contrôle) en fonction de la significativité du test statistique. La procédure détaillée est indiquée ci-dessous.

Paramètres	Sélection
Filter rows > based on categorical column	Only identified by sites + Reverse + Potential contaminant
Basic > Transform	Log2(x) on LFQ intensity
Imputation > Replace missing values from normal distribution	Width : 0,3. Down shift : 1,8
Annot. Rows > Categorical annotation rows	Rename the 3 replicates with same name (positive and control)
Misc. > Volcano plot	First group : positive, Second group : control, T-test, Side : Both, Number of randomizations : 250, FDR : 0,05, s0 : 2

## V.2 – Analyse de transcriptomique

L'analyse de transcriptomique a été menée sur des plantules de 17 jours cultivées *in vitro* dans une enceinte Percival® réglée avec des conditions classiques de culture. Deux semis ont été fait en parallèle faisant offices de réplicats biologiques. Après croissance, les boîtes toujours scellées ont été séparées en deux lots pour être incubées 15 min à 20°C ou à 38°C dans une autre





**Figure 47 : Présentation de la série d'analyses bio-informatiques pour l'approche de transcriptomique**

Au centre sont indiquées les étapes de l'analyse avec à droite le logiciel associé et à gauche les données obtenues à chaque étape. rpk : reads per kilobase per million reads mapped. QC : Quality Control.

enceinte Percival® avec les mêmes conditions de lumière ( $110 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et d'humidité (60%). Les plantes sont ensuite récoltées rapidement avec une pince et congelées dans l'azote liquide avant d'être broyées au vibro-broyeur et stockées à  $-80^\circ\text{C}$  avant utilisation.

### **V.2.1 – Extraction des d'ARN et séquençage**

Pour l'analyse de transcriptomique, deux populations d'ARN ont été utilisées, à savoir des ARN totaux et des ARN associés aux fractions des polysomes. L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir de 100 mg de poudre de tissus broyés à l'aide du kit RNeasy Micro Kit (Qiagen) incluant un traitement DNase sur colonne et selon les instructions du fournisseur. Les ARN associés aux polysomes ont été extraits après séparation des polysomes par gradient de sucrose selon la méthode décrite dans la partie Pour les ARN associés aux polysomes, l'extraction a été réalisée selon la méthode décrite dans la partie V.3.1. Pour chaque gradient de sucrose, 200 mg d'équivalent biomasse a été déposé. Après séparation, les fractions correspondant aux polysomes ont été récupérées et précipitées une nuit à  $-20^\circ\text{C}$  avec 2 volumes de tampon guanidium (8 M Guanidium-HCl, 20 mM MES, 20 mM EDTA, pH 7) et 3 volumes d'éthanol 100 %. Les extraits sont ensuite centrifugés à 16 000 g pendant 45 à  $4^\circ\text{C}$  et le culot est resuspendu dans 350  $\mu\text{L}$  de tampon RLT (RNeasy Micro Kit, Qiagen). L'extraction des ARN est ensuite réalisée à l'aide du kit RNeasy Micro Kit, (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Un traitement DNase a été effectué au cours de l'extraction des ARN totaux ou de polysomes avec la DNase du kit. La qualité des ARN extraits a été vérifiée à l'aide d'un bioanalyseur (Agilent 2100, Agilent). Par la suite, la construction des banques ainsi que le séquençage ont été réalisés par la société Fasteris (Genève, Suisse). Le kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina) a été utilisé pour la construction des banques. L'ensemble des librairies a été mis en commun après indexage et séquencé en single reads 50 (SR50) sur un HiSeq 4000 (Illumina). Les échantillons ont été séquencés en multiplexage au cours d'une même analyse.

### **V.2.2 – Traitement des données**

Les données de séquençage ont été analysées par la plateforme bio-informatique du laboratoire (Marie-Christine Carpentier & Christel Llauro, LGDP, Perpignan). Chaque banque de données a été traitée selon une série d'analyse (Figure 47) permettant de générer un tableau de comptage. Brièvement, les données brutes ont d'abord été filtrées avec le logiciel FastQC pour répondre à des critères de qualité. Près de 99 %, ont obtenu un Q score moyen de 38 sur une échelle de 40. Par la suite, un autre filtre avec le logiciel Bowtie2 a permis d'éliminer les séquences attribuées à des ARN ribosomiques, chloroplastiques et mitochondriaux. Entre 0,5 et 17 % ont été éliminés selon l'échantillon considéré. Les lectures ont ensuite été alignées sur le génome de

référence d'*Arabidopsis thaliana* (version TAIR10) à l'aide du logiciel HISAT2. La quantification des gènes en rpkms (reads per kilobase per million mapped reads) a été réalisée avec le logiciel Cufflinks. Finalement, les lectures ont été filtrées pour contenir au moins 5 rpkms dans au moins une librairie en utilisant le logiciel R. Le tableau de comptage final regroupant 16 700 transcrits a été analysé sur Excel (Microsoft).

## **VI – TECHNIQUES D'IMAGERIE**

### **VI.1 – Microscopie confocale**

Les localisations subcellulaires de protéines étiquetées ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal (LSM 700, Zeiss) sur des pointes de racines de plantules de 7 jours cultivées *in vitro*. La préparation des racines à observer a été réalisée de la façon suivante : des plantules entières de 7 jours sont transférées dans un puits d'une boîte de culture (Plaques de cultures 12 puits TPP, Dominique Dutscher) contenant 3 mL de milieu MS liquide (4,41 g MS/L, pH 5,7) et supplémenté selon les besoins de cycloheximide (100  $\mu$ M) ou de DMSO (0,1 %). Les boîtes sont ensuite incubées dans une enceinte Percival® réglée dans les conditions classiques de lumière et d'humidité avec une température de 20°C ou 38°C selon les applications. Après un temps d'incubation variant selon les applications, les plantes sont transférées dans 1 mL d'une solution de fixation (2 % paraformaldéhyde, tampon MTSB 1X (50 mM PIPES, 5 mM EGTA, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7) et 0,2 % Triton-X100) puis le tout est incubé sous vide pendant 5 min à l'aide d'une pompe à vide. La fixation est prolongée avec une agitation à température ambiante pendant 10 min. Les plantules sont ensuite rincées 2 fois 5 min dans 2 mL de tampon MTSB 1 X et conservées à 4°C avant observation. Les pointes de racines sont découpées à l'aide d'un rasoir et déposées dans une goutte d'eau du robinet entre lame et lamelle. Dans certains cas, des colorations DAPI ont été réalisées en déposant les racines dans une goutte d'une solution de coloration (1 X PBS pH 7, 0,1 % Triton-X100, DAPI 1  $\mu$ g/mL). Les longueurs d'ondes utilisées pour l'excitation et l'émission des étiquettes fluorescentes sont les suivantes : DAPI (405 nm / 420-480 nm), GFP (488 nm / 490-540 nm), RFP (561 nm / 580-640 nm), YFP (514 nm / 520-550 nm).

### **VI.2 – Observation de trichomes à la loupe binoculaire**

Les trichomes ont été observés à l'aide d'une loupe binoculaire (Olympus SZ60) sur la première paire de feuille de plantules de 3 semaines cultivées uniquement sur terreau en chambre de culture. Dans chacun des cas, le nombre de branches de chacun des trichomes a été déterminé

sur les deux feuilles et additionné pour avoir une seule donnée par plante. Les analyses statistiques ont été effectuées avec une version d'évaluation du logiciel XLSTAT (Addinsoft) où une ANOVA suivi d'un test de Dunnett en post-hoc, mesurant les différences entre la moyenne d'un groupe contrôle (plantes sauvages Col0) avec la moyenne de plusieurs autres groupes (autres génotypes) ont été réalisés.



# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Aguilo F. & Walsh M.J. (2017). The N6-Methyladenosine RNA modification in pluripotency and reprogramming. *Current Opinion in Genetics and Development*, 46; 77–82.
- Aguilo F., Zhang F., Sancho A., Wohlschlegel J.A., Wang J., Walsh M.J., Aguilo F., Zhang F., et al. (2015). Coordination of m6A mRNA Methylation and Gene Transcription by ZFP217 Regulates Pluripotency and Reprogramming. *Stem Cell*, 17; 1–16.
- Aik W., Scotti J.S., Choi H., Gong L., Demetriades M., Schofield C.J., & McDonough M.A. (2014). Structure of human RNA N6-methyladenine demethylase ALKBH5 provides insights into its mechanisms of nucleic acid recognition and demethylation. *Nucleic Acids Research*, 42 (7); 4741–4754.
- Aitken C.E. & Lorsch J.R. (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19 (6); 568–576.
- Aizer A., Kalo A., Kafri P., Shraga A., Ben-Yishay R., Jacob A., Kinor N., & Shav-Tal Y. (2014). Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. *Journal of Cell Science*, 127 (20); 4443–4456.
- Alarcón C.R., Goodarzi H., Lee H., Liu X., Tavazoie S., & Tavazoie S.F. (2015a). HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell*, 162 (6); 1299–308.
- Alarcón C.R., Lee H., Goodarzi H., Halberg N., & Tavazoie S.F. (2015b). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 519 (7544); 482–485.
- Alfano C., Sanfelice D., Babon J., Kelly G., Jacks A., Curry S., & Conte M.R. (2004). Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11 (4); 323–329.
- Amort T., Rieder D., Wille A., Khokhlova-Cubberley D., Riml C., Trixl L., Jia X.-Y., Micura R., & Lusser A. (2017). Distinct 5-methylcytosine profiles in poly(A) RNA from mouse embryonic stem cells and brain. *Genome Biology*, 18 (1); 1–16.
- Anderson P. & Kedersha N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*, 33 (3); 141–150.
- Aoki K., Adachi S., Homoto M., Kusano H., Koike K., & Natsume T. (2013). LARP1 specifically recognizes the 3' terminus of poly(A) mRNA. *FEBS Letters*, 587 (14); 2173–2178.
- Arciga-Reyes L., Wootton L., Kieffer M., & Davies B. (2006). UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis. *Plant Journal*, 47 (3); 480–489.
- Arribere J.A., Doudna J.A., & Gilbert W. V. (2011). Reconsidering movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and P bodies. *Molecular Cell*, 44 (5); 745–758.
- Batista P.J., Molinie B., Giallourakis C.C., Howard Y., Batista P.J., Molinie B., Wang J., Qu K., et al. (2014). m6A RNA Modification Controls Cell Fate Transition in Mammalian Embryonic Stem Cells. *Stem Cell*, 15 (6); 707–719.
- Batool A., Aashaq S., & Andrabi K.I. (2017). Reappraisal to the study of 4E-BP1 as an mTOR substrate – A normative critique. *European Journal of Cell Biology*, 96 (4); 325–336.
- Blagden S.P., Gatt M.K., Archambault V., Lada K., Ichihara K., Lilley K.S., Inoue Y.H., & Glover D.M. (2009). Drosophila Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. *Developmental Biology*, 334 (1); 186–197.
- Blumenthal J., Behar L., Elliott E., & Ginzburg I. (2009). Dcp1a phosphorylation along neuronal development and stress. *FEBS Letters*, 583 (1); 197–201.

- Bodi Z., Bottley A., Archer N., May S., & Fray R.G. (2015). Yeast m6A Methylated mRNAs Are Enriched on Translating Ribosomes during Meiosis, and under Rapamycin Treatment. *Plos One*, 10 (7); e0132090.
- Bodi Z., Zhong S., Mehra S., Song J., Graham N., Li H., May S., & Fray R.G. (2012). Adenosine Methylation in Arabidopsis mRNA is Associated with the 3' End and Reduced Levels Cause Developmental Defects. *Frontiers in Plant Science*, 3 (48); 1–10.
- Boissel S., Reish O., Proulx K., Kawagoe-Takaki H., Sedgwick B., Yeo G.S.H., Meyre D., Golzio C., et al. (2009). Loss-of-Function Mutation in the Dioxygenase-Encoding FTO Gene Causes Severe Growth Retardation and Multiple Malformations. *American Journal of Human Genetics*, 85 (1); 106–111.
- Bokar J.A., Rath-Shambaugh M.E., Ludwiczak R., Narayan P., & Rottman F. (1994). Characterization and partial purification of mRNA N6-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei: Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (26); 17697–17704.
- Bokar J.A., Shambaugh M.E., Polayes D., Matera A.G., & Rottman F.M. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 3 (11); 1233–47.
- Bousquet-Antonelli C. & Deragon J.-M. (2009). A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA*, 15 (5); 750–764.
- Braun J.E., 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 (12); 1324–1331.
- Bravo J., Aguilar-Henonin L., Olmedo G., & Guzmán P. (2005). Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of Arabidopsis thaliana Poly(A)-binding proteins. *Molecular Genetics and Genomics*, 272 (6); 651–665.
- Bregues M., Teixeira D., & Parker R. (2005). Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. *Science*, 310 (5747); 486–489.
- Breuer C., Braidwood L., & Sugimoto K. (2014). Endocycling in the path of plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 17 (1); 78–85.
- Buchan J.R., Muhlrad D., & Parker R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 183 (3); 441–455.
- Burgess A., David R., & Searle I.R. (2016). Deciphering the epitranscriptome: A green perspective. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58 (10); 822–835.
- Burrows C., Abd Latip N., Lam S.J., Carpenter L., Sawicka K., Tzolovsky G., Gabra H., Bushell M., Glover D.M., Willis A.E., & Blagden S.P. (2010). The RNA binding protein Larp1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic Acids Research*, 38 (16); 5542–5553.
- Cantara W.A., Crain P.F., Rozenski J., McCloskey J.A., Harris K.A., Zhang X., Vendeix F.A.P., Fabris D., & Agris P.F. (2011). The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Research*, 39 (Database issue); 195–201.
- Carlile T.M., Rojas-duran M.F., Zinshteyn B., Shin H., Bartoli K.M., & Gilbert W. V (2014). Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 515; 143–146.
- Castells-Roca L., García-Martínez J., Moreno J., Herrero E., Bellí G., & Pérez-Ortín J.E. (2011). Heat shock response in yeast involves changes in both transcription rates and mRNA stabilities. *PLoS ONE*, 6 (2); e17272.
- Chang E., Heo K.S., Woo C.H., Lee H., Le N.T., Thomas T.N., Fujiwara K., & Abe J.I. (2011). MK2 SUMOylation regulates actin filament remodeling and subsequent migration in endothelial cells by inhibiting MK2 kinase and HSP27 phosphorylation. *Blood*, 117 (8); 2527–2537.



- Charenton C., Taverniti V., Gaudon-Plesse C., Back R., Séraphin B., & Graille M. (2016). Structure of the active form of Dcp1–Dcp2 decapping enzyme bound to m7GDP and its Edc3 activator. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23 (11); 982–986.
- Chekulaeva M., Hentze M.W., & Ephrussi A. (2006). Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell*, 124 (3); 521–533.
- Chen T., Hao Y., Zhang Y., Li M., Wang M., Han W., & Wu Y. (2015). m6A RNA Methylation Is Regulated by MicroRNAs and Promotes Reprogramming to Pluripotency. *Stem Cell*, 16; 1–13.
- Chen W., Zhang L., Zheng G., Fu Y., Ji Q., Liu F., Chen H., & He C. (2014). Crystal structure of the RNA demethylase ALKBH5 from zebrafish. *FEBS Letters*, 588 (6); 892–898.
- Chen Y. & Varani G. (2013). Engineering RNA-binding proteins for biology. *FEBS Journal*, 280 (16); 3734–3754.
- Cherkasov V., Hofmann S., Druffel-Augustin S., Mogk A., Tyedmers J., Stoecklin G., & Bukau B. (2013). Coordination of translational control and protein homeostasis during severe heat stress. *Current Biology*, 23 (24); 2452–2462.
- Chernov K.G., Barbet A., Hamon L., Ovchinnikov L.P., Curmi P.A., & Pastré D. (2009). Role of microtubules in stress granule assembly: Microtubule dynamical instability favors the formation of micrometric stress granules in cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (52); 36569–36580.
- Choi J., Jeong K.-W., Demirci H., Chen J., Petrov A., Prabhakar A., O’Leary S.E., Dominissini D., Rechavi G., Soltis S.M., Ehrenberg M., & Puglisi J.D. (2016). N6-methyladenosine in mRNA disrupts tRNA selection and translation-elongation dynamics. *Nature Structural and molecular biology*, (August 2015).
- Church C., Moir L., McMurray F., Girard C., Banks G.T., Teboul L., Wells S., Brüning J.C., Nolan P.M., Ashcroft F.M., & Cox R.D. (2010). Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nature Genetics*, 42 (12); 1086–1092.
- Cléry A. & Frédéric H.-T.A. (2012). From Structure to Function of RNA Binding Domains. *RNA Binding Proteins*, (Chapter 9); 137–158.
- Clough S.J. & Bent A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16 (6); 735–743.
- Colcombet J. & Hirt H. (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413 (2); 217–226.
- Coller J. & Parker R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell*, 122 (6); 875–886.
- Cox J. & Mann M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26 (12); 1367–1372.
- Damgaard C.K. & Lykke-Andersen J. (2011). Translational coregulation of 5’TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes and Development*, 25 (19); 2057–2068.
- Darnell J.C., Van Driesche S.J., Zhang C., Hung K.Y.S., Mele A., Fraser C.E., Stone E.F., Chen C., et al. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, 146 (2); 247–261.
- David R., Burgess A., Parker B., Li J., Pulsford K., Sibbritt T., Preiss T., & Searle I.R. (2017). Transcriptome-Wide Mapping of RNA 5-Methylcytosine in *Arabidopsis* mRNAs and Noncoding RNAs. *The Plant Cell*, 29 (3); 445–460.
- Decker C.J. & Parker R. (2012). P-Bodies and Stress Granules : Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4; 1–16.
- Deragon J.-M. & Bousquet-Antonelli C. (2015). The role of LARP1 in translation and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6.

- Desrosiers R., Friderici K., & Rottman F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71 (10); 3971–5.
- Dickey L.L., Duncan J.K., Hanley T.M., & Fearn R. (2015). Decapping protein 1 phosphorylation modulates IL-8 expression during respiratory syncytial virus infection. *Virology*, 481; 199–209.
- Dobrenel T., Mancera-Martínez E., Forzani C., Azzopardi M., Davanture M., Moreau M., Schepetilnikov M., Chicher J., et al. (2016). The Arabidopsis TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6. *Frontiers in Plant Science*, 7 (1611); 1–16.
- Dominissini D., Moshitch-Moshkovitz S., Salmon-Divon M., Amariglio N., & Rechavi G. (2013). Transcriptome-wide mapping of N(6)-methyladenosine by m(6)A-seq based on immunocapturing and massively parallel sequencing. *Nature protocols*, 8; 176–89.
- Dominissini D., Moshitch-Moshkovitz S., Schwartz S., Salmon-Divon M., Ungar L., Osenberg S., Cesarkas K., Jacob-Hirsch J., Amariglio N., Kupiec M., Sorek R., & Rechavi G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485 (7397); 201–206.
- Dominissini D., Nachtergaele S., Moshitch-Moshkovitz S., Peer E., Kol N., Ben-Haim M.S., Dai Q., Di Segni A., et al. (2016). The dynamic N1-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 530 (7591); 441–446.
- Droillard M.J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., & Laurière C. (2002). Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in Arabidopsis thaliana cell suspensions: Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Letters*, 527 (1–3); 43–50.
- Du H., Zhao Y., He J., Zhang Y., Xi H., Liu M., Ma J., & Wu L. (2016). YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4–NOT deadenylase complex. *Nature Communications*, 7.
- Dufresne P.J., Ubalijoro E., Fortin M.G., & Laliberte J.F. (2008). Arabidopsis thaliana class II poly(A)-binding proteins are required for efficient multiplication of turnip mosaic virus. *Journal of General Virology*, 89 (9); 2339–2348.
- Edelheit S., Schwartz S., Mumbach M.R., Wurtzel O., & Sorek R. (2013). Transcriptome-Wide Mapping of 5-methylcytidine RNA Modifications in Bacteria, Archaea, and Yeast Reveals m5C within Archaeal mRNAs. *PLoS Genetics*, 9 (6).
- Edupuganti R.R., Geiger S., Lindeboom R.G.H., Shi H., Hsu P.J., Lu Z., Wang S.-Y., Baltissen M.P.A., et al. (2017). N6-methyladenosine (m6A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24 (10); 870–878.
- Eulalio A., Behm-Ansmant I., Schweizer D., & Izaurralde E. (2007). P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing. *Molecular and Cellular Biology*, 27 (11); 3970–3981.
- Evrard A., Kumar M., Lecourieux D., Lucks J., von Koskull-Döring P., & Hirt H. (2013). Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ*, 1 (e59).
- Fan J., Yang X., Wang W., Wood W.H., Becker K.G., & Gorospe M. (2002). Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (16); 10611–10616.
- Fenger-Grøn M., Fillman C., Norrild B., & Lykke-Andersen J. (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Molecular Cell*, 20 (6); 905–915.
- Fischer J., Koch L., Emmerling C., Vierkotten J., Peters T., Bruning J.C., & Ruther U. (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature*, 458; 894–898.
- Fonseca B.D., Zakaria C., Jia J.J., Graber T.E., Svitkin Y., Tahmasebi S., Healy D., Hoang H.D., et al. (2015). Lar-related protein 1 (LARP1) represses terminal oligopyrimidine (TOP) mRNA translation downstream of mTOR complex 1 (mTORC1). *Journal of Biological Chemistry*, 290 (26); 15996–16020.

- Fray R.G. & Simpson G.G. (2015). The Arabidopsis epitranscriptome. *Current Opinion in Plant Biology*, 27; 17–21.
- Fry N.J., Law B.A., Ilkayeva O.R., Holley C.L., & Mansfield K.D. (2017). N6-methyladenosine is required for the hypoxic stabilization of specific mRNAs. *RNA*, 23 (9); 1444–1455.
- Fu Y., Jia G., Pang X., Wang R.N., Wang X., Li C.J., Smemo S., Dai Q., et al. (2013). FTO-mediated formation of N6-hydroxymethyladenosine and N6-formyladenosine in mammalian RNA. *Nature communications*, 4 (1798).
- Fujisaki K. & Ishikawa M. (2008). Identification of an Arabidopsis thaliana protein that binds to tomato mosaic virus genomic RNA and inhibits its multiplication. *Virology*, 380 (2); 402–411.
- Fujita Y., Krause G., Scheffner M., Zechner D., Leddy H.E.M., Behrens J., Sommer T., & Birchmeier W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology*, 4 (3); 222–231.
- Furuichi Y. (2015). Discovery of m7G-cap in eukaryotic mRNAs. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 91 (8); 394–409.
- Fustin J.-M., Doi M., Yamaguchi Y., Hida H., Nishimura S., Yoshida M., Isagawa T., Morioka M.S., Takeya H., Manabe I., & Okamura H. (2013). RNA-Methylation-Dependent RNA Processing Controls the Speed of the Circadian Clock. *Cell*, 155 (4); 793–806.
- Gendreau E., Höfte H., Grandjean O., Brown S., & Traas J. (1998). Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the Arabidopsis thaliana hypocotyl. *Plant Journal*, 13 (2); 221–230.
- Gentilella A., Moro F.D., Fuentes P., Mene P., Kozma S.C., Thomas G., Fuentes P., Zweig-rocha G., & Rian F. (2017). Autogenous Control of 5'TOP mRNA Stability by 40S Ribosomes. *Molecular Cell*, 67; 55–70.
- Geula S., Moshitch-Moshkovitz S., Dominissini D., Mansour A.A., Kol N., Salmon-Divon M., Hershkovitz V., Peer E., et al. (2015). m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 347 (6225); 1002–1006.
- Goldstrohm A.C., Hook B.A., Seay D.J., & Wickens M. (2006). PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13 (6); 533–539.
- Gowrishankar G., Winzen R., Dittrich-Breiholz O., Redich N., Kracht M., & Holtmann H. (2006). Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biological Chemistry*, 387 (3); 323–327.
- Goyal M., Banerjee C., Nag S., & Bandyopadhyay U. (2016). The Alba protein family: Structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864 (5); 570–583.
- Gray M.C.M.W. (2000). Pseudouridine in RNA: What, Where, How, and Why. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 49 (5); 341–351.
- Gutierrez-Beltran E., Moschou P.N., Smertenko A.P., & Bozhkov P. V (2015). Tudor staphylococcal nuclease links formation of stress granules and processing bodies with mRNA catabolism in Arabidopsis. *The Plant cell*, 27 (3); 926–43.
- Harigaya Y., Tanaka H., Yamanaka S., Tanaka K., Watanabe Y., Tsutsumi C., Chikashige Y., Hiraoka Y., Yamashita A., & Yamamoto M. (2006). Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature*, 442 (7098); 45–50.
- Hausmann I.U., Bodi Z., Sanchez-Moran E., Mongan N.P., Archer N., Fray R.G., & Soller M. (2016). m6A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust Drosophila sex determination. *Nature*, 540 (7632); 301–304.
- Hess M.E. & Brüning J.C. (2014). The fat mass and obesity-associated (FTO) gene: Obesity and beyond? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842 (10); 2039–47.
- Hilgers V., Teixeira D., & Parker R. (2006). Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in Saccharomyces cerevisiae. *RNA*, 12 (10); 1835–1845.

- Holcik M. & Sonenberg N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (4); 318–327.
- Hong S., Freeberg M.A., Han T., Kamath A., Yao Y., Fukuda T., Suzuki T., Kim J.K., & Inoki K. (2017). LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *eLife*, 6; 1–24.
- Horiuchi K., Kawamura T., Iwanari H., Ohashi R., Naito M., Kodama T., & Hamakubo T. (2013). Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 288 (46); 33292–33302.
- Horiuchi K., Umetani M., Minami T., Okayama H., Takada S., Yamamoto M., Aburatani H., Reid P.C., Housman D.E., Hamakubo T., & Kodama T. (2006). Wilms' tumor 1-associating protein regulates G2/M transition through stabilization of cyclin A2 mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (46); 17278–17283.
- Hou C., Lee W., Chou H., Chen A., Chou S., & Chen H. (2016). Global Analysis of Truncated RNA Ends Reveals New Insights into Ribosome Stalling in Plants. *The Plant Cell*, 28 (10); 2398–2416.
- Hsu P.J., Zhu Y., Ma H., Guo Y., Shi X., Liu Y., Qi M., Lu Z., et al. (2017). Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, 27; 1115–1127.
- Hsu P.P., Kang S.A., Rameseder J., Zhang Y., Ottina K.A., Lim D., Peterson T.R., Choi Y., Gray N.S., Yaffe M.B., Marto J.A., & Sabatini D.M. (2011). The mTOR-Regulated Phosphoproteome Reveals a Mechanism of mTORC1-Mediated Inhibition of Growth Factor Signaling. *Science*, 332 (6035); 1317–1322.
- Hu W., Sweet T.J., Chamnongpol S., Baker K.E., & Collier J. (2009). Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 461 (7261); 225–229.
- Huang Y., Yan J., Li Q., Li J., Gong S., Zhou H., Gan J., Jiang H., Jia G.-F., Luo C., & Yang C.-G. (2015). Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m6A over ALKBH5. *Nucleic Acids Research*, 43 (1); 373–84.
- Hubner N.C., Bird A.W., Cox J., Splettstoesser B., Bandilla P., Poser I., Hyman A., & Mann M. (2010). Quantitative proteomics combined with BAC TransgeneOmics reveals in vivo protein interactions. *Journal of Cell Biology*, 189 (4); 739–754.
- Hubstenberger A., Courel M., Benard M., Souquere S., Ernoult-Lange M. le, Chouaib R., Yi Z., Morlot J.-B., et al. (2017). P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Molecular Cell*, 68; 144–157.
- Hülkamp M., Miséra S., & Jürgens G. (1994). Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell*, 76 (3); 555–566.
- Humphrey S.J., James D.E., & Mann M. (2015). Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26 (12); 676–687.
- Hunt A.G. (2014). The *Arabidopsis* polyadenylation factor subunit CPSF30 as conceptual link between mRNA polyadenylation and cellular signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 21; 128–132.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., & Shinozaki K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal*, 24 (5); 655–665.
- Ishida T., Kurata T., Okada K., & Wada T. (2008). A Genetic Regulatory Network in the Development of Trichomes and Root Hairs. *Annual Review of Plant Biology*, 59 (1); 365–386.
- Ivanova I., Much C., Giacomo M. Di, Carrieri C., & Enright A.J. (2017). The RNA m6A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence. *Molecular Cell*, 67; 1–9.
- Jackson R.J., Hellen C.U.T., & Pestova T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11 (2); 113–127.

- Jain S., Wheeler J.R., Walters R.W., Agrawal A., Barsic A., & Parker R. (2016). ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell*, 164 (3); 487–498.
- Jia G., Fu Y., & He C. (2013). Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation. *Trends in Genetics*, 29 (2); 108–115.
- Jia G., Fu Y., Zhao X., Dai Q., Zheng G., Yang Y., Yi C., Lindahl T., Pan T., Yang Y.-G., & He C. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, 7; 885–887.
- Kan L., Grozhik A. V., Vedanayagam J., Patil D.P., Pang N., Lim K.-S., Huang Y.-C., Joseph B., et al. (2017). The m6A pathway facilitates sex determination in *Drosophila*. *Nature Communications*, 8; 15737.
- Kang H.-J., Jeong S.-J., Kim K.-N., Baek I.-J., Chang M., Kang C.-M., Park Y.-S., & Yun C.-W. (2014). A novel protein, Pho92, has a conserved YTH domain and regulates phosphate metabolism by decreasing the mRNA stability of PHO4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 457 (3); 391–400.
- Kastenmayer J.P. & Green P.J. (2000). Novel features of the XRN-family in *Arabidopsis*: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (25); 13985–90.
- Kato M., Han T.W., Xie S., Shi K., Du X., Wu L.C., Mirzaei H., Goldsmith E.J., et al. (2012). Cell-free formation of RNA granules: Low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell*, 149 (4); 753–767.
- Ke S., Alemu E.A., Mertens C., Gantman E.C., Fak J.J., Mele A., Haripal B., Zucker-Scharff I., et al. (2015). A majority of m6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes and Development*, 29; 2037–2053.
- Ke S., Pandya-Jones A., Saito Y., Fak J.J., Vågbø C.B., Geula S., Hanna J.H., Black D.L., Darnell J.E., & Darnell R.B. (2017). m6A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover. *Genes and Development*, 31 (10); 990–1006.
- Kedersha N., Ivanov P., & Anderson P. (2013). Stress granules and cell signaling: More than just a passing phase? *Trends in Biochemical Sciences*, 38 (10); 494–506.
- Kedersha N., Stoecklin G., Ayodele M., Yacono P., Lykke-Andersen J., Fitzler M.J., Scheuner D., Kaufman R.J., Golan D.E., & Anderson P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *Journal of Cell Biology*, 169 (6); 871–884.
- Kennedy E.M., Courtney D.G., Tsai K., & Cullen B.R. (2017). Viral Epitranscriptomics. *Journal of Virology*, 91 (9); e02263-16.
- Kershaw C.J., Costello J.L., Castelli L.M., Talavera D., Rowe W., Sims P.F.G., Ashe M.P., Hubbard S.J., Pavitt G.D., & Grant C.M. (2015). The Yeast La Related Protein Sif1p Is a Key Activator of Translation during the Oxidative Stress Response. *PLoS Genetics*, 11 (1); e1004903.
- Kim H.S., Abbasi N., & Choi S.B. (2013). Bruno-like proteins modulate flowering time via 3'UTR-dependent decay of SOC1 mRNA. *New Phytologist*, 198 (3); 747–756.
- Kishore S., Lubner S., & Zavolan M. (2010). Deciphering the role of RNA-binding proteins in the post-transcriptional control of gene expression. *Briefings in Functional Genomics*, 9 (5–6); 391–404.
- Klann E. & Dever T.E. (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 5 (12); 931–942.
- Lageix S., Lanet E., Pouch-Pélissier M.-N., Espagnol M.-C., Robaglia C., Deragon J.-M., & Pélissier T. (2008). *Arabidopsis* eIF2 $\alpha$  kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biology*, 8 (134); 1–9.
- Lahiri S.K., Lu H., Mukherjee D., Yu L., & Zhao J. (2016). ERK2 phosphorylates Krüppel-like factor 8 protein at serine 48 to maintain its stability. *Am J Cancer Res*, 6 (5); 910–923.

- Lahr R.M., Fonseca B.D., Ciotti G.E., Al-Ashtal H.A., Jia J.J., Niklaus M.R., Blagden S.P., Alain T., & Berman A.J. (2017). La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs. *eLife*, 6; 1–15.
- Lahr R.M., Mack S.M., Héroux A., Blagden S.P., Bousquet-Antonelli C., Deragon J.M., & Berman A.J. (2015). The La-related protein 1-specific domain repurposes HEAT-like repeats to directly bind a 5'TOP sequence. *Nucleic Acids Research*, 43 (16); 8077–8088.
- Larkindale J. & Vierling E. (2007). Core Genome Responses Involved in Acclimation to High Temperature. *Plant Physiology*, 146 (2); 748–761.
- Lee S.R. & Lykke-Andersen J. (2013). Emerging roles for ribonucleoprotein modification and remodeling in controlling RNA fate. *Trends in Cell Biology*, 23 (10); 504–510.
- Lence T., Akhtar J., Bayer M., Schmid K., Spindler L., Ho C.H., Kreim N., Andrade-Navarro M.A., Poeck B., Helm M., & Roignant J.-Y. (2016). m6A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature*, 540 (7632); 242–247.
- Li A., Chen Y.-S., Ping X.-L., Yang X., Xiao W., Yang Y., Sun H.-Y., Zhu Q., et al. (2017). Cytoplasmic m6A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Research*, 1; 1–4.
- Li D., Zhang H., Hong Y., Huang L., Li X., Zhang Y., Ouyang Z., & Song F. (2014a). Genome-Wide Identification, Biochemical Characterization, and Expression Analyses of the YTH Domain-Containing RNA-Binding Protein Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32 (6); 1169–1186.
- Li X., Xiong X., Wang K., Wang L., Shu X., Ma S., & Yi C. (2016a). Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N1-methyladenosine methylome. *Nature Chemical Biology*, 12 (5); 311–316.
- Li X., Xiong X., & Yi C. (2016b). Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. *Nature Methods*, 14 (1); 23–31.
- Li Y., Dong O., Johnson K., & Zhang Y. (2011). MOS1 epigenetically regulates the expression of plant Resistance gene SNC1. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (3); 434–436.
- Li Y., Tessaro M.J., Li X., & Zhang Y. (2010). Regulation of the Expression of Plant Resistance Gene SNC1 by a Protein with a Conserved BAT2 Domain. *Plant Physiology*, 153 (3); 1425–1434.
- Li Y., Wang X., Li C., Hu S., Yu J., & Song S. (2014b). Transcriptome-wide N(6)-methyladenosine profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors involved in selective mRNA modification. *RNA biology*, 11 (9); 1180–8.
- Li Z., Weng H., Su R., Weng X., Zuo Z., Li C., Huang H., Nachtergaele S., et al. (2016c). FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N6-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer Cell*, 31; 1–15.
- Liang W., Li C., Liu F., Jiang H., Li S., Sun J., Wu X., & Li C. (2009). The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Research*, 19 (3); 307–316.
- Lien P.T.K., Izumikawa K., Muroi K., Irie K., Suda Y., & Irie K. (2016). Analysis of the physiological activities of Scd6 through its interaction with Hmt1. *PLoS ONE*, 11 (10); 1–19.
- Lin S., Choe J., Du P., Triboulet R., & Gregory R.I. (2016). The m6A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Molecular Cell*, 62 (3); 335–345.
- Little N. a, Hastie N.D., & Davies R.C. (2000). Identification of WTAP, a novel Wilms' tumour 1-associating protein. *Human molecular genetics*, 9 (15); 2231–9.
- Liu H. & Charng Y. (2013). Common and Distinct Functions of Arabidopsis Class A1 and A2 Heat Shock Factors in Diverse Abiotic Stress Responses and Development. *Plant Physiology*, 163 (1); 276–290.
- Liu H., Liao H.T., & Charng Y. (2011). The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, 34 (5); 738–751.

- Liu J. & Jia G. (2014). Methylation Modifications in Eukaryotic Messenger RNA. *Journal of Genetics and Genomics*, 41 (1); 21–33.
- Liu J., Yue Y., Han D., Wang X., Fu Y., Zhang L., Jia G., Yu M., et al. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature chemical biology*, 10 (2); 93–5.
- Liu N., Dai Q., Zheng G., He C., Parisien M., & Pan T. (2015). N6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA–protein interactions. *Nature*, 518 (7540); 560–564.
- Liu N., Zhou K.I., Parisien M., Dai Q., Diatchenko L., & Pan T. (2017). N6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Research*, 45 (10); 6051–6063.
- Liu X., Qin T., Ma Q., Sun J., Liu Z., Yuan M., & Mao T. (2013). Light-regulated hypocotyl elongation involves proteasome-dependent degradation of the microtubule regulatory protein WDL3 in Arabidopsis. *The Plant cell*, 25 (5); 1740–55.
- Logemann J., Schell J., & Willmitzer L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 163 (1); 16–20.
- Lorković Z.J., Wicczorek Kirk D.A., Klahre U., Hemmings-Mieszczak M., & Filipowicz W. (2000). RBP45 and RBP47, two oligouridylylate-specific hnRNP-like proteins interacting with poly(A)<sup>+</sup> RNA in nuclei of plant cells. *RNA*, 6 (11); 1610–24.
- Lovejoy A.F., Riordan D.P., & Brown P.O. (2014). Transcriptome-wide mapping of pseudouridines: Pseudouridine synthases modify specific mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE*, 9 (10); e110799.
- Luo G., Macqueen A., Zheng G., Duan H., Dore L.C., Lu Z., Liu J., Chen K., Jia G., Bergelson J., & He C. (2014). Unique features of the m6A methylome in Arabidopsis thaliana. *Nature communications*, 5 (5630).
- Luo S. & Tong L. (2014). Molecular basis for the recognition of methylated adenines in RNA by the eukaryotic YTH domain. *PNAS*, 111 (38); 13834–39.
- Maraia R.J., Mattijssen S., Cruz-Gallardo I., & Conte M.R. (2017). The La and related RNA-binding proteins (LARPs): Structures, functions, and evolving perspectives. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8 (6); e1430.
- Marnef A., Sommerville J., & Lodomery M.R. (2009). RAP55: insights into an evolutionarily conserved protein family. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41 (5); 977–981.
- Marnef A. & Standart N. (2010). Pat1 proteins: a life in translation, translation repression and mRNA decay. *Biochemical Society Transactions*, 38 (6); 1602–1607.
- Martínez-Pérez M., Aparicio F., López-Gresa M.P., Bellés J.M., Sánchez-Navarro J.A., & Pallás V. (2017). Arabidopsis m6A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m6A abundance in its genomic RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (40); 10755–60.
- Mathur J. & Chua N.H. (2000). Microtubule stabilization leads to growth reorientation in Arabidopsis trichomes. *The Plant cell*, 12 (4); 465–477.
- Mauer J., Luo X., Blanjoie A., Jiao X., Grozhik A. V., Patil D.P., Linder B., Pickering B.F., et al. (2017). Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 541 (7637); 371–375.
- Mazan-mamczarz K., Lal A., Jennifer L., Kawai T., Gorospe M., & Martindale J.L. (2006). Translational Repression by RNA-Binding Protein TIAR. *Molecular and cellular biology*, 26 (7); 2716–2727.
- Merret R., Carpentier M., Favory J., Picart C., Descombin J., Bousquet-Antonelli C., Tillard P., Lejay L., Deragon J., & Charng Y. (2017). Heat Shock Protein HSP101 Affects the Release of Ribosomal Protein mRNAs for Recovery after Heat Shock. *Plant physiology*, 174 (2); 1216–1225.
- Merret R., Descombin J., Juan Y.T., Favory J.J., Carpentier M.C., Chaparro C., Charng Y., Deragon J.-M., & Bousquet-Antonelli C. (2013). XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell Reports*, 5; 1279–1293.

- Merret R., Nagarajan V.K., Carpentier M.C., Park S., Favory J.J., Descombin J., Picart C., Charng Y., Green P.J., Deragon J.-M., & Bousquet-Antonelli C. (2015). Heat-induced ribosome pausing triggers mRNA co-translational decay in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 43 (8); 4121–4132.
- Messier V., Zenklusen D., & Michnick S.W. (2013). XA nutrient-responsive pathway that determines M phase timing through control of B-cyclin mRNA stability. *Cell*, 153 (5); 1080–1093.
- Meyer K.D. & Jaffrey S.R. (2017). Rethinking m6A Readers, Writers, and Erasers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 33; 13.1-13.24.
- Meyer K.D., Patil D.P., Zhou J., Zinoviev A., Skabkin M.A., Elemento O., Pestova T. V., Qian S.-B., & Jaffrey S.R. (2015). 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, 163; 1–12.
- Meyer K.D., Saletore Y., Zumbo P., Elemento O., Mason C.E., & Jaffrey S.R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 149 (7); 1635–1646.
- Meyuhas O. & Kahan T. (2015). The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849 (7); 801–811.
- Mielecki D., Zugaj D.Ł., Muszewska A., Piwowarski J., Chojnacka A., Mielecki M., Nieminuszczy J., Grynberg M., & Grzesiuk E. (2012). Novel AlkB Dioxygenases—Alternative Models for In Silico and In Vivo Studies. *PLoS ONE*, 7 (1); e30588.
- Motomura K., Le Q.T.N., Hamada T., Kutsuna N., Mano S., Nishimura M., & Watanabe Y. (2015). Diffuse decapping enzyme DCP2 accumulates in DCP1 foci under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 56 (1); 107–115.
- Mustroph A., Zanetti M.E., Jang C.J.H., Holtan H.E., Repetti P.P., Galbraith D.W., Girke T., & Bailey-Serres J. (2009). Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (44); 18843–18848.
- Nadezhdina E.S., Lomakin A.J., Shpilman A.A., Chudinova E.M., & Ivanov P.A. (2010). Microtubules govern stress granule mobility and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1803 (3); 361–371.
- Nakamura A., Sato K., & Hanyu-Nakamura K. (2004). *Drosophila* Cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA Translation in Oogenesis. *Developmental Cell*, 6 (1); 69–78.
- Narsai R., Howell K.A., Millar A.H., O'Toole N., Small I., & Whelan J. (2007). Genome-Wide Analysis of mRNA Decay Rates and Their Determinants in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 19 (11); 3418–3436.
- Nelson M.R., Leidal A.M., & Smibert C.A. (2004). *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *The EMBO Journal*, 23 (1); 150–159.
- Nichols J.L. (1979). N6-methyladenosine in maize poly(a)-containing rna. *Plant Science Letters*, 15; 357–361.
- Nissan T., Rajyaguru P., She M., Song H., & Parker R. (2010). Decapping Activators in *Saccharomyces cerevisiae* Act by Multiple Mechanisms. *Molecular Cell*, 39 (5); 773–783.
- Nykamp K., Lee M.-H., & Kimble J. (2008). *C. elegans* La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *RNA*, 14 (7); 1378–1389.
- Ohn T. & Anderson P. (2010). The role of posttranslational modifications in the assembly of stress granules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1 (3); 486–493.
- Ok S.H., Jeong H.J., Bae J.M., Shin J.-S., Luan S., & Kim K.-N. (2005). Novel CIPK1-associated proteins in *Arabidopsis* contain an evolutionarily conserved C-terminal region that mediates nuclear localization. *Plant physiology*, 139; 138–150.
- Olsen J. V., Blagoev B., Gnäd F., Macek B., Kumar C., Mortensen P., & Mann M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127 (3); 635–648.



- Ortega A., Niksic M., Bachi A., Wilm M., Sánchez L., Hastie N., & Valcárcel J. (2003). Biochemical function of female-lethal (2)D/Wilms' tumor suppressor-1-associated proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (5); 3040–3047.
- Paik I., Yang S., & Choi G. (2012). Phytochrome regulates translation of mRNA in the cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (4); 1335–40.
- Parcy F., Valon C., Raynal M., Gaubier-Comella P., Delseny M., & Giraudat J. (1994). Regulation of Gene Expression Programs during Arabidopsis Seed Development: Roles of the ABI3 Locus and of Endogenous Abscisic Acid. *The Plant Cell*, 6 (11); 1567–1582.
- Parker R. (2012). RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191 (3); 671–702.
- Parker R. & Sheth U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell*, 25 (5); 635–646.
- Patil D.P., Chen C.-K., Pickering B.F., Chow A., Jackson C., Guttman M., & Jaffrey S.R. (2016). m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537; 369–373.
- Pattanaik S., Patra B., Singh S.K., & Yuan L. (2014). An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 5 (259); 1–8.
- Pelechano V., Wei W., & Steinmetz L.M. (2015). Widespread co-translational RNA decay reveals ribosome dynamics. *Cell*, 161 (6); 1400–1412.
- Perazza D., Herzog M., Hülskamp M., Brown S., Dorne a M., & Bonneville J.M. (1999). Trichome cell growth in Arabidopsis thaliana can be derepressed by mutations in at least five genes. *Genetics*, 152 (1); 461–476.
- Perea-Resa C., Carrasco-López C., Catalá R., Turečková V., Novak O., Zhang W., Sieburth L., Jiménez-Gómez J.M., & Salinas J. (2016). The LSM1-7 Complex Differentially Regulates Arabidopsis Tolerance to Abiotic Stress Conditions by Promoting Selective mRNA Decapping. *The Plant Cell*, 28 (2); 505–520.
- Perry R.P. & Kelley D.E. (1974). Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells. *Cell*, 1 (1); 37–42.
- Ping X.-L., Sun B.-F., Wang L., Xiao W., Yang X., Wang W.-J., Adhikari S., Shi Y., et al. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell research*, 24; 177–89.
- Poornima G., Shah S., Vignesh V., Parker R., & Rajyaguru P.I. (2016). Arginine methylation promotes translation repression activity of eIF4G-binding protein, Scd6. *Nucleic Acids Research*, 44 (19); 9358–9368.
- Presnyak V., Alhusaini N., Chen Y.H., Martin S., Morris N., Kline N., Olson S., Weinberg D., Baker K.E., Graveley B.R., & Collier J. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, 160 (6); 1111–1124.
- Presnyak V. & Collier J. (2013). The DHH1/RCKp54 family of helicases: An ancient family of proteins that promote translational silencing. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829 (8); 817–823.
- Protter D.S.W. & Parker R. (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in Cell Biology*, 26 (9); 668–679.
- Quenault T., Lithgow T., & Traven A. (2011). PUF proteins: Repression, activation and mRNA localization. *Trends in Cell Biology*, 21 (2); 104–112.
- Radhakrishnan A., Chen Y.H., Martin S., Alhusaini N., Green R., & Collier J. (2016). The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. *Cell*, 167; 122–132.
- Rafalska I., Zhang Z., Benderska N., Wolff H., Hartmann A.M., Brack-Werner R., & Stamm S. (2004). The intranuclear localization and function of YT521-B is regulated by tyrosine phosphorylation. *Human Molecular Genetics*, 13 (15); 1535–1549.

- Rajyaguru P., She M., & Parker R. (2012). Scd6 Targets eIF4G to Repress Translation: RGG Motif Proteins as a Class of eIF4G-Binding Proteins. *Molecular Cell*, 45 (2); 244–254.
- Reichel M., Liao Y., Rettel M., Ragan C., Evers M., Alleaume A.-M., Horos R., Hentze M.W., Preiss T., & Millar A.A. (2016). In planta determination of the mRNA-binding proteome of Arabidopsis etiolated seedlings. *The Plant Cell*, 28; 2435–2452.
- Roberts J.D., Thapaliya A., Martínez-Lumbreras S., Kryzstofinska E.M., & Isaacson R.L. (2015). Structural and Functional Insights into Small, Glutamine-Rich, Tetratricopeptide Repeat Protein Alpha. *Frontiers in molecular biosciences*, 2 (71).
- Romero-santacreu L., Moreno J., Perez-Ortin J.E., & Alepuz P. (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 15; 1110–1120.
- Roost C., Lynch S.R., Batista P.J., Qu K., Chang H.Y., Kool E.T., Roost C., Lynch S.R., Batista P.J., Qu K., Chang H.Y., & Kool E.T. (2015). Structure and Thermodynamics of N6-methyladenosine in RNA : a Spring-Loaded Base Modification. *Journal of the american chemical society*, 137 (5); 2107–2115.
- Roundtree I.A., Evans M.E., Pan T., & He C. (2017). Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*, 169 (7); 1187–1200.
- Roux M.E., Rasmussen M.W., Palma K., Lolle S., Regué À.M., Bethke G., Glazebrook J., Zhang W., Sieburth L., Larsen M.R., Mundy J., & Petersen M. (2015). The mRNA decay factor PAT1 functions in a pathway including MAP kinase 4 and immune receptor SUMM2. *The EMBO Journal*, 34 (5); 593–608.
- Rudrabhatla P., Reddy M.M., & Rajasekharan R. (2006). Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/ tyrosine-specific protein kinases. *Plant Molecular Biology*, 60 (2); 293–319.
- Růžička K., Zhang M., Campilho A., Bodi Z., Kashif M., Saleh M., Eeckhout D., El-Showk S., et al. (2017). Identification of factors required for m6A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytologist*, 215 (1); 157–172.
- Safra M., Nir R., Farouq D., Slutzkin I.V., & Schwartz S. (2017). TRUB1 is the predominant pseudouridine synthase acting on mammalian mRNA via a predictable and conserved code. *Genome Research*, 27 (3); 393–406.
- Schenk L., Meinel D.M., Strässer K., & Gerber A.P. (2012). La-motif-dependent mRNA association with Slf1 promotes copper detoxification in yeast. *RNA*, 18 (3); 449–461.
- Schnittger A. & Hulskamp M. (2002). Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357 (1422); 823–826.
- Schwartz S., Agarwala S.D., Mumbach M.R., Jovanovic M., Mertins P., Shishkin A., Tabach Y., Mikkelsen T.S., et al. (2013). High-Resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation program in yeast meiosis. *Cell*, 155 (6); 1409–1421.
- Schwartz S., Bernstein D., Mumbach M.R., Jovanovic M., Herbst R.H., Leon-Ricardo B.X., Engreitz J.M., Guttman M., Satija R., Lander E.S., Fink G., & Regev A. (2014a). Transcriptome-wide Mapping Reveals Widespread Dynamic-Regulated Pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*.
- Schwartz S., Mumbach M.R., Jovanovic M., Wang T., Maciag K., Bushkin G.G., Mertins P., Ter-Ovanesyan D., et al. (2014b). Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Reports*, 8 (1); 284–296.
- Scutenaire J. (2014). Identification of specific “readers” for the RNA modification N6 -methyladenosine in *Arabidopsis thaliana*.
- Serna L. & Martin C. (2006). Trichomes: different regulatory networks lead to convergent structures. *Trends in Plant Science*, 11 (6); 274–280.
- Sesma A., Castresana C., & Castellano M.M. (2017). Regulation of Translation by TOR, eIF4E and eIF2 $\alpha$  in Plants: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8 (644); 1–7.

- Shankar a, Agrawal N., Sharma M., Pandey a, & Pandey G.K. (2015). Role of protein tyrosine phosphatases in plants. *Current Genomics*, 16 (4); 224–236.
- Sharova L. V., Sharov A.A., Nedorezov T., Piao Y., Shaik N., & Ko M.S.H. (2009). Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Research*, 16 (1); 45–58.
- Shen L., Liang Z., Gu X., Chen Y., Teo Z.W.N., Hou X., Cai W.M., Dedon P., Liu L., & Yu H. (2016). N6-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 38 (2); 1–15.
- Sheth U. & Parker R. (2007). Targeting of Aberrant mRNAs to Cytoplasmic Processing Bodies. *Cell*, 125 (6); 1095–1109.
- Shi H., Wang X., Lu Z., Zhao B.S., Ma H., Hsu P.J., & He C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*, 27 (3); 315–328.
- Shi Y., Mowery R.A., Ashley J., Hentz M., Ramirez A.J., Bilgicer B., Slunt-Brown H., Borchelt D.R., & Shaw B.F. (2012). Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. *Protein Science*, 21 (8); 1197–1209.
- Shoemaker C.J. & Green R. (2012). Translation drives mRNA quality control. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19 (6); 594–601.
- Śledź P. & Jinek M. (2016). Structural insights into the molecular mechanism of the m6A writer complex. *eLife*, 5 (e18434); 1–16.
- Soma F., Mogami J., Yoshida T., Abekura M., Takahashi F., Kidokoro S., Mizoi J., Shinozaki K., & Yamaguchi-Shinozaki K. (2017). ABA-unresponsive SnRK2 protein kinases regulate mRNA decay under osmotic stress in plants. *Nature Plants*, 3 (16204); 1–8.
- Sorenson R. & Bailey-Serres J. (2014). Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (6); 2373–8.
- Souret F., Kastenmayer J.P., & Green P.J. (2004). AtXRN4 Degrades mRNA in Arabidopsis and Its Substrates Include Selected miRNA Targets. *Molecular Cell*, 15; 173–183.
- Spitale R.C., Flynn R.A., Zhang Q.C., Crisalli P., Lee B., Jung J.-W., Kuchelmeister H.Y., Batista P.J., Torre E.A., Kool E.T., & Chang H.Y. (2015). Structural imprints in vivo decode RNA regulatory mechanisms. *Nature*, 519 (7544); 486–490.
- Spriggs K.A., Bushell M., & Willis A.E. (2010). Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Molecular Cell*, 40 (2); 228–237.
- Squires J.E., Patel H.R., Nusch M., Sibbritt T., Humphreys D.T., Parker B.J., Suter C.M., & Preiss T. (2012). Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Research*, 40 (11); 5023–5033.
- Stebbins-Boaz B., Cao Q., de Moor C.H., Mendez R., & Richter J.D. (1999). Maskin Is a CPEB-Associated Factor that Transiently Interacts with eIF-4E. *Molecular Cell*, 4 (6); 1017–1027.
- Stoilov P., Rafalska I., & Stamm S. (2002). YTH: A new domain in nuclear proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 27 (10); 495–497.
- Stoneley M. & Willis A.E. (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene*, 23 (18); 3200–3207.
- Su C., Gao X., Yang W., Zhao Y., Fu X., Cui X., Zhang C., Xin L., et al. (2017). Phosphorylation of Tudor-SN, a novel substrate of JNK, is involved in the efficient recruitment of Tudor-SN into stress granules. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864 (3); 562–571.

- Sugiyama N., Nakagami H., Mochida K., Daudi A., Tomita M., Shirasu K., & Ishihama Y. (2008). Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. *Molecular Systems Biology*, 4 (193); 1–7.
- Sweet T., Boyer B., Hu W., Baker K.E., & Collier J. (2007). Microtubule disruption stimulates P-body formation. *RNA*, 13 (4); 493–502.
- Sweet T., Kovalak C., & Collier J. (2012). The dead-box protein dhh1 promotes decapping by slowing ribosome movement. *PLoS Biology*, 10 (6); e1001342.
- Tanabe A., Tanikawa K., Tsunetomi M., Takai K., Ikeda H., Konno J., Torigoe T., Maeda H., Kutomi G., Okita K., Mori M., & Sahara H. (2016). RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which HIF-1a mRNA is translated. *Cancer Letters*, 376 (1); 34–42.
- Tanaka K.J., Ogawa K., Takagi M., Imamoto N., Matsumoto K., & Tsujimoto M. (2006). RAP55, a cytoplasmic mRNP component, represses translation in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (52); 40096–40106.
- Tat T.T., Maroney P.A., Chamnongpol S., Collier J., & Nilsen T.W. (2016). Cotranslational microRNA mediated messenger RNA destabilization. *eLife*, 5 (e12880); 1–18.
- Tcherkezian J., Cargnello M., Romeo Y., Huttlin E.L., Lavoie G., Gygi S.P., & Roux P.P. (2014). Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5' TOP mRNA translation. *Genes and Development*, 28; 357–371.
- Theler D., Dominguez C., Blatter M., Boudet J., & Allain F.H.T. (2014). Solution structure of the YTH domain in complex with N6-methyladenosine RNA : a reader of methylated RNA. *Nucleic Acids Research*, 42 (22); 13911–19.
- Tian J., Han L., Feng Z., Wang G., Liu W., Ma Y., Yu Y., & Kong Z. (2015). Orchestration of microtubules and the actin cytoskeleton in trichome cell shape determination by a plant-unique kinesin. *eLife*, 4 (e09351); 1–22.
- Tian T., Liu Y., Yan H., You Q., Yi X., Du Z., Xu W., & Su Z. (2017). AgriGO v2.0: A GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 45; W122–W129.
- Tucker M., Staples R.R., Valencia-sanchez M.A., Muhlrads D., & Parker R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p / Pop2p / Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 21 (6); 1427–1436.
- Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M.Y., Geiger T., Mann M., & Cox J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13 (9); 731–740.
- Ubersax J.A. & Ferrell Jr J.E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (7); 530–541.
- Valverde R., Edwards L., & Regan L. (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS Journal*, 275 (11); 2712–2726.
- Vespa L., Vachon G., Berger F., Perazza D., Faure J.-D., & Herzog M. (2004). The immunophilin-interacting protein AtFIP37 from Arabidopsis is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. *Plant physiology*, 134 (4); 1283–1292.
- Walley J.W., Kelley D.R., Nestorova G., Hirschberg D.L., & Dehesh K. (2010). Arabidopsis Deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b Play Overlapping and Distinct Roles in Mediating Environmental Stress Responses. *Plant Physiology*, 152 (2); 866–875.
- Wan Y., Tang K., Zhang D., Xie S., Zhu X., Wang Z., & Lang Z. (2015). Transcriptome-wide high-throughput deep m6A-seq reveals unique differential m6A methylation patterns between three organs in Arabidopsis thaliana. *Genome Biology*, 16 (1); 272.

- Wang C., Zhu Y., Bao H., Jiang Y., Xu C., Wu J., & Shi Y. (2016a). A novel RNA-binding mode of the YTH domain reveals the mechanism for recognition of determinant of selective removal by Mmi1. *Nucleic Acids Research*, 44 (2); 969–982.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., & Zhang S. (2007). Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19 (1); 63–73.
- Wang N., Yue Z., Liang D., & Ma F. (2014a). Genome-wide identification of members in the YTH domain-containing RNA-binding protein family in apple and expression analysis of their responsiveness to senescence and abiotic stresses. *Gene*, 538 (2); 292–305.
- Wang P., Doxtader K.A., & Nam Y. (2016b). Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Molecular Cell*, 63 (2); 306–317.
- Wang X., Feng J., Xue Y., Guan Z., Zhang D., Liu Z., Gong Z., Wang Q., Huang J., Tang C., Zou T., & Yin P. (2016c). Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature*, 534 (7608); 575–578.
- Wang X., Lu Z., Gomez A., Hon G.C., Yue Y., Han D., Fu Y., Parisien M., et al. (2014b). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505; 117–20.
- Wang X., Zhao B.S., Roundtree I. a, Lu Z., Han D., Ma H., Weng X., Chen K., Shi H., & He C. (2015). N6-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*, 161 (6); 1388–1399.
- Wang Y., Li Y., Toth J.I., Petroski M.D., Zhang Z., & Zhao J.C. (2014c). N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nature cell biology*, 16 (2); 191–8.
- Waris S., Wilce M.C.J., & Wilce J.A. (2014). RNA recognition and stress granule formation by TIA proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (12); 23377–23388.
- Wilhelm J.E., Buszczak M., & Sayles S. (2005). Efficient protein trafficking requires trailer hitch, a component of a ribonucleoprotein complex localized to the ER in Drosophila. *Developmental Cell*, 9 (5); 675–685.
- Wolf J. & Passmore L.A. (2014). Deadenylation by Pan2 / Pan3. *Biochem Soc Trans.*, 42 (1); 184–187.
- Wu B., Li L., Huang Y., Ma J., & Min J. (2017). Readers, writers and erasers of N6-methylated adenosine modification. *Current Opinion in Structural Biology*, 47; 67–76.
- Wu S.-Y. & Chiang C.-M. (2009). Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *The EMBO Journal*, 28 (9); 1246–1259.
- Xiao W., Adhikari S., Dahal U., Chen Y., Hao Y., Sun B., & Sun H. (2016). Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 61 (4); 507–519.
- Xu C., Liu K., Ahmed H., Loppnau P., Schapira M., & Min J. (2015). Structural Basis for the Discriminative Recognition of N 6-Methyladenosine RNA by the Human YT521-B Homology Domain Family of Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (41); 24902–24913.
- Xu C., Liu K., Tempel W., Demetriades M., Aik W., Schofield C.J., & Min J. (2014a). Structures of human ALKBH5 demethylase reveal a unique binding mode for specific single-stranded N6-methyladenosine RNA demethylation. *Journal of Biological Chemistry*, 289; 17299–17311.
- Xu C., Wang X., Liu K., Roundtree I. a, Tempel W., Li Y., & Lu Z. (2014b). Structural basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nature Chemical Biology*, 10 (11); 927–9.
- Xu J. & Chua N. (2009). Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *The Plant cell*, 21 (10); 3270–9.
- Xu J. & Chua N. (2012). Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *The EMBO Journal*, 31 (8); 1975–1984.

- Xu K., Yang Y., Feng G., Sun B., Chen J., Li Y., & Chen Y. (2017). Mettl3-mediated m<sup>6</sup>A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell research*, 27 (9); 1100–1114.
- Yadav P.K. & Rajasekharan R. (2017). The m<sup>6</sup>A methyltransferase Ime4 epitranscriptionally regulates triacylglycerol metabolism and vacuolar morphology in haploid yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (33); 13727–44.
- Yamashita A., Chang T.-C., Yamashita Y., Zhu W., Zhong Z., Chen C.-Y.A., & Shyu A.-B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12 (12); 1054–1063.
- Yan Y. Bin (2014). Deadenylation: enzymes, regulation, and functional implications. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 5 (3); 421–443.
- Yang C. & Ye Z. (2013). Trichomes as models for studying plant cell differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70 (11); 1937–1948.
- Yang W., Yu J.H., Gulick T., Bloch K.D., & Bloch D.B. (2006). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA*, 12 (4); 547–554.
- Yang X., Yang Y., Sun B.-F., Chen Y.-S., Xu J.-W., Lai W.-Y., Li A., Wang X., et al. (2017a). 5-methylcytosine promotes mRNA export — NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m<sup>5</sup>C reader. *Cell Research*, 27 (5); 606–625.
- Yang Y., Sun B.-F., Xiao W., Yang X., Sun H.-Y., Zhao Y.-L., & Yang Y.-G. (2015). Dynamic m<sup>6</sup>A modification and its emerging regulatory role in mRNA splicing. *Science Bulletin*, 60 (1); 21–32.
- Yang Z., Li J., Feng G., Gao S., Wang Y., Zhang S., Liu Y., Ye L., Li Y., & Zhang X. (2017b). MicroRNA-145 Modulates N<sup>6</sup>-methyladenosine levels by targeting the 3'-untranslated mRNA Region of the N<sup>6</sup>-Methyladenosine Binding YTH domain family 2 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (9); 3614–3623.
- Yoon J., Choi E., & Parker R. (2010). Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of cell biology*, 189 (5); 813–827.
- Yoshida T., Ohama N., Nakajima J., Kidokoro S., Mizoi J., Nakashima K., Maruyama K., Kim J.M., et al. (2011). Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics*, 286 (5–6); 321–332.
- Yu X., Willmann M.R., Anderson S.J., & Gregory B.D. (2016). Genome-Wide Mapping of Uncapped and Cleaved Transcripts Reveals a Role for the Nuclear mRNA Cap-Binding Complex in Cotranslational RNA Decay in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28 (10); 2385–2397.
- Yu Y., Yoon S.-O., Poulgiannis G., Yang Q., Ma X.M., Villen J., Kubica N., Hoffman G.R., Cantley L.C., Gygi S.P., & Blenis J. (2011). Phosphoproteomic Analysis Identifies Grb10 as an mTORC1 Substrate That Negatively Regulates Insulin Signaling. *Science*, 332 (6035); 1322–1326.
- Zanin E., Pacquelet A., Scheckel C., Ciosk R., & Gotta M. (2010). LARP-1 promotes oogenesis by repressing fem-3 in the *C. elegans* germline. *Journal of Cell Science*, 123 (16); 2717–2724.
- Zhang X., Henriques R., Lin S., Niu Q., & Chua N. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature protocols*, 1 (2); 641–646.
- Zhang Y., Gu L., Hou Y., Wang L., Deng X., Hang R., Chen D., Zhang X., Zhang Y., Liu C., & Cao X. (2015). Integrative genome-wide analysis reveals HLP1, a novel RNA-binding protein, regulates plant flowering by targeting alternative polyadenylation. *Cell research*, 25 (7); 864–76.
- Zhang Z., Theler D., Kaminska K.H., Hiller M., De La Grange P., Pudimat R., Rafalska I., Heinrich B., Bujnick J.M., Allain F.H.T., & Stamm S. (2010). The YTH domain is a novel RNA binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 285; 14701–14710.
- Zhao B.S., Roundtree I.A., & He C. (2016). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18 (1); 31–42.

- Zhao B.S., Wang X., Beadell A. V., Lu Z., Shi H., Kuuspalu A., Ho R.K., & He C. (2017). m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 542 (7642); 475–478.
- Zhao X., Yang Y., Sun B., Shi Y., Yang X., Xiao W., Hao Y., Ping X., et al. (2014). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Research*, 24; 1403–1419.
- Zheng G., Dahl J.A., Niu Y., Fedorcsak P., Huang C.M., Li C.J., Vågbø C.B., Shi Y., et al. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49 (1); 18–29.
- Zhong S., Li H., Bodi Z., Button J., Vespa L., Herzog M., & Fray R.G. (2008). MTA is an Arabidopsis messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *The Plant cell*, 20; 1278–1288.
- Zhou J., Wan J., Gao X., Zhang X., Jaffrey S.R., & Qian S.-B. (2015). Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*, 526 (7574); 591–594.
- Zhu T., Roundtree I. a, Wang P., Wang X., Wang L., Sun C., Tian Y., Li J., He C., & Xu Y. (2014). Crystal structure of the YTH domain of YTHDF2 reveals mechanism for recognition of N6-methyladenosine. *Cell Research*, 24 (12); 1493–1496.





## Résumé

Le contrôle de l'expression des gènes est un processus crucial pour le développement, la reproduction ou les mécanismes d'acclimatation aux stress environnementaux et met en jeu des voies de régulation post-transcriptionnelles agissant sur les ARN messagers (ARNm). Ces molécules portent des modifications chimiques dont l'une des plus abondantes est la N<sup>6</sup>-méthyladénosine ou m<sup>6</sup>A. Cette modification affecte le devenir des ARNm de plusieurs façons, en particulier *via* le recrutement de protéines spécifiques qualifiées de « lecteurs ». Ces lecteurs possèdent un domaine conservé nommé YTH formant une poche de liaison au m<sup>6</sup>A. Chez les mammifères, les protéines à motif YTH agissent principalement pour favoriser la dégradation et/ou la traduction des transcrits méthylés. Mes travaux de thèse ont eu pour objectif de caractériser les fonctions d'une protéine à domaine YTH, nommée ECT2, chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Dans un premier temps, sa fonction de liaison aux ARNm méthylés ainsi que son rôle dans le développement de la plante ont été démontrés. Au niveau moléculaire, une approche de protéomique a permis d'identifier de nombreux partenaires d'ECT2 dont la majorité est impliquée dans le métabolisme des ARNm parmi lesquels des facteurs inhibiteurs de traduction. Plus particulièrement, des interactions clés ont été mises en évidence avec les protéines LARP1 et DCP5, deux facteurs évolutivement conservés qui agissent dans le contrôle de la traduction. Des analyses de translatome à partir de mutants pour ECT2, LARP1 et DCP5 ont permis d'identifier des transcrits dont la traduction semble favorisée en l'absence de chacun de ces facteurs. Les résultats obtenus permettent de proposer un modèle où ECT2 jouerait un rôle de répresseur de la traduction d'ARNm méthylés en coopération avec LARP1 et DCP5. Enfin, j'ai découvert qu'ECT2 est dynamiquement phosphorylée en réponse à un stress thermique ce qui affecte notamment sa capacité à reconnaître les résidus m<sup>6</sup>A. Ce résultat suggère ainsi pour la première fois que l'activité d'un lecteur de méthylation peut être régulée par des modifications post-traductionnelles en réponse à des variations environnementales.

**Mots-clés :** Régulation post-transcriptionnelle, N<sup>6</sup>-méthyladénosine, protéines à domaine YTH, stress thermique, *Arabidopsis thaliana*.

## Abstract

Control of gene expression is a crucial process for development, reproduction or acclimation to environmental stresses and involves post-transcriptional regulatory pathways acting on messenger RNAs (mRNAs). These molecules carry chemical modifications of which N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) is one of the most abundant. This modification affects mRNA fate by several ways, including the recruitment of specific proteins named "readers". Readers possess a conserved YTH domain that form an m<sup>6</sup>A-binding pocket. In mammals, YTH-domain proteins mainly act to promote decay and/or translation of methylated mRNAs. My thesis aimed to characterize the functions of a YTH domain protein, named ECT2, as a methylation reader in the model plant *Arabidopsis thaliana*. First, its binding function to methylated mRNAs and its role in plant development was demonstrated. At the molecular level, a proteomic approach identified numerous ECT2's protein partners, mainly involved in mRNA metabolism including translation inhibition factors. More particularly, key interactions were identified with LARP1 and DCP5, two evolutionarily conserved factors acting in translational control. Translatome analysis of ECT2, LARP1 and DCP5 mutants allowed the identification of transcripts whose translation seems up-regulated in the absence of each of these factors. Results obtained suggest a model where ECT2 could play a repressive role on the translation of methylated mRNAs cooperatively with LARP1 and DCP5. Finally, I discovered that ECT2 is dynamically phosphorylated in response to heat stress affecting its ability to recognize m<sup>6</sup>A residues. This result suggests for the first time that the activity of an m<sup>6</sup>A reader could be regulated by post-translational modifications in response to environmental changes.

**Keywords:** Post-transcriptional regulation, N<sup>6</sup>-methyladenosine, YTH domain proteins, heat stress, *Arabidopsis thaliana*.