Modifications épitranscriptomiques des ARNt d'Arabidopsis et régulation traductionnelle de l'expression des gènes en réponse au stress

Arnaud Dannfald

▶ **To cite this version:**

Arnaud Dannfald. Modifications épitranscriptomiques des ARNt d'Arabidopsis et régulation traductionnelle de l'expression des gènes en réponse au stress. Biologie végétale. Université de Perpignan, 2023. Français. NNT : 2023PERP0039 . tel-04446544

HAL Id: tel-04446544
https://theses.hal.science/tel-04446544

Submitted on 8 Feb 2024

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 Arnaud Dannfald

Modifications épitranscriptomiques des ARNt d'Arabidopsis et régulation traductionnelle de l'expression des gènes en réponse au stress

Soutenue le 16 novembre 2023devant le jury composé de

Laurence DROUARD – DR, CNRS, IBMP	Rapportrice
Christophe ROBAGLIA – PR, Université Aix Marseille	Rapporteur
Julio SÁEZ-VÁSQUEZ – DR, CNRS, LGDP	Examinateur
Martin CRESPI – DR, CNRS, IPS2	Examinateur
Jean-Jacques FAVORY – MdC, Université de Perpignan	Co-encadrant de thèse
Jean-Marc DERAGON – PR, Université de Perpignan	Directeur de thèse

Remerciements

Nous y voilà, après trois ans au sein du LGDP, mon expérience de thésard touche à sa fin. Je voudrais tout d'abord remercier l'Ecole Doctorale 305 ainsi que l'Université de Perpignan qui m'ont permis de réaliser cette thèse. Merci aux membres du Jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux : Laurence Drouard, Christophe Robaglia, Martin Crespi et Julio Saez-Vasquez.

Merci à Jean-Marc et Jean-Jacques de m'avoir fait confiance durant cette visioconférence en pleine pandémie et de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ma passion en réalisant cette thèse. Merci pour toute l'attention que vous avez porté à ce projet. Vos portes ont toujours été grandes ouvertes et je ne vous remercierai jamais assez pour cela.

Jean-Marc, merci pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues depuis le début, merci de m'avoir montré et enseigné ce métier passionnant qu'est la recherche ! Une mention spéciale pour ces dernières semaines et ton aide si précieuse !

Jean-Jacques, merci pour toutes les discussions et conseils que tu m'as transmis à travers ces trois années. Et une mention spéciale pour le café du dernier jour de rédaction qui m'a sauvé.

Merci aux trois membres de mon CSI : Christophe Hirtz, Alexandre David et Olivier Rey. Vos conseils ont été très précieux et discuter avec vous a toujours été un réel plaisir ! Merci à Aurore pour tes coups de pouces sur les données d'épitranscripto !

Rémy (aka Mr. RNAse-free), un grand merci pour toute ton aide au cours de cette thèse ! Jamais je n'aurais pu extraire tous ces ARNt polysomaux sans tous tes tips de laboratoire (pour une bonne extraction toujours passer les ARNt 10'' au micro-onde) ! Qui sait, peut-être un jour mes profils seront plus beaux que les tiens… Enfin, merci pour ton aide sur la fin, même si tes honoraires ne sont pas donnés...

Marie-Christine (aka MC), un immense merci à toi !! Tout d'abord pour TOUTES les analyses bioinfo (pour toutes les fois où j'ai toqué à ta porte (ouverte) en disant : « coucou MC t'aurais pas deux minutes par hasard ? » alors qu'on savait très bien tous les deux que ça n'allait pas durer deux minutes…). Merci aussi pour tout le reste : ton énergie débordante et toujours rayonnante au sein du laboratoire (#lecomitédesfêtes), les cafés papotes et les bières toujours accompagnées de rire !!!

Adrien, merci pour tous les moments passés ensemble depuis nos arrivées (quasiment en même temps) au labo mais aussi en dehors !

Une mention spéciale pour les doctorants du bureau (passés et présents) : Emilie, Clément, Edu, Abirami, Lucas, et Juline. Merci pour les discussions, les rigolades et les bières du jeudi (même si je n'étais pas très présent cette dernière année...). Et bien sûr merci aux autres doctorants du LGDP !! Je vous souhaite à tous et à toutes de bien profiter de ces années de thèse et vous souhaite bonne chance pour la suite !

Un grand merci général à tous les membres du LGDP : merci à tout le personnel permanant et non-permanant que j'ai pu croiser au cours de ces trois ans et qui m'ont aidé et permis de réaliser cette thèse : sans vous tous et toutes, tout ça n'aurait jamais été possible et je vous en suis très reconnaissant.

Merci à toutes les personnes de Perpignan qui composent le Perpi Gang et le Bicicleta Cartel. Merci à vous pour tous ces moments de joies et de rire. Vous avez fait de mon séjour à Perpignan une magnifique expérience.

Merci aussi à toute la bande de Bordeaux (et d'ailleurs) pour ces supers week-end revigorant dans le Sud-Ouest qui m'ont fait tant plaisir au cours de ces trois années (vous m'avez manqué).

Merci à mon équipe de correction de thèse « ultra technique ». Merci à toutes les quatre d'avoir accepté de prendre le temps de relire et corriger plusieurs fois mes travaux (Michou, Mamou, Camou et Flow)

Je tiens aussi à remercier toute ma famille qui m'a toujours soutenu tout au long de cette expérience. Merci à mes parents, pour tout ce que vous apportez dans ma vie et ce que vous m'avez enseigné. Merci à ma sœur qui a toujours été là, une épaule sur qui me reposer, une béquille quand tu as la jambe cassée, un poteau de cabane tchanquée. Merci à mon frère pour tous les moments de complicité que l'on a pu passer au cours de ces trois ans malgré la distance. Merci à tous les autres membres qui composent cette incroyable et belle famille.

Merci à Flow de m'avoir soutenu tout au long de cette aventure. Depuis le (quasi) début, merci pour ton soutien permanent, pour nos réflexions sans fin, pour les rires, pour la joie et pour l'amour.

Sommaire

Table des matières

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION 4
1 - Réchauffement climatique et stress thermique : conséquences majeures pour les végétaux 4
2 - La reprogrammation de l'expression des gènes en réponse à un stress thermique chez les végétaux (et principalement chez Arabidopsis) 8
2.1 - Perception du stress thermique : voies de signalisations impliquées 8
2.2 - Reprogrammation transcriptionnelle des gènes de réponse au stress thermique 13
2.2.1 – La structure des HSF 13
2.2.2 - Les HSF sont induits en réponse au stress thermique 15
2.2.3 – Trois classes de HSF aux fonctions moléculaires différentes 17
2.2.4 – D'autres facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress thermique 18
2.2.5 – Les régulations épigénétiques induites par le stress thermique 19
2.3 - Le rôle des HSP dans la réponse au stress thermique : régulation et protection des protéines 20
2.3.1 – Les plantes possèdent une forte diversité de HSP 20
2.3.2 - Les petites HSP 21
2.3.3 – Les HSP70 23
2.3.4 - Les HSP90 25
2.3.5 - Les HSP100 27
2.3.6 – Les voies CPR et UPR : des sous-compartiments de la réponse au stress 30
2.4 - Rôles des petits ARN dans la réponse au stress thermique 33
2.4.1 - Le rôle des miARN dans la réponse au stress thermique 33
2.4.2 - Le rôle des siARN dans la réponse au stress thermique 35
2.5 - Priming et effet mémoire chez Arabidopsis 39
2.5.1 – Les régulations transcriptionnelles impliquées dans l'amorçage et l'effet mémoire 43
2.5.2 - Petits ARN et effet mémoire 45
2.5.3 - Épissage et effet mémoire 46
2.5.4 - Dégradation des ARN et effet mémoire 49
2.5.5 – Modifications post-traductionnelles et effet mémoire du stress thermique 50
2.5.6 – Les phénomènes polysomaux (traduction et dégradation co-traductionnelle) jouent-ils un rôle dans l'effet mémoire en réponse au stress thermique ? 51
3 – Traduction et dégradation co-traductionnelle: quel rôle dans la régulation du stress thermique ? 53
3.1 – Le processus de traduction chez les eucaryotes 53
3.1.1 – L'initiation de la traduction 54

3.1.2 – L'élongation 57
3.1.3 – La terminaison 59
3.2 – Dégradation des ARNm 61
3.2.1 – Les différentes voies de dégradation cellulaire 61
3.2.2 – La dégradation co-traductionnelle 62
3.2.3 – La dégradation co-traductionnelle, un reflet de la dynamique de la traduction ? 65
3.3 – Les rôles des phénomènes polysomaux dans la réponse au stress thermique et l'effet mémoire 67
3.3.1 – Le stress thermique impacte négativement la traduction 68
3.3.2 - Le stress thermique induit la traduction spécifique de sous-populations de transcrits 72
3.3.3 – La dégradation co-traductionnelle régule la réponse au stress thermique 73
3.3.4 – Le rôle des processus polysomaux dans la récupération et l'effet mémoire ? 75
4 - Rôles des ARN de transfert dans la régulation de la traduction au cours du stress thermique 77
4.1 - Introduction générale des ARN de transfert 79
4.1.1 – Synthèse des ARNt 79
4.1.2 – Maturation des ARNt 81
4.1.3 – Dégradation des ARNt 85
4.1.4 - Le transport rétrograde des ARNt : une voie de régulation et de contrôle 85
4.2 - Les modifications chimiques des ARNt 87
4.2.1 – Description générale des modifications des ARNt 87
4.2.2 - Le rôle des modifications chimiques dans la structure, la maturation et la stabilité des ARNt 91
4.2.3 – Rôles des modifications dans la fonction de décodage 97
4.2.4 - Revue : Variations in transfer and ribosomal RNA epitranscriptomic status can adapt eukaryote translation to changing physiological and environmental conditions 99
4.3 - Impact du stress thermique sur les ARNt 100
4.3.1 – L'impact du stress thermique sur l'homéostasie des ARNt 100
4.3.2 - Le stress thermique impacte la structure des ARNt 102
5 – Objectifs de la thèse 104
CHAPITRE 2 - Résultats 106
1 - Variabilité épitranscriptomique naturelle des ARNt 106
1.1 - Contexte et objectif 106
1.2 - Présentation des cinq écotypes naturels d'Arabidopsis 108
1.3 - Comparaison des épitranscriptomes d'écotypes naturels d'Arabidopsis 112
1.3.1 - Existe-t-il une variabilité naturelle des modifications des ARNt ? 114
1.4 - Peut-on classer les écotypes sur la base de leurs profils épitranscriptomiques d'ARNt ? 124

1.5 - Des corrélations positives entre les conditions environnementales et les modifications des ARNt ? 126
1.6 - Résultats épitranscriptomiques des autres populations d'ARN 128
1.6.1 - Les ARNr possèdent aussi une variabilité naturelle 128
1.7 - Conclusion 131
2 – Impact du stress thermique sur la traduction et la dégradation co-traductionnelle, un rôle clé dans l'effet mémoire ? 132
2.1 – Contexte et objectifs. 132
2.2 – Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency 134
2.3 – Résultats complémentaires de "Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency" 167
2.3.1 – Un sous-groupe de transcrits est exclusivement régulé par leur engagement polysomal 167
2.3.2 – L'amorçage permet-il de réguler différentiellement des sous-populations de protéines ribosomales ? 171
3 - L'impact du stress thermique et de la mémoire sur l'épitranscriptome des ARNt. Un rôle dans la régulation de la traduction chez Arabidopsis ? 174
3.1 - Contexte et objectif 174
3.2 - L'impact du stress thermique sur l'épitranscriptome des ARNt 176
3.2.1 - Contrôle qualité 176
3.2.2 - Impact d'un stress thermique simple sur l'épitranscriptome des ARNt 178
3.2.3 - L'amorçage induit des changements de profils épitranscriptomiques 184
3.3 - L'impact des modifications chimiques des ARNt sur la régulation de la traduction 189
CHAPITRE 3 – DISCUSSION GÉNÉRALE 194
I – Il existe une variabilité épitranscriptomique naturelle chez Arabidopsis 194
II – L'impact du stress thermique sur les phénomènes polysomaux et leurs rôles dans l'effet mémoire chez Arabidopsis 197
III - Le stress thermique et l'amorçage impactent l'épitranscriptome des ARNt d'Arabidopsis 202
Matériel et méthodes 207
Annexes 213
Figures Supplémentaires 213
Tableaux Supplémentaires 219
Tableau abréviations : 230
BIBLIOGRAPHIE 234
Abstract 254
Résumé 255

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

1 - Réchauffement climatique et stress thermique : conséquences majeures pour les végétaux

Les plantes, en tant qu'organismes sessiles, sont soumises à des fluctuations environnementales continues (telles que les températures extrêmes, la sécheresse, l'accumulation de métaux ou la salinité par exemple) et à des attaques biotiques (champignons, bactéries ou herbivores). En raison de leur incapacité à fuir ces contraintes et à se déplacer vers un environnement plus favorable, les plantes doivent s'adapter et s'acclimater pour faire face à ces stress. L'étude de ces mécanismes est une question fondamentale et concentre de nombreux projets de recherche menés par la communauté scientifique.

La biodiversité végétale subit de plein fouet les changements environnementaux causés par les activités humaines. Le dernier rapport de synthèse du Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'évolution du Climat (GIEC) de 2023 affirme que, en majeure partie à cause des émissions de gaz à effet de serre, la température globale à la surface du globe s'est réchauffée de 1,1°C (entre 2011-2020 par rapport à 1850-1900) [1]. Ce chiffre est une moyenne regroupant les terres et les océans, mais les parties émergées se réchauffent encore plus vite (1,6°C depuis 1850-1900), affectant de manière accrue les végétaux terrestres. De plus, l'accélération de ce réchauffement s'accroit elle aussi : jamais depuis 2000 ans la température globale ne s'est réchauffée aussi vite qu'au cours des 50 dernières années, et jamais depuis 2 millions d'années la concentration en CO_2 dans l'atmosphère n'a été aussi élevée. Selon le GIEC, les réductions d'émissions de gaz à effet de serre provenant d'améliorations technologiques sont moindres comparées aux augmentations des émissions (en constantes hausses, excepté pour la période COVID en 2020) et ne représentent pas aujourd'hui une solution viable.

Le stress thermique, une des conséquences majeures de ces changements, affecte l'ensemble de la biosphère végétale. En 2021, Duffy *et al*., ont utilisé un ensemble de données massives, surveillant le flux de carbone à travers la planète, leur permettant d'établir un lien entre la température et l'absorption globale de carbone par les organismes végétaux. Leurs résultats sont alarmants : ils montrent que la température moyenne du trimestre le plus chaud, surpasse le maximum thermique permettant à la photosynthèse de fonctionner efficacement. Au-delà de ces températures, les taux de respiration continuent d'augmenter, contrairement aux taux de photosynthèse qui eux chutent drastiquement. En considérant les émissions de carbone actuelles, cela conduirait à une réduction de moitié environ de la capacité d'absorption du carbone par les puits terrestres dès 2040 [2]. En résumé, l'augmentation des températures, en réduisant la capacité des plantes à absorber le carbone, va conduire à une augmentation du dioxyde de carbone dans l'atmosphère, favorisant l'effet de serre, et augmentant à son tour la température globale : un cercle vicieux déjà enclenché.

La hausse des températures observée depuis la révolution industrielle et prédite pour l'avenir représente également une menace sérieuse pour la production alimentaire et la durabilité des cultures dans le monde. Comprendre comment les plantes s'acclimatent et s'adaptent aux stress thermiques est nécessaire pour penser l'avenir de l'agriculture. Les températures extrêmes ont un impact sur les cultures en réduisant leur croissance, en affectant négativement leur physiologie et leur reproduction, ce qui entraîne d'importantes pertes de rendement. Une étude a récemment montré comment le réchauffement d'origine anthropique influence les rendements des principales cultures consommées par l'humanité. Ainsi, depuis les années 1960, les rendements du riz, du maïs et du blé ont diminué respectivement de 4,2 %, 5,9 % et 4,9 % [3]. Malgré les améliorations technologiques de ces dernières décennies, Ortiz-Bobea *et al*., expliquent que l'indice "Productivité Totale des Facteurs" (PTF) permettant d'évaluer la productivité des exploitations a été réduite de 21% depuis les années 1960. Et les prévisions du scénario RCP-8.5 (Representative Concentration Pathway) (basé sur l'utilisation des combustibles fossiles – comme cela se déroule aujourd'hui -) estiment que 10 % des terres arables d'ici 2050 et 30 % d'ici 2100, ne pourront plus soutenir la production agricole [4]. Cet événement interpelle l'humanité tout entière : Thiault *et al*., en se basant sur le scénario RCP8.5, prévoient que les chaleurs extrêmes auront un impact négatif

sur l'agriculture et la production d'aliments marins dans des régions où vivent actuellement 90 % de la population mondiale [5]. Le dernier rapport du GIEC de 2023 sur l'agriculture adressé aux dirigeants [1], explique que les choix politiques et les voies actuellement suivies à travers le monde ne permettent pas de répondre aux problèmes actuels et conduisent la population mondiale à faire face à une insécurité alimentaire sans précédent depuis la révolution industrielle. Le recoupement de toutes ces données montre la nécessité pour la communauté scientifique de poursuivre et d'intensifier ses recherches sur les changements climatiques, leur impact sur la production alimentaire et sur la biodiversité terrestre.

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, le stress thermique est un sujet vaste : la définition même du stress thermique dépend de nombreux facteurs. Par exemple, un même régime de température peut être perçu par un organisme comme un stress et à l'inverse comme une condition favorable et adaptée à la croissance. Cette notion est particulièrement vraie chez les plantes : les végétaux présents à des latitudes extrêmes, ainsi qu'au niveau des Tropiques et de l' Équateur, se sont adaptés à différentes températures en fonction de leur habitat. De plus, une même espèce de plante peut posséder différentes populations dont les conditions favorables de croissance peuvent varier fortement.

Ainsi il est nécessaire pour la bonne compréhension de la suite de ce manuscrit de thèse, de préciser quelle est la nature du stress thermique que nous allons étudier et quelles sont les conséquences biologiques de ce stress thermique sur *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis). Arabidopsis est une plante originaire d'Eurasie qui s'est répandue en Amérique du Nord et en Australie [6]. La température optimale pour sa croissance se situe entre 22 et 23°C. Lorsque l'optimum de température est dépassé, l'organisme est alors considéré comme stressé, avec des effets négatifs sur sa physiologie [7]. Comme énoncé précédemment, il peut exister plusieurs conditions de stress thermique : par exemple, en été, au cours d'une journée la température de l'air peut passer progressivement d'une dizaine jusqu'à une trentaine de degrés. En revanche la plante peut aussi passer d'une situation ombragée à ensoleillée, conduisant à une augmentation fugace de la température au niveau des tissus de la plante. Les plantes peuvent aussi subir des vagues de chaleur (de plus en plus fréquentes et longues

dans le contexte actuel de changement climatique) pouvant se prolonger sur plusieurs jours. Bien que tous ces exemples s'apparentent à des stress thermiques, il n'en est pas moins évident que la réponse biologique diffère face à la diversité de ces stress. Dans le cadre de cette thèse, nous examinerons la réponse d'Arabidopsis à des périodes de stress allant de quelques minutes à quelques heures. L'objectif principal de cette étude est d'analyser les mécanismes traductionnels qui interviennent dans la reprogrammation de l'expression génique en réponse à un stress thermique de courte durée chez Arabidopsis.

2 - La reprogrammation de l'expression des gènes en réponse à un stress thermique chez les végétaux (et principalement chez Arabidopsis)

Le stress thermique (ST) est un évènement nécessitant de l'énergie pour survire, or les plantes ont une capacité de production d'énergie qui est forcément limitée. Par conséquent il leur est crucial de concentrer l'utilisation de cette énergie vers les phénomènes physiologiques en adéquation avec leur environnement : favoriser la croissance quand les conditions environnementales leurs sont favorables, et à l'inverse favoriser la réponse au stress quand elles subissent des changements dangereux pour leur survie [8,9]. Chez les végétaux, le ST est un stress majeur, aux conséquences multiples et ayant été intensivement étudié. Il induit, entre autres, un important remaniement de l'expression des gènes, nécessaire pour s'y acclimater. Cette réorganisation de l'expression des gènes débute par la perception du signal jusqu'à la production de protéines permettant de répondre à ce stress et implique plusieurs niveaux de régulations. Cette partie vise à réaliser un état de l'art des mécanismes moléculaires mis en place en réponse à un ST court afin de modifier le programme d'expression des gènes chez les plantes.

2.1 - Perception du stress thermique : voies de signalisations impliquées

Chez les végétaux, plusieurs organites (réticulum endoplasmique (RE), noyau, mitochondrie, chloroplaste) sont des senseurs du ST. Cependant, différentes études convergent pour s'accorder sur le fait que la première étape permettant de déclencher la réponse au ST chez les plantes provient de la membrane plasmique [10–12]. Cette réponse se manifeste par une augmentation de la fluidité de la membrane plasmique [13] conduisant à l'activation des canaux ioniques transmembranaires (CNGC) (*CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELs)* [14] engendrant l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) dans la cellule. Cette augmentation de la concentration en Ca^{2+} va déclencher l'activation de calmodulines (CaMs), capables de se fixer

sur les CNGC. L'activation des calmodulines déclenche une cascade d'activation de kinases, phosphorylant la protéine *HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A1 (HSFA1)* (un maître régulateur de la réponse au ST) permettant sa relocalisation vers le noyau et son activation [15].

Une deuxième voie d'activation de la réponse au ST a été décrite. Les changements de fluidité de la membrane peuvent également être à l'origine de l'activation de phospholipases : les Phosphoinositide-Specific Phospholipases C (PLC). Chez Arabidopsis les isoformes 3 et 9 (AtPLC3 & AtPLC9) sont considérés comme deux acteurs majeurs de cette réponse, ayant des effets additifs [16]. Une fois activées, ces protéines vont hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3). L'IP3 est un messager secondaire qui permet de contrôler le relargage du Ca^{2+} contenu dans le RE et la vacuole vers le cytosol. Chez Arabidopsis, une augmentation d'IP3 est observée dans la minute qui suit l'apparition du stress, attestant de la rapidité de la réponse cellulaire [17]. Les ions calciums libérés depuis le RE vont engendrer une cascade d'activations de kinases conduisant à l'activation d'HSFA1.

Une troisième voie de perception est connue, impliquant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme messagers secondaires (hydrogène peroxyde, oxygène singulet, superoxyde par exemple). Un stress très court mais intense (45 secondes à 42°C) permet d'observer une accumulation cellulaire de ROS chez des protoplastes d'Arabidopsis [18]. La génération de ces ROS peut avoir différentes origines, dont l'activation par phosphorylation des NADPB/respiratory burst oxidase proteins (RbohD), impliquées dans la synthèse de ROS au sein des cellules. Les perturbations de la photosynthèse, de la chaîne respiratoire et les péroxysomes sont une autre source majeure de ROS. Malgré le caractère cytotoxique de ces molécules (elles ont longtemps été considérées uniquement comme délétères pour les cellules, avec beaucoup d'effets néfastes impactant les lipides des membranes, les protéines et les activités enzymatiques), elles possèdent aussi des fonctions de transduction du signal. Les facteurs de transcription AtHSF4a, AtHSFA8 et NONEXPRESSOR OF PR GENES 1 (NPR1) sont sensibles à l'état redox de la cellule, permettant leur relocalisation nucléaire et leur activation [19]. Des résultats très intéressants montrent qu'une baisse du niveau d'H_20_2 dans la cellule, va diminuer l'activité de liaison à l'ADN d'HSF2A, HSFA7a, HSFB2b [20]. La même étude a montré

que la production d'H_20_2 était nécessaire pour déclencher une réponse adaptée, puisque les mutants *rbohB, rbohD* et *rhohB/D* (dont la capacité de produire H_20_2 est négativement impactée) accumulent moins de HSP17.7 et HSP21 (deux protéines impliquées dans la réponse au ST, partie 2.3) comparé au sauvage lorsqu'elles sont soumises à un stress thermique à 37°C [20]. De plus, certaines HSP sont sensibles à l'état redox de la cellule et nécessitent une régulation fine afin de fonctionner de manière optimale. En conclusion, les ROS sont nécessaires pour activer une réponse adaptée au ST, majoritairement via deux mécanismes : en augmentant la capacité de liaison des HSF à l'ADN et en favorisant l'activité de HSP.

Enfin, une quatrième voie de signalisation existe, celle de la réponse hormonale. Plusieurs types de phytohormones sont impliquées dans la réponse au ST : acide abscissique (ABA), acide jasmonique (JA), éthylène, acide salicylique et brassinosteroïdes. Ces différentes hormones ont des rôles différents et induisent des réponses très contrastées. L'acide abscissique, l'acide jasmonique et l'éthylène peuvent ainsi réguler l'accumulation de ROS : en réponse à un ST, une hausse rapide et transitoire d'ABA est observée. L'ABA va alors stimuler la production de ROS, permettant d'induire la réponse au stress régulée par ces molécules. L'éthylène est lui aussi nécessaire afin de stimuler la production de ROS. En réponse à un ST, une rapide accumulation de ROS est normalement attendue, or cette brève augmentation n'est pas observée dans les mutants de réponse à l'éthylène *erf74* et *erf75* [18,21], indiquant un rôle de l'éthylène et de ces facteurs de transcription dans la transduction du signal. Aussi, lors d'un ST plusieurs récepteurs ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1), ETHYLENE RESPONSE 2 (ETR2), ETHYLENE RESISTANT 1 (ERS1), ETHYLENE RESISTANT 2 (ERS2), and ETHYLENE INSENSITIVE 4 (EIN4) vont fixer la phytohormone pour induire une cascade de régulations. Ces cascades vont ensuite favoriser l'expression de facteurs de transcription de la réponse à l'éthylène : les gènes de la superfamille AP2/ERF (APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR) (eux aussi impliqués dans la réponse au ST) [22]. Une autre étude propose un lien entre l'accumulation d'ABA en réponse au ST et l'expression du facteur de transcription HSFA6b [23]. Lors d'une élévation de température, la hausse du taux cellulaire d'ABA permet d'activer ABA-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN1 (un effecteur clé de la signalisation de l'ABA), alors capable de se fixer sur le promoteur d'HSFA6b afin d'en stimuler sa transcription. D'autres facteurs de transcription

nécessaires pour une réponse adéquate au ST, tels que SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) 1 et 12, sont aussi activés via la voie de signalisation de l'ABA [23,24].

À travers ces exemples nous avons montré que les plantes sont capables de percevoir le stress thermique via différentes voies, puis de transduire ce signal afin de déclencher une réponse génétique conduisant à remoduler l'expression de leurs gènes (Figure 1). Pour cela, les différentes voies de signalisation citées ci-dessus conduisent (dans la majorité des cas) à l'activation de facteurs de transcription de la réponse au ST. Ces facteurs de transcription, via des cascades de régulations (activations, répressions), vont permettent une réponse rapide, généralisée et adaptée.

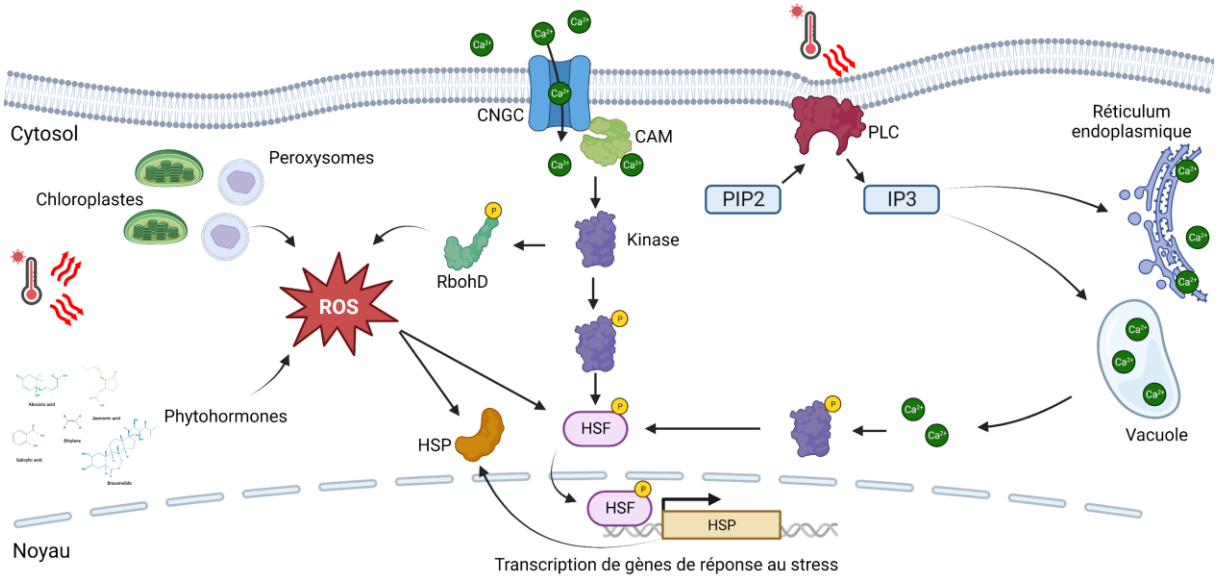


Figure 1. Schéma simplifié des différentes voies de perception et de signalisation de la réponse au stress thermique chez Arabidopsis*. En réponse au ST, les changements de fluidité membranaire vont activer les CNCG et conduire à l'entrée de calcium. Ce calcium va se fixer sur les CAM, qui vont induire des cascades de kinases permettant d'activer les HSF. Une fois actifs les HSF vont activer la transcription des HSP. En parallèle, le stress thermique va activer PLC, qui permet la transformation de PIP2 en IP3. IP3 va servir de messager secondaire et conduire au relargage de calcium contenu dans la vacuole et le RE. Le calcium va ensuite induire l'activation de kinases conduisant à activer les HSF. Aussi, lors d'un ST une accumulation de ROS est observée, médiée par l'activation de la RbohD, par les chloroplastes et péroxysomes ainsi que par les phytohormones. Les ROS vont ensuite soutenir l'expression des HSF et permettent d'activer ou de favoriser certaines fonctions de HSP.*

2.2 - Reprogrammation transcriptionnelle des gènes de réponse au stress thermique

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, de nombreuses voies de signalisation permettent de percevoir le ST et transduire le signal afin d'activer la réponse en reprogrammant l'expression des gènes. Les *HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTORS (HSF)* sont des acteurs clés de cette réponse et jouent un rôle crucial pour convertir le signal perçu en une information génétique conduisant à reprogrammer et réguler l'expression des gènes de réponse au stress, comme les *HEAT SHOCK PROTEINS (HSP,* section 2.3*)*. Les HSF ont été intensivement étudiées chez les végétaux : leur complexité et diversité excèdent celles de tout autre type d'organisme connu puisque l'on a identifié aujourd'hui 21 HSF chez Arabidopsis et jusqu'à 56 chez le blé [25] contre seulement 3 chez les mammifères [26] et une seule chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [27]. Dans de nombreux cas, ces facteurs de transcription vont se fixer sur des *cis*-éléments présents dans les régions promotrices de leurs cibles afin de les activer ou les réprimer. Ces cascades de signalisation régulent de façon fine tout un réseau de gènes qui coopèrent afin de mettre en place la thermotolérance de la plante [28].

2.2.1 – La structure des HSF

Les HSF sont très conservées chez les végétaux : toutes ces protéines partagent une structure modulaire (Figure 2). Elles sont composées d'un domaine N-terminal de liaison à l'ADN (DNA Binding Domaine : DBD), qui est la partie la plus conservée au sein des HSF. Ce domaine est constitué d'un motif en hélice-coude-hélice qui permet la fixation sur les régions cibles : les "Heat Stress Elements" (HSE). Ces séquences se trouvent au sein du promoteur de gènes cibles, et la fixation sur ces régions permet d'induire leur transcription [29]. Les HSF contiennent aussi un domaine d'oligomérisation (OD), caractérisé par un grand nombre de résidus hydrophobes. Ce domaine permet aux HSF de fixer les HSE sous forme trimérique [30]. Les domaines DBD et OD sont séparés par une région flexible de taille variable. De plus, le domaine OD contient des motifs hydrophobes répétés. Le nombre d'acides aminés compris entre deux de ces motifs hydrophobes a servi d'élément permettant de distinguer trois familles de HSF :

les classes A et C possèdent respectivement 21 et 7 insertions et les classes B n'en possèdent pas [29,31]. De plus, un signal de localisation nucléaire (NLS) est conservé chez les HSF, leur permettant d'être présent dans le noyau pour activer la transcription de leurs cibles [32]. Certaines HSF peuvent posséder un signal d'export nucléaire NES, ainsi qu'un domaine d'activation C-terminal composé d'un ou deux motifs AHA (Acidic Hydrophobic Aromatic). Ce motif AHA est spécifique des HSF de classe A et, lorsqu'il est présent, permet l'activation de leurs cibles en induisant leur transcription [33]. À l'inverse, les HSF de classes B et C ne possèdent pas ce motif, et ne possèdent donc pas d'activité activatrice intrinsèque mais dépendent d'autres facteurs leur permettant d'agir comme co-activateurs ou répresseurs [34].

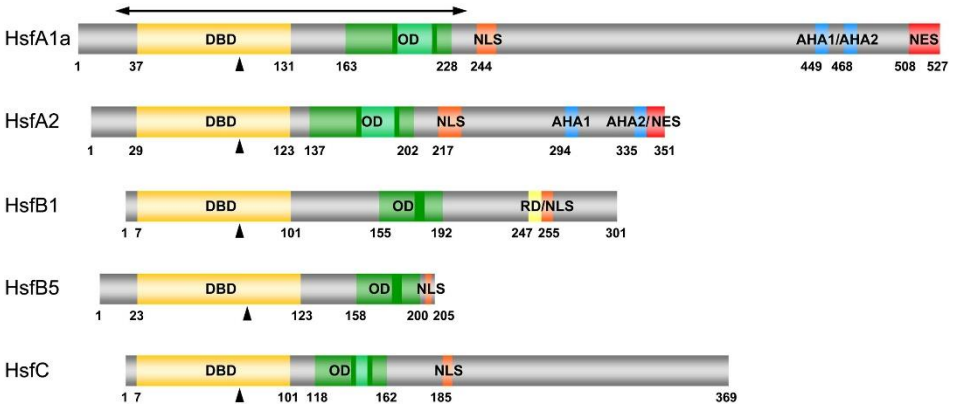


Figure 2. Schéma de la structure des différentes sous-familles de HSF chez Solanum lycopersicum*. En jaune le domaine DBD de liaison à l'ADN, en vert le domaine OD d'oligomérisation puis en orange le domaine de localisation nucléaire (NLS), en rouge le domaine d'export nucléaire (NES) et enfin en bleu les domaines AHA1/2 d'activation. Ce schéma est représentatif des familles de HSF chez les végétaux Adapté de "The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution"* [35].

2.2.2 - Les HSF sont induits en réponse au stress thermique

Chez Arabidopsis, la majorité des études s'intéressant à l'expression des HSF mesurent le taux d'ARNm à l'équilibre (RNASeq). Même si les corrélations entre taux d'ARNm et taux de protéines ne sont pas systématiquement positives, ces études donnent tout de même une indication sur le niveau régulation de ces gènes. Différentes études chez Arabidopsis font état d'une induction du niveau d'ARNm à l'équilibre en réponse au ST pour *HSFA1, HSFA2, HSFA3, HSFA7, HSFB1, HSFB2, HSFC2* [36–43]. Récemment, Andràsi *et al*., ont compilé et re-analysé plusieurs bases de données transcriptomiques chez Arabidopsis afin de déterminer les comportements des différents HSF en réponse au ST. Étonnamment la transcription des gènes *HSFA1* n'est que très peu induite en condition de ST. En revanche les gènes *HSFA2*, *HSFA3*, *HSFA7A*, *HSFA7B*, *HSFB1*, *HSFB2A*, et *HSFB2B* voient leurs niveaux de transcrits fortement augmenter. De façon très intéressante, cet effet disparait chez le quadruple mutant (*hsfa1a-1b-1d-1e)*, indiquant le rôle des HSFA1 dans la régulation d'autres HSF et faisant d'eux des « maitres régulateurs » de la réponse au ST chez Arabidopsis (Figure 3) [44]. Une seconde étude publiée en 2013 soutient cette hypothèse, puisque dans ce même quadruple mutant la surexpression de HSFA2 permet de restaurer le phénotype de thermotolérance. Il est proposé que les *HSFA1* régulent positivement *HSFA2* et *HSFA3*, et que ces facteurs de transcription permettent d'amplifier la réponse en activant d'autres gènes de réponse au stress. Les HSFA1 possèdent aussi d'autres cibles : ils permettent notamment l'activation de la transcription des gènes DEHYDRATATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2 (*DREB2A* et *DREB2C*), eux aussi des facteurs de transcription capables de se fixer sur les promoteurs et d'activer la transcription de nombreux gènes de réponse au stress nécessaires pour la thermotolérance [45].

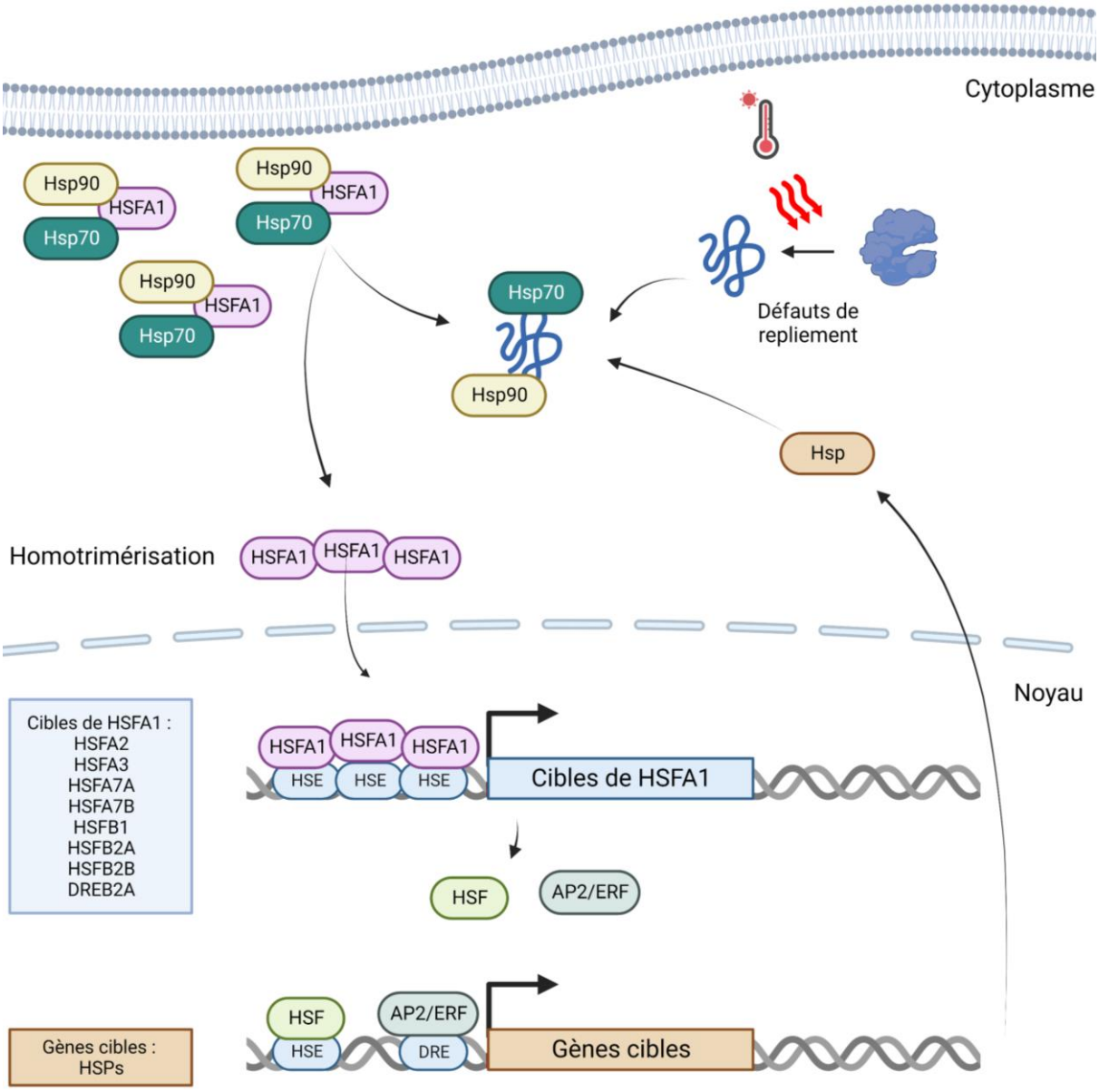


Figure 3. Modèle simplifié du fonctionnement moléculaire des HSFA1. *En condition non stressée, les différentes HSFA1 (représentées ici comme une seule protéine) sont séquestrées dans le cytoplasme par HSP90 et HSP70. Lors d'un stress thermique, les HSP90 et HSP70 sont recrutées pour servir leur rôles de chaperonnes, libérant alors les HSFA1 qui vont former des homotrimères. Ces oligomères vont alors être recrutés dans le noyau pour se fixer sur le promoteur de leurs gènes via la fixation des régions HSE. Les HSFA1 vont cibler des gènes codant des facteurs de transcription de la réponse au stress. Une fois traduit, ces gènes vont à leur tour activer la transcription de leurs gènes cibles, majoritairement des HSP.*

2.2.3 – Trois classes de HSF aux fonctions moléculaires différentes

Les mécanismes permettant l'induction des HSF sont multiples. Dans la partie 2.1 des exemples ont été cités : cascades de kinases conduisant à la phosphorylation et activation, changement d'état rédox permettant d'activer des HSF. Une autre voie de régulation impliquant les HSP a été démontrée (Figure 3) : en condition normale, les HSFA1 sont séquestrées par les HSP70 et HSP90 [46]. Lors de l'apparition d'un stress thermique, les HSP70 et 90 sont recrutées afin d'assurer leurs fonctions de chaperonnes et d'aider au repliement des protéines, conduisant à la libération des HSFA1. Une fois libres, les HSFA1 peuvent être relocalisées vers le noyau pour activer la transcription des gènes de réponse. Sous forme de trimère dans le noyau, elles vont se fixer via leur domaine DBD à une région HSE sur le promoteur de sa cible. Puisque ces protéines agissent sous forme trimérique, il est nécessaire d'avoir au moins trois séquences HSE sur le promoteur d'un gène afin d'être activé par les HSF de manière efficace [30]. Chez les eucaryotes, les séquences HSE sont des séquences conservées composées de motifs GAA agencés en répétitions inversées et dont le nombre de répétitions peut varier. De nombreuses études ont confirmé l'importance de ces séquences pour la fixation des HSF et l'activation des gènes de réponse tels que les HSP [47].

De façon intéressante, il existe aussi des facteurs de transcription considérés comme répresseurs de la réponse au ST : les HSFB peuvent présenter les deux caractéristiques, activateur et répresseurs. En tant qu'activateur, leur action se conjugue avec celle des HSFA1 afin d'améliorer leur activité [48]. Une étude a proposé que les HSFB ont un impact positif sur les mécanismes d'effet mémoire de la réponse au ST [49]. De façon paradoxale, des études montrent aussi leur rôle dans la répression de nombreux autres HSF et aussi certaines HSP (dû à la présence d'un domaine répresseur présent en C-terminal et composé d'une courte séquence peptidique (R/KLFGV)). Du fait de l'importante diversité des HSF, de nombreuses études pointent l'existence d'une redondance dans leurs cibles et leur régulation [50].

Très peu d'études visant à caractériser les HSF de classe C ont été réalisées et il n'existe pas encore de consensus sur le potentiel rôle activateur ou répresseur de ces facteurs de transcription [43]. Néanmoins les profils d'expressions des HSFC montrent qu'ils répondent positivement au ST. Récemment, une expérience visant a cloner et surexprimer HSFC1b

provenant de *Festuca arundinacea* (une plante monocotylédone de la famille des *Poaceae*) dans Arabidopsis, a conduit à accroître sa thermotolérance et supposant un rôle positif de cette classe de facteur de transcription dans la réponse au ST [51].

2.2.4 – D'autres facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress thermique

Mêmes si les HSF sont les acteurs centraux de la réponse au ST chez Arabidopsis, d'autres facteurs de transcription permettent de reprogrammer l'expression des gènes en réponse au ST. Les facteurs de transcription APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (APE2/ERF) ont été décrits comme des régulateurs majeurs de la réponse au stress (notamment thermique) [52]. C'est une superfamille de facteurs de transcription, composée de 147 gènes chez Arabidopsis [53] et qui regroupe les familles des facteurs de transcription AP2, ERF et RAV [54]. Ces gènes sont régulés en conditions normales de croissance : leur expression peut être renforcée ou réprimée en fonction des stades de développement et des tissus [55]. Mais leur expression est fortement régulée et amplifiée en condition de ST [56]. Par exemple, l'expression de DREB2A (un facteur de transcription de la famille AP2/ERF) est sous contrôle des HSFA1. À son tour DREB2A va activer des gènes de réponse au ST. Il est à noter que les différents membres qui composent cette superfamille de facteurs de transcription peuvent avoir des fonctions très contrastées : à la fois d'activateurs ou de répresseurs de la transcription [57].

2.2.5 – Les régulations épigénétiques induites par le stress thermique

Au-delà des facteurs de transcription, un autre dispositif permet aux plantes de moduler rapidement la transcription de gènes en réponse au ST. Certains de ces mécanismes sont qualifiés de régulations épigénétiques et englobent : les variants d'histones, les modifications des histones, des remodeleurs de la chromatine, des modifications de l'ADN ou encore des ARN non codants. Certaines modifications des histones (H3K4me3) peuvent faciliter l'accès à la machinerie transcriptionnelle et favoriser cette dernière et d'autres (comme la désacétylation des histones H3 et H4 par exemple) à l'inverse vont empêcher cet accès et réprimer la transcription. Ces différents mécanismes sont sensibles aux variations environnementales et des régulations dynamiques et transitoires de la chromatine sont une conséquence du ST. De plus, les HSF peuvent aussi induire une régulation épigénétique. L'utilisation du mutant *hsfa2* a permis de démontrer son implication dans le dépôt de marques H3K4me2, H3K4me3 ainsi que H3K9Ac sur des *loci* de gènes cibles, liés à la réponse et la mémoire du stress thermique. En effet, lorsque HSFA2 fixe les promoteurs de APX2 et HSP18.2 (deux cibles de HSFA2), cela entraîne une accumulation des marques épigénétiques H3K4me2/3 sur des régions clés, intensifiant leur activité transcriptionnelle [58]. Un autre exemple met en avant le rôle de HSFA1 dans le retrait de l'histone H2A.Z, déclenchant l'activation des gènes où elle était présente [59].

Au cours cette partie 2.2 nous avons décrit les mécanismes transcriptionnels permettant de reprogrammer de façon rapide et efficace l'expression des gènes en réponse à un ST. Ainsi, le rôle central des HSF dans ce mécanisme y a été éclairci : certaines HSF jouent le rôle d'activatrices de la réponse au ST. Ces activatrices vont enclencher une réponse globale et finement réguler l'expression des gènes de réponses au ST. Les protéines codées par ces gènes de réponse au stress possèdent des capacités d'effectrices afin de pallier les effets néfastes du ST. Les effectrices principales de la réponse au stress sont les Heat Shock Proteins (HSP) qui seront traitées dans la partie suivante.

2.3 - Le rôle des HSP dans la réponse au stress thermique : régulation et protection des protéines

Au sein des cellules, les stress biotiques et abiotiques (et particulièrement le stress thermique) causent d'importants dysfonctionnements protéiques. Cela se traduit principalement par des difficultés pour les protéines d'adopter une conformation fonctionnelle, conduisant à l'agrégation de protéines mal repliées, pouvant causer d'importants dégâts et inéluctablement conduire à la mort cellulaire. Afin de pallier ce phénomène, les cellules ont mis en place des mécanismes à l'échelle moléculaire permettant d'aider les protéines à conserver leur conformation physiologique lors d'épisodes de stress : c'est le rôle des HSP. Cette classe de protéines tire son nom du fait qu'elles ont d'abord été identifiées comme étant très fortement induites lors d'un ST chez la drosophile [60]. Par la suite des études ont pointé du doigt d'autres rôles pour ces protéines, impliquées à la fois dans la réponse aux stress (froid, osmotique, salin, oxydatif) [61] mais aussi nécessaires dans des processus de développement et de croissance [62–64], ainsi que dans le maintien de l'homéostasie et le transport de protéines [65]. Elles jouent des rôles de chaperonne au sein des cellules : lorsque les protéines sont relâchées du ribosome, elles doivent être repliées afin d'atteindre leur conformation tridimensionnelle (3D) fonctionnelle. Les HSP, en se fixant à leurs substrats protéiques, vont aider au bon repliement de ces dernières. Le rôle effecteur des HSP dans la réponse au ST est alors déterminant pour la survie de la plante.

2.3.1 – Les plantes possèdent une forte diversité de HSP

Les HSP sont des protéines très conservées au cours de l'évolution : elles sont retrouvées chez la plupart des eucaryotes et des procaryotes, où elles possèdent de fortes homologies de séquences [66]. Toutes les HSP se caractérisent par la présence d'un domaine carboxylique terminal appelé « heat-shock domain » [65,67]. Elles sont réparties en différentes classes, dont la nomenclature repose sur leur taille. Chez les plantes, les HSP sont séparées en cinq familles : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, et les petites HSP [68,69]. On recense aujourd'hui 46 HSP chez Arabidopsis : 8 HSP100, 7 HSP90, 18 HSP70 et 13 HSP20 [70–73]. Du fait de leurs rôles cruciaux en

conditions normales de croissance, l'expression de certaines HSP est ubiquitaire. Aussi, de nombreuses HSP sont différentiellement exprimées au cours du développement des plantes [74]. En revanche lors d'un ST, alors que les cellules ont tendance à faire chuter l'expression de la majorité des gènes, les HSP sont quant à elles fortement exprimées : elles sont soumises à un important contrôle transcriptionnel, induit par les HSF. Les HSF reconnaissent et se fixent à un domaine HSE, présent dans le promoteur des HSP, stimulant leur expression (partie 2.2).

2.3.2 - Les petites HSP

La famille de petites HSP (sHSP) est subdivisée en différentes classes sur la base de leur localisation subcellulaire : nucléaire, chloroplastiques, péroxysomes, RE, dont certaines pouvant être présentes à la fois au niveau du RE et du chloroplaste [75]. Les sHSP sont composées d'un domaine alpha-crystalline (ACD), proposé comme étant capable de se lier aux protéines dénaturées, sans avoir recours à l'utilisation d'ATP. Cette activité ATPase-indépendante est caractéristique de la classe des sHSP [70]. En amont du ACD se trouve un domaine N-terminal (de taille variable) et en aval un court domaine C-terminal non conservé (CTS) (Figure 4). Le modèle actuel propose que les caractéristiques des trois domaines permettent de réguler la capacité des sHSPs à former des oligomères, composés au minimum de 12 protéines (dodécamère) et pouvant aller jusqu'à 32 protéines [76,77]. Cette capacité de s'assembler en oligomères est cruciale pour assurer leurs fonctions de chaperonnes. Ce modèle est aujourd'hui validé par quatre études : trois structures cristallines oligomériques et une autre utilisant de la microscopie cryo-électronique [75,78–80].

Les sHSP sont surexprimées en condition de ST et ont pour rôle principal d'aider au repliement des protéines ainsi qu'à la dégradation des protéines mal repliées. Néanmoins, il est intéressant de noter que les sHSP sont incapables d'inverser le processus si les protéines sont déjà mal repliées et ont d'ores et déjà formé des agrégats : elle se doivent donc d'être présentes dès lors que les protéines peinent à se replier. Assez peu d'études ont montré et expliqué les mécanismes d'interactions entre des sHSP et leurs substrats. Récemment, *Yu et al.*, ont démontré chez Arabidopsis la formation d'un complexe entre HSP21 et la 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXPS) en condition de ST avec une résolution proche de

l'atome (3.7 Å), faisant de cette image la meilleure résolution actuelle montrant l'interaction entre une sHSP et un de ses substrats naturels. Il y est proposé que HSP21 interagit physiquement avec DXPS en condition de ST dans le but d'empêcher son agrégation [81].

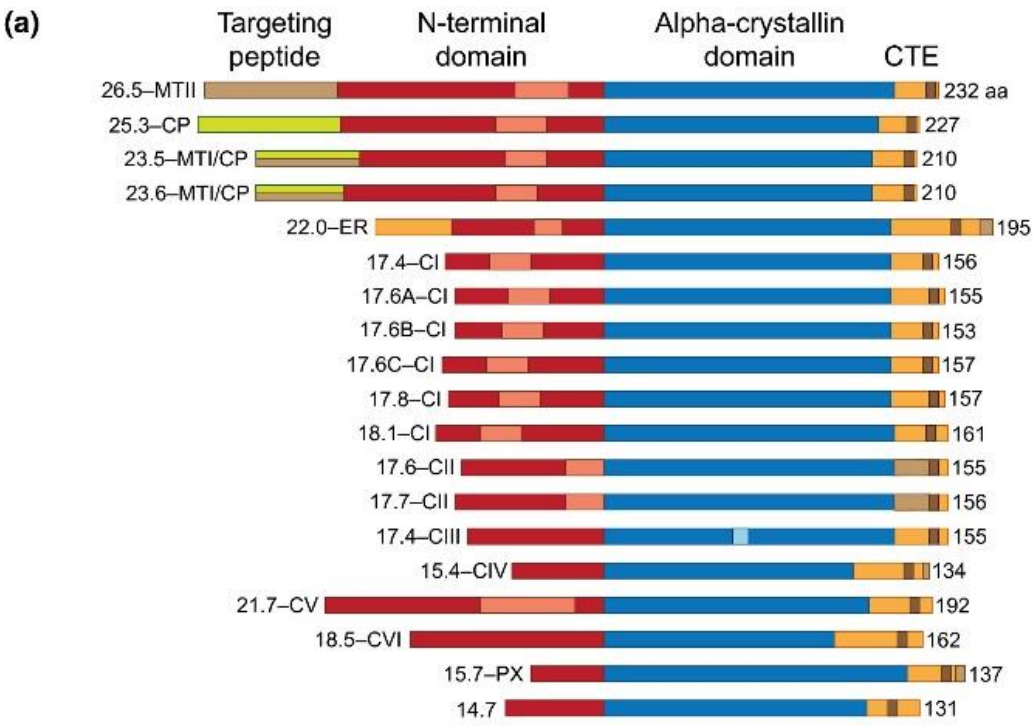


Figure 4. Schéma de la structure des petites HSP chez Arabidopsis. *On trouve les parties N-terminal et C-terminal qui entourent le domaine ACD permettant de se fixer aux substrats. Adapté de "Plant small heat shock proteins – evolutionary and functional diversity"* [82].

2.3.3 – Les HSP70

Chez les plantes, les HSP70 forment une superfamille, subdivisée en deux familles : les HSP70 (DnaK) et les HSP110/SEE [83]. Chez Arabidopsis, le génome encode 14 HSP70 et 4 HSP110 retrouvées dans quatre compartiments subcellulaires différents : cytosol (AtHSP70-1, -5, -14, -16 et -18), mitochondries (AtHSP70-9 et -10), RE (AtHSP70-11, -13 et -17) et chloroplastes (AtHSP70-6 et -8) [83]. D'un point de vue structurel, les HSP70 des plantes contiennent un domaine ATPase N-terminal de liaison nucléotidique (NBD) de 45-kDa qui fixe et hydrolyse l'ATP, suivi par un domaine de liaison peptidique de 15-kDA (SBDβ), d'un domaine hélicoïdal de 10-kDA (SBDα) et d'une queue C-terminale désordonnée et de longueur variable. Les HSP110 possèdent la même structure à laquelle s'ajoute une insertion de résidus acides entre les régions SDBα et SDBβ, ainsi qu'une extension au niveau de la queue C-terminal [84] (Figure 5). Des variations de séquences sont retrouvées aux extrémités des parties C-terminal. Ce sont ces différences qui dictent les caractéristiques de localisation subcellulaires et d'interactions moléculaires des HSP70 [85] . Leur localisation est déterminée en fonction des différents motifs C-terminaux : le motif EEVD est retrouvé chez les HSP70 cytosoliques et nucléaires, le motif HDEL pour le RE, le motif PEAEYEEAKK pour la mitochondrie et le motif PEGDVIDADFTDSK pour les plastes [83].

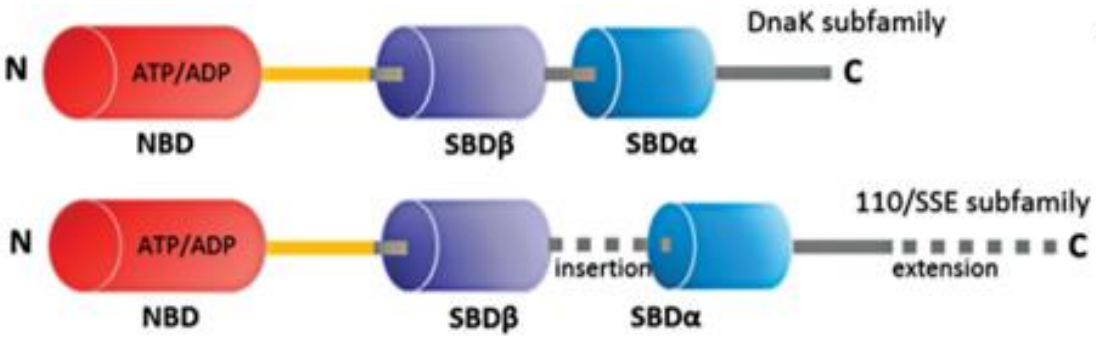


Figure 5. Schéma de la structure des HSP70/HSP110. *En rouge le domaine NBD permettant de fixer et d'hydrolyser l'ATP, entre violet et bleu les domaines SBDα et SBDβ respectivement. Les protéines HSP110 possèdent des insertions entre ces deux domaines ainsi qu'une partie C-terminale plus longue. Adapté de "Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity" [82].*

Tout comme les sHSP, leurs niveaux d'expression sont stimulés lors d'un ST. Les activités moléculaires des HSP70 sont très diverses : elles sont impliquées dans la biogénèse des protéines, leur protection en condition de stress, leur mouvement à travers les membranes et parfois même des rôles plus spécialisés d'assemblage ou de désassemblage de complexes protéiques. Si ces protéines peuvent avoir des rôles si variés cela est dû à leur capacité de fixer une importante diversité de substrats aux fonctions diverses. L'interaction entre les HSP70 et leur substrat dépend de nombreux facteurs impliquant à la fois l'activité ATPase du NBD et les domaines SBD : les domaines SBD vont se lier à de courts motifs polypeptidiques (ces motifs ne sont pas rigoureusement définis), puis l'affinité entre HSP70 et son substrat est modulée de manière allostérique par le domaine NDB et la présence ou l'absence d'ATP. Il est intéressant de noter qu'alors que l'activité ATPase est nécessaire à la liaison avec le substrat, l'activité ATPase intrinsèque des HSP70 est faible et nécessite des co-chaperonnes pour la favoriser: les nucleotides exchange factor (NEFs) [86]. À l'inverse d'autres HSP, les HSP70 ne nécessitent pas forcément de former des oligomères pour réaliser leurs fonctions moléculaires et les monomères peuvent exercer les fonctions de chaperonnes [87]. En plus de l'activité chaperonne, les HSP70 permettent la translocation et le mouvement de protéines vers certaines organelles (RE, mitochondrie, chloroplastes) [88,89]. Enfin, un autre rôle crucial est attribué aux HSP70 : le contrôle qualité des protéines, en vue de les dégrader. Des ubiquitines ligases (E3), sont capables d'interagir avec HSP70 afin d'ubiquitinyler la protéine substrat fixée par HSP70. Cette ubiquitinylation est un signal de dégradation impliquant le protéasome 26S [90].

2.3.4 - Les HSP90

Les HSP de 90-kDA (HSP90) sont des protéines très abondantes, puisqu'à elles seules elles représentent environ 1% du pool total de protéines dans une cellule végétale en condition normale [91]. Sept membres ont été trouvés chez Arabidopsis sur la base de leur phylogénie et de leur localisation subcellulaire : AtHSP90-1 localisée dans le cytoplasme, les AtHSP90-2, -3 et -4 dans le noyau et AtHSP90-5, -6 et -7 dans les plastes, les mitochondries et le RE respectivement. Les HSP90 se distinguent par la présence de trois domaines très conservés : un premier domaine de liaison à l'ATP en N-terminal (ND), un deuxième domaine appelé "Middle Domain" (MD) et un domaine en C-terminale (CD) contenant le pentapeptide MEEVD motif (Met-Glu-Glu-Val-Asp), proposé comme nécessaire pour la formation de dimère de HSP90 [92] (Figure 6). Il a été montré qu'en condition de stress, les HSP90 forment des homodimères et que cette dimérisation est nécessaire pour la capture et la prise en charge des protéines mal repliées. Le modèle communément accepté propose qu'après avoir formé un homodimère, cette interaction va conduire à un changement de conformation aboutissant sur une structure en forme d'anneau permettant de capturer les protéines non-repliées via les deux parties N-terminales. Cette étape nécessite de l'ATP [93,94].

Les HSP90 sont souvent tributaires de co-chaperonnes qui vont réguler leurs rôles moléculaires : différentes co-chaperonnes peuvent interagir avec les différents domaines des HSP90 [95]. Lors de ST, les protéines mal repliées sont prises en charge par les HSP70/HSP40. La protéine co-chaperonne HOP (HSP70/HSP90-organizing protein) se fixe sur le domaine CD des HSP90 lorsque ces dernières se trouvent dans une conformation « ouverte », afin de conserver cet état et permettre à la protéine cible associée à HSP70/HSP40 d'être prise en charge par les HSP90 et fixer l'ATP [96]. La protéine Arabidopsis H+-ATPase 1 (AHA1) quant à elle se fixe sur le domaine MD et permet d'accélérer l'étape d'hydrolyse de l'ATP (relâchant HOP et HSP70/HSP40), permettant de stabiliser la conformation « fermée » des HSP90 (et conduisant au relâchement de HOP) [97]. Les fonctions des HSP90 ne se limitent pas à leur capacité à prendre en charge les protéines mal repliées : par exemple, HSP90 peut réguler l'expression de HSFA2 en modulant le taux de dégradation de son transcrit [46].

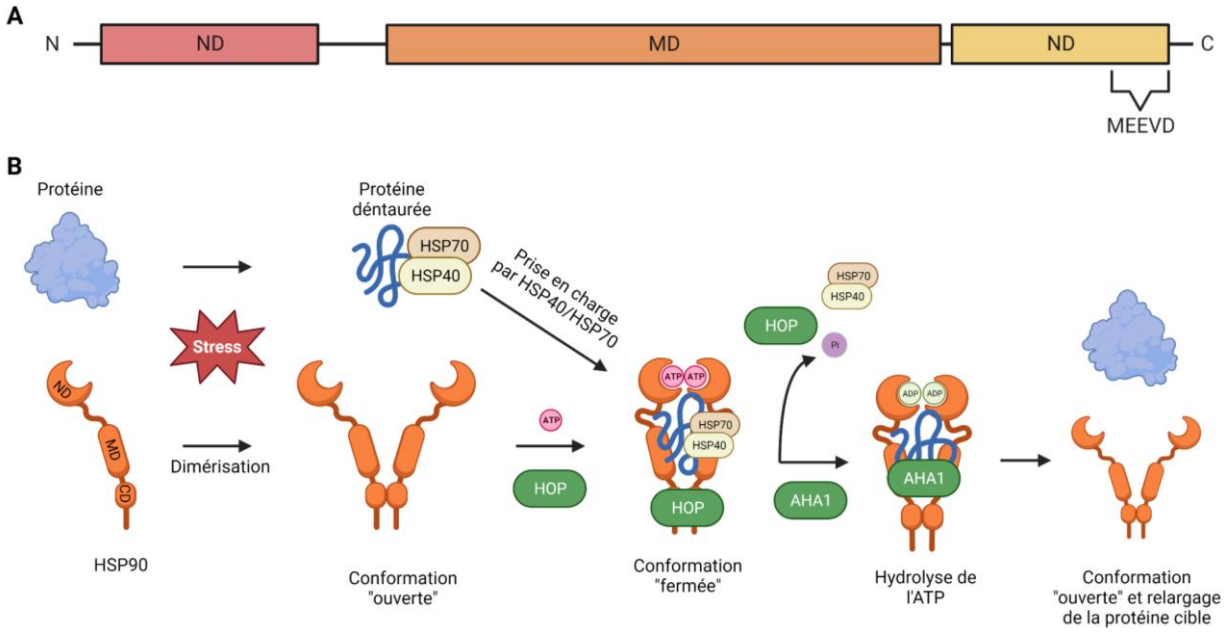


Figure 6. Schéma représentant la structure et le mode d'action des protéines de la famille des HSP90. *A) Schéma simplifié de la structure des HSP90. En rouge le domaine ND permettant la fixation de l'ATP, en orange le domaine MD permettant de fixer le substrat et en brun le domaine CD contenant le motif MEEVD et impliqué dans la dimérisation des HSP90. B) Modèle du mode d'action des HSP90 en réponse au stress : le stress va conduire à l'homodimérisation des HSP90 dans une conformation dite « ouverte », stabilisé par HOP. Les HSP90 vont prendre en charge les protéines mal repliées associés à HSP70/HSP40 et fixer l'ATP. Cela va induire un changement de conformation des HSP90 dans un état dit « fermé ». Cet état permet la fixation de AHA1 qui va accélérer l'hydrolyse de l'ATP conduisant au relargage de HOP, HSP70/HSP40 et de Pi. La protéine correctement repliée est ensuite relâchée et le dimère de HSP90 retrouve une conformation « ouverte ».*

2.3.5 - Les HSP100

Comme les autres familles de HSP (sauf les sHSP), les HSP100 sont dépendantes de l'ATP afin de réaliser leur fonction de chaperonnes lors d'un ST. Contrairement aux HSP70 et sHSP qui aident aux repliements des protéines mais sont incapables de désassembler les agrégats protéiques, les Caseinolytic Protease (Clp) (superfamille dont font parties les HSP100), ont quant à elles la capacité de démanteler ces agrégations protéiques. Les Clp sont subdivisées en deux sous-familles sur la base de la présence d'un (classe II) ou de deux (classe I) domaine(s) de liaison à l'ATP (nucleotide binding domain i.e., NBD). Chez Arabidopsis on retrouve 3 Clp de classe I (ClpB, ClpC et ClpD, avec des tailles allant de 68 à 110 kDa) et 1 de classe II (ClpX) [98] (Figure 7). La sous-famille des ClpB regroupent des protéines de poids moléculaires avoisinant les 100kDa et qui sont fortement induites lors d'un ST et nécessaires pour permettre la thermotolérance de la plante (les distinguant des autres Clp) : c'est pour cela que les ClpB ont adopté le nom de HSP100 [99].

Chez Arabidopsis *l*es HSP100/ClpB sont composées de 4 domaines : N-terminal, nucleotide-binding domain 1 (NBD1), middle domain (M-domain), nucleotide-binding domain 2 (NBD2) (Figure 7). Ces domaines sont fortement conservés au cours de l'évolution puisqu'ils présentent une forte homologie avec des HSP100 d'autres organismes eucaryotes mais aussi procaryotes [100]. Au sein des domaines NBD se trouve un motif impliqué dans la liaison à l'ATP (Walker A) et un motif impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP (Walker B). Il a été montré que la fixation de l'ATP par le motif Walker A est essentielle et suffisante pour l'oligomérisation des protéines [101]. Les monomères d'HSP100 s'organisent en hexamère, fixant 12 molécules d'ATP afin d'être fonctionnels. Le domaine NBD1 est connecté à la partie N-terminal des ClpB via un linker riche en glycine, lui conférant une importante motilité. Il est proposé que cette forte mobilité lui confère la capacité de reconnaitre et de fixer une grande diversité de substrats [102]. Néanmoins, assez peu de substrats de HSP100 sont connus aujourd'hui. Mais du fait de leur rôle critique dans la réponse au stress, il est suggéré que ces protéines ciblent une quantité importante de substrats.

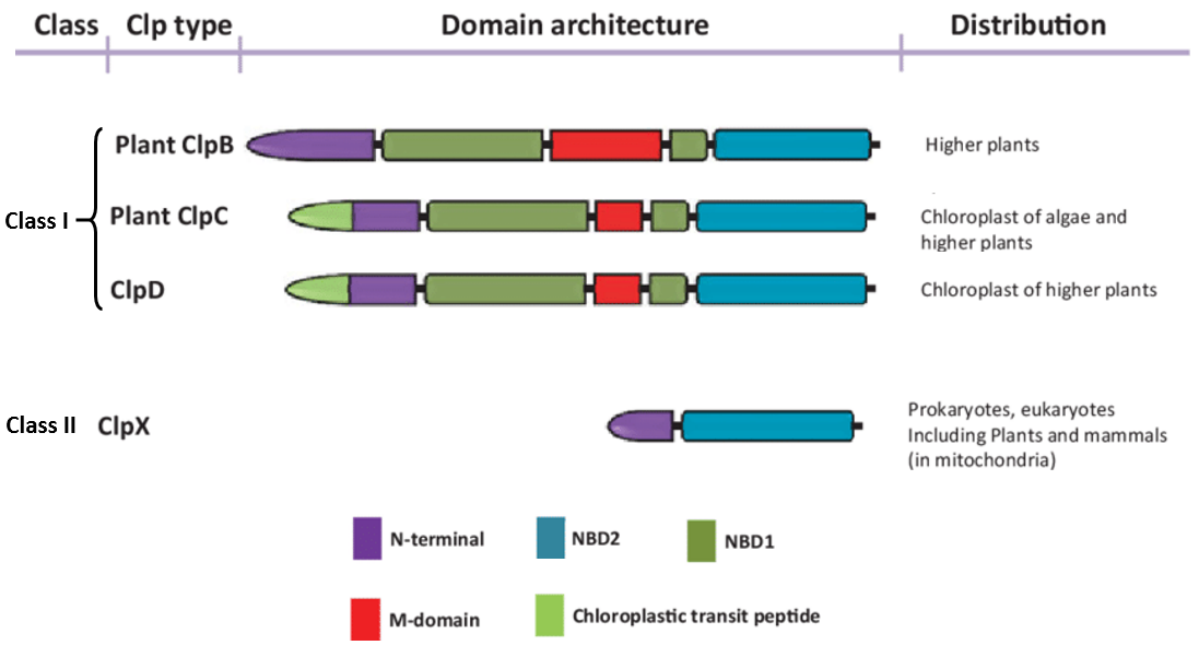


Figure 7. Schéma représentant la structure des protéines de la famille des Clp. *En vert clair, le domaine de localisation chloroplastique. En violet le domaine N-terminal, en vert foncé le domaine NBD1 retrouvé chez les Clp de classe I, suivi du domaine M en rouge. Enfin en C-terminal, le domaine NBD2. Adapté de « ClpB/Hsp100 proteins and heat stress tolerance in plants »* [98].

Chez les plantes, une HSP100 a été intensivement étudiée : HSP101 (aussi appelée ClpB1 ou HOT1), notamment du fait de son rôle clé dans la thermotolérance. Trois homologues de HSP101 ont été trouvés dans le génome d'Arabidopsis : ClpB2, ClpB3 et 4 (Caseinolytic Protease). Lee *et al.,* ont montré que CLPB2 est localisée dans le noyau et le cytosol, ClpB3 dans le chloroplaste et CLPB4 dans la mitochondrie. De plus, bien que les transcrits de ces trois gènes soit surexprimés en condition de ST, seul le mutant *hsp101* présente des phénotypes de thermosensibilité. Néanmoins il est impossible d'exclure la possibilité que ClpB3 joue un rôle dans la thermotolérance : en effet un mutant KO de ClpB3 est létal car incapable d'accumuler de la chlorophylle et ne parvient pas à former des chloroplastes fonctionnels, attestant de l'importance de cette protéine dans des processus de développement et de croissance. Le rôle d'HSP101 diffère comparé aux autres HSP décrites précédemment. Les autres HSP empêchent la formation d'agrégats en aidant les protéines à se replier, en revanche elles ne sont plus d'aucune utilité une fois que les protéines sont mal repliées. Les HSP101 quant à elles possèdent la capacité de prendre en charge les agrégats protéiques afin de renaturer les protéines pour rétablir leurs fonctions natives [99]. Les HSP101 sont aussi impliquées dans la dégradation de protéines agrégées : une étude montre que HSP101 interagit avec des agrégats protéiques au sein desquelles les protéines sont hautement ubiquitinylées. En accord avec ce résultat, ils montrent aussi que HSP101 colocalise avec le protéasome 26S, soutenant le rôle de HSP101 dans la dégradation des agrégats protéiques ubiquitinylés [103].

2.3.6 – Les voies CPR et UPR : des sous-compartiments de la réponse au stress

Le stress thermique induit une réponse généralisée, mais en son sein peuvent se distinguer différents mécanismes. Ces derniers sont principalement différenciés sur la base de leur localisation subcellulaire : la voie CPR (Cytosolic Protein Response) se met en place pour répondre aux contraintes du cytoplasme et la voie UPR (Unfolded Protein Response) quant à elle agit au niveau du RE.

L'étude spécifique de la réponse au ST au sein du cytosol a permis aux chercheurs de mettre en avant l'existence d'une voie de régulation de la réponse au stress spécifique à ce compartiment (CPR). Cette voie de réponse est déclenchée par l'accumulation de protéines mal repliées dans le cytoplasme en réponse à un stress. Elle est majoritairement contrôlée par les facteurs de transcription HSF décrits dans la partie précédente (partie 2.2). En particulier, HSFA2 est nécessaire pour induire l'accumulation d'HSP70 cytosoliques. Cette induction des cibles de HSFA2 (et donc de la voie CPR) est hautement dépendante de la présence de HSE dans les promoteurs des gènes ciblés [104]. Les mécanismes permettant de réguler la voie CPR ne sont pas encore clairement élucidés, contrairement à la voie UPR qui agît dans le RE.

En réponse à différents stress (biotiques et abiotiques), la capacité des protéines à se replier correctement au niveau du RE peut aussi être impactée. Le stress du RE va alors déclencher une réponse appelée *unfolded protein response* (UPR). Des HSP70 sont induites lors de la réponse UPR : les binding proteins (BiPs). Chez Arabidopsis trois BiPs ont été décrites : BiP1 (HSP70-11), 2 (HSP70-12) et 3 (HSP70-13). BiP1 et BiP2 sont très similaires d'un point de vue de leur séquence en acides aminés et sont exprimées de façon ubiquitaire alors que BiP3 est très fortement induite en réponse au stress du RE (faisant de BiP3 un marqueur privilégié de la réponse UPR chez Arabidopsis*)* [105]. En condition physiologique les protéines BiP sont liées à IRE1a (INOSITOL REQUIRING 1a) et IRE1b (INOSITOL REQUIRING 1b), deux protéines transmembranaires situées dans la membrane du RE. En condition de stress du RE, les BiP vont libérer IRE1a,b et enclencher leur activité de chaperonnes afin d'aider au repliement des protéines dans le RE . IRE1a,b vont alors dimérisées (ou oligomérisées) afin d'épisser le facteur de transcription bZIP60 (BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 60) [106]. Une fois épissé ce

facteur de transcription va adopter sa forme active, permettant de former des dimères (homo- ou hétérodimères). Ces oligomères vont être relocalisés vers le noyau et activer les gènes de la réponse UPR (Figure 8) [107].

Il existe une seconde manière d'activer la voie UPR, via deux facteurs de transcription transmembranaires appelés bZIP17 et bZIP28. Ces facteurs sont enchevêtrés dans la membrane du réticulum endoplasmique et lors d'un stress du RE, les BiP libèrent ces protéines qui sont relocalisées vers l'appareil de Golgi, où elles sont hydrolysées par deux protéases : SP1 (site1 proteases) et SP2 (site2 proteases). Une fois hydrolysées, elles vont adopter leur forme active et être importées vers le noyau afin de stimuler les gènes de la réponse UPR (Figure 8) [107–109].

En conclusion, malgré le fait que les HSP soient connues depuis très longtemps et fortement étudiées par la communauté scientifique, de nombreuses zones d'ombres doivent encore être éclaircies : par exemple nous manquons drastiquement d'informations sur les substrats des HSP, qu'ils soient des protéines mal repliées ou bien des co-acteurs nécessaires pour assurer leurs fonctions biologiques. L'usage et la combinaison de techniques de pointe telles que la microscopie cryo-électronique, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (NMR) et la spectrométrie de masse sont nécessaires pour déceler les rôles variés que peuvent jouer ces molécules. Comme nous avons pu le voir, les HSP sont décrites aujourd'hui comme les principales effectrices de la réponse au ST, notamment chez les plantes. Bien que les HSF soient leurs principaux régulateurs, d'autres molécules peuvent elles aussi réguler l'expression des effectrices : dans la partie suivante nous nous intéresserons à une autre classe de molécules régulatrices, les petits ARN régulateurs et leur rôle dans la réponse au ST.

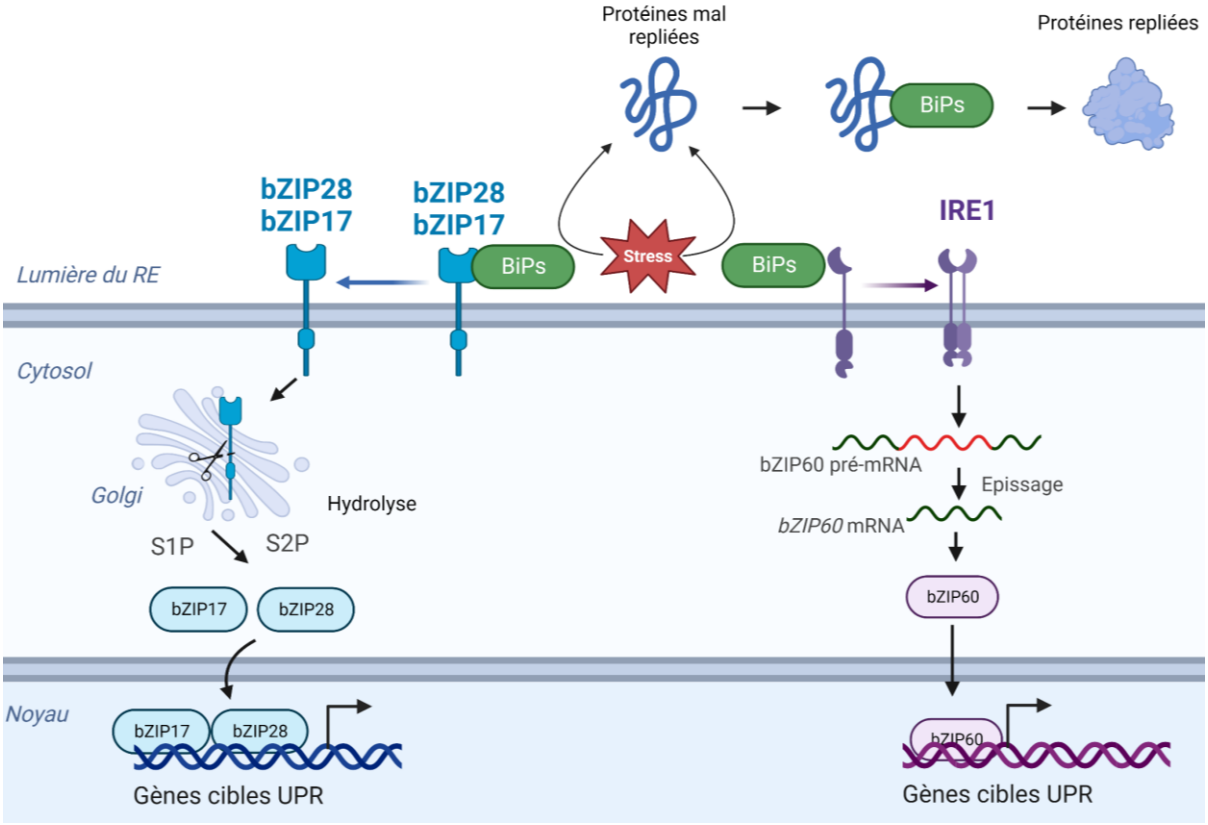


Figure 8. Schéma simplifié des différentes voies d'activation de la voie UPR chez Arabidopsis. *En condition normale, les BiPs (chaperonnes du RE) fixent les protéines bZIP17/28. Lors d'un stress du RE, les BiPs sont réquisitionnés pour aider au repliement des protéines traduites au niveau du RE, relâchant bZIP17/28. Elles vont alors être hydrolysées au niveau de l'appareil de Golgi afin de former un facteur de transcription actif qui sera recruté dans le noyau pour activer les gènes de la voie UPR. De même, les protéines IRE1a,b sont libérées des BiPs lors d'un stress du RE. La dimérisation des IRE1a et IRE1b va activer leur fonction et permettre d'épisser l'ARN messager codant la protéine bZIP60. Une fois produit, bZIP60 va être recrutée dans le noyau pour activer la transcription de gènes de la voie UPR.*

2.4 - Rôles des petits ARN dans la réponse au stress thermique

Les petits ARN sont connus pour jouer des rôles importants dans la régulation de l'expression de gènes de développement mais aussi de défense et de réponse au stress [110]. Deux classes de petits ARN non-codants ayant des rôles régulateurs ont été découvertes : les microARN (miRNAs) et les small interfering ARNs (siRNAs). Ces deux classes de petits ARN possèdent de nombreuses différences dans leur biologie et leur mode d'action mais conservent la même fonction, celle de réguler négativement l'expression de leur cible. Dans cette partie, je me limiterai à souligner le rôle spécifique des siRNA et miRNA dans la réponse au ST.

2.4.1 - Le rôle des miARN dans la réponse au stress thermique

En réponse au stress thermique chez Arabidopsis, une induction de miR398 est rapidement observée. En conséquence, le niveau d'accumulation des transcrits de ses cibles *CSD1* (*COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1*), *CSD2* (*COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 2*) et *CCS* (*COPPER CHAPERONE FOR SOD1*) chutent. Les mutants exprimant un miR398 non fonctionnel voient leur thermotolérance baisser et à l'inverse les mutants *csd1, csd2 et ccs* présentent une résistance accrue aux évènements de ST (indiquant le rôle négatif de ces protéines dans la réponse au ST et soulignant l'importance de les réprimer via miR398 lors d'un évènement de ST) (Figure 9) [111]. D'autres exemples ont été décrits dans la littérature. miR160 est induit lors d'un ST et les niveaux d'expression de ses cibles *ARF10* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 10*), *ARF16* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 16*) et *ARF17* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 17*) sont alors réduits. Comme dans l'exemple précédent, le mutant *miR160* est plus sensible au ST et les versions surexprimant miR160 sont plus résistantes. De même, les mutants *arf10, arf16 et arf17* ont des niveaux de thermotolérance accrus par rapport au sauvage soulignant leur caractère défavorable dans la réponse au ST et la nécessité de les réguler négativement [112]. Plus récemment, Tsai *et al.*, ont montré l'implication de miR164 dans la réponse au ST chez Arabidopsis [113] et indiquent un lien entre la régulation de miR164 et l'expression de HSP.

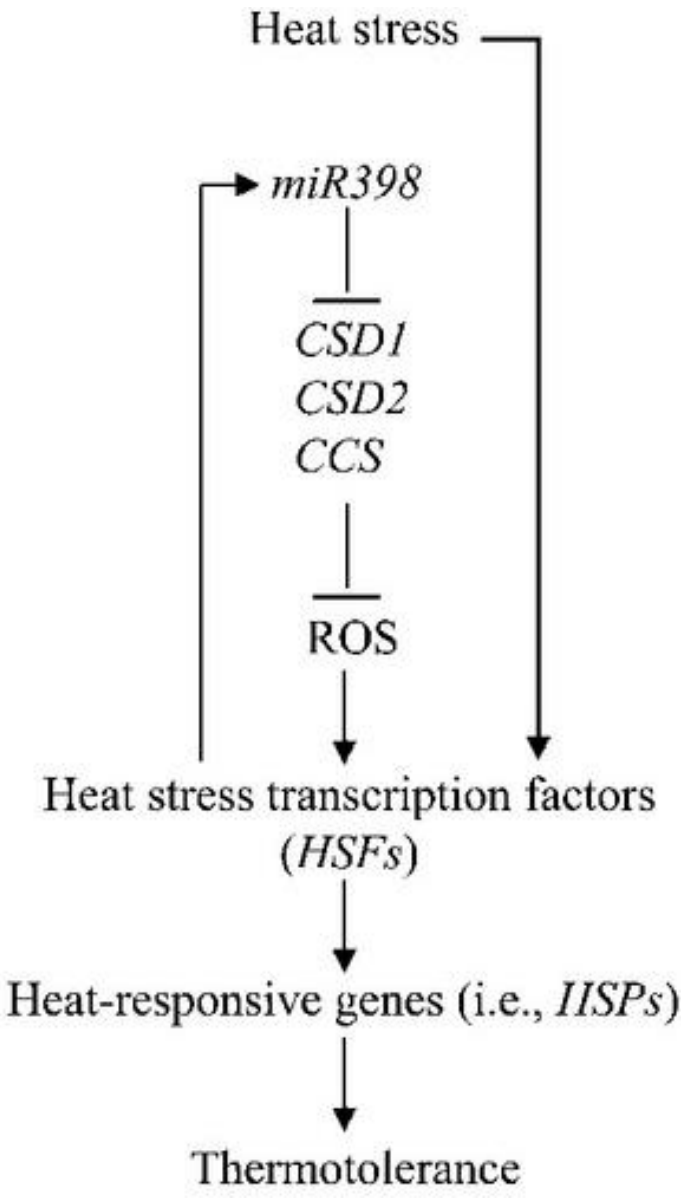


Figure 9. miR398 est impliqué dans la réponse au stress thermique chez Arabidopsis*. Lors d'un stress thermique, les HSF sont activées et vont induire la transcription du miRNA miR398. Ce petit ARN va induire la répression de CSD1/2 et CCS. Ces derniers permettent de réprimer la fabrication de ROS. En conséquence, la production de ROS est activée et permet d'enclencher la réponse au stress thermique.* Adapté de "*Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis"* [111].

2.4.2 - Le rôle des siARN dans la réponse au stress thermique

Les tasiRNAs (trans-acting small interfering RNAs) font partie de la famille des siARN les mieux décrits dans la réponse au stress thermique. Chez Arabidopsis on connait aujourd'hui quatre *loci* générant des tasiRNA : *TAS1, TAS2, TAS3* et *TAS4.* Le *locus TAS1* code lui-même pour plusieurs tasiRNAs avec des séquences très similaires (siR480, siR255, siR396 et siR4383). En condition de ST, les siRNAs dérivant du *locus TAS1* décroient dès la première heure du stress. En accord avec cela, les gènes *HTT1* et *HTT2* (cibles de ces siRNAs) voient leurs niveaux de transcrits augmenter car leur transcription est stimulée par la fixation de HSFA1A sur leur promoteur et leur répression par les siRNA est levée. Ces gènes cibles codent des protéines qui interagissent avec la protéine HSP70-14 et servent de cofacteurs afin d'assurer les fonctions des complexes de HSP. Des mutants surexprimant ces siRNAs montrent une baisse du nombre de transcrits de *HTT1* (*HEAT-INDUCED TAS1 TARGET 1*) et *HTT2* (*HEAT-INDUCED TAS1 TARGET 2*) et des défauts de thermotolérance, et à l'inverse des mutants surexprimant les HTT1 et HTT2 présentent des phénotypes de thermotolérance accrue (Figure 10) [114].

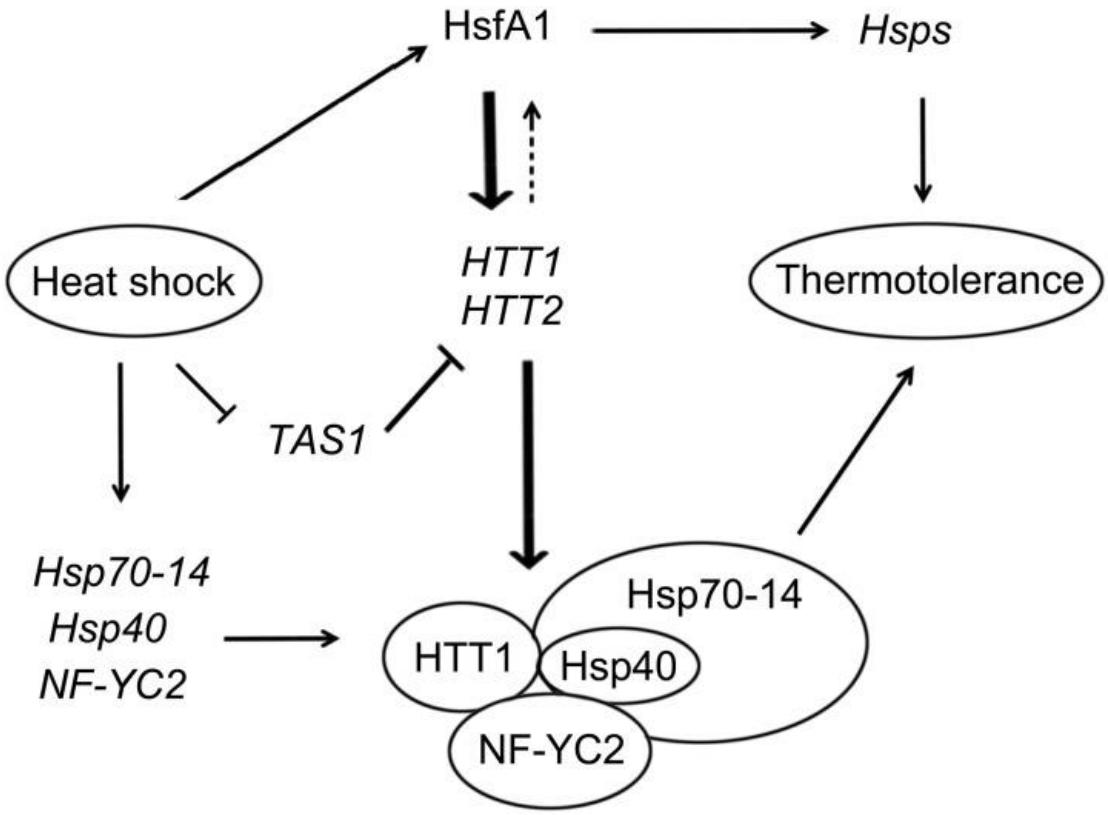


Figure 10. Rôle de TAS1 dans la régulation du stress thermique*. En condition normale TAS1 inhibe HTT1 et HTT2. En réponse au stress thermique la transcription du tasiARN TAS1 est inhibée, levant la répression de HTT1 et HTT2 (eux-mêmes activés par HSFA1). HTT1 et HTT2 vont ensuite activer la transcription de gènes de réponse au stress (HSP70-14). Adapté de "HEAT-INDUCED TAS1 TARGET1 Mediates Thermotolerance via HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A1a–Directed Pathways in Arabidopsis"* [114].

En conclusion, les petits ARN non codants (miARN et siARN) ont émergé comme des acteurs essentiels et multifonctionnels dans la régulation de la réponse au ST chez les plantes. Leur implication dans la modulation de la régulation de l'expression génique et de l'adaptation cellulaire témoigne de leur rôle crucial dans la protection et la survie des plantes en milieu thermiquement contraignant. Les miARNs et les siARNs, en particulier, ont été identifiés comme des régulateurs clés, modulant la stabilité des ARNm et la traduction, impliqués dans la réponse au stress. De plus, l'interaction complexe entre les petits ARN non codants et d'autres voies de régulation, telles que les facteurs de transcription et les HSP, renforce leur influence sur la plasticité et la résilience des plantes face aux variations de température. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et des cibles spécifiques des petits ARN non codants (en particulier les siARN) est encore nécessaire afin de comprendre l'étendue de leurs rôles dans ce phénomène.

À travers cette partie nous avons pu voir que le ST est un stress majeur chez les organismes végétaux. La nécessité de réagir rapidement aux changements de températures se traduit par une réponse rapide et finement régulée de l'expression des gènes permettant l'acclimatation des végétaux. Nous allons maintenant nous pencher sur la façon dont les plantes, une fois soumises à un ST initial, sont capables de conserver une "mémoire" de cet événement. En conditions naturelles, les plantes sont rarement sujettes à un seul évènement de ST : lors d'une vague de chaleur, les températures peuvent rester excessivement élevées pendant plusieurs jours. Or les plantes sont capables de se « souvenir » d'un évènement de stress passé afin d'appréhender de façon plus optimale un nouvel épisode de stress. On appelle ce phénomène de mémoire l'amorçage (ou priming en anglais). Ces mécanismes d'effet mémoire sont très variés et peuvent être impliqués dans des mécanismes d'acclimatation rapide (de l'ordre de minutes, heures) à des phénomènes d'acclimatation et d'adaptation beaucoup plus longs (pouvant s'étendre sur plusieurs générations). La partie suivante nous permet de passer d'une perspective axée sur les mécanismes agissant à court terme à ceux impliqués dans des phénomènes permettant une réponse sur le long terme, préparant les plantes à de futurs stress. En réalisant cette transition, nous élargissons notre compréhension pour saisir comment les plantes, en plus de réagir instantanément aux conditions changeantes, intègrent également des stratégies à plus long terme pour améliorer leur adaptation face aux défis

thermiques. Cette perspective temporelle nous permet d'explorer comment les plantes utilisent leur expérience passée pour anticiper et renforcer leur réponse future, offrant ainsi un aperçu de leur résilience et adaptabilité face aux environnements changeants.

2.5 - Priming et effet mémoire chez Arabidopsis

Au cours des précédentes parties, j'ai montré comment se mettent en place les réponses cellulaires et moléculaires permettant la réponse au stress thermique chez les plantes et en particulier chez Arabidopsis. J'y ai décrit une partie de la réponse intégrative permettant l'établissement de la thermotolérance basale d'Arabidopsis, fondamentale pour sa survie. Mais les plantes possèdent, en plus de cette réponse basale, la capacité de tirer avantage des évènements de stress passés afin d'être mieux préparées lorsque de nouveaux évènements de stress se manifestent. Cette capacité est attribuée à la notion de mémoire : au sens large en science la mémoire est définie comme une activité biologique qui permet d'emmagasiner, de conserver et de restituer des informations [115]. Ainsi, même si nous avons pour habitude de cantonner la capacité mémorielle du vivant aux organismes multi-cellulaires dotés d'un système nerveux, en réalité beaucoup d'organismes, notamment les plantes, rentrent dans cette définition et présentent cette capacité. La première étude faisant état d'un effet mémoire chez les végétaux a été publiée en 1928 chez le tabac (*Nicotiana tabacum)* dans un contexte de réponse à un virus (TRSV) [116]. De nombreuses études ont prouvé que cette capacité d'acclimatation et d'adaptation est fortement conservée chez les végétaux, et ce dans des contextes de stress biotiques et abiotiques (thermique, salin, hydrique, fongique, bactériologique ou encore face aux attaques d'herbivores) [117–120]. Un nombre croissant d'études mettent en lumière les mécanismes moléculaires permettant aux plantes une meilleure tolérance à un ST aigu lorsqu'elles ont subi au préalable un autre évènement de stress non létal : on nommera ce phénomène le thermo-amorçage (ou thermopriming en anglais) (Figure 11). Aujourd'hui les mécanismes moléculaires à l'origine du thermo-amorçage chez les plantes ont principalement été étudiés aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel : un nombre conséquent d'études ont montré que le transcriptome et le protéome des plantes sont fortement reprogrammés au cours de l'évènement d'amorçage ainsi que de la phase de récupération, permettant en partie, d'expliquer les phénotypes d'acclimatation [39,121–123]. Ces différentes études soulignent l'importance de poser les questions de la mise en place de la mémoire, mais aussi de son maintien à travers le temps : ce sont les deux facettes nécessaires pour que le phénomène de mémoire soit efficace chez les plantes.

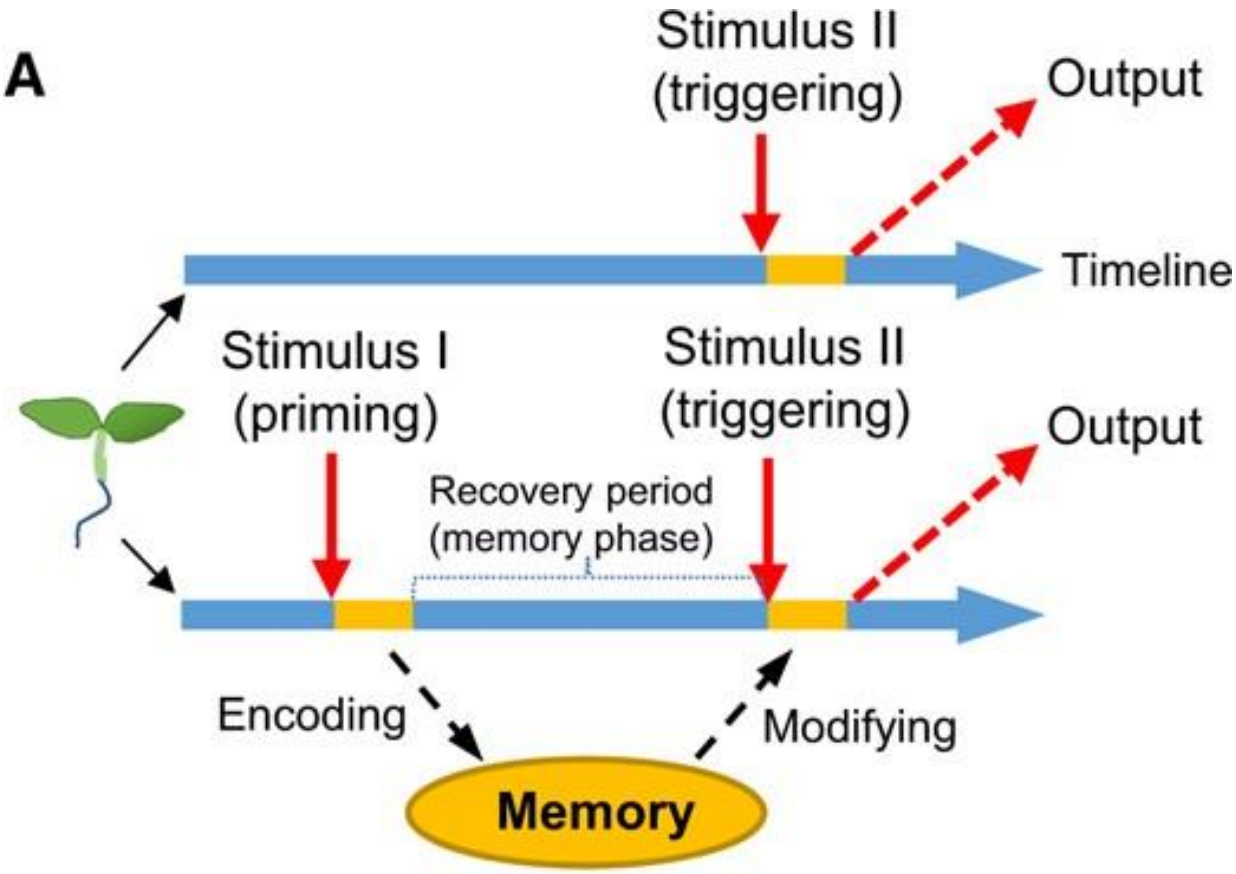


Figure 11. La mise en place de l'effet mémoire. *Lorsqu'une plante subit un évènement de stress non-létal, elle possède la capacité de mettre en place des mécanismes moléculaires au cours de la phase de récupération qui lui permettront de mieux répondre à un autre évènement de stress subséquent. On qualifie ce mécanisme de mémoire car la plante a stocké une information qu'elle est capable de restituer sous la forme d'une réponse plus rapide et plus adaptée. Adapté de "Maintenance of abiotic stress memory in plants: Lessons learned from heat acclimation"* [124].

D'importants questionnements persistent à propos du maintien de cette mémoire moléculaire à travers le temps. Afin d'élucider les mécanismes moléculaires induits par l'évènement d'amorçage, de nombreuses recherches se sont basées sur l'étude d'analyses quantitatives, permettant de comparer l'abondance de différentes classes de molécules (ARN, protéines, métabolites) tout au long de régimes de ST incluant ou non l'évènement d'amorçage.

Les études -omiques ont permis de mettre en lumière l'existence de nombreux gènes nécessaires pour l'effet mémoire, et ce dans différents contextes de stress (abiotique, salin, thermique, lumineux ou même mécanique)[124]. Deux grands types de gènes de mémoires aux comportements différents ont pu être distingués sur la base de leur comportement : ceux de type I sont fortement exprimés au cours de l'évènement d'amorçage et leur expression est soutenue au cours de la récupération. Ils permettent à l'individu d'être mieux préparé à un nouveau stress plus aigu en possédant déjà les ressources moléculaires nécessaires lorsque le second stress survient. Les gènes de type II quant à eux sont peu induits lors de l'évènement de priming mais voient leur expression croitre fortement lors du second stress (Figure 12)[125]. On peut distinguer trois types de mémoires sur la base de la durée et de l'héritage de cette mémoire au travers des générations suivantes : somatique, intergénérationnelle et transgénérationnelle. La mémoire somatique se limite à la vie d'un individu. La mémoire intergénérationnelle se retrouve uniquement dans la génération suivante (lorsque cette dernière n'a pas subi de nouvel évènement de stress) et enfin la mémoire transgénérationnelle est retrouvée à travers au moins deux générations n'ayant pas subi d'évènement de stress [126]. Les détails moléculaires expliquant ces phénomènes d'héritage commencent à être élucidés mais de nombreuses zones d'ombres persistent encore.

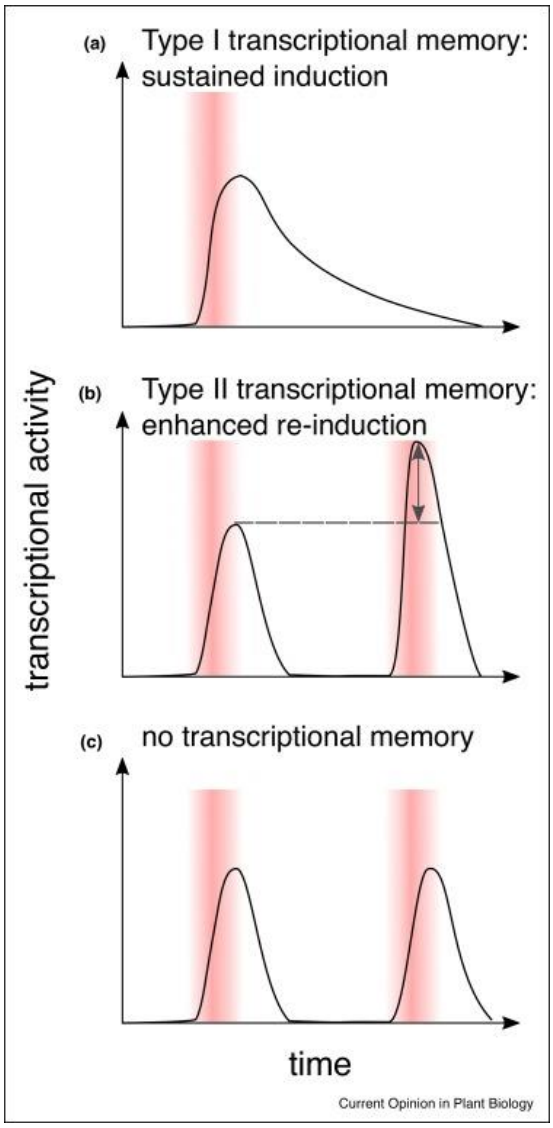


Figure 12. Les gènes mémoire de type I et II. *a) Gène mémoire de type I : leur expression est induite par le stress thermique puis conservée à travers une certaine période. b) Gène mémoire de type II : leur induction est induite par le stress thermique mais décroit. Lors d'une nouvelle exposition leur expression est renforcée. c) Gènes de réponse au stress (car induit par le stress thermique) mais sans phénomène de mémoire transcriptionnelle. Adapté de "Epigenetic regulation of abiotic stress memory: maintaining the good things while they last"* [127].

À travers les paragraphes qui vont suivre je me concentrerai sur l'étude de l'effet mémoire en réponse au stress thermique à différents niveaux de régulation : transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle. Dans un premier temps je traiterai de la mémoire somatique pour ensuite aborder la mémoire transgénérationnelle.

2.5.1 – Les régulations transcriptionnelles impliquées dans l'amorçage et l'effet mémoire

La mémoire somatique se base sur le maintien ou la réinduction de l'expression de facteurs clés liés à la réponse au stress thermique au cours de la vie d'un individu. Charng *et al*., ont montré l'importance du facteur de transcription HSFA2 dans la mémoire somatique chez Arabidopsis : le mutant *hsfa2* est sensible à un stress sévère lorsque ce dernier a subi un évènement d'amorçage au préalable, un phénotype non retrouvé chez la plante sauvage. Dans le mutant *hsfa2,* de nombreux gènes de réponses au stress normalement surexprimés durant la période de récupération voient leur expression baissée significativement. Par exemple, les niveaux de transcrits des gènes *HSA32* (*HEAT-STRESS-ASSOCIATED 32*) et sHSP de classe I (*HSP18.1* et *HSP25.3-P*) augmentent rapidement en réponse au stress et leur induction est conservée sur une période de plusieurs jours. Chez le mutant *hsfa2*, cette forte induction est présente mais une réduction rapide de la quantité des transcrits de ces gènes est observée. Ces résultats soulignent l'importance de HSFA2 non pas dans l'induction mais dans le maintien de l'expression de ces gènes, et par conséquent dans l'effet mémoire. D'autres études ont montré que l'expression de HSFA2 était sous le contrôle des facteurs de transcription maitres régulateurs HSFA1, introduisant HSFA2 et l'effet mémoire dans le modèle général de réponse au ST chez Arabidopsis [37,128]*.* Alors que HSFA2 était le seul HSF connu impliqué dans la mémoire du ST, récemment, Friedrich *et al.,* ont montré que HSFA3 (aussi nommé FORGETTER3), en coopération avec HSFA2, joue lui aussi un rôle dans l'effet mémoire. Tout comme HSFA2, le mutant *hsfA3* n'est pas sensible à un ST basal de moyenne intensité mais présente une sensibilité lors de ST impliquant un évènement d'amorçage (et un second stress de forte intensité). Les HSF ayant la capacité de s'oligomériser pour réaliser leurs fonctions biologiques, ils démontrent que HSFA2 et HSFA3 interagissent afin de conduire au phénotype de mémoire

thermique et portent la même fonction biologique. Ces deux facteurs de transcription sont alors capables de former un complexe hétéromérique permettant de déposer la marque H3K4me3 sur leurs gènes cibles afin de promouvoir leur transcription[129] (partie 2.5.5). Dernièrement, des résultats de Chip-Seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing), ont démontré que HSFA2 et HSFA3 partagent les mêmes cibles (presque à l'identique) [130].

Alors que la mémoire somatique est transitoire, la mémoire transgénérationnelle se conserve à travers plusieurs générations. La notion de mémoire transgénérationnelle a été décrite assez récemment : la première publication faisant état de ce phénomène chez les plantes est parue en 2006 [131]. Depuis de nombreuses études visent à comprendre et élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de cette mémoire transmise sur plusieurs générations. La mémoire transgénérationnelle chez les plantes est un sujet encore très débattu au sein de la communauté scientifique, mais de plus en plus d'études convergent pour affirmer que ce mécanisme est une réalité biologique. Liu *et al*., ont montré l'existence d'une boucle de rétroaction positive entre HSFA2 et H3K27me3 : HSFA2 permet d'activer RELATIVE OF EARLY FLOWERING (REF6), une H3K27me3 déméthylase qui elle-même va lever la répression de HSFA2 et conserver son état chromatinien dans une conformation « active » [131]. Or, ce mécanisme peut être conservé à travers plusieurs générations : la descendance des plantes ayant subi un stress thermique, possèdent ces états chromatiniens « actifs » sur des *loci* clés de *HSFA2*, permettant une réponse plus rapide et amplifiée lors d'un nouveau stress thermique [132]. Dans la continuité de ces résultats, une récente étude pointe qu'au cours de l'héritage transgénérationnel de la mémoire du stress thermique chez Arabidopsis, des *loci* non-reméthylables contiennent des niveaux de H3K4me3 et H3KA8ac plus élevés. Or, H3K4me3 interfère avec le recrutement de la machinerie moléculaire RdDM (RNA-directed DNA methylation), et H3KA8ac quant à lui aide au recrutement de la déméthylase ROS1, antagoniste de la voie RdDM. En conclusion, ces marques diminuent la capacité de méthyler des *loci* cibles, conduisant à les conserver dans un état transcriptionnel actif [133].

Les régulations transcriptionnelles permettant d'expliquer les phénomènes de mémoires thermiques (somatiques ou transgénérationnelles) ont été intensivement étudiées et malgré de nombreuses lacunes qui persistent, une image des réseaux de régulations transcriptionnelles impliquées commence à se dessiner. Néanmoins, les résultats de plusieurs travaux pointent du doigt l'importance d'autres niveaux de régulations dans l'effet mémoire : par exemple Charng *et al*., observent que les taux de variations des transcrits de HSA32, HSP18.1 et HSP25.3-P ne corrèlent pas avec leurs quantités protéiques [38]. Ces résultats sous-entendent l'existence d'autres niveaux de régulations pouvant opérer à l'échelle post-transcriptionnelle, traductionnelle ou encore post-traductionnelle. Au cours des parties suivantes nous nous intéresserons aux différents mécanismes connus de régulations post-transcriptionnelles impliqués dans l'effet mémoire.

2.5.2 - Petits ARN et effet mémoire

Les petits ARN régulateurs (partie 2.4) peuvent eux aussi jouer un rôle dans les phénomènes de mémoire somatique chez Arabidopsis, en régulant au niveau post-transcriptionnel l'expression d'acteurs clés. En effet, les mutants hypomorphiques *ago1-25* et *ago1-27* et un mutant hétérozygote pour *dcl1-9*, présentent des phénotypes de sensibilité en réponse à un ST dans un contexte d'amorçage, imitant ceux de *hsfA2* et ainsi indiquant l'importance de la régulation des petits ARN dans l'effet mémoire. Afin de comprendre le mécanisme moléculaire derrière ce phénotype, Stief *et al*., ont montré qu'en condition de ST, les facteurs de transcription SPL sont des cibles des différents isoformes de miR156 [133]. Ces facteurs de transcription jouent d'importants rôles dans la synchronisation de l'initiation des feuilles et les transitions développementales. Par conséquent il est nécessaire pour mettre en place la réponse au ST, de réguler négativement leur expression. Dans ce sens les lignées déficientes en miR156 présentent une hausse de l'expression de SPL2 et 12 durant les périodes de récupération : ce phénotype moléculaire se traduit alors par une perte de l'effet mémoire et de la résistance à un second évènement de ST. Ces résultats sont confirmés par des lignées surexprimant miR156 qui présentent alors des phénotypes de mémoire thermique accrue [134].

2.5.3 - Épissage et effet mémoire

L'épissage alternatif (EA) est un mécanisme de régulation post-transcriptionnel au cours duquel les exons d'un seul et même gène peuvent être combinés de différentes façons. Ces combinaisons conduisent à la formation de transcrits différents mais tous apparentés au même gène. Ainsi, lorsque ces transcrits alternatifs sont engagés dans la machinerie traductionnelle, les protéines provenant de ces transcrits alternatifs pourront avoir des structures et des fonctions distinctes [135]. Ce mécanisme est très répandu chez les eucaryotes photosynthétiques : chez Arabidopsis entre 60 et 83% des gènes multi-exoniques présentent des différences d'épissage [136]. Il existe quatre classes majeures d'évènements d'EA : le saut d'exon (ES), la rétention d'intron (RI), le choix d'un donneur d'épissage alternatif, ou d'un accepteur (Figure 13). Ces quatre systèmes sont très conservés chez les eucaryotes, mais certains sont favorisés en fonction des lignées : chez les végétaux le mécanisme prévalent est l'IR [137]. L'épissage alternatif permet, en périodes de stress, de réguler l'expression de gènes afin de conduire à l'acclimatation de la plante. En réponse au ST les végétaux visent à réduire le niveau général de synthèse de protéines tout en traduisant sélectivement les gènes de réponse au stress. Dans la même logique, chez les mammifères une exposition à un ST induit une baisse générale de l'épissage : le facteur d'épissage SRp38 va guider cette répression de manière contrôlée. Le choix des transcrits non-épissés est alors finement régulé et à l'inverse, les transcrits non affectés par ces répressions (par conséquent qui continuent d'être épissés efficacement) sont liés à des fonctions moléculaires telles que le repliement des protéines et la réduction de l'état d'oxydation, attestant de l'importance de la régulation et du choix des cibles de l'épissage alternatif dans la réponse au ST [138]. Les transcrits non-épissés ne sont pas traduits car retenus dans le noyau. Il est proposé que cette rétention nucléaire permette d'empêcher la synthèse de protéines aberrantes, soulageant les chaperonnes lors d'un ST [139]. De multiples études pointent l'existence de l'épissage alternatif de nombreux transcrits d'*HSF* chez Arabidopsis [104,140] : par exemple un isoforme de HSFA2 a été montré comme jouant un rôle déterminant dans la régulation de sa propre expression [141].

Récemment, Ling *et al*., ont mis en évidence l'existence du rôle de l'EA dans la mémoire en réponse au ST chez Arabidopsis [141]. Cette étude a confirmé que la RI est la forme prévalente d'EA en réponse au ST chez Arabidopsis, représentant 82% des évènements d'EA trouvés. De

plus, leurs résultats confirment aussi une répression massive de la machinerie d'épissage en réponse au ST conduisant à une accumulation de pré-ARNm contenant des introns retenus. Les résultats majeurs de cette étude montrent que durant la récupération après le ST, la plante est capable de revenir à des niveaux d'EA comparable à la condition non traitée. Mais surtout, lors d'une nouvelle exposition à un stress aigu, les plantes ayant subi un évènement d'amorçage présentent des taux de RI significativement plus faibles que dans la condition non amorcée. Ces résultats attestent que la plante a gardé en mémoire sa capacité d'épisser de manière efficace, et est capable de conserver ce mécanisme actif durant le ST. De plus, après la fin de l'évènement de stress, les plantes ayant été amorcées présentent des profils d'épissage alternatifs qui supportent la croissance et le développement d'Arabidopsis, ce qui n'est pas le cas dans la condition non amorcée [142]. Plus récemment une nouvelle étude a élargi cette notion impliquant l'EA dans la thermo-mémoire chez les conifères, suggérant que ce mécanisme serait conservé à travers le règne végétal. Cette étude apporte une autre information pertinente : elle montre l'implication de l'EA dans l'effet mémoire à bien plus long terme, à l'échelle de plusieurs mois [143].

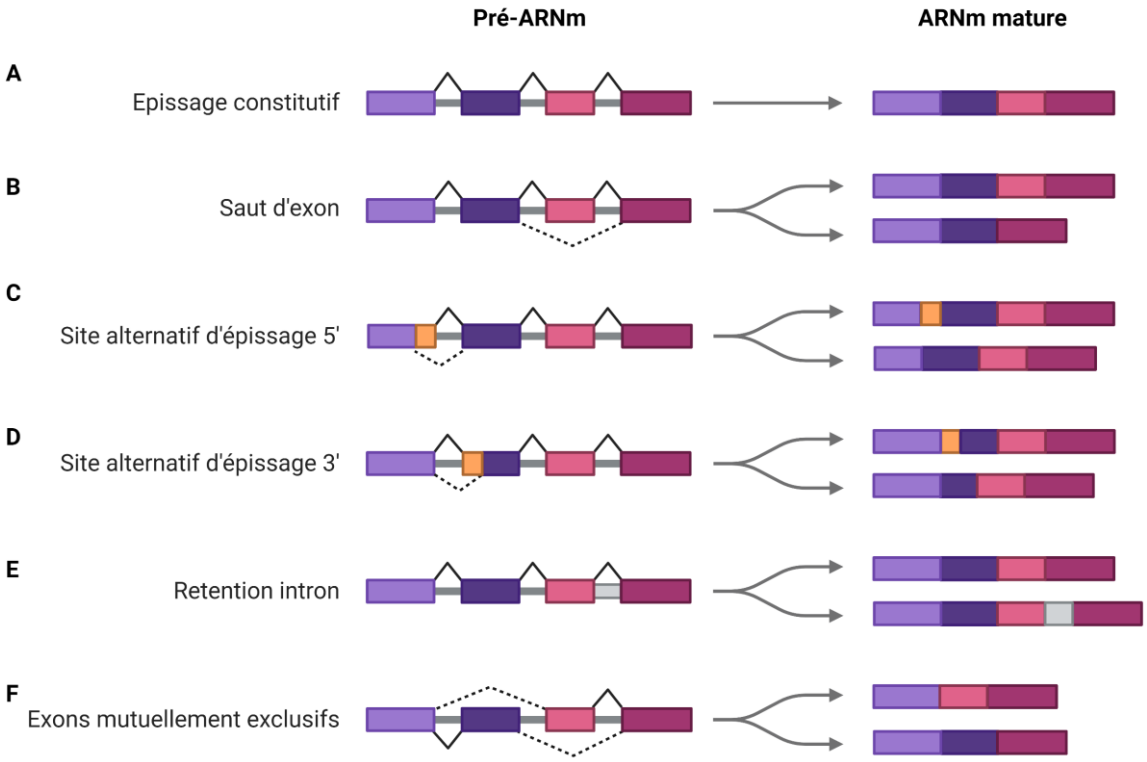


Figure 13. Les différents types d'épissages connus. *A) L'épissage constitutif correspond au retrait de tous les introns et la ligation de tous les exons. B) Le saut correspond au retrait de tous les introns, pouvant retirés certains exons. C) et D) Les sites alternatifs d'épissage (5' et 3') peuvent conduire au retrait d'une partie d'exon adjacent à l'intron retiré. E) La rétention d'intron correspond à la conservation de certains introns. F) Les exons mutuellement exclusifs ne permettent pas que deux exons soient retrouvés dans l'ARNm mature.*

2.5.4 - Dégradation des ARN et effet mémoire

Alors que de nombreuses études se concentrent sur l'importance des régulations transcriptionnelles dans l'effet mémoire en mesurant le taux de transcrits à l'équilibre ou bien associés aux polysomes (partie 2.5.1), elles négligent souvent la contribution cruciale que peut avoir la dégradation des ARN messagers. Pourtant, il est aujourd'hui connu que la dégradation des transcrits est nécessaire dans la réponse au stress thermique, puisque pas moins de 25% du transcriptome d'Arabidopsis est ciblé par la dégradation après une exposition au ST, et que cette dégradation est nécessaire pour induire une réponse au ST efficace [210]. Ainsi pour décrire le métabolisme des ARNm il est nécessaire de prendre en compte, la production, le stockage et la dégradation des ARNm [144]. Aujourd'hui aucune étude ne décrit l'existence d'une régulation de la dégradation des ARNm impliqués dans l'effet mémoire en réponse au ST [145].

Le choix des transcrits engagés ou protégés de la dégradation pourrait-être impliqué dans l'effet mémoire en réponse au ST. Une étude se basant sur l'utilisation du mutant *xrn4* (mutant déplété dans la principale enzyme responsable de la dégradation 5'-3' des transcrits et ayant été montré comme fortement régulée lors d'un ST) a démontré que HSFA2 était une cible de XRN4 (EXORIBONUCLEASE 4) lors des périodes de récupération. Ainsi XRN4 pourrait négativement réguler la capacité à conserver la mémoire du ST via la dégradation des transcrits du gène *HSFA2* [146]. Malgré ces résultats, l'impact de ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle dans l'effet mémoire du ST n'est pas encore élucidé. Aujourd'hui seul un rôle de régulation de la dégradation des ARNm dans l'effet mémoire en réponse à l'exposition à une source de carbone chez *Saccharomyces cerevisiae* a été décrit [147].

2.5.5 – Modifications post-traductionnelles et effet mémoire du stress thermique

Les modifications post-traductionnelles (PTM) offrent la capacité aux plantes de rapidement adapter leur protéome en réponse aux changements environnementaux : les nombreuses modifications connues peuvent avoir un impact sur l'activité, la stabilité et la localisation des protéines. Aujourd'hui beaucoup d'études se sont intéressées à l'impact du stress thermique sur les modifications des protéines [148,149], dont la majorité se sont concentrées sur le rôle des modifications des histones décrites plus tôt dans ce manuscrit de thèse (partie 2.2.5). Assez peu d'études décrivent l'implication d'autres PTM dans l'effet mémoire en réponse à un ST : un exemple nous vient de l'étude de HSP21, une chaperonne dont le rôle dans l'effet mémoire est bien connu. HSP21 est une sHSP fortement induite lors de l'étape d'amorçage. L'étude du mutant *hsp21* chez Arabidopsis, montre que ce mutant est sensible à des régimes de stress avec des courts temps de récupération mais pas avec d'importants temps de récupérations. Ces résultats sont paradoxaux car la production de la protéine est induite rapidement au cours de la phase d'amorçage, soupçonnant l'implication de cette protéine dans l'effet mémoire à court et à long terme. Une des solutions pouvant expliquer ce phénomène serait l'état de modification de HSP21. La région N-terminal de HSP21 est fortement enrichie en résidus méthionines, ces derniers contenant un atome de soufre pouvant être sujet à l'oxydation. Or, il est proposé que ces mêmes méthionines soient impliquées dans la reconnaissance des parties hydrophobes des peptides mal repliés. Après oxydation des méthionines, HSP21 et ses méthionines perdent leurs capacités de chaperonnes. Ce processus est réversible : une PEPTIDE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE (PMSR) localisée dans le chloroplaste permet de réduire les méthionines et conférer de nouveau sa fonction de chaperonne à HSP21. Ainsi dans le contexte de l'effet mémoire, il est proposé que HSP21 soit induite au cours de l'évènement d'amorçage mais soit rapidement inactivée via l'oxydation de ses méthionines. Puis au cours d'un long temps de récupération (plusieurs jours), ces niveaux d'oxydations baissent, réduits par les PMSR, ce qui permet d'activer l'activité chaperonne de HSP21 et induire l'effet mémoire [124,150].

2.5.6 – Les phénomènes polysomaux (traduction et dégradation co-traductionnelle) jouent-ils un rôle dans l'effet mémoire en réponse au stress thermique ?

Lors d'un stress thermique, une baisse drastique des niveaux de polysomes est observée [151], néanmoins les ARNm encore traduits par les ribosomes doivent être sélectionnés avec attention afin de traduire en priorité les transcrits permettant d'induire la réponse au ST. En période de récupération, le choix de l'engagement des transcrits dans les polysomes est aussi un prérequis pour mettre en place une mémoire efficace afin de préparer la plante à un évènement de ST subséquent. Aujourd'hui très peu d'informations sont disponibles pour répondre à ces questions : quels sont les transcrits spécifiquement sélectionnés pour être engagés dans la machinerie traductionnelle permettant la mise en place et la conservation de l'effet mémoire chez Arabidopsis ? Sur quelles bases biologiques ces transcrits sont spécifiquement sélectionnés pour être engagés dans les polysomes ? Quel est l'impact de l'amorçage sur le potentiel de traduction de la plante ? La dégradation co-traductionnelle joue-t-elle un rôle régulateur dans ce processus ?

Récemment une étude a montré qu'en réponse à un stress lumineux, un sous-groupe de transcrits est spécifiquement engagé dans les polysomes durant la période de récupération et que cet engagement polysomal est aussi sous contrôle du cycle circadien. Ils proposent l'hypothèse que cette régulation post-transcriptionnelle pourrait intervenir dans l'effet mémoire permettant à la plante de mieux réagir à un nouvel évènement de stress lumineux [152].

Un nombre croissant d'études visent à élucider les mécanismes sous-jacents au thermo-amorçage chez les plantes. En effet plusieurs groupes de recherche proposent qu'une meilleure connaissance de ces mécanismes pourrait avoir des répercussions positives dans le domaine agricole, en amorçant les plantes destinées à la culture afin de leur conférer une meilleure résistance (pouvant être transmise à travers plusieurs générations) [153,154]. Néanmoins, plus les études s'accumulent plus de nouveaux degrés de complexité sont découverts, mais la répartition des connaissances est inégale : certains niveaux de régulations sont intensivement caractérisés (régulations transcriptionnelles, modifications des histones) alors que d'autres regorgent de nombreuses zones d'ombres ou seules des spéculations

suggèrent un rôle de ces mécanismes dans le thermo-amorçage. On peut notamment citer les phénomènes (polysomaux engagement dans les polysomes et dégradation co-traductionnelle), où aucune étude connue à ce jour ne permet de mettre en évidence le rôle de ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle dans l'effet mémoire chez Arabidopsis. C'est dans ce contexte que s'insère une partie de mes travaux de thèse qui pose la question du rôle des régulations post-transcriptionnelles liées aux phénomènes polysomaux dans l'effet mémoire en réponse au ST chez Arabidopsis. Dans ce sens la partie suivante documentera les connaissances actuelles sur les mécanismes traductionnels et la dégradation co-traductionnelle chez Arabidopsis.

3 – Traduction et dégradation co-traductionnelle: quel rôle dans la régulation du stress thermique ?

3.1 – Le processus de traduction chez les eucaryotes

La traduction est le processus moléculaire au cours duquel l'information génétique codée par les ARNm est convertie en séquence d'acides aminées, permettant la synthèse des protéines nécessaires au fonctionnement des cellules. C'est un mécanisme très conservé au cours de l'évolution et qui implique de nombreux facteurs dont le ribosome, les ARN de transfert (ARNt), l'ARNm et les différents facteurs de traduction [155]. À travers ces parties je me concentrerai sur l'étude des mécanismes traductionnels cytosoliques. Pour plus d'informations sur les ribosomes des organites (chloroplastiques et mitochondriaux) chez les plantes le lecteur pourra se référer aux publications suivantes : [156–158].

Le ribosome est un large complexe ribonucléoprotéique composé d'ARN ribosomiques (ARNr) et de protéines ribosomales (PR). Les ribosomes sont organisés en deux sous-unités appelées grande sous-unité (LSU pour large subunit en anglais, aussi appelée 60S sur la base de son coefficient de sédimentation de Svedberg) et petite sous-unité (SSU pour small subunit en anglais, aussi dite 40S). La LSU est composée de trois ARNr : 5S, 5.8S et 25S ainsi que de 47 protéines ribosomales. La SSU quant à elle est composée d'un seul ARNr 18S et de 33 protéines ribosomales [159]. Les deux sous-unités possèdent des fonctions distinctes : la LSU présente le site actif du ribosome : le centre de transfert peptidique (PTC, pour peptidyl transferase center en anglais) qui permet de catalyser la formation de la liaison peptidique entre les acides aminés au cours de la synthèse protéique. La SSU quant à elle est impliquée dans la reconnaissance et le décodage de l'ARNm [160]. Chacune des deux sous-unités présente trois sites de liaison aux ARNt : le site d'aminoacylation (site A), le site peptidique (site P) et enfin le site de sortie (site E, pour « exit » en anglais) [161]. Pour plus d'informations sur la biogénèse des composants du ribosome (ARNr et protéines ribosomales) le lecteur pourra se référer aux publications suivantes : [162,163].

Le processus de traduction conduisant à la synthèse de protéines comporte trois étapes clés : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation débute par la fixation d'un ARNt

initiateur lié à une méthionine ($ARNt_i^{met}$) au niveau du site P du ribosome où il va interagir avec le codon start de l'ARNm. Ensuite au cours de l'élongation, un nouvel ARNt aminoacylé (aaARNt) est apporté au site A du ribosome sur la base de la lecture du codon suivant. Une fois la liaison peptidique réalisée, l'ARNt greffé à la chaine peptidique naissante est déplacé du site A vers le site P repoussant ainsi l'ARNt déacylé vers le site E en vue de son expulsion. Un nouvel ARNt aminoacylé (aaARNt) peut ensuite entrer au site A du ribosome expulsant l'ARNt déacylé du site E. La terminaison a lieu lorsque le ribosome rencontre un des trois codons "stop" de l'ARNm. Puisqu'aucun aaARNt correspondant n'existe pour décoder ce codon, cela va déclencher le clivage de la chaine peptidique et la dissociation de l'ARNm et des ARNt déacylés du ribosome. Le ribosome pourra alors être recyclé afin de traduire un nouvel ARNm. Les sous-parties suivantes approfondissent ces trois étapes.

3.1.1 – L'initiation de la traduction

Au début du processus d'initiation, le complexe EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4F (eIF4F, composé des sous-unités eIF4A, eIF4E et eIF4G) se positionne au niveau de la coiffe de l'ARNm. La sous-unité eIF4E fixe directement la coiffe alors qu'eIF4G permet à l'ARNm d'adopter une conformation dite en « boucle fermée » en interagissant avec les protéines de liaisons de la queue polyA (les PolyA-Binding Protein (PAB)). La présence du complexe eIF4F sur la coiffe permet de recruter la SSU associée à plusieurs facteurs de traduction (eIF3, eIF1, eIF1A, eIF2) formant un complexe appelé le 43S PIC (PIC pour Pré-Initiation Complex en anglais). Au niveau du 43S PIC, le complexe multiprotéique eIF3 est essentiel à l'assemblage des autres facteurs de traduction. Le facteur eIF1 quant à lui s'associe au site P de la SSU, son rôle étant d'empêcher l'association avec la LSU avant le décodage du codon START [164]. Le facteur eIF1A se fixe sur le site A de la SSU et empêche la liaison avec un autre ARNt que l'$ARNt_i^{met}$ [165]. La combinaison de ces deux facteurs permet de conserver la SSU du ribosome dans un état dit « ouvert » permettant la fixation à l'ARNm [166]. Le facteur eIF2 (composé de trois sous-unités : α, β, and γ) lié à l'$ARNt_i^{met}$ et au GTP s'associe également à la SSU au niveau du 43S PIC [167,168]. Le complexe eIF4F permet le recrutement du 43S PIC sur la coiffe formant ainsi un nouveau complexe appelé 48S PIC [169]. L'activité hélicase du facteur eIF4A (parfois aidé du facteur eIF4B)

va ensuite participer à la migration du 48S PIC de la coiffe vers le codon initiateur. Le 48S PIC va alors scanner l'ARNm de façon processive jusqu'à décoder le codon d'initiation (habituellement AUG chez les eucaryotes). La reconnaissance du codon d'initiation va déclencher un changement de conformation du complexe vers un état dit « fermé » [170].

Cette nouvelle conformation va conduire au recrutement d'un nouveau facteur d'initiation de la traduction : eIF5. Il va rentrer en compétition avec eIF1 pour la fixation sur eIF2β (dissociant alors eIF1 du complexe). Cette nouvelle interaction va permettre l'activation de l'activité GTPase de eIF2 conduisant à la dissociation de eIF2 et eIF5 du complexe. La perte de eIF2-eIF5 va permettre à un nouveau facteur d'initiation, eIF5B, d'être recruté sur la SSU. Les données expliquant comment la LSU est alors recrutée ne font pas consensus mais une étude indique que les facteurs eIF5B et eIF1A sont nécessaires pour cette association. Une fois les deux sous-unités assemblées, les facteurs eIF5B et eIF1A sont eux aussi hydrolysés et dissociés du complexe ribosomal, donnant naissance à un ribosome 80S mature et prêt à réaliser la seconde étape de la traduction : l'élongation [171].

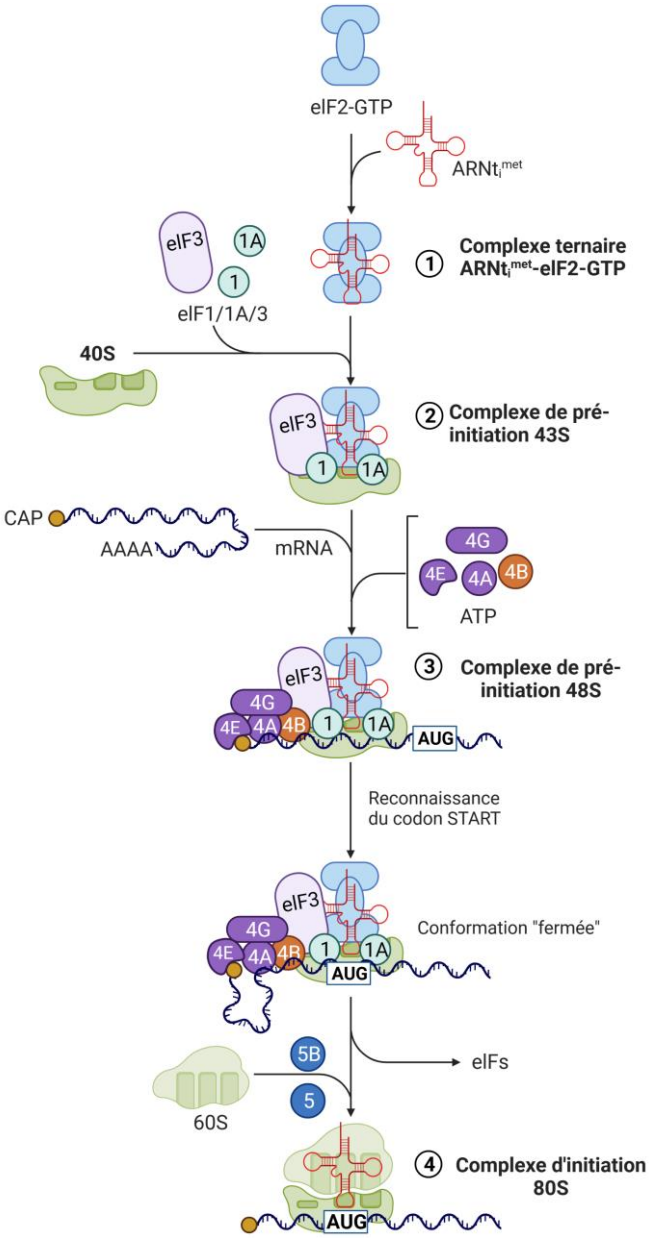


Figure 14. Schéma récapitulatif de l'initiation de la traduction. *En bref, eIF2-GTP-ARNt$_i^{met}$ vont former un complexe ternaire qui va être recruté sur le 40S associé aux facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 pour former le complexe de pré-initiation 43S. Les facteurs eIF4G, eIF4E et eIF4A (parfois associés à eIF4B) vont se fixer à l'ARNm au niveau de la coiffe afin de recruter le complexe 43S dessus, donnant lieu à un nouveau complexe de pré-initiation : le 48S. Ce complexe va alors scanner l'ARNm jusqu'à décoder le codon START. Son décodage conduit au recrutement de la sous-unité 60S associée aux facteurs eIF5 et eIF5B donnant naissance au complexe d'initiation de la traduction 80S. Les différents facteurs d'initiation sont relargués et l'élongation peut commencer.*

3.1.2 – L'élongation

Une fois le ribosome 80S assemblé sur l'ARNm et l'ARNt$_i^{met}$ présent dans le site P, la machinerie traductionnelle peut enclencher l'étape d'élongation de la traduction. Le facteur eEF1A (EUKARYOTIC ELONGATION FACTOR 1A) possède la capacité de se fixer à un acide aminé acétylé et va former un complexe ternaire : eEF1A-GTP-aaARNt. L'élongation débute lorsque ce complexe est recruté au niveau du site A du ribosome, où le site P est alors occupé par l'ARNt$_i^{met}$. L'anticodon de l'ARNt va alors interagir avec le codon de l'ARNm (interaction codon-anticodon) : ces interactions suivent les lois d'appariement de bases de Watson et Crick pour les positions 1 et 2 de l'ARNm avec les positions 36 et 35 de l'ARNt respectivement. Mais l'interaction entre les positions 3-34 peut réaliser des appariements non canonicaux, ne respectant pas ces lois. On appelle cette position la position oscillante (« wobble » en anglais) [172]. Une fois l'interaction codon-anticodon réalisée, cela entraîne des changements de conformation du ribosome et conduit à l'hydrolysation du GTP en GDP, diminuant l'affinité de eEF1A pour l'ARNt. eEF1A va alors être relarguée, permettant à l'ARNt d'adopter une conformation optimale dans le site A. L'étape suivante est la formation de la liaison peptidique par transfert de la méthionine du site P vers l'acide aminé présent au site A. Une chaine polypeptidique naissante est ainsi formée sur le site A et l'ARNt, maintenant déacylé est présent au site P. Une translocation du ribosome permet le déplacement de l'ARNt déacylé vers le site E, de la chaîne peptidique au site P et la libération du site A permettant d'accueillir un nouvel aaARNt [173]. La translocation du ribosome le long de l'ARN messager est catalysée par le facteur eEF2 associé au GTP [174]. La fixation de eEF2-GTP sur le ribosome va faire pivoter la petite sous-unité d'environ 20° [175], permettant à la fois le mouvement le long de l'ARNm et le déplacement de l'ARNt-déacylé vers le site E. eEF2-GTP est ensuite hydrolysé en eEF2-GDP et relargué, induisant le repositionnement initial de la SSU. Ce retour à la conformation de base permet alors à un nouveau complexe eEF1A-GTP-aaARNt de se fixer sur le site A ribosome afin d'enclencher un nouveau cycle de translocation [176]. Il existe aussi d'autres facteurs d'élongation de la traduction (eEF1B, eF4, eEF3, EFsec, Bip1) qui permettent d'affecter l'efficacité globale de l'élongation [177].

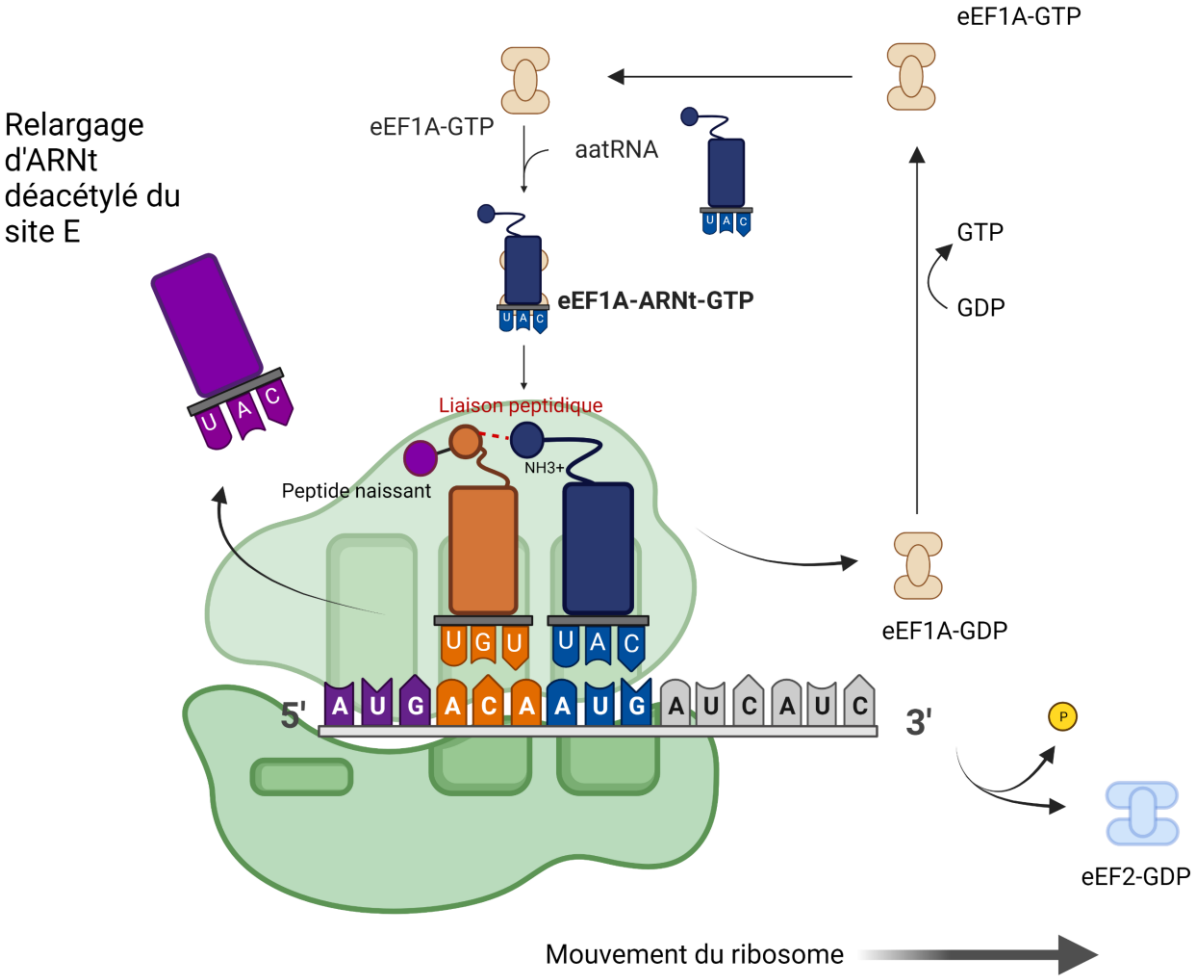


Figure 15. Schéma récapitulatif de l'élongation de la traduction. *Le facteur d'élongation de la traduction eEF1A va fixer un ARNt aminoacylé pour former un complexe ternaire eEF1A-aaARNt-GTP. Ce complexe est recruté sur le site A du ribosome et l'anticodon de l'ARNt va décoder le codon de l'ARNm afin d'apporter le bon acide aminé. Ce nouvel acide aminé va former une liaison peptidique avec le peptide naissant. Le ribosome va ensuite se déplacer de trois nucléotides, relarguant l'ARNt présent dans le site E et libérant le site pour l'arrivée du prochain ARNt à l'aide du facteur eEF2-GTP.*

3.1.3 – La terminaison

Lorsqu'un codon de terminaison est scanné par le ribosome, il est reconnu par le facteur de terminaison eRF1 (EUKARYOTIC RELEASE FACTOR 1 en anglais). Ce facteur de terminaison est capable de reconnaître les trois codons de terminaison standards chez les eucaryotes (UAG, UAA et UGA) et va se fixer au niveau du site A du ribosome en association avec un autre facteur : eRF3 [178]. Ils vont alors former un complexe eRF1-eRF3-GTP qui empêche la fixation de tout autre complexe ternaire eEF1A-GTP-aaARNT. L'interaction entre eERF1 et eERF3 va induire un changement de conformation et va stimuler l'activité GTPase de eRF3. eRF3 est alors relarguée et eRF1 va atteindre le PTC au sein de la LSU [179]. eRF1 possède un domaine contenant un motif GGQ qui lui permet d'hydrolyser la liaison peptidique et libérer la chaîne peptidique naissante. eERF1 va ensuite permettre le recrutement d'une protéine de liaison à l'ATP : ATP-BINDING CASSETTE E1 (ABCE1) [180]. Une fois le relargage du nouveau peptide réalisé, ABCE1 induit le détachement de la LSU. Puis, des facteurs d'initiations ou de ré-initiations de la traduction vont fixer la petite sous-unité du ribosome pour faciliter le détachement de l'ARNm et retirer les ARNt déacylés restant [181]. Les sous-unités libres des ribosomes peuvent alors être recyclées afin d'initier de nouveau un cycle de traduction en fixant un nouvel ARNm.

Dans cette partie 3.1 nous avons pu voir que la synthèse des protéines est un phénomène complexe impliquant de nombreux facteurs et molécules différentes. Une régulation fine de chacun de ses éléments est nécessaire pour assurer la synthèse de protéines. De plus, réguler la traduction peut aussi être une stratégie pour les organismes afin d'exprimer différentiellement leurs gènes au cours du développement ou en réponse à un stress [182]. Récemment, des études ont montré l'existence d'un phénomène de dégradation affilié à la traduction : un ARNm en cours de traduction peut aussi être soumis à la dégradation. Ce mécanisme a été nommé dégradation co-traductionnelle (CTRD, pour co-translational decay en anglais). Ayant consacré une part importante de mes travaux sur ce mécanisme de dégradation, nous traiterons de l'implication ce phénomène dans la réponse au stress thermique (ST) et l'effet mémoire dans la partie suivante.

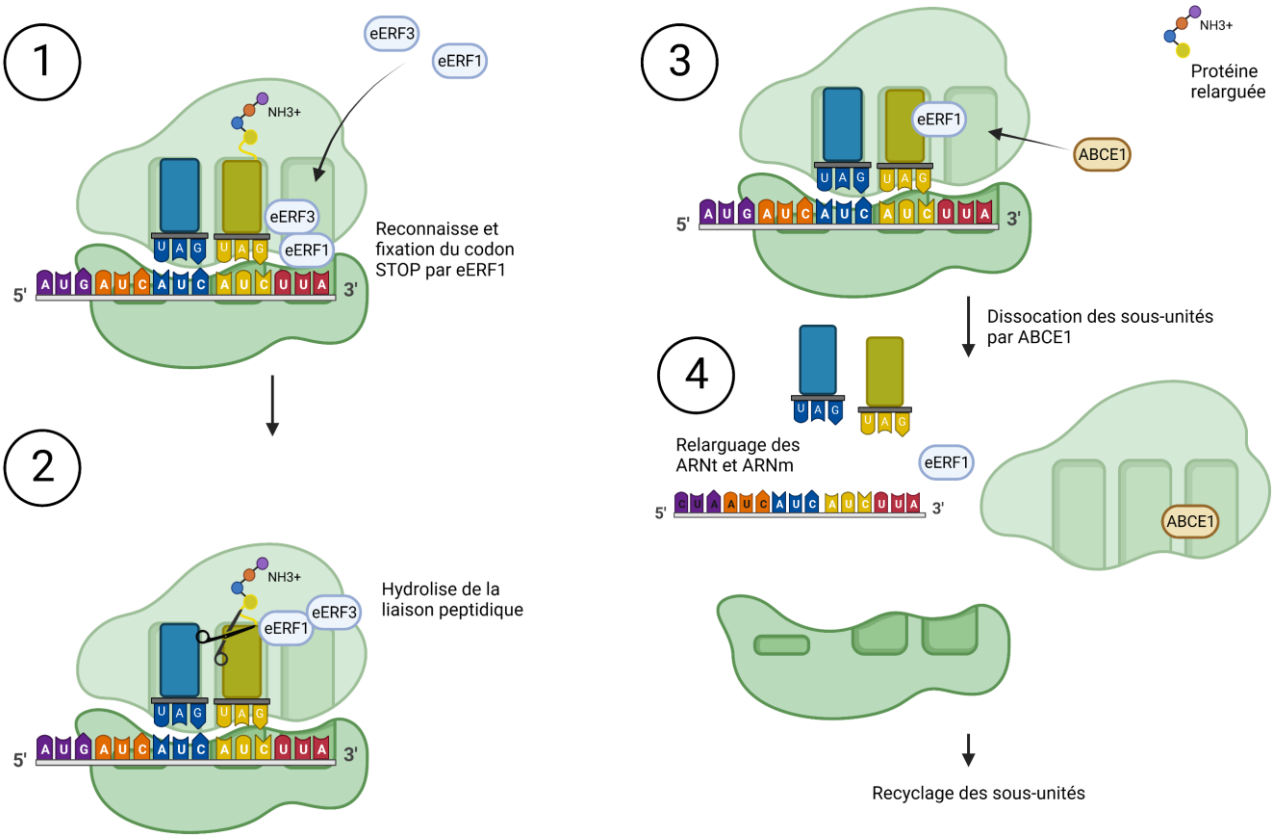


Figure 16. Schéma récapitulatif de la terminaison de la traduction. *Lorsque le ribosome arrive sur le codon STOP, ce dernier est reconnu et fixé par les facteurs eERF1 et 3. Ces facteurs vont aider à l'hydrolyse de la liaison peptidique permettant de relarguer la protéine nouvellement synthétisée. Le facteur ABCE1 est ensuite recruté afin de médier la dissociation des sous-unités et le relargage de facteurs de terminaison, de l'ARNm et des ARNt. Les sous-unités peuvent ensuite être recyclées afin de réenclencher un nouveau cycle de traduction.*

3.2 – Dégradation des ARNm

3.2.1 – Les différentes voies de dégradation cellulaire

Afin de réguler l'homéostasie du transcriptome, les ARNm sont perpétuellement soumis à une balance entre production et dégradation. Avoir une vision globale du métabolisme des ARN messagers nécessite d'appréhender le taux de transcription mais aussi celui de dégradation et de stockage. Pendant longtemps, les phénomènes transcriptionnels ont été considérés comme prévalent dans la régulation de l'expression des gènes. Néanmoins, en comparaison, l'aspect de la dégradation n'a été que très peu documenté et par conséquent, d'importantes lacunes permettant de décrire les rôles moléculaires de ce phénomène persistent.

Deux voies de dégradation cytoplasmiques ont d'abord été élucidées : d'une part les ARNm peuvent être dégradés depuis leur extrémité 5' vers leur extrémité 3' (5'-3' dégradation) ou bien à l'inverse de l'extrémité 3' vers 5' (3'-5' dégradation). On peut aussi noter l'existence de trois voies de dégradation des ARN, impliquées dans des mécanismes de contrôle qualité lorsque des ARNm aberrants sont détectés : NMD (nonsense-mediated decay en anglais), NGD (no-go decay en anglais) et NSD (non-stop decay en anglais). La mise en place de ces voies de dégradation, liées au contrôle qualité des ARNm, utilisent des acteurs spécifiques.

Le modèle général actuel de dégradation des ARNm propose que la voie 5'-3' débute par la déadénylation de la queue polyA par le complexe Ccr4-not, aidé des protéines PARN et PAN [183,184]. La perte de la queue polyA est une étape cruciale dans la dégradation des ARNm puisque la déplétion de CCR4-*ASSOCIATED FACTOR* 1 (*CAF1*) (appartenant au complexe Ccr4-not) conduit à d'importants défauts de dégradation des ARNm chez le riz [185]. Cependant, alors que ce modèle propose que le raccourcissement de la queue polyA soit l'étape limitante de la dégradation, plusieurs études remettent en cause ce point de vue et proposent que la déadénylation ne soit pas le facteur majeur régulant le taux de dégradation des ARN [186,187].Une fois la queue polyA raccourcie au-delà d'un certain seuil (ne permettant plus la liaison avec les protéines PAB), la coiffe (cap en anglais) en 5' est ciblée : DECAPPING 2 (DCP2) va former un hétérodimère avec DECAPPING 1 (DCP1). DCP1 va alors activer DCP2, qui quant à elle va retirer la coiffe [188]. Alors que ce dimère est suffisant pour induire le retrait de la coiffe chez *S.*

cerevisiae, il nécessite chez les plantes d'interagir avec VARICOSE (VSC) [189]. Certaines études ont proposé que ce complexe permettant le retrait de la coiffe soit localisé dans les P-bodies (processing bodies en anglais) [190] mais pour l'instant aucun consensus n'est établi et le sujet est encore débattu puisque d'autres résultats attestent que les P-bodies ne sont pas le site principal de la dégradation des ARNm [191]. La perte de la coiffe en 5' conduit à l'apparition d'une extrémité arborant un 5'-monophosphate libre (5'P) et vulnérable à la dégradation : cette extrémité 5'P est la cible de l'enzyme de dégradation EXORIBONUCLEASE 1/4 (XRN1/4 : 1 chez la levure, 4 chez Arabidopsis) : c'est une exoribonucléase processive qui dégrade nucléotide par nucléotide dans le sens 5'-3'. Chaque intermédiaire de dégradation produit par XRN4 présentera un nouveau nucléotide avec un 5'P libre pouvant être ciblé et dégradé [192].

À l'inverse de la voie 5'-3', la voie 3'-5' nécessite uniquement des transcrits qu'ils soient déadénylés. Une fois la queue polyA raccourcie au-delà d'un certain seuil ne permettant plus la liaison avec les protéines PAB, les transcrits soumis à la dégradation 3'-5' vont être pris en charge par un complexe multiprotéique appelé l'exosome, lui-même associé à un autre complexe nommé Ski [193]. L'exosome est un large complexe composé de nombreuses sous-unités et possède une activité exoribonucléase 3'-5' [194]. Chez les plantes, une autre voie de dégradation 3'- 5' indépendante de l'exosome et nécessitant elle aussi la diminution de la taille de la queue polyA existe : elle requiert l'exonucléase 3'-5' SUPPRESSOR OF VARICOSE (SOV) [195,196].

3.2.2 – La dégradation co-traductionnelle

En 2009, alors que les hypothèses prédisaient que pour être dégradé un ARNm devait d'abord être libéré du ribosome, une étude pionnière a montré l'existence d'une troisième voie de dégradation des ARNm. Hu *et al.,* ont révélé qu'il existait une voie de dégradation des ARNm indépendante de la dissociation avec les ribosomes [50]. Leurs résultats montrent que le retrait de la coiffe peut avoir lieu alors que l'ARNm est associé aux ribosomes, libérant une extrémité 5'P permettant à XRN1 de dégrader ces transcrits alors en cours de traduction : un mécanisme que l'on appellera dégradation co-traductionnelle. Par la suite, se basant sur l'approche GMUCT (Genome-Wide Mapping of Uncapped Transcripts, permettant de capturer et séquencer les transcrits décoiffés) afin de détecter des sites de clivages de miRNA et siRNA,

Willmann *et al*., ont observé une accumulation des produits de dégradation en 3' du CDS, et ce à l'échelle du génome entier. À ce moment-là, aucun phénomène connu et décrit ne permet d'expliquer que les produits de dégradation soient enrichis à l'extrémité 3' [197].

Un an plus tard, une autre étude novatrice a capturé et séquencé l'ensemble des transcrits présentant une extrémité 5'-phosphate libre. Leurs résultats valident ceux de Willmann *et al*., en montrant une forte accumulation de ces produits de dégradation en 3' des transcrits [197]. Mais cette étude va plus loin et montre qu'en réalité cette forte accumulation a lieu majoritairement 17 nucléotides en amont du codon stop (Figure 17). De plus, ils montrent que l'enrichissement des produits de dégradation présentent une surprenante périodicité de 3 nucléotides. Ces résultats leur permettent d'émettre un modèle selon lequel les transcrits en cours de traduction peuvent perdre leur coiffe et être dégradés. L'enzyme de dégradation co-traductionnelle XRN1/4 va dégrader les transcrits dans le sens 5'-3' jusqu'à rencontrer le dernier ribosome en cours de traduction. Le ribosome va alors protéger le transcrit de la dégradation. Puis à chaque translocation du ribosome (codon par codon), trois nouveaux nucléotides sont libérés. Comme XRN1/4 est plus rapide que le phénomène de translocation du ribosome, à peine les trois nucléotides sont-ils libérés qu'ils sont immédiatement dégradés. Cela explique pourquoi nous parvenons à capturer des intermédiaires de dégradation majoritairement avec une périodicité de 3 nucléotides, et ce alors que les protocoles utilisent des fractions d'ARN totales pour purifier les transcrits ayant perdus leur coiffe. Le fait qu'il ne soit pas nécessaire de capturer des ARNm associés aux ribosomes pour obtenir ces résultats atteste que les transcrits que l'on capture sont bel et bien des intermédiaires de dégradation, protégés par le ribosome. Ce modèle permet aussi d'expliquer la forte accumulation de transcrits en 3' et particulièrement sur la position -17 nucléotides (en amont du codon stop) : l'étape de terminaison de la traduction est plus lente que l'élongation. Plusieurs études montrent que lors de son arrivée sur le codon stop, le ribosome va ralentir avant d'être libéré [198]. Cet important ralentissement permet à la technique de capturer plus de produits de dégradation et se traduit dans les données de séquençage par ce fort enrichissement en 3' (Figure 17). L'enrichissement spécifique sur la position 17 nucléotides en amont du codon stop est proposé comme étant le reflet de l'encombrement du ribosome bloqué sur le codon stop au niveau du site A, et protégeant exactement 17 nucléotides en amont de ce codon (chez les plantes l'empreinte du ribosome fait apparaitre un pic soit à -16nt, soit à -17nt par rapport au

codon STOP). Ce modèle est validé par l'utilisation du mutant *xrn1*, où les résultats montrent la perte de la périodicité et de l'accumulation des produits de dégradation en amont du codon stop (-17nt) (Figure 17).

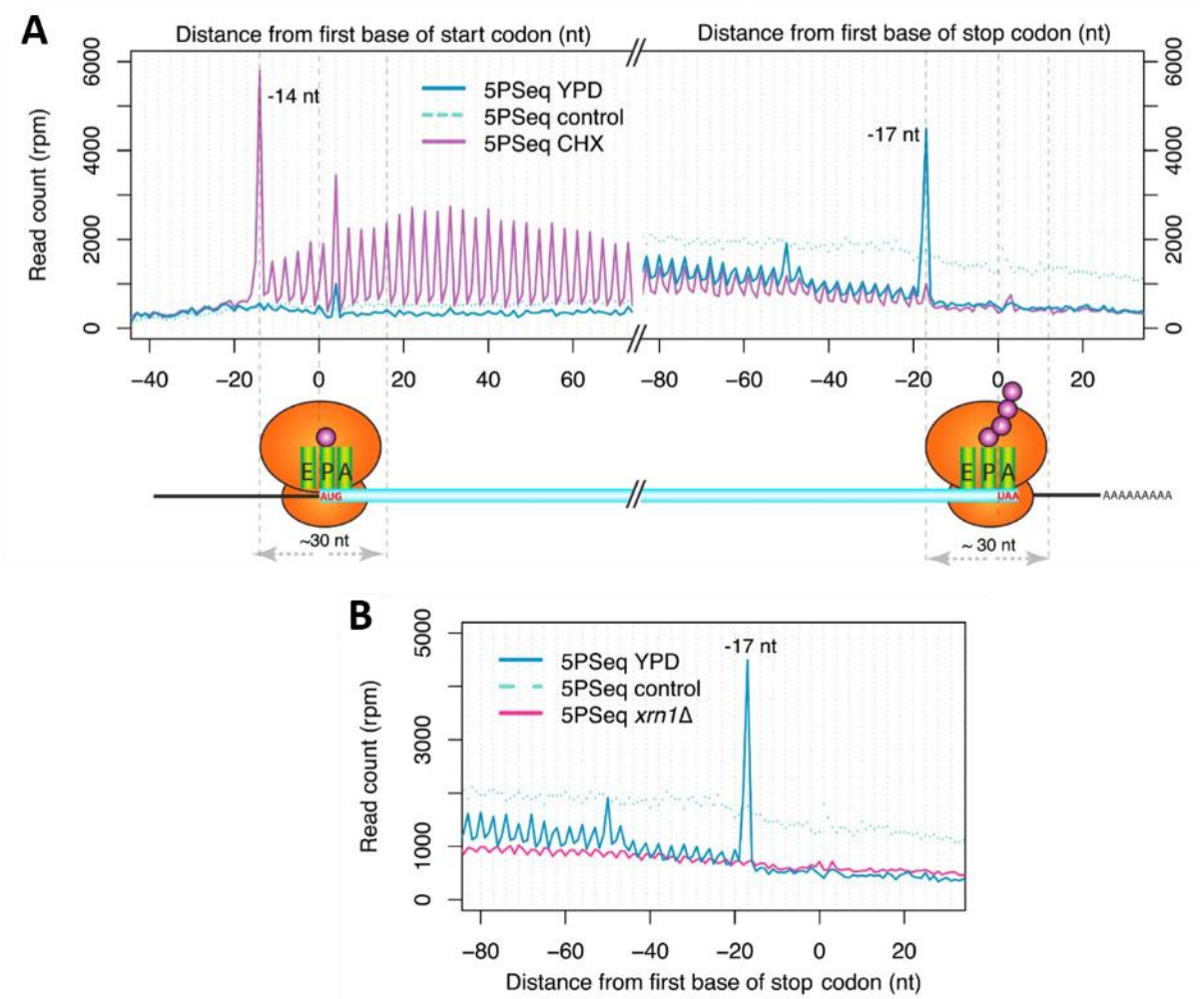


Figure 17. Les résultats de 5PSeq permettent d'observer la dynamique du ribosome. *A) Résultats d'une méta-analyse montrant le taux de lectures des transcrits avec un 5'P libre par rapport aux codons START et STOP. À gauche une accumulation de lectures est observée en position -14nt par rapport au codon START, il est proposé que cette accumulation soit le reflet de l'encombrement du ribosome lorsque le codon START se trouve au niveau du site P durant l'initiation. À droite, un pic en position -17nt par rapport au codon STOP est proposé comme étant le reflet de l'encombrement du ribosome lorsque le codon STOP se trouve au niveau du site A durant la terminaison. Comme ces deux étapes que sont l'initiation et la terminaison sont plus lentes que l'élongation, on capture plus de produits de dégradation. B) Méta-analyse du nombre de lectures de 5'P par rapport au codon STOP dans une souche sauvage et une*

souche mutante xrn1Δ. On observe la perte de la périodicité de 3nt ainsi que le pic à -17nt dans le mutant, indiquant que xrn1 est l'enzyme majeur de la dégradation co-traductionnelle. Adapté de "Widespread Co-translational RNA Decay Reveals Ribosome Dynamics" [199].

Le séquençage des produits de dégradation d'un échantillon ayant été soumis à un traitement cycloheximide (CHX, la cycloheximide bloque l'élongation de la traduction en se fixant sur le site A du ribosome) [199] montre une disparition du pic à -17nt en amont du codon stop et l'apparition d'une accumulation de transcrits ayant perdus leur coiffe précisément 14nt en amont du codon start. Cette accumulation est proposée comme étant le reflet du ribosome coincé par le traitement CHX, sur le codon start au niveau du site P (Figure 17). Ces différents résultats montrent qu'il est possible de mesurer la dynamique du ribosome le long du transcrit via une mesure des produits de dégradation.

3.2.3 – La dégradation co-traductionnelle, un reflet de la dynamique de la traduction ?

Les différents résultats de Pelechano *et al.,* soutiennent que la dynamique de la dégradation co-traductionnelle est le reflet de la dynamique du ribosome et par extension de la traduction, et ce à l'échelle du génome entier [199]. En mesurant et positionnant les produits de dégradation le long des transcrits, il est possible de corréler une hausse des produits de dégradation à un ralentissement du ribosome. Un des avantages de cette technique est l'obtention d'une image de la dynamique du ribosome à la résolution du codon sans l'utilisation de drogues bloquant la traduction. Il est ainsi possible de mesurer l'accumulation des produits de dégradation pour un codon à l'échelle du génome entier, une forte accumulation des produits de dégradation 17 nucléotides en amont d'un codon donné signifiant un ralentissement du ribosome lors de son décodage (Figure 18).

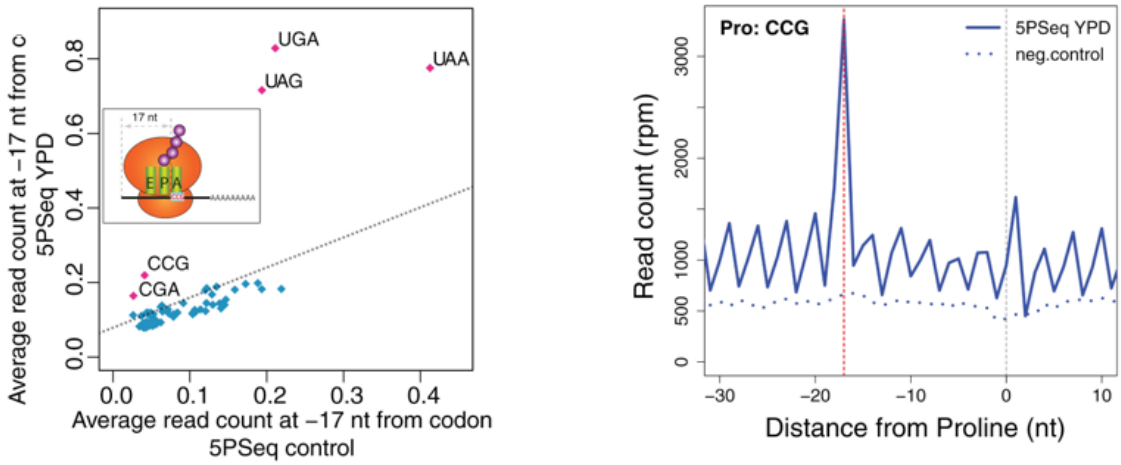


Figure 18. L'analyse des produits de dégradation co-traductionnelle permet d'évaluer l'efficacité de traduction à l'échelle du codon. *A) Nombre de fragments 5'P totaux 17nt en amont de chaque codon. Comme observé précédemment, les trois codons stop sont fortement enrichis en produits de dégradation 17nt en amont. Deux autres codons présentent une accumulation de produits de dégradation 17nt en amont dû à leur rareté : CCG et CGA. B) Méta-analyse du nombre de 5'P par rapport au codon CCG. On observe le pic en -17nt, attestant d'une pause du ribosome sur ce codon. Adapté de "Widespread Co-translational RNA Decay Reveals Ribosome Dynamics"* [200].

Bien que ces études aient été conduites chez la levure, par la suite d'autres approches se sont basées sur la capture et le séquençage des produits de dégradation pour montrer que ce phénomène était conservé à travers l'évolution [201–205]. Les résultats obtenus chez d'autres organismes ont confirmé que ces données peuvent être utilisées afin d'obtenir une mesure précise de la dynamique traductionnelle. Plus récemment, Carpentier *et al.,* ont montré que l'utilisation des données de GMUCT pouvait être couplée aux mesures d'engagements des transcrits dans les polysomes afin d'obtenir une image précise de l'efficacité de traduction : ils ont découvert que certaines populations de transcrits présentaient d'importantes variations de dégradation co-traductionnelle mais sans changement notable de leur engagement dans les polysomes [205]. De façon très intéressante, les ratios entre engagement polysomal et dégradation co-traductionnelle corrèlent avec les résultats obtenus au niveau protéique ainsi qu'avec le taux d'accumulation de XRN4 dans les fractions polysomales [206]. Mesurer le taux d'enrichissement de la protéine XRN4 est alors proposé comme proxy pour évaluer l'activité de la dégradation co-traductionnelle. Ainsi, en combinant différentes données, ils ont montré que la dégradation co-traductionnelle est capable de moduler l'efficacité traductionnelle de certains transcrits au cours du développement d'Arabidopsis.

3.3 – Les rôles des phénomènes polysomaux dans la réponse au stress thermique et l'effet mémoire

La reprogrammation de l'expression des gènes est un prérequis obligatoire pour les organismes afin de répondre aux variations environnementales. Pendant longtemps la communauté scientifique s'est basée sur les taux de transcrits à l'équilibre pour évaluer l'expression des gènes. Cependant, bien que les régulations transcriptionnelles jouent un rôle prépondérant dans ces mécanismes (partie 2.2), les résultats transcriptomiques ne corrèlent pas systématiquement avec le taux de protéines correspondant. Ils indiquent un coefficient de corrélation de 0.3 en moyenne. Ces observations soutiennent l'existence d'autres niveaux de régulations [207]. Cette partie sera divisée en deux grandes questions : quel est l'impact du stress thermique sur le phénomène de traduction ? Et comment les régulations traductionnelles permettent de reprogrammer l'expression des gènes en réponse au stress thermique (ainsi que dans l'effet mémoire) ?

3.3.1 – Le stress thermique impacte négativement la traduction

La synthèse de protéines est un processus extrêmement coûteux en énergie (environ 30% de l'énergie des cellules en cours de division est consacrée à la synthèse protéique chez les mammifères) [208]. Il est alors crucial pour les organismes de réprimer leur traduction afin d'économiser cette énergie, tout en favorisant la traduction de gènes de réponse au stress comme les HSP [209,210]. Cette répression globale et cette sélection spécifique sont dirigées par différents mécanismes moléculaires.

La répression se traduit par une rapide dissociation des ribosomes associés aux ARNm : plusieurs études montrent qu'en réponse à un stress court (< 1h) une baisse drastique du niveau de polysomes a lieu, se traduisant par une hausse significative de la quantité de monosomes et de sous-unités ribosomales libres [211–213]. La répression de la traduction peut avoir lieu à différentes étapes du processus traductionnel.

L'initiation de la traduction est un point important de contrôle et est rapidement réprimée afin d'inhiber la traduction. Ces voies ont majoritairement été décrites chez les animaux. La répression de la traduction est intrinsèquement liée à la voie Target Of Rapamycin (TOR). Chez les levures et mammifères, TOR peut former deux complexes : TORC1 (TOR COMPLEX 1) et TORC2 (TOR COMPLEX 2). Chez les plantes, aucun orthologue des sous-unités AVO1 et AVO3 de TORC2 n'a été trouvé [214], et il est proposé que seul le complexe TORC1, composé des protéines RAPTOR et LTS8 existe chez les végétaux. TOR est une sérine/thréonine protéine kinase qui régule le métabolisme cellulaire en favorisant des processus anaboliques quand les nutriments sont disponibles : chez les mammifères, la voie TOR est activée par la disponibilité en acide aminé et favorise la traduction. Elle permet à l'organisme de réguler ses taux de production de protéines par rapport à la disponibilité en acide aminé [215]. Chez les végétaux, TOR est impliqué dans l'embryogénèse, la croissance et le développement [216–219]. L'activité de TOR est régulée par de nombreux signaux intra et extra-cellulaire : glucose, lumière, auxine, nitrates, ABA et brassinosteroides. Elle va induire la régulation de nombreuses voies à travers des cascades de phosphorylation et d'activation [220–222].

La protéine ribosomal-protein S6 kinase (S6K) est une des cibles principales de TOR. Quand TOR est activée, elle active la protéine kinase S6K, qui va réguler l'état de phosphorylation de

plusieurs facteurs de traduction afin de favoriser la traduction. Lors d'un évènement de ST, la répression de la voie TOR inhibe l'activité de S6K. Ainsi toutes les voies positivement régulées par S6K sont alors à leurs tours réprimées, conduisant à une réduction de l'efficacité d'initiation de la traduction.

TOR régule aussi l'état de phosphorylation des eIF4E-binding proteins (4EBPs). Ces protéines peuvent entrer en compétition avec eIF4G pour la fixation sur eIF4E. La capacité de fixation des 4EBPs sur eIF4E dépend de leur état de phosphorylation : phosphorylées en condition normale, elles sont déphosphorylées en condition de ST, augmentant leur capacité de fixation à eIF4E et séquestrant ce dernier. eIF4E ne fixant plus la m^7G-cap, le recrutement des ribosomes sur l'ARNm est inhibé. Bien que des protéines proches des 4EBP aient été récemment identifiées chez Arabidopsis [223], il reste à démontrer si cette voie existe également chez les végétaux.

Enfin, une autre voie reposant sur la régulation d'états de phosphorylation de eIF2α a été décrite : le recyclage du facteur d'initiation de la traduction eIF2α est médié par le rechargement d'une molécule de GTP. Mais lorsque eIF2α est phosphorylé, il perd cette capacité à fixer le GTP et à être recyclé. L'absence de recyclage de eIF2α conduit à réprimer l'étape d'initiation de la traduction, en réduisant les taux de formation des complexes eIF2-GTP-$ARNt_i^{met}$. Différentes kinases activées par le stress sont à l'origine de la phosphorylation de eIF2 chez les animaux: GCN2, PERK, HRI et PKR [224]. Chez les organismes végétaux, seule l'enzyme GCN2 est présente et le rôle de la phosphorylation de eIF2α dans la répression de la traduction ne semble pas aussi marqué que chez les animaux [225].

Malgré cela, la répression de l'initiation de la traduction ne permet pas d'expliquer l'entièreté de la répression de la traduction observée [226].

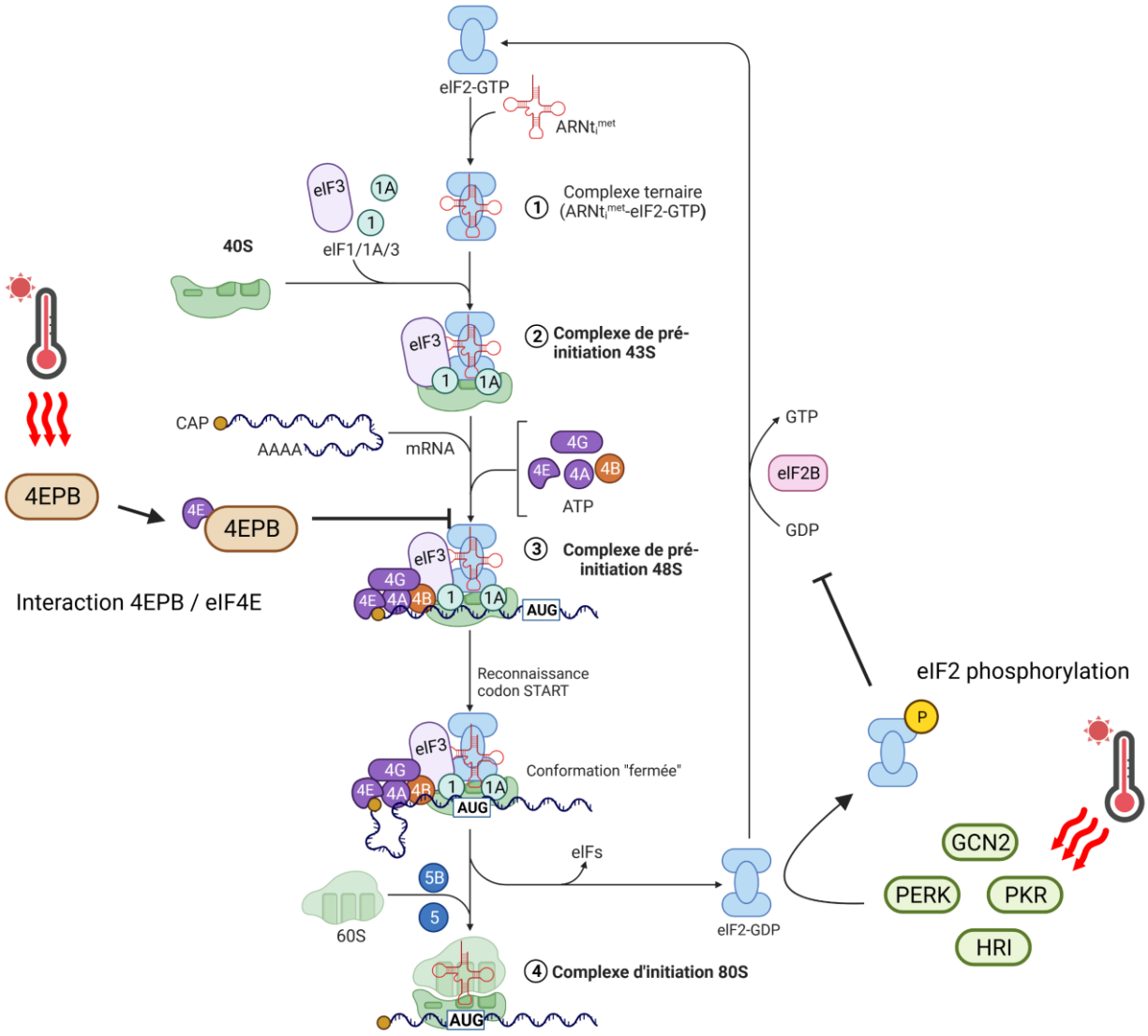


Figure 19. Impact du stress thermique sur le blocage de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. *Lors d'un stress thermique, les protéines 4EPBs vont fixer le facteur d'initiation eIF4E. Ce dernier étant nécessaire pour la reconnaissance de la coiffe sur l'ARNm, le complexe de pré-initiation 43S ne pourra plus être recruté sur l'ARNm. Le stress thermique conduit à l'activation de kinases (GCN2, PERK, PKR, HRI) qui vont phosphoryler eIF2-GDP. Cette phosphorylation inhibe sa capacité à transformer le GDP en GTP, empêchant la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-ARNt$_i^{met}$.*

D’autres approches montrent que l’élongation de la traduction est négativement impactée afin de réprimer globalement la traduction : une pause du ribosome est observée 65 codons après le codon start en réponse au ST. Cela est dû à des défauts de repliement des protéines qui peinent à se replier correctement lors de leur synthèse, ralentissant la traduction et induisant ces pauses. En condition normale, les protéines naissantes sont prises en charge par des chaperonnes (HSP70) afin de favoriser leur repliement. Mais en condition de ST, l’association des HSP70 avec la machinerie traductionnelle, et particulièrement avec les fractions polysomales est fortement altérée. Cela suggère que les HPS70 sont nécessaires pour aider au repliement lors d’un ST, qui sinon conduit à un ralentissement de l’élongation des ribosomes le long des transcrits (Figure 20) [209].

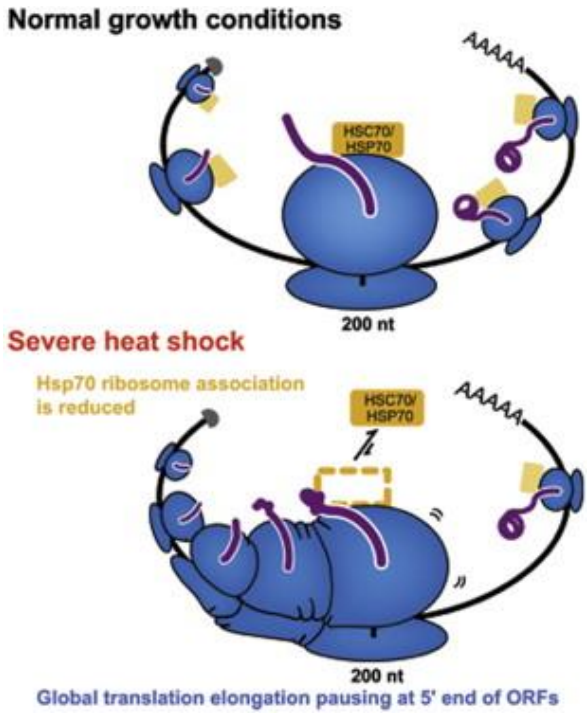


Figure 20. Le stress thermique induit un blocage de la traduction*. Lors d’un stress thermique les HSP70 voient leur association avec les ribosomes réduites. Cela conduit à des défauts de repliement des peptides induisant une pause globale de l’élongation de la traduction. Adapté de “Widespread Regulation of Translation by Elongation Pausing in Heat Shock”* [208].

3.3.2 - Le stress thermique induit la traduction spécifique de sous-populations de transcrits

Alors que dans son ensemble la traduction est réprimée, il est nécessaire de favoriser la traduction des transcrits de la réponse au stress thermique. Ici les organismes se heurtent à un problème de taille : comment favoriser certains transcrits en traduction lorsque l'activité traductionnelle globale est réprimée ? Afin de répondre à la dualité de ce problème différents mécanismes ont évolué : comme cité précédemment, le ST induit une baisse de l'initiation de la traduction cap-dépendante en régulant eIF4E. Une estimation indique qu'environ 10% du transcriptome possède des IRES (internal ribosome entry sites, en anglais) [227]. Ces IRES confèrent la capacité à la machinerie traductionnelle d'être recrutée de façon cap-indépendante au sein du 5'UTR, permettant d'outrepasser la répression induite par les 4EBP (partie 3.3.1) [228]. Les uORFs (upstream open reading frame) sont un autre exemple de régulation impliquant un élément en -cis. La présence de codons start dans la région 5'UTR (5' Untranslated Region) de certains gènes peut inhiber leur traduction. Mais lorsque eIF2α est phosphorylé et réprimé, cela peut à l'inverse induire la traduction de certains gènes possédant des uORFs (Upstream Open Reading Frame) [229]. Des facteurs en trans- peuvent aussi réguler la traduction : des IREs (iron responsive elements) ou encore des miRNAs peuvent inhiber la traduction de certains transcrits. Leur répression est levée au cours du ST et permet de promouvoir l'expression de gènes de réponse [230]. Tous ces mécanismes permettent alors à des sous-populations précises de transcrits d'être traduites.

Afin de déterminer la nature des gènes spécifiquement sélectionnés par la machinerie traductionnelle au cours d'un ST, le séquençage des ARNm associés aux fractions polysomales est généralement utilisé comme proxy pour attester le taux de traduction de chaque transcrit. Des études basées sur ce type d'approche ont confirmé la répression de la traduction en montrant une chute drastique de l'engagement des transcrits dans les polysomes. Merret *et al.,* ont montré que ces transcrits codent pour des gènes affiliés à des mécanismes de croissance et développement [151,211]. Néanmoins alors que le translatome subit une baisse générale de son engagement polysomal, cette approche permet de détecter et de quantifier

les transcrits spécifiquement favorisés par la machinerie traductionnelle lors d'un ST [231]. Il est très intéressant de noter que certaines populations de transcrits sont régulées de manière coordonnée entre leur transcription et traduction alors que d'autres sont majoritairement régulées au niveau traductionnel. D'autre part, une méta-analyse regroupant différents jeux de données de transcriptomes et de translatomes dans différentes conditions de stress montre que la transcription et la traduction sont deux mécanismes de régulation de l'expression des gènes qui peuvent être à la fois couplés ou découplés [232]. Néanmoins, malgré les exemples énoncés dans ce paragraphe, l'éventail des régulations permettant de réguler l'engagement préférentiel de certains transcrits dans les polysomes en réponse au ST restent encore à explorer.

3.3.3 – La dégradation co-traductionnelle régule la réponse au stress thermique

Nous avons souligné, dans les paragraphes précédents, la nécessité pour la plante de réprimer son taux de traduction, à travers la répression de l'initiation, de l'élongation et de la dissociation des polysomes lors d'un stress thermique. Mais plus récemment Merret *et al.,* ont montré l'importance de la dégradation co-traductionnelle dans cette répression [211]. Lorsqu'Arabidopsis est soumise à un ST, les facteurs impliqués dans la voie de dégradation co-traductionnelle sont enrichis dans les fractions polysomales : XRN4, LARP1 (LA RELATED PROTEIN 1A), DCP1/DCP2. Cette étude montre aussi que 25% de son transcriptome est dégradé par XRN4 (en association avec LARP1), et que cette voie de dégradation est nécessaire à la survie et l'acclimatation de la plante puisque le mutant *xrn4* est hypersensible à un régime de ST prolongé bien que ce résultat soit contesté [146]. De façon intéressante ces transcrits ciblés par XRN4 en réponse au ST codent pour des protéines possédant une partie N-terminal hautement hydrophobe : cette forte hydrophobicité à tendance à favoriser la formation d'agrégats protéiques : lors d'un ST le peptide naissant présente des défauts de repliement à la sortie du tunnel ribosomal et nécessite la présence de HSP70 afin d'être repliée efficacement [233]. Cette difficulté à être traduit de manière optimale va induire un ralentissement du ribosome le long du transcrit. Ce ralentissement est détecté comme un signal de dégradation co-traductionnelle, induisant le retrait de la coiffe puis le recrutement de XRN4 sur ces transcrits (Figure 21) [211].

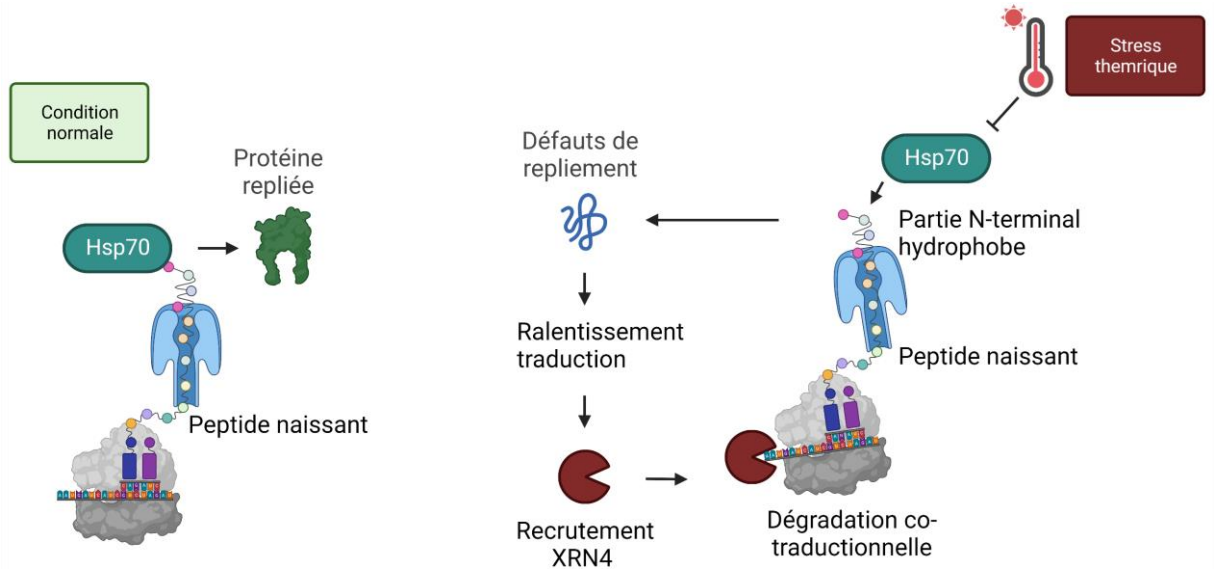


Figure 21. Schéma simplifié de l'activation de la dégradation co-traductionnelle au cours d'un stress thermique*. L'association des HSP70 au ribosome décroît et elles vont être relocalisées vers d'autres clients. Les peptides nécessitant le plus les HSP70 sont ceux possédant une queue N-terminal hautement hydrophobe et prompt à présenter des défauts de repliement. Ces défauts de repliement du peptide naissant conduisent à un ralentissement / une pause de l'élongation. Ce ralentissement est un signal de recrutement de XRN4 qui va induire la dégradation co-traductionnelle de ces transcrits.*

3.3.4 – Le rôle des processus polysomaux dans la récupération et l'effet mémoire ?

Une fois l'évènement de stress terminé il est nécessaire pour l'organisme d'abandonner ses mécanismes de défense pour remettre en place ceux de croissance et de développement. Les cellules en récupération ont la capacité de réassembler leurs ribosomes afin de réengager des transcrits en traduction. Bien que tous les détails moléculaires expliquant ce phénomène ne permettent pas d'établir un consensus, plusieurs études ouvrent des pistes : une étude pointe le rôle crucial de eIF5B (partie 3.1) dans la ré-initiation des complexes polysomaux et la régulation de l'initiation de la traduction en récupération après un stress thermique [234]. Une autre analyse souligne l'importance de HSP101 dans la récupération de la capacité traductionnelle après un évènement de ST : en réponse au ST, certains ARNm sont stockés dans des compartiments subcellulaires appelés granules de stress (SG) où ils seront protégés de la dégradation. Lors d'un ST, HSP101 va s'accumuler dans des granules de stress auxquels vont être associés des ARNm codant majoritairement pour des protéines ribosomales. Au cours de la récupération, ces ARNm qui ont été protégés de la dégradation vont être relâchés et rapidement réengager en traduction. Ce mécanisme permet aux cellules de traduire rapidement de nouvelles protéines ribosomales afin de relancer la machinerie traductionnelle qui a été impactée par le ST [144].

Une autre approche a permis de montrer que la dégradation co-traductionnelle est aussi nécessaire afin de restaurer l'homéostasie du transcriptome après une période de stress. Lors de la récupération après un stress lumineux chez Arabidopsis, 87% des transcrits surexprimés au cours du stress présentaient une forte dégradation : l'exemple de HSP101 est marquant puisque l'abondance de son transcrit – induit d'un facteur 750 après 30 minutes - décroît d'un facteur 2 toutes les 5 minutes. Des résultats similaires sont trouvés pour d'autres gènes codant pour des protéines de réponse au stress et mettent en lumière le rôle de la dégradation co-traductionnelle dans le phénomène de récupération [235]. Ces résultats représentent la seule source d'informations suggérant une implication de la dégradation co-traductionnelle dans un mécanisme d'effet mémoire et ce uniquement dans un contexte de réponse à un stress lumineux.

En conclusion, à ce jour aucune étude n'a élucidé précisément le rôle des mécanismes polysomaux (sélection préférentielle des transcrits, dégradation co-traductionnelle) dans l'effet mémoire en réponse au ST chez Arabidopsis : cette question est un aspect central de cette thèse où il sera question de caractériser l'implication des évènements de régulation traductionnelle dans la réponse et l'effet mémoire du ST chez Arabidopsis. Afin d'expliquer comment ces mécanismes sont régulés nous nous sommes penchés sur le rôle d'acteurs clés de la traduction : les ARNt et plus particulièrement leurs modifications. L'optimalité des codons semble jouer un rôle prépondérant dans la capacité traductionnelle ainsi que dans la dégradation des transcrits. Or, la disponibilité en ARN de transfert a été proposée comme faisant partie des facteurs clés régulant l'optimalité des codons chez les eucaryotes [236,237]. C'est dans ce contexte que nous ajoutons un autre niveau de complexité à cette thèse : nous nous intéresserons aux ARN de transfert et en particulier à l'impact de leurs modifications dans la régulation de la traduction, en mettant l'accent sur le ST et l'effet mémoire. La partie suivante sera consacrée au rôle des ARNt ainsi que leurs modifications dans la réponse au ST et l'effet mémoire chez Arabidopsis.

4 - Rôles des ARN de transfert dans la régulation de la traduction au cours du stress thermique

Les ARN de transfert (ARNt) sont de petits ARN non codants intimement liés au processus de traduction du fait de leur rôle biologique au sein des cellules : leurs fonctions principales sont le transport de l'acide aminé vers le ribosome et le décodage du message génétique présent sur l'ARNm. Plus récemment, il a été montré que leur produit de clivage pouvait également jouer un rôle régulateur de l'expression des gènes [238].

L'existence des ARNt a d'abord été prédite par Francis Crick [239] afin de faire le lien entre les nucléotides (ARNm) et les peptides (protéines) avant d'être rapidement découverte [240]. Les ARNt sont extrêmement conservés au cours de l'évolution et retrouvés à travers tous les clades du vivant. Ce sont de petites molécules comprenant entre 76 et 90 nucléotides chez les eucaryotes et possédant une structure secondaire assimilée à un trèfle ou l'on peut distinguer 6 domaines : la tige acceptrice, la boucle D, la boucle de l'anticodon, la boucle variable, la boucle T et la partie 3'-CCA terminale (Figure 22). Ces molécules présentent aussi une très forte diversité : au sein d'une même cellule, certains ARNt ont la capacité de se lier au même acide aminé mais possèdent différentes séquences d'anticodons (isoaccepteurs) alors que d'autres peuvent avoir la même séquence d'anticodon mais comporter des variations de séquences d'autres parts (isodécodeurs).

À travers cette partie je décrirai dans une première une partie les mécanismes allant de leur synthèse à leur recrutement sur le ribosome et l'interaction avec l'ARNm. Puis dans une seconde partie j'introduirai les modifications chimiques des ARNt et particulièrement l'impact de ces modifications sur le contrôle fin de la traduction. Puis nous nous intéresserons à l'impact du stress thermique (ST) sur les ARNt et notamment sur leurs modifications chimiques. Cette partie intégrera une revue que nous avons publiée en juin 2021 (et dont je suis le premier auteur) traitant de la capacité des modifications des ARNt (et des ARN ribosomiques) à répondre rapidement aux variations environnementales afin d'adapter la traduction en conséquence.

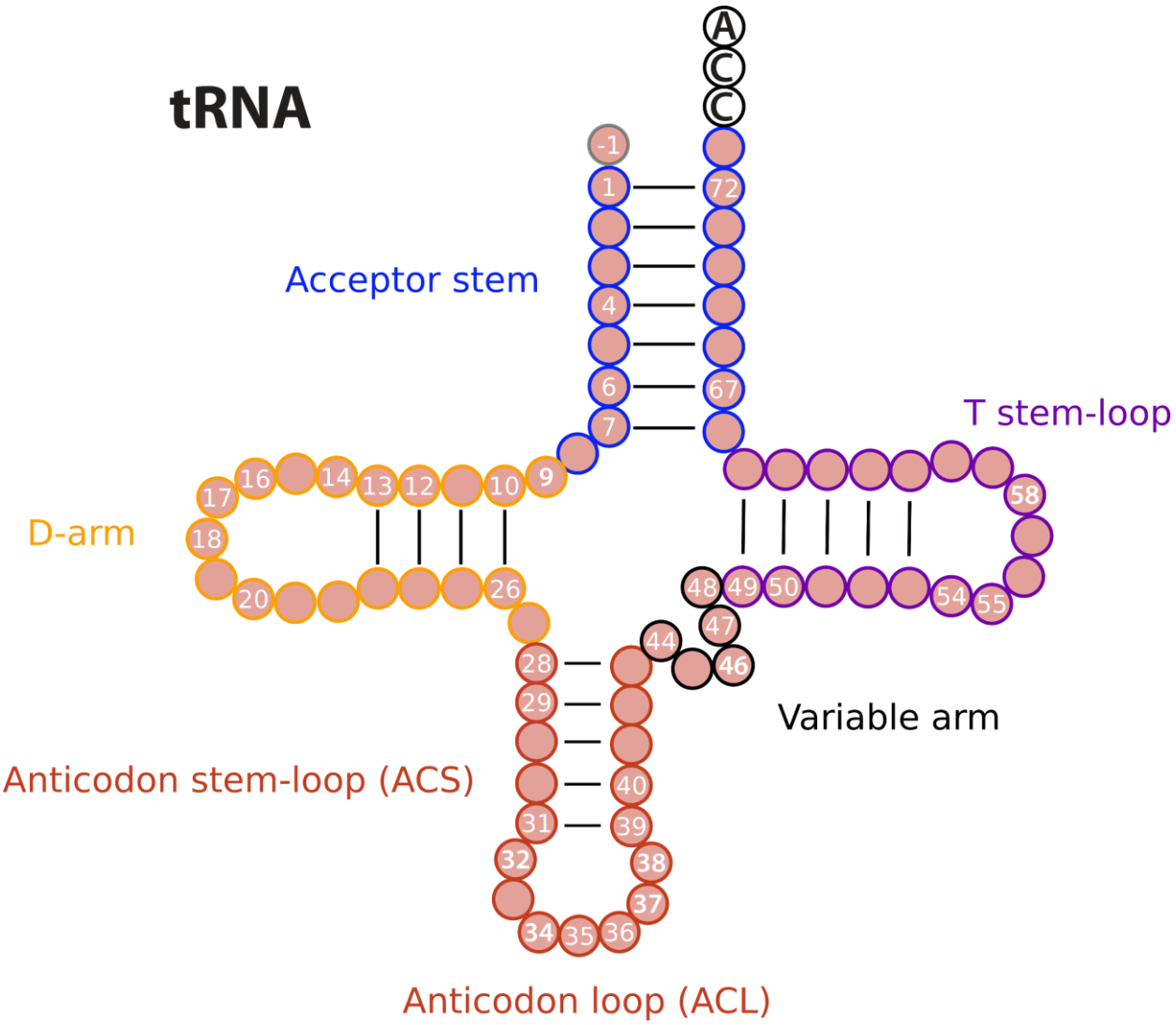


Figure 22. Schéma de la structure d'un ARNt. *Schéma représentant la structure en trèfle des ARNt, composé de la tige acceptrice, de la boucle D, la boucle de l'anticodon, l'anticodon, la partie variable, la boucle T et l'extrémité 3'-CAA.*

4.1 - Introduction générale des ARN de transfert

4.1.1 – Synthèse des ARNt

La synthèse des ARNt débute par la transcription des gènes d'ARNt par l'ARN polymérase III (Pol III). Le génome nucléaire d'Arabidopsis encode 585 gènes d'ARNt et les génomes des organites d'Arabidopsis, chloroplastiques et mitochondriaux, encodent respectivement 37 et 22 gènes d'ARNt [241]. Les gènes des ARNt possèdent un promoteur interne composé de deux éléments fonctionnels : les boîtes A et B. Ces deux éléments sont spécifiquement reconnus et fixés par le facteur de transcription IIIC (TFIIIC). TFIIIC est un large complexe composé de multiples sous-unités : on trouve six polypeptides organisés en deux domaine globulaires τA et τB, où chaque domaine cible la région promotrice correspondante (boîte A - τA / boîte B - τB) [242]. Le facteur de transcription IIIB (TFIIIB), un complexe multiprotéique composé de trois sous-unités : TBP, Bdp1 et Brf1, va alors interagir avec le domaine τA de TFIIIC et permettre son recrutement en amont du site d'initiation de la transcription [243]. Puis TFIIIC et TFIIIB vont permettre le recrutement de Pol III, la formation du complexe de pré-initiation et *in fine* la transcription des gènes d'ARNt. La transcription se termine lors de la rencontre d'un terminateur (une suite d'au moins quatre "T") en fin de séquence. Les gènes d'ARNt sont alors transcrits dans un premier temps sous forme d'ARNt précurseurs (pri-ARNt) (Figure 23).

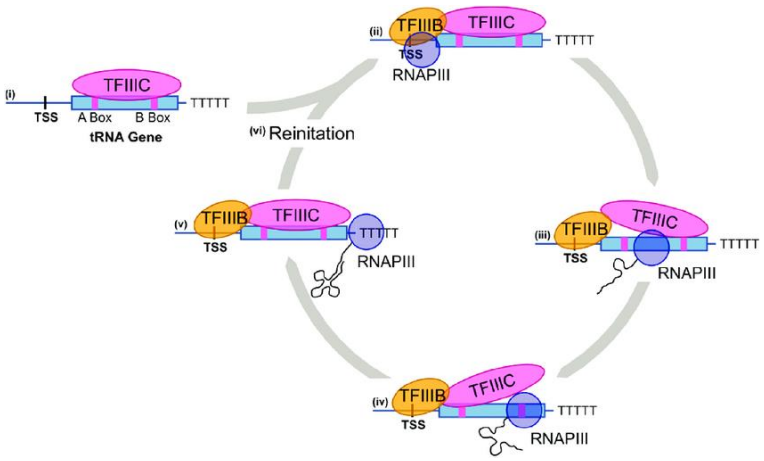


Figure 23. Schéma décrivant le mécanisme de transcription des gènes d'ARNt. *Le facteur de transcription TFIIIC va se fixer sur le gène d'ARNt via deux motifs du promoteur interne : boîte A et B. Le facteur TFIIIB est alors recruté. La combinaison de ces facteurs permet de recruter l'ARN polymérase III qui va alors transcrire le gène et terminer sur une région riche en "T". Le produit directement issu de la transcription est un pri-ARNt (primary transcript of tRNA) qui va nécessiter des étapes de maturation pour obtenir la forme mature. Adapté de "Transfer RNAs: diversity in form and function"* [244]*.*

4.1.2 – Maturation des ARNt

Une fois transcrits, les pri-ARNt subiront plusieurs processus de maturation avant de former des ARNt matures. Ce processus peut être décomposé en quatre étapes clés.

1) La maturation débute par l'excision de l'extrémité 5', dirigée par des RNase donnant des pré-ARNt (precursors-tRNA). L'extrémité 5' et son excision sont très conservées à travers l'évolution mais les acteurs du mécanisme divergent : alors que chez les archées, les bactéries, les champignons et les vertébrés la RNase P est un complexe ribonucléoprotéique (comprenant un ARN et plusieurs protéines), chez les végétaux supérieurs, ce complexe appelé PROPR (protein-only RNase P) a évolué pour n'utiliser uniquement que des protéines [245]. Une fois l'extrémité 5' retirée, c'est au tour de l'extrémité 3' d'être excisée. Cette réaction est catalysée par différentes nucléases (à la fois des endo- et des exonucléases) : chez *Saccharomyces cerevisiae* tRNase Z *(*Trz1) est une endonucléase impliquée dans l'excision de l'extrémité 3'. En parallèle RNA exonuclease 1 (Rex1) est quant à elle une exonucléase permettant elle aussi de retirer l'extrémité 3' des pré-ARNt. Certaines études stipulent que Trz1 et Rex1 collaborent pour mener à bien ce processus de maturation mais la voie endonucléolitique est prédominante [246]. La maturation des extrémités 5' et 3' des pré-tRNA, ainsi que le bon repliement de la molécule, sont sous le contrôle de l'authentique protéine LA et du complexe LSM. Lors de la terminaison de la transcription des pré-ARNt par Pol III, l'authentique protéine La reconnait et se fixe sur le motif 3'-UUU-OH [247]. La fixation de cette protéine sur les pré-ARNt est nécessaire pour leur maturation et notamment l'excision de l'extrémité 3'. L'authentique protéine La est aussi nécessaire afin d'aider les ARNt à adopter leur bonne conformation. En effet, une mutation au niveau de l'anticodon du pré-ARNt$^{Arg}_{CCG}$ peut causer des défauts de repliement. Dans ce contexte, la protéine La est nécessaire pour aider au bon repliement du pré-ARNt$^{Arg}_{CCG}$ muté. La même étude montre que deux ARNt (ARNt$^{Thr}_{CGU}$ et ARNt$^{Ser}_{CGA}$) présentent des défauts d'aminoacylation dans le mutant *La*. En somme, ces résultats proposent que cette protéine agisse comme une chaperonne moléculaire des pré-ARNt pour faciliter leur maturation.

La classe des protéines LSM possède des fonctions moléculaires diverses (par exemple DCP5 est l'homologue de LSM14 chez Arabidopsis), et des études ont montré leur rôle dans la

maturation de molécules d'ARN (ARNr, snoARN et ARNt) : des protéines LSM s'associent avec les ARNt au cours de leur maturation afin d'aider à son bon déroulement [248]. En effet des mutants *lsm* présentent d'importantes accumulations de pré-ARNt possédant encore leur extrémités 5' et 3'. Il est proposé que les protéines LSM jouent elles aussi un rôle de chaperonnes, permettant de faciliter l'association des facteurs de maturation des pré-ARNt [249].

2) L'étape de maturation suivante consiste à l'addition de trois nucléotides sur l'extrémité 3'-CCA. Chez les eucaryotes, les gènes encodant les ARNt ne possèdent pas cette séquence CCA en 3', qui se doit donc d'être ajoutée post-transcriptionnellement. Ce phénomène est réalisé par une enzyme : une ARNt nucléotidyle transférase (aussi appelé CCA-adding enzyme en anglais) [250]. Ce mécanisme est particulier car l'ajout des trois nucléotides CCA ne dépendent pas d'un modèle et l'enzyme va ajouter successivement les trois nucléotides sur l'extrémité 3' des pré-ARNt. Cette étape est cruciale et fortement régulée, puisque la séquence CCA va servir de site d'attachement à l'acide aminé.

3) Certains ARNt possèdent dans leurs gènes des introns qu'il faut épisser au cours de la maturation des pré-ARNt. Les introns des ARNt sont localisés entre les bases 37 et 38 et sont assez courts (de 6 à 133nt chez les eucaryotes) [251,252]. Aujourd'hui le rôle des introns n'est pas parfaitement éclairci : les introns sont conservés chez les eucaryotes et pourtant des études d'ingénierie moléculaire où les introns ont été retirés manuellement, montrent que cela n'impacte pas la viabilité des souches de levures [253]. Mais de récentes avancées suggèrent leur implication dans de nombreux processus [254]. Les mécanismes d'épissage entre les ARNm et les ARNt sont très différents : chez les ARNt ce n'est pas le spliceosome qui prend en charge l'épissage mais le complexe hétérotétramérique RNA SPLICING ENDONUCLEASE (SEN) ayant une activité endonucléase. Chez Arabidopsis deux sous-unités catalytiques du complexe ont été décrites : SEN1 et SEN2 [255]. Alors que chez la levure le modèle atteste que l'épissage a lieu au niveau des mitochondries [256], chez Arabidopsis, des données suggèrent que les évènements d'épissages peuvent avoir lieu à la fois dans le noyau mais aussi dans d'autres compartiments cellulaires [257]. Une fois l'épissage réalisé, les deux exons vont ensuite être ligués afin de donner un pré-ARNt pouvant être aminoacylé.

4) L'aminoacylation des ARNt est le processus permettant l'estérification de l'acide aminé sur son ARNt correspondant [258]. Il est médié par des enzymes : les aminoacyl-tRNA synthétases

(aaRS) et conduit à la formation d'un ARNt-aminoacylé (aaARNt). On connait aujourd'hui 23 aaRS, divisées en deux sous classes sur la base de leur site actif [259]. L'aminoacylation des ARNt peut se décomposer en deux étapes. La première est appelée activation de l'acide aminé : dans un premier temps l'acide aminé couplé à une molécule d'ATP (aaATP) vient se fixer sur le site catalytique de l'enzyme. Cette interaction induit l'hydrolysation de l'ATP en AMP. Lors de la seconde réaction, l'adénine en 3' de l'ARNt (-CC**A**) va fixer l'aa-AMP. La pression évolutive induite sur les aaRS les a conduits à posséder une extrême spécificité pour leurs substrats. En effet, il est nécessaire que le bon ARNt soit associé au bon acide aminé. Or la diversité des ARNt est telle, qu'il peut être compliqué pour l'enzyme de distinguer deux isoaccepteurs possédants des structures très similaires ainsi qu'une large panoplie d'acides aminés, ayant pour certains des propriétés chimiques très proches. Une fois que le bon acide aminé est associé au bon ARNt, l'ARNt est mature et prêt à être recruté jusqu'au ribosome afin d'entrer en traduction.

Tout au long de ce processus de maturation des modifications sont ajoutées aux ARNt. Certaines d'entre elles vont être nécessaires pour progresser dans ce processus de maturation.

En 2016, une étude a montré chez la levure qu'une fois transcrits, tout comme les ARNm, certains pré-ARNt peuvent être stabilisés par l'ajout d'une coiffe en 5' (représentant en 5% et 22% du pool de pré-ARNt). Cet ajout semble être dépendant de l'enzyme Ceg1p chez *Saccharomyces cerevisiae* puisque la déplétion de cette protéine conduit à une baisse drastique du taux de cap sur les pré-ARNt. Les auteurs montrent l'importance de cette modification dans la protection des pré-ARNt face à la dégradation au cours de la maturation. Ils proposent l'existence d'une autre voie alternative de maturation des ARNt possédant une coiffe : les ARNt présentant une coiffe vont d'abord être épissés au niveau de la paroi des mitochondries avant d'être transportés de nouveau vers le noyau afin d'exciser les extrémités 3' et 5' et ajouter la séquence -CCA (Figure 24) [260].

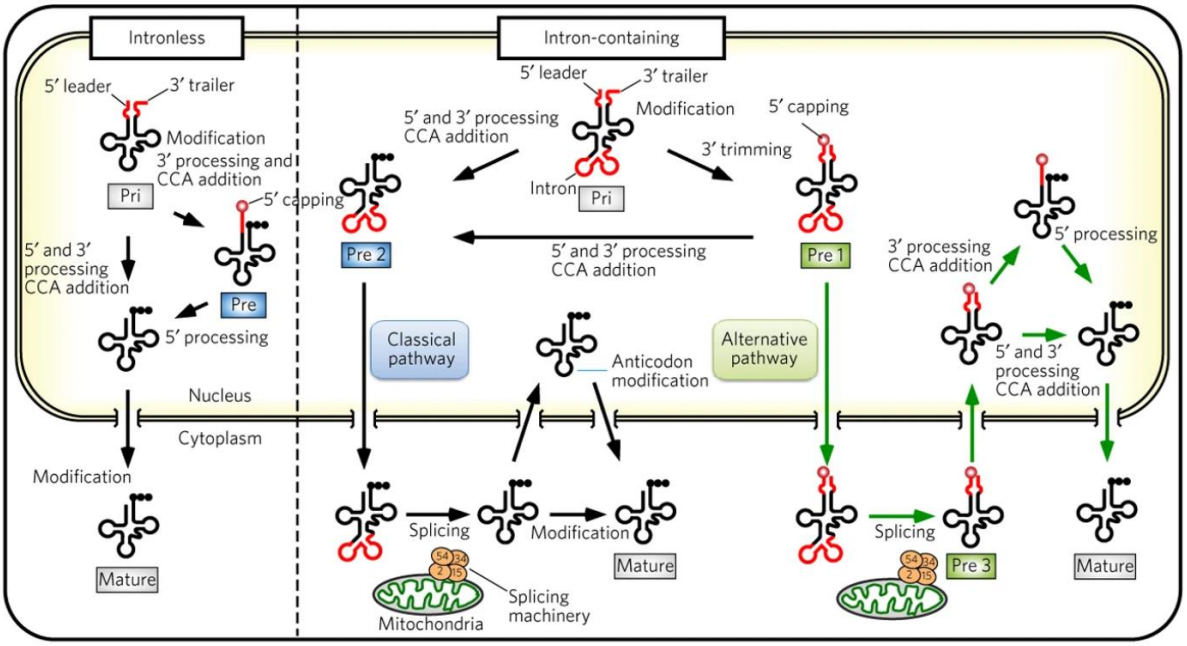


Figure 24. La maturation des ARNt. *Chez la levure, les gènes des ARNt sont transcrits par Pol III dans le noyau donnant naissance à un pri-ARNt qui va subir différentes étapes de maturation. Les ARNt ne possédant pas d'introns subissent la majorité des étapes de maturation dans le noyau avant d'être exportés dans le cytoplasme ou des modifications peuvent avoir lieu pour donner un ARNt mature. Chez la levure, il existe deux voies de maturation des pré-ARNt lorsqu'ils contiennent des introns. La première nécessite l'excision des extrémités 5' et 3' ainsi que l'ajout de la séquence -CCA dans le noyau avant d'être exportés dans le cytoplasme pour y être épissés au niveau de la surface des mitochondries. Enfin des modifications peuvent être ajoutés afin de donner lieu à un ARNt mature. Une seconde voie est possible pour les ARNt contenant des introns : ils peuvent posséder une coiffe en 5' qui va protéger de l'excision en 5' (mais pas en 3'). Les pré-ARNt sont ensuite exportés pour être épissé au niveau de la mitochondrie puis réimporter afin de terminer la maturation de l'extrémité 5' et l'ajout de la séquence -CCA et de modifications. Enfin ces ARNt sont de nouveaux exportés dans le cytoplasme.* Adapté de *"Precursors of tRNAs are stabilized by methylguanosine cap structures"* [258].

4.1.3 – Dégradation des ARNt

Comme toutes autres molécules, les ARNt ont une durée de vie limitée. Celle-ci est en revanche particulièrement élevée par rapport aux autres ARN : pouvant aller de plusieurs heures jusqu'à plusieurs jours [261]. Mais tout comme il est nécessaire pour les organismes de réguler les taux de dégradation des ARNm, les ARNt subissent eux aussi des phénomènes de dégradation. L'absence ou la perte de modifications peuvent entrainer la dégradation d'ARNt, qui est médiée par deux voies distinctes. La première est une voie de surveillance nucléaire qui cible les pré-ARNt rapidement après qu'ils soient transcrits. Les pré-ARNt sont alors dégradés par l'exosome dans le sens 3'-5' [262]. La seconde voie de dégradation aussi appelée « voie de dégradation des ARNt rapide (RTD) » cible et dégrade des ARNt mature cette fois dans le sens 5'-3'.

Une fois maturés, modifiés et aminoacylés les ARNt sont fixés par eEF1A (ou bien par eIF2α pour l'$ARNt_i^{met}$) et délivrés jusqu'au ribosome afin d'y décoder le message de l'ARNm et apporter l'acide aminé correspondant.

4.1.4 - Le transport rétrograde des ARNt : une voie de régulation et de contrôle

Alors qu'un consensus établissait le transport des ARNt comme unidirectionnel depuis le noyau vers le cytoplasme, une première étude a remis en cause ce paradigme et fait l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme permettant le transport rétrograde des ARNt depuis le cytoplasme vers le noyau. Cette hypothèse a émergé après qu'une étude ait montré que chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'épissage des ARNt a lieu dans le cytoplasme alors que des ARNt épissés sont observés au sein du noyau [256]. Puis d'autres études ont étendu ce phénomène à d'autres organismes, tel que les vertébrés (même si ces derniers épissent leur ARNt dans le noyau) [263]. Aujourd'hui certaines fonctions du transport rétrograde des ARNt ont été élucidées.

Le transport rétrograde sert de voie de surveillance afin de contrôler l'homéostasie des modifications des ARNt cytoplasmiques. Ce phénomène sert de contrôle qualité permettant de dégrader les ARNt défectueux. Deux types d'ARNt défectueux ont été découverts : ceux ayant conservés des extensions 5' et 3' (mais tout de même épissés) et des ARNt hypomodifiés. Cette voie travaille en parallèle avec la RTD (qui peut avoir lieu à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme) afin de dégrader en 5'-3' les ARNt aberrants [264].

Le transport rétrograde est aussi important pour la déposition de certaines modifications : chez *S. cerevisiae*, l'ARNt^{Phe} possède un intron qui est excisé dans le cytoplasme, à la surface des mitochondries. Cet épissage est nécessaire pour le dépôt de la modification wybutosine (yW) en position 37. L'enzyme permettant de déposer yW étant nucléaire, l'ARNt^{Phe} doit alors retourner dans le noyau afin d'être modifié pour finalement être de nouveau exporté vers le cytoplasme. Dans un mutant ou la rétention nucléaire des pré-ARNt est accrue, une baisse de yW est observée sur ARNt^{Phe}, en adéquation avec une hausse d'un de ces précurseurs : m^{1}G37 [265].

Enfin, l'implication du transport rétrograde dans des voies de réponse au stress a été proposée. Chez les mammifères, en réponse à un déficit nutritionnel, un important et rapide transport rétrograde de l'ARNt^{Lys} est observé. De façon intéressante ce transport est réversible et l'ajout de nutriment permet de restaurer une distribution d'ARNt comparable à celle d'avant stress. Chez l'humain, un stress oxydatif induit aussi un important transport rétrograde. Une étude montre que ce transport est sélectif puisqu'il n'affecte que certaines sous-populations d'ARNt : les ARNt avec une courte extrémité 3' sont préférentiellement ciblés par ce transport rétrograde. Il est proposé que le transport rétrograde soit régulé par les voies UPR et TOR et participe à la mise en place de la réponse au stress oxydatif chez l'humain [266].

Bien que le transport rétrograde soit conservé à travers plusieurs eucaryotes, aucune étude attestant de son existence chez les végétaux n'a été publiée à ce jour. Toutes ces étapes de maturation/dégradation/transport des ARNt (ainsi que le décodage des ARNm par les ARNt) nécessitent et/ou induisent des modifications chimiques qui seront traitées dans le paragraphe suivant.

4.2 - Les modifications chimiques des ARNt

À travers cette partie sur les ARNt, je me concentrerai sur une caractéristique phare de ces molécules : les nucléotides modifiés post-transcriptionnellement. De toutes les molécules d'ARN, les ARNt sont celles qui arborent la plus importante diversité de modifications chimiques avec en moyenne 17% de leurs nucléotides modifiés. La diversité de ces molécules représente une des barrières à leur étude : on compte aujourd'hui 155 modifications compilées dans la base de données modomics [267] dont 111 sur les ARNt et plus spécifiquement 68 sur les ARNt eucaryotes [268]. Elles jouent de nombreux rôles dans la synthèse, la maturation, le transport, l'aminoacylation ou encore la fonction de décodage des ARNt. Les modifications peuvent être trouvées à de nombreuses positions de l'ARNt : soit au sein du corps de l'ARNt, soit au niveau de la boucle de l'anticodon. De plus, ces décorations sont dynamiques et peuvent varier d'un point de vue qualitatif et quantitatif en réponse à des variations intra- ou extracellulaires. À travers cette partie je décrirai dans un premier temps les modifications des ARNt de façon générale, puis je me concentrerai sur leurs rôles, principalement dans la structure et le décodage de l'ARNm.

4.2.1 – Description générale des modifications des ARNt

Les modifications chimiques des ARNt ont été les premières modifications d'ARN découvertes avec l'identification en 1957 de la pseudouridine (ψ) [269]. Récemment, le terme épitranscriptomique a été proposé en 2012 lors d'une étude décrivant des variations de N^6-méthyladénosine (m^6A) sur l'ensemble des ARNm d'un organisme dans une condition donnée [270]. Ce terme est maintenant utilisé pour décrire les approches globales permettant de documenter les marques chimiques de tous types d'ARN. Au cours des trois dernières décennies, l'épitranscriptomique a connu un regain d'intérêt par la communauté scientifique [271]. Cela est notamment dû à l'amélioration des techniques de détection et de quantification plus sensibles (spectrométrie de masse), mais aussi permettant de positionner ces modifications au sein des ARN incluant les ARNt (techniques de séquençage haut-débit) [272]. Cette diversité chimique des modifications portée par les ARNt est très importante : méthylation de la base ou du sucre, acétylation, déamination, hydroxylation, isomérisation, réduction, cyclisation, thiolation (Figure 25).

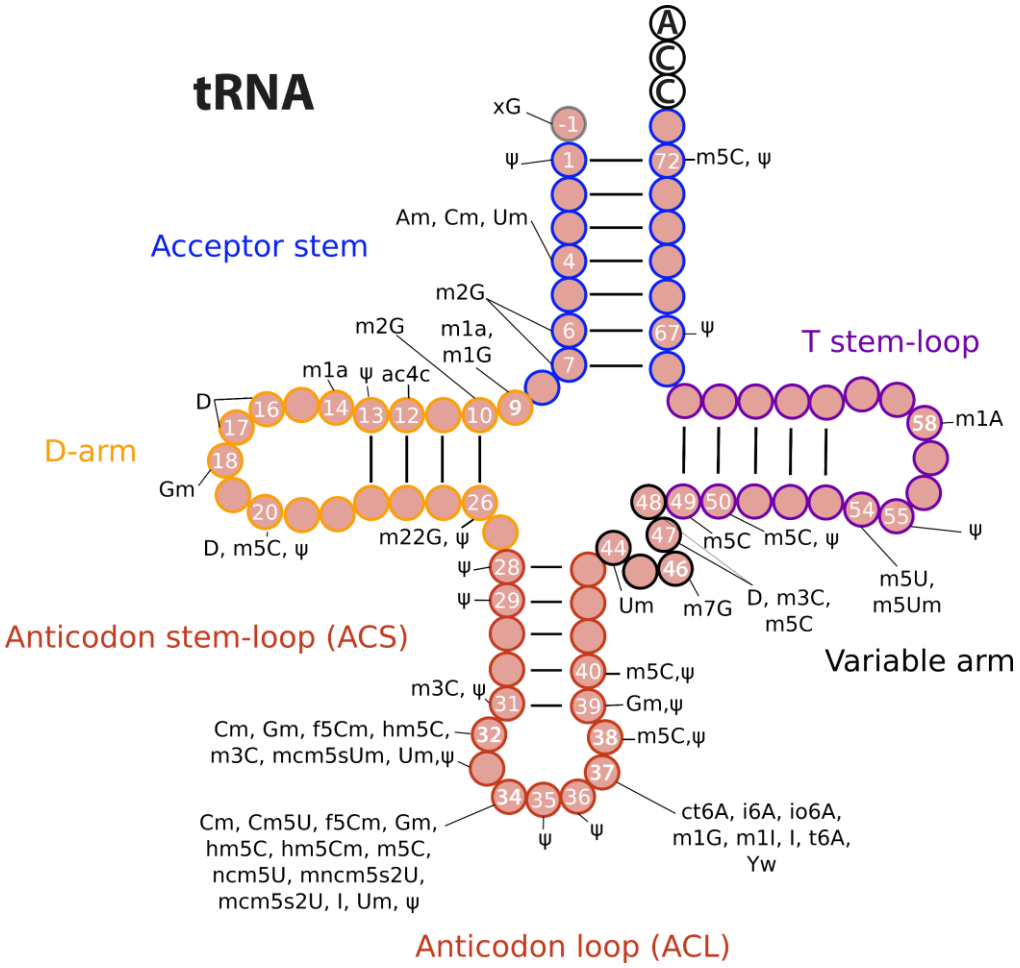


Figure 25. Représentation schématique de la conformation en trèfle de l'ARNt et de ses modifications. *Chaque position des modifications de l'ARNt est indiquée par le numéro correspondant. Les abréviations utilisées sont celles décrites dans la base de données Modomics [267]. Ψ : pseudouridine, ac^4c : N4-acetylcytidine, Am : 2'O-methyladénosine, Cm : 2'-O-methylcytidine , Cm^5U : 5-carboxymethyluridine, ct^6A : cyclic N6-threonylcarbamoyladenosine, D : dihydrouridine, f^5Cm : 5-formyl-2'-O-methylcytidine, Gm : 2'-O-methylguanosine, hm^5C : 5-hydroxymethylcytidine, hm^5Cm : 2'-O-methyl-5-hydroxymethylcytidine, I : Inosine, i^6A : N6-isopentenyladenosine, io^6A : N6-(cis-hydroxyisopentenyl)adenosine, m^1A : 1-methyladenosine, m^1G : 1-methylguanosine , m^1I : 1-methylinosine , m^2G : N2-methylguanosine , $m^{2,2}G$: N2,N2-dimethylguanosine , m^3C : 3-methylcytidine , m^5C : 5-methylcytidine , m^5U : 5-methyluridine, m^5Um : 5,2'-O-dimethyluridine, mcm^5S^2U : 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine, mnm^5s^2U : 5-methylaminomethyl-2-thiouridine, m^7G : 7-methylguanosine, ncm^5U : 5-carbamoylmethyluridine, t^6A : N6-threonylcarbamoyladenosine, Um : 2'-O-methyluridine, yW : wybutosine.*

Le dépôt de ces modifications est réalisé par des enzymes spécifiques. Les modifications les plus fréquemment retrouvées sont aussi les plus simples et impliquent souvent un nombre limité d'enzymes pour leur synthèse : les méthylations Cm, Gm, m^1A, m^2G, m^5C, m^5U, m^7G, l'isomérisation de la pseudouridine (ψ) et la réduction de la dihydrouridine, nécessitent une seule enzyme (parfois exclusivement dédiée à modifier une position précise de l'ARNt). En revanche, d'autres modifications impliquant des groupes chimiques plus importants dépendent souvent de plusieurs étapes de modifications réalisées par différentes enzymes. Un exemple bien caractérisé est celui des modifications de l'uridine en position 34 : les premières étapes de cette voie sont catalysées par le complexe Elongator permettant à partir de l'uridine de générer la 5-carbonylméthyluridine (cm^5U). L'enzyme tRNA methyltransferase 9 (TRM9) va méthyler le cm^5U pour former le 5-methoxycarbonylmethyl (mcm^5U). Enfin mcm5U va être thiolé pour donner le 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine (mcm^5S^2U) par un complexe composé de deux protéines : Cytosolic Thiouridylase Subunit 1 (CTU1) et Cytosolic Thiouridylase Subunit 2 (CTU2) (Figure 26) [273]. D'autres modifications de la position U34 peuvent également compléter ce tableau.

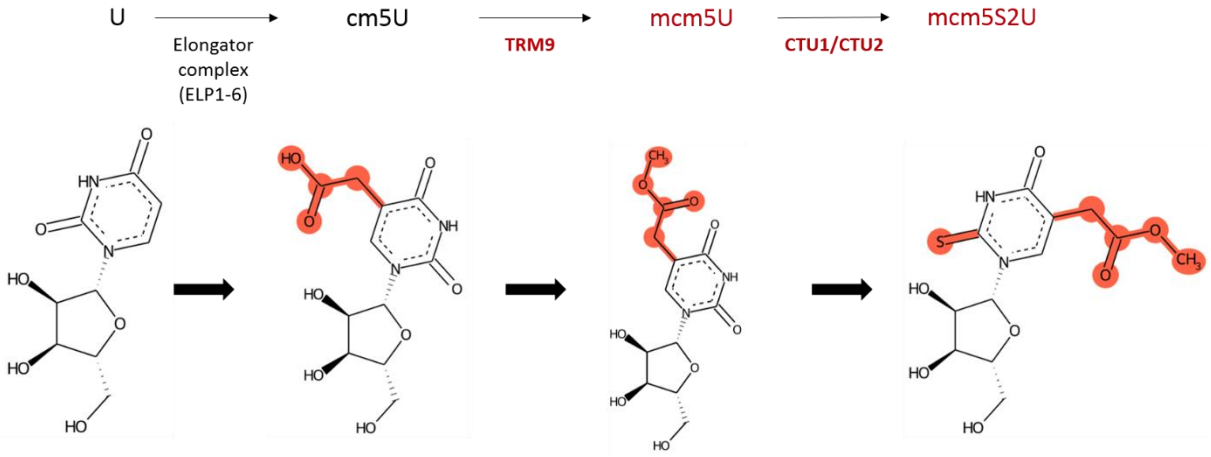


Figure 26. Voie de biosynthèse de mcm^5S^2U. *Les images des molécules proviennent de la base de données Modomics [265].*

Les modifications ne sont pas déposées aléatoirement au sein de la molécule d'ARNt : alors que certaines positions ne sont jamais modifiées, d'autres le sont de façon ubiquitaire. Certaines positions ont la possibilité d'être modifiées par plusieurs groupements chimiques différents: Les exemples les plus marquants sont les nucléotides présents sur la boucle de l'anticodon et spécifiquement la position 34 et la position 37. En se basant sur les positions et les rôles des modifications il est possible de distinguer deux groupes : les modifications chimiques présentes dans le corps de l'ARNt jouent majoritairement des rôles dans la structure, le repliement et la stabilité des molécules. D'autre part, les modifications retrouvées au niveau de la boucle de l'anticodon (BAC) jouent des rôles clés dans les mécanismes de décodage des codons. Dans la partie suivante je viserai à décrire les rôles de ces modifications, tout d'abord dans la structure et la stabilité des ARNt et ensuite au niveau de la fonction de décodage des ARNm.

4.2.2 - Le rôle des modifications chimiques dans la structure, la maturation et la stabilité des ARNt

Tout au long de la maturation des pré-ARNt en ARNt matures (partie 4.2.1), des modifications sont ajoutées aux nucléotides. Nombres d'entre elles retrouvées dans le corps des ARNt jouent un rôle prépondérant dans le repliement et la stabilité des ARNt. Dans cette partie je décrirai quelques exemples de modifications chimiques de ce type. C'est le cas de la modification 1-méthyladénosine (m^1A) en position 58. Elle est déposée par un complexe de deux protéines tRNA methyltransferase 6 (TRM6) et tRNA methyltransferase 9 (TRM61). La perte de l'une ou l'autre de ces enzymes conduit inévitablement à la mort de l'embryon chez Arabidopsis [274]. Il est probable que m^1A_{58} soit une ancienne modification puisqu'elle est conservée sur les ARNt des bactéries, des archées, et les eucaryotes, supposant l'importance capitale de cette décoration [275]. Cette méthylation en position 58 de l'$ARNt_i^{met}$ est importante pour sa stabilité, et sa perte a été montré comme étant létale chez la levure et embryo-létale chez l'Homme. Étant donné que cette modification porte une charge électrostatique positive, il est proposé qu'elle joue un rôle critique dans la stabilité structurelle de l'$ARNt_i^{met}$ via des interactions électrochimiques avec les nucléotides A_{20} , A_{54} et A_{60} (Figure 27) [276]. Pour compléter ce modèle, chez la levure l'absence de m^1A_{58} sur le pré-$ARNt_i^{met}$ conduit à sa dégradation par la voie RTD (rapid tRNA decay) [277].

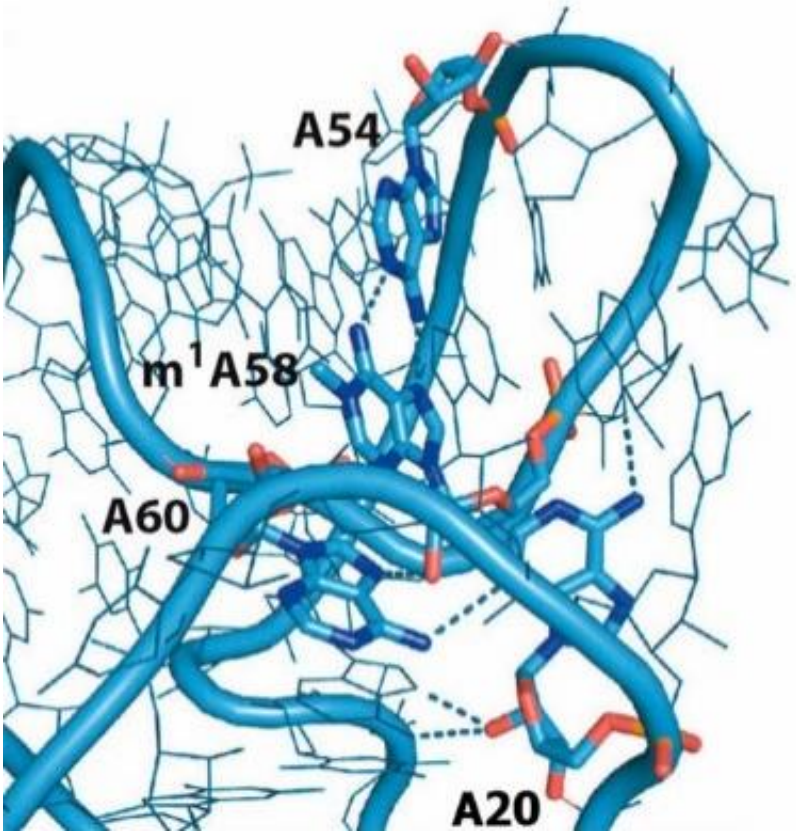


Figure 27. Interaction nucléotidique entre les boucles C et T d'un ARNt. *Schéma indiquant l'interaction entre m^1A_{58} (boucle T) et A_{54} et A_{60} (boucle T). Ce schéma présente aussi l'importance de ces liaisons dans l'interaction en A20 (boucle C) et la boucle T. Adapté de « m^1A Post-Transcriptional Modification in tRNAs » [274].*

Deux autres positions présentes sur la boucle T sont cruciales pour la stabilité des ARNt : les positions 54 et 55. Il est proposé que la présence de ces modifications aient un impact indirect sur la stabilité des ARNt en régulant les niveaux de m^1A_{58}. En se basant à la fois sur des approches génétiques et biochimiques, plusieurs études montrent que le dépôt de 5-méthyluridine en position 54 (m^5U_{54} , aussi désignée T_{54}) est stimulé par la présence de ψ_{55}. La présence de T_{54} et ψ_{55} stimulent à leur tour de manière synergique l'incorporation de m^1A_{58} (Figure 28). En plus de montrer l'importance des modifications dans la structure des ARNt, ces résultats mettent en évidence l'existence de réseaux interconnectés de régulations des modifications, où la présence et l'absence de modifications peuvent impacter positivement ou négativement d'autres modifications : dans la littérature on nomme ce phénomène les « circuits de modifications » [278]. Les raisons exactes de l'existence et du fonctionnement de ces réseaux ne sont pas encore élucidées. Certaines études proposent que les premières modifications servent de signal afin d'induire d'autres modifications. En complément, d'autres études supposent que les premières modifications induisent des changements de conformation qui permettent à l'enzyme d'être en capacité d'accéder au nucléotide pour y déposer la modification [279]. Bien qu'à travers ces lignes j'ai présenté un exemple de réseaux de régulations de modifications du corps de l'ARNt, ce mécanisme est aussi une réalité pour les modifications présentes sur la boucle de l'anticodon [280,281].

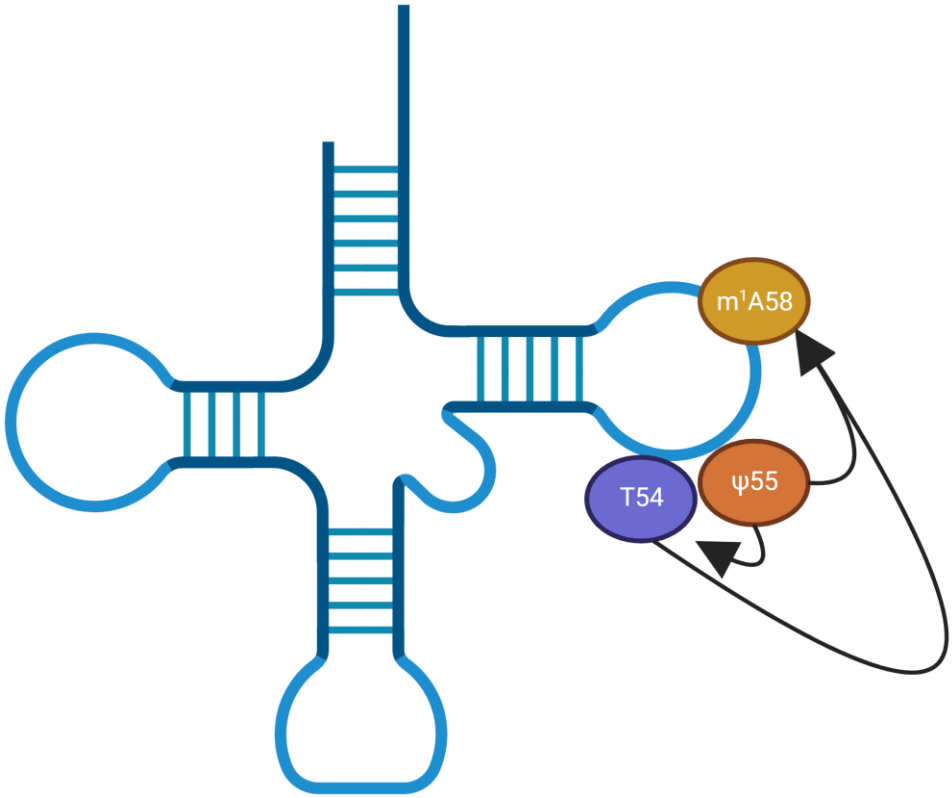


Figure 28. Les réseaux de modifications. *Schéma présentant les réseaux de régulation interconnecté des modifications : ψ_{55} favorise la modification T_{54}. Ensemble T_{54} et ψ_{55} vont favoriser le dépôt de la modification m^1A_{58}* [282].

D'autres modifications influençant les interactions des bases au sein de l'ARNt sont cruciales pour la structure et la stabilité : dans le génome mitochondrial des humains, les ARNt sont particulièrement enrichis en adénines (A) et en thymines (T). Ce biais conduit à la synthèse d'ARNt où d'importantes interactions A-T peuvent avoir lieu et doivent être évitées pour obtenir une conformation viable. L'absence de la modification m^1A_9 sur l'$ARNt^{Lys}$ mitochondrial conduit l'ARNt à adopter une conformation « étendue », et est incapable de se replier correctement pour aboutir à la conformation en trèfle. L'ajout de m^1A_9 permet alors de rétablir le bon repliement de l'ARNt. Pour expliquer ce phénotype moléculaire, il est proposé que m^1A_9 empêche l'interaction entre les bases A9 et U64, qui sinon, forment une liaison hydrogène suivant les lois de Watson et Crick et conduisent à une conformation « étendue » de l'ARNt (Figure 29) [283].

Chez les organismes thermophiles, un autre biais est observé : les ARNt ont favorisé les bases guanine (G) et cytosine (C). Le problème est le même qu'avec l'enrichissement en A-T : des difficultés de repliement dues à des appariements de bases peuvent impacter la structure des ARNt. Ici aussi c'est une méthylation qui permet d'empêcher ces appariements non désirables : la modification $m^{2,2}G$ peut être retrouvée en position 10 ou 26 et empêcher des interactions de Watson et Crick qui conduirait à un repliement inadéquat. La perte de cette modification conduit à une baisse drastique des compétences thermophiles de ces organismes [284]. D'autres modifications présentes dans le corps de l'ARNt ont été proposé comme influençant la stabilité des ARNt : la perte des modifications 4-acétylcytidine en position 12 (ac^4C_{12}) et 7-méthylguanosine en position 46 (m^7G_{46}) induisent une baisse de stabilité des ARNt qui seront alors dégradés par la RTD [285,286].

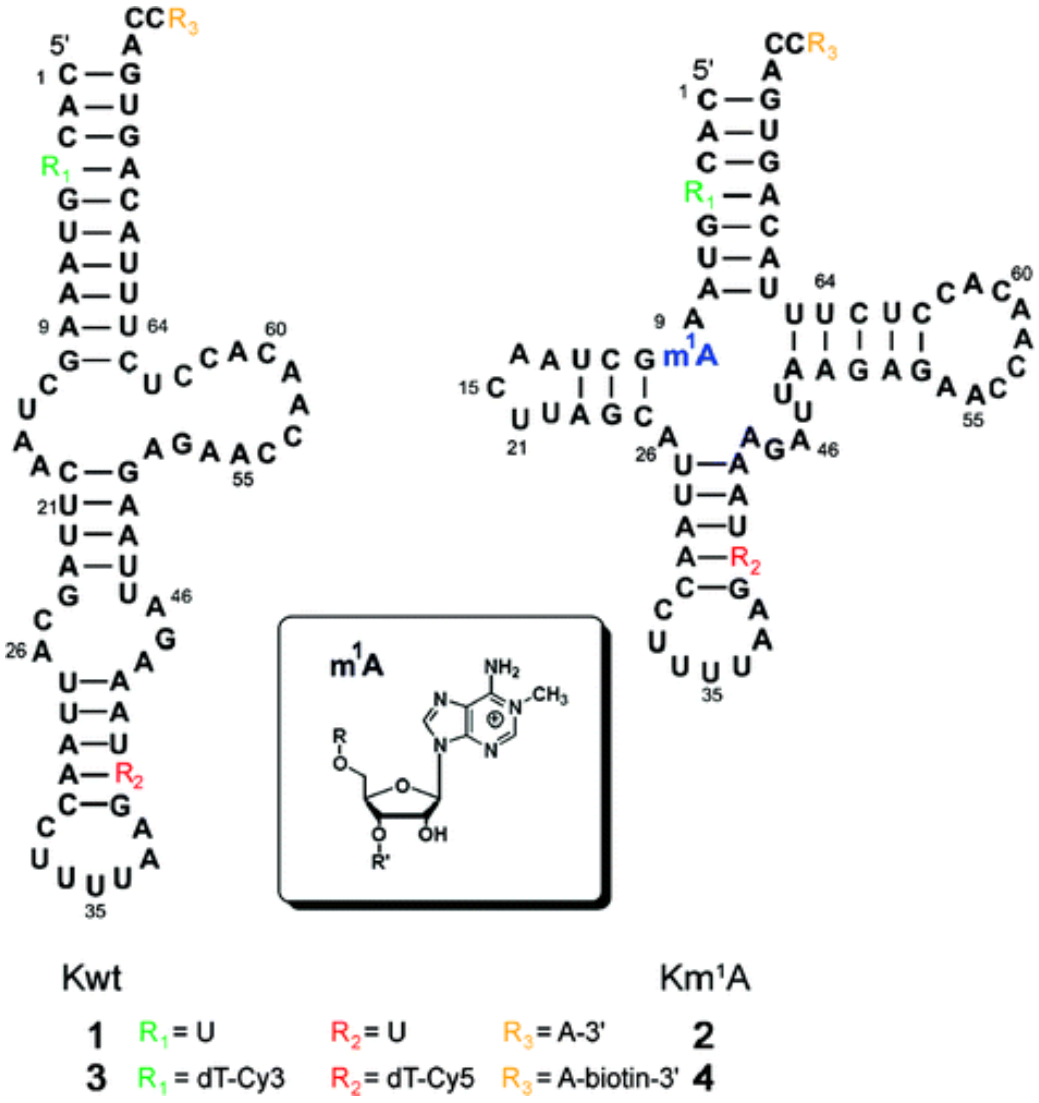


Figure 29. Impact de modifications sur la structure d'ARNt. *L'absence de m¹A9 ne permet pas la mise en place de la conformation en trèfle. Cela conduit à un ARNt avec une conformation allongée. Adapté de* [281].

4.2.3 – Rôles des modifications dans la fonction de décodage

Le rôle des ARNt dans la traduction est central, en permettant de faire le pont entre le code présent sur l'ARNm et la protéine. Au cours des dernières années, l'importance des modifications dans le processus traductionnel a été pointé du doigt. À travers cette partie je décrirai dans un premier temps les principes généraux permettant aux modifications chimiques (présentes dans la boucle anticodon ou dans les autres parties de l'ARNt) d'impacter la traduction. Par la suite, les détails de l'importance de la diversité des modifications et de leurs interactions qui impactent la traduction seront développés dans l'article de revue "*Variations in transfer and ribosomal RNA epitranscriptomic status can adapt eukaryote translation to changing physiological and environmental conditions*" présentée ci-dessous et dont je suis le premier auteur.

Les trois nucléotides en positions 34, 35 et 36 des ARNt forment l'anticodon. Cet anticodon est capable de reconnaitre et de fixer le codon de l'ARNm au niveau du site A du ribosome via des liaisons hydrogènes. Les deux premières bases du codon (1-2) sont décodées par les deuxièmes et troisièmes bases de l'anticodon (36-35) et respectent méthodiquement les interactions de Watson et Crick. En revanche, les interactions entre les bases 3-34 ne suivent pas systématiquement les règles de Watson et Crick : elles ont la capacité de réaliser des interactions dites « oscillantes » (ou wobble en anglais) (Figure 30). En effet des analyses de cryo-microscopie électronique ont permis de montrer qu'il existait assez d'espace au niveau du site A de la petite sous-unité pour accueillir des interactions « wobble » avec parfois des modifications de tailles importantes [287]. Une incroyable diversité de modifications est nécessaire pour assurer ces interactions « wobble » [288].

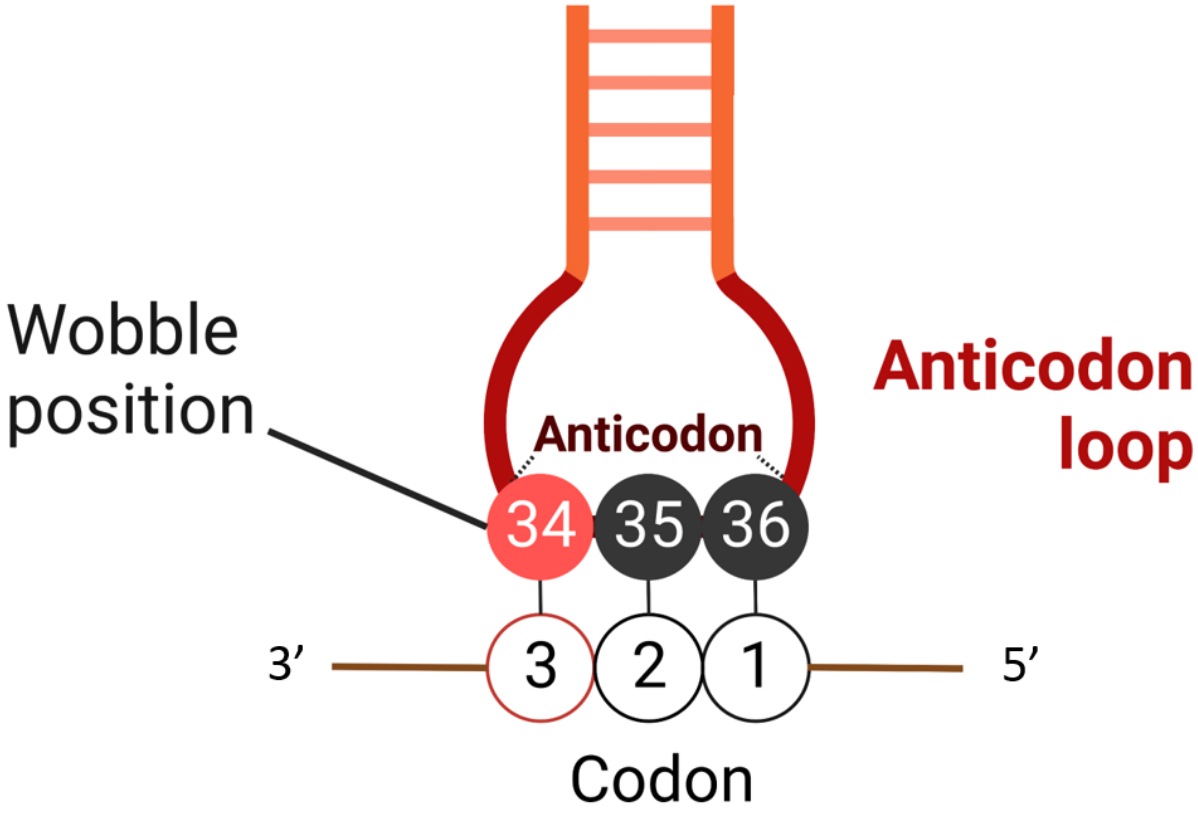
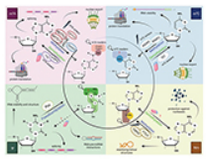


Figure 30. Interactions codon/anticodon*. Les bases 1,2 et 3 du codon de l'ARNm interagissent avec respectivement avec les bases 36, 35 et 34 de l'anticodon (des ARNt). L'interaction entre les bases 3 et 34 est décrite comme « wobble » car elle autorise des interactions ne suivant pas les lois de Watson et Crick.*

Le rôle central des modifications présentes sur l'anticodon est d'augmenter la capacité de décodage des ARNt. En effet, alors que le code génétique est composé de 64 codons, il n'existe pas autant d'ARNt correspondant. Plutôt que de favoriser l'émergence de nouveaux ARNt, l'évolution a favorisé l'apparition de modifications chimiques permettant d'augmenter les capacités d'interaction entre les ARNt et les codons. Dans ce sens, il existe certains codons dont le décodage efficace dépend directement de la présence d'une modification au niveau de l'anticodon. J'invite le lecteur ou la lectrice à prendre connaissance de cette revue afin d'éclaircir les questions des relations entre les modifications chimiques des ARNt et la régulation de la traduction.

4.2.4 - Revue : Variations in transfer and ribosomal RNA epitranscriptomic status can adapt eukaryote translation to changing physiological and environmental conditions

RNA Biology



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/krnb20

Variations in transfer and ribosomal RNA epitranscriptomic status can adapt eukaryote translation to changing physiological and environmental conditions

Arnaud Dannfald, Jean-Jacques Favory & Jean-Marc Deragon

To cite this article: Arnaud Dannfald, Jean-Jacques Favory & Jean-Marc Deragon (2021) Variations in transfer and ribosomal RNA epitranscriptomic status can adapt eukaryote translation to changing physiological and environmental conditions, RNA Biology, 18:sup1, 4-18, DOI: 10.1080/15476286.2021.1931756

To link to this article: https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1931756

© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

View supplementary material

Published online: 23 Jun 2021.

Submit your article to this journal

Article views: 1457

View related articles

View Crossmark data

Citing articles: 3 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=krnb20

RNA BIOLOGY
2021, VOL. 18, NO. S1, 4–18
https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1931756

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW

OPEN ACCESS Check for updates

Variations in transfer and ribosomal RNA epitranscriptomic status can adapt eukaryote translation to changing physiological and environmental conditions

Arnaud Dannfald[a,b], Jean-Jacques Favory[a,b], and Jean-Marc Deragon[a,b,c]

[a]CNRS LGDP-UMR5096, Pepignan, France; [b]Université de Perpignan via Domitia, Perpignan, France; [c]Institut Universitaire de France, Paris, France

ABSTRACT

The timely reprogramming of gene expression in response to internal and external cues is essential to eukaryote development and acclimation to changing environments. Chemically modifying molecular receptors and transducers of these signals is one way to efficiently induce proper physiological responses. Post-translation modifications, regulating protein biological activities, are central to many well-known signal-responding pathways. Recently, messenger RNA (mRNA) chemical (i.e. epitranscriptomic) modifications were also shown to play a key role in these processes. In contrast, transfer RNA (tRNA) and ribosomal RNA (rRNA) chemical modifications, although critical for optimal function of the translation apparatus, and much more diverse and quantitatively important compared to mRNA modifications, were until recently considered as mainly static chemical decorations. We present here recent observations that are challenging this view and supporting the hypothesis that tRNA and rRNA modifications dynamically respond to various cell and environmental conditions and contribute to adapt translation to these conditions.

ARTICLE HISTORY
Received 9 March 2021
Revised 7 May 2021
Accepted 13 May 2021

KEYWORDS
Epitranscriptome; tRNA; rRNA; ribosome; translation; stress; environment; acclimation; adaptation; post-transcriptional modifications

Introduction

Co- or post-transcriptional modification of RNA is an evolutionarily conserved process that drastically increases the biological potential of these crucial molecules. In all life kingdoms, at least 143 distinct chemical modifications can occur on RNA molecules, 111 on transfer RNAs (tRNAs), 33 on ribosomal RNAs (rRNAs) and 17 on messenger RNAs (mRNAs) [1]. Considering only eukaryotes, these numbers are 68, 21 and 17 for respectively tRNAs, rRNAs and mRNAs. In eukaryotes, mRNA epitranscriptomic marks have a dramatic impact on mRNA splicing, transport, stability, storage and translation and can regulate genes involved in development and stress responses [2,3]. The chemical modification of mRNAs is a dynamic process, with enzymes responsible for setting up (writers), removing (erasers) and reading (readers) marks in response to various developmental and stress conditions [2,3].

Compared to mRNA, tRNA modifications are much more diverse, ranging from simple modifications (i.e. methylation of the nucleobase or the sugar moiety), to the addition of complex compounds (i.e. isopentenylation of adenosine or the formation of cyclopentendiol derivates or imidazopurines from guanosine). tRNA biogenesis and functions, including tRNA maturation, stability, structure, aminoacylation, interaction with ribosomes and mRNA decoding properties, can be modulated by these chemical modifications [4]. Not all tRNA ribonucleotides are equal in terms of modifications as some positions in the T-loop (54 and 55), the D-loop (16 and 20) and the anticodon-loop (32, 34 and 37) are more frequently targeted. The most complex modifications are mainly found in the anticodon-loop region while modifications in the tRNA core are usually simpler. On average, 17% of tRNA ribonucleotides are modified (representing 13 modifications on each tRNA) [5].

From 2% to around 3% of all ribonucleotides of the four eukaryote cytosolic rRNAs (28S (25S in yeast, 26S in nematodes), 18S, 5.8S and 5S), representing over 100 nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) and 200 in human, are modified co- or post-transcriptionally [6]. Most of these modifications are 2′-*O*-methylation of ribose (to generate 2′-*O*-methyladenosine (Am), 2′-*O*-methyluridine (Um), 2′-*O*-methylguanosine (Gm) or 2′-*O*-methylcytidine (Cm)) or uridine conversion to pseudouridine (Ψ), and are largely contributing to the biogenesis and stabilization of ribosomes [7]. Almost all rRNA modifications are found on either 18S and 28S rRNAs while 5.8S and 5S rRNAs are not modified or presenting a small number of modified positions. For example, in yeast, 5.8S rRNA is not modified and a single position is converted to Ψ in 5S rRNA [6]. In contrast with yeast, human 5S rRNA is not modified but four modifications (Um, Gm and two Ψ) are present on 5.8S rRNA [8]. The majority of 2′-*O*-methylations and pseudouridylations are guided by C/D or H/ACA snoRNPs [9]. Other known rRNA modifications include 5-methylcytidine (m^5C), 6-methyladenosine (m^6A), N^6,N^6-dimethyladenosine ($m^{6,6}A$), 7-methylguanosine (m^7G), 1-methyladenosine (m^1A), N^4-acetylcytidine (ac^4C),

CONTACT Jean-Marc Deragon jean-marc.deragon@univ-perp.fr Université de Perpignan via Domitia, LGDP-UMR5096 58 Av. Paul Alduy, Perpignan 66860, France

This article has been republished with minor changes. These changes do not impact the academic content of the article.
Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

and 3-methyluridine (m^3U) [1]. Some of these modifications (such as 25S/28S rRNA NOP2/NSUN1-dependent m^5C [10] or the RRP8-dependent m^1A [11] modifications) are clearly important for normal ribosome biogenesis, others (like human m^6A or yeast m^3U modifications) have no clear impact on this process [12,13]. In general, little is known on the impact of these modifications on ribosome function, although many of them are evolutionarily conserved in eukaryotes and localized within or near catalytic centres, suggesting that they should play important roles in translation [6].

A first line of evidence supporting the hypothesis that tRNA and rRNA modifications are not static comes from the observation that these chemical decorations vary in human diseases including cancer [14–22]. For example, two recent studies revealed a global reduction of rRNA 2′-*O*-methylation at some rRNA sites (named variable sites) in two types of human tumours compared to their corresponding level in normal tissue [21,22]. These new cancer-related hypomethylated patterns were found to be tumour-specific and associated with tumour aggressiveness [21,22]. In contrast, the global level of tRNA modifications is generally higher in cancer cells compared to their corresponding level in normal tissue [23]. Based on these variations, both rRNA and tRNA modifications are now proposed as useful prognostic markers for cancer [14,21,22,24,25]. More generally, eukaryote tRNA modification levels have been shown to vary during cell cycle and in response to environmental stresses [5,26–31]. Although the kinetic of these variations has not been investigated *in vivo*, the fact that they can be observed from 15 min to 1 h after yeast cell exposure to stressing agents suggests that they result of either increased enzyme activity and/or variations in tRNA copy numbers [27,28,30,32,33]. For example, yeasts grown at high temperature (37°C) or exposed for 15 min to hyperosmotic conditions (0.4 M NaCl) show changes in their global tRNA modification levels, with induction of new chemical marks and elimination of others [28]. A global analysis of tRNA marks revealed that a combination of 14 modified ribonucleotides has strong predictive power to distinguish exposure of yeast to oxidative or alkylating agents, in a manner similar to transcriptional, proteomic and metabolomic profiling [30], although the exact profiles of stress-induced tRNA variations can be different among different yeast strains [34]. In plants, tRNA modification levels were also shown to vary in different stress situations. For example, in *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) and *Oryza sativa* (rice), several tRNA marks increase in response to 1–5 days of exposure to drought, salt or cold temperature conditions [31]. Also, while tRNAs are stable molecules, with estimated half-lives from 9 h to days, stress-induced tRNA modifications can affect their stability in one way or the other [32,35].

The dynamic, and not static, nature of tRNA and rRNA modifications suggests that it represents a sensing system linking cellular and environmental stimuli to translation and metabolism. For this system to work, variations in tRNA and rRNA chemical status must be exploited to adapt ribosome mRNA decoding potential to particular cellular conditions. One way to do this is to target tRNA subsets, especially in the anticodon loop [26,29,30,36,37], in order to better translate physiologically relevant mRNAs preferentially decoded by these tRNAs. Another way to modulate translation is to synthesize new 'specialized' ribosomes with variable levels of key rRNA modifications [6,38]. These specialized ribosomes could then preferentially bind and translate mRNA subsets involved in responding to specific cellular and/or environmental conditions [39,40]. We review here evidence supporting the idea that variations in tRNA and rRNA epitranscriptomic marks are not only passive consequences of different cellular conditions but can fine-tune translation to adapt cellular activities and the physiology of organisms to environmental changes. The principal tRNA- and rRNA-modified positions discussed in the following sections are presented in Figure 1, and a short summary of major information concerning these positions and their impact on translation is presented in Supplementary Table S1. In addition, Figure 2 gives an outline of the translation adjustment through tRNA and rRNA epitranscriptomic landscape modifications leading to adaptation to new environmental conditions.

Stress-modulated tRNA modifications and impact on translation

A key tRNA function is to decode mRNAs in the context of ribosome-directed translation. The 20 amino acids are encoded by 61 sense codons so that, for each amino acid, several 'isoacceptor' tRNAs (i.e. charged with the same amino acid but having distinct anticodons) are required. For example, the plant Arabidopsis has 597 tRNA genes, producing 198 unique sequences and 46 isoacceptors [41]. tRNA position 34 is named 'wobble' as it allows non-Watson and Crick parings with codon's third positions. In yeast, stress-responsive mRNAs named MoTTs for Modified Tunable Transcripts are biased for codons that necessitate the presence of corresponding tRNAs decorated with the proper chemical modification at the wobble position to be efficiently decoded [26,29,30,36,37]. Stress-induced variations of chemical modifications at the wobble position can therefore directly impact MoTTs (as well as other mRNAs) translation elongation speed [42], potentially influence co-translational mRNA decay [43], and affect the capacity of yeasts to survive stress. Apart from position 34, other stress-responsive modifications in the anticodon loop, such as the ones in positions 32 and 37, can also directly impact translation. Finally, modifications outside the anticodon loop can also affect cell translational capacities during stress. The next sections will focus on the description of these stress-responsive tRNA modifications involved in modulating the translational potential of cells.

Stress-responsive modifications of tRNA 'wobble' position 34

Uridine in position 34 of eukaryote tRNAs almost invariably carries a modification. In many instances, U_{34} is transformed to 5-methoxycarbonylmethyluridine (mcm^5U) or 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine (mcm^5s^2U) by

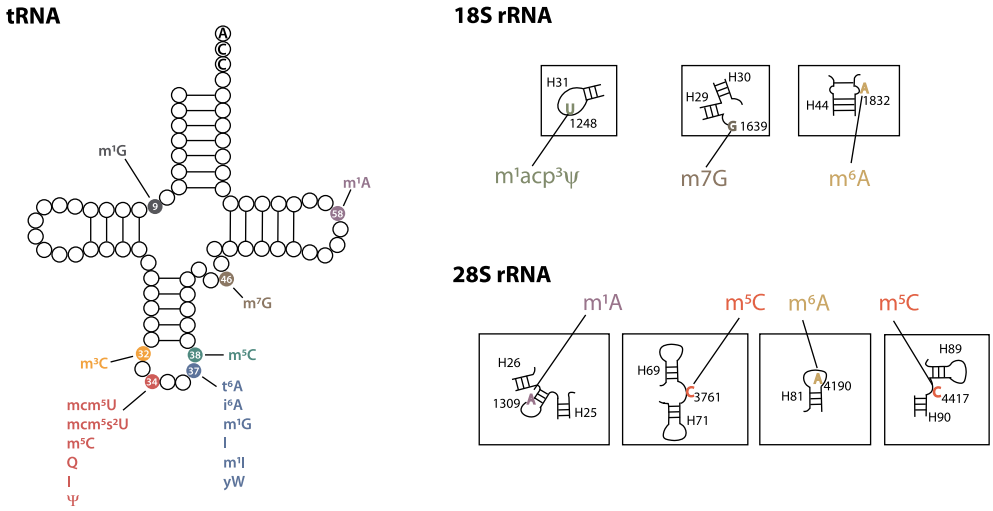


Figure 1. Schematic representation of tRNA and rRNA molecules with the position of major modifications discussed in the main text: 5-methylcytidine (m^5C), 3-methylcytidine (m^3C), 1-methyladenosine (m^1A), 6-methyladenosine (m^6A), 1-methylguanosine (m^1G), 7-methylguanosine (m^7G), queuosine (Q), wybutosine (yW), 5-methoxycarbonylmethyluridine (mcm^5U), 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine (mcm^5s^2U), Inosine (I), Pseudouridine (Ψ), 1-methylinosine (m1I), N6-threonylcarbamoyladenosine (t^6A), N6-isopentenyladenosine (i^6A) and 1-methyl-3-amino-carboxyl-propyl pseudouridine (m^1acp^3 Ψ). Positions of each modified tRNA ribonucleotides are indicated by their corresponding number. For 18S and 28S rRNAs, only close-ups of the different regions are presented. The numbering of the different 18S and 28S positions and helices (H) are taken from human sequences. A short summary of key information concerning these modifications is presented in Table S1.

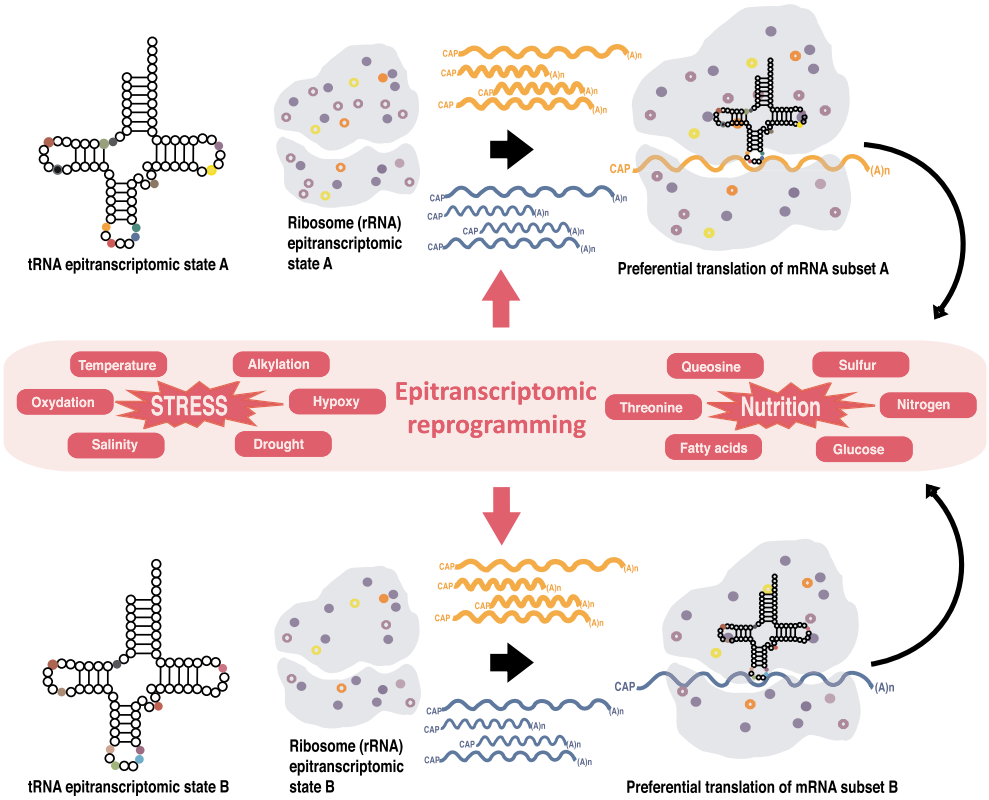


Figure 2. Reprogramming of tRNA and rRNA epitranscriptomic landscape to fit nutritional variation and stress condition. Nutrient availability and/or various stress conditions can reprogram the tRNA and/or rRNA epitranscriptomic landscape. This epitranscriptomic reprogramming than contributes to focus translation on different subsets of mRNAs facilitating acclimation and/or adaptation processes. Mechanisms by which various changes in tRNA and rRNA epitranscriptomic marks impact translation are summarized in Table S1.

a complex enzymatic process [1]. The elongator complex, composed of six subunits (ELP1–ELP6), is needed to transform U_{34} into 5-carboxymethyluridine (cm^5U) [44]. Next, the TRM9/TRM112 complex can methylate cm^5U_{34} to form mcm^5U_{34} [45]. Finally, thiolation of mcm^5U_{34}, to generate $mcm^5s^2U_{34}$, is a multistep process involving the ubiquitin-

related protein modifier 1 (URM1)-like proteins URM11 and URM12, and the CTU1/CTU2 complex [46]. tRNA arginine (UCU), glycine (UCC), glutamine (UUG), glutamic acid (UUC) and lysine (UUU) can be mcm^5U-modified while the last three tRNAs can be further thiolated [15,37]. The loss of ELP3, the catalytic subunit of the elongator complex [47] or TRM9 [48] completely abolishes the presence in tRNAs of both mcm^5U_{34} and $mcm^5s^2U_{34}$. This situation is embryo lethal in *Drosophila melanogaster* (drosophila) and mouse [49,50], which results in developmental defects in *Caenorhabditis elegans* (nematode) and plants [51,52] and generates stress hypersensitive phenotypes in yeast [37,42]. Alternatively, overexpressing Arabidopsis ELP3 or ELP4 in tomato and strawberry enhances resistance to pathogens [53,54]. In yeast, the loss of TRM9, drastically reduces the amount of polysomal mRNAs enriched in AGA and GAA codons, and corresponding protein production, without affecting global translation [37]. Deficiency in mcm^5U_{34} modification also leads to amino acid incorporation errors due to improper pairing of arginine tRNAs (UCU) with near-cognate serine codons in the ribosome [37]. Mutation of *URM11, URM12, CTU1* or *CTU2* prevents the formation of $mcm^5s^2U_{34}$ [55,56]. In yeast, this results in a slower propagation speed at high temperature of mutant stains compared to wild type (wt) [57]. More generally, the level of U_{34} thiolation is closely associated with thermotolerance properties of different yeast strains [34]. Dysfunction of CTU1 in nematodes also leads to a thermosensitive phenotype [46]. In Arabidopsis, the *urm11*/*urm12* double mutant is more sensitive to drought stress and produces leaf cells with altered ploidy levels and less chlorophyll content [55,56]. In rice, mutation of *CTU2* impairs the heat-stress response while its overexpression enhances tolerance to high temperature [58]. Also, in both rice and Arabidopsis, the *ctu1* or *ctu2* mutations are associated with a root-deficient phenotype [58–60].

In yeast, mcm^5U_{34} and $mcm^5s^2U_{34}$ levels vary in the presence of oxidative and alkylating agents or in heat and salt stress conditions [5,27–29]. Variations in the level of U_{34} modifications in the five concerned tRNAs have been shown to impact translation of stress-responsive mRNAs enriched in their cognate codons [37,61]. This is also true in *Schizosaccharomyces pombe* where, in response to H_2O_2, $mcm^5s^2U_{34}$-containing tRNA lysine (UUU) better translates AAA codon-rich stress-responsive genes [62]. In addition, a global reduction of yeast mcm^5U_{34} and $mcm^5s^2U_{34}$ levels in tRNA lysine (UUU), glutamine (UUG) and glutamic acid (UUC) induces ribosome pausing at cognate codons for a subpopulation of mRNAs and triggers the proteotoxic stress response [37,42]. The level of U_{34} thiolation is also critical in yeast to adjust translation and growth to the amount of sulphur amino acids [63]. Under nutritional stress, low levels of sulphur-containing amino acids directly impact negatively the thiolation status of U_{34}. This results in the reduced translation of key mRNAs coding for important translation and growth factors that are enriched in lysine, glutamine and glutamate codons. This, in turn, slows down cell growth and stimulates the synthesis and salvage of methionine and cysteine [63].

Interestingly, a crosstalk between the Target of Rapamycin (TOR) pathway and mcm^5U_{34} and $mcm^5s^2U_{34}$ tRNA levels has been observed in yeast, human and plants [60,64–67]. In yeast, the *urm11* mutant is hypersensitive to the TOR kinase inhibitor rapamycin and reduction in $mcm^5s^2U_{34}$ levels impacts the TOR pathway negatively by a yet-to-describe feedback mechanism [64,65]. In human cancer cells, higher expression of CTU1 is associated with increased cell growth and TOR activation [67]. In Arabidopsis, *ctu1* and *ctu2* mutants as well as the *urm11*/*urm12* double mutant phenocopy the root phenotype of hypomorph *tor* mutants [56,59]. Also, the Arabidopsis *ctu1* mutant is hypersensitive to TOR inhibitors [60]. These results suggest that stress-induced variations of mcm^5U_{34} and $mcm^5s^2U_{34}$ could also impact translation initiation through the TOR pathway. Overall, these observations indicate that mcm^5U_{34} and $mcm^5s^2U_{34}$ deposition is likely an evolutionarily conserved process that regulates translation initiation and elongation of a subset of transcripts involved in stress, nutrition and development.

Uridine in position 34 (as well as 6 other positions) can also be transformed to Ψ by the stand-alone pseudouridine synthase PUS1 [68,69]. In yeast, the *pus1* mutation causes a growth defect at high temperature. It also leads to synthetic lethality in combination with the loss of other pseudouridine synthases or in the presence of destabilized tRNA variants [69]. This suggests that PUS1-dependent modifications become essential when other aspects of tRNA biogenesis or modifications are disturbed. More specifically, Ψ in position 34 is proposed to stabilize codon-anticodon interactions, preventing the formation of unconventional pairs at non-synonymous near-cognate tRNAs [69]. The stabilizing property of Ψ is attributed to the presence of an extra NH moiety able to make more hydrogen bonds than uridine [70]. Also, Ψ in position 34 prevents 5-carmoylmethyluridine (mcm^5U_{34}) modification of intron-containing tRNA Isoleucine (UAU), a modification that would jeopardize its normal decoding capacity [71]. Although yeast tRNA Ψ levels have been shown to vary upon exposure to oxidative and alkylating agents [5,27] and during cold and heat stress [72], it is not clear at the moment if these modifications affect especially Ψ in position 34 (or other tRNA positions that are also converted to Ψ, see Table S1) and are used to reprogram translation in stress situations.

The nucleobase queuine (q) is a cyclopentendiol derivative of 7-aminomethyl-7-deazaguanine. This micronutrient, and its corresponding nucleoside queuosine (Q), cannot be synthesized by eukaryotes and must be acquired from the environment [73]. In most eukaryotes (with a few exceptions, such as *S. cerevisiae* and plants from the Brassicaceae family including Arabidopsis [74,75]), Q replaces G in position 34 of tRNAs having a GUN anticodon. The level of Q-tRNAs was shown to vary during development and the absence of Q-modified tRNAs is concordant with, and relevant to, the replicative undifferentiated cellular state. Accordingly, tRNAs of human primary tumours are hypomodified with respect to Q, with decreased levels correlating with disease progression

and poor patient survival such that Q hypomodification is proposed to be a deliberate and advantageous adaptation of cancer cells [76]. In mice, Q modification of tRNA is also required for normal tyrosine production such that animals made deficient in Q died within 18 days of withdrawing tyrosine from the diet [77]. Queuine deficiency also impacts the activity of several antioxidant systems [78] and phosphorylation levels of tyrosine phosphoproteins involved in cell signalling [79]. In plants other than Brassicaceae, the degree of Q-modification in $tRNA^{tyr}$(GUA) impacts the capacity of this tRNA to suppress UAG termination codons present on tobacco mosaic virus mRNAs [80]. All these observations suggest that Q modification of tRNA may affect severalf biological processes through broad changes in protein translation profiles.

The exact molecular impact of Q-tRNA on translation is still debated and possibly varies among species. In *Schizosaccharomyces pombe*, Q modifications enhance the translational speed of C-ending codons for aspartate (GAC), histidine (CAC), asparagine (AAC) and tyrosine (UAC), and reduce that of synonymous U-ending codons thus equilibrating the genome-wide translation of these codons [81]. Furthermore, Q prevents translation errors by suppressing second-position misreading of the glycine codon GGC. The absence of Q causes reduced translation of mRNAs involved in mitochondrial functions, and accordingly, lack of Q modification causes a mitochondrial defect [81]. In drosophila, the quantity of Q-containing tRNAs was shown to vary across development and translation to be adapted to these variations [82]. For example, at the embryonic stage, the level of Q-tRNA is high, and gene highly expressed at this stage are enriched in C-ending codons for fast and very accurate translation. However, at the larval and pupal stages, when low levels of Q-tRNAs are available, U-ending synonymous codons are favoured in highly expressed genes. In mammals, the translation of Q-decoded codons is slowed down in the absence of Q modifications [83]. This dysregulation of translation results in the accumulation of misfolded proteins and aggregates that triggers the activation of endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response. Consistent with reduced rates of protein translation, Q-deficient mice had a substantially reduced body weight. Overall, these observations reveal a route by which environment nutrients (including those generated by the gut microbiome of animals or the endophytic bacteria of plant tissues) can adapt protein translation. Furthermore, it is interesting to note that methylation by the DNMT2 methyltransferase of cytidine in position 38 of tRNAs to generate m^5C is strongly stimulated by the Q_{34} modification in *S. pombe* [84]. As m^5C_{38} has been shown to have a function in the control of tRNA cleavage (see below) and translational accuracy [85], this observation suggests another way by which nutritional factors could modulate mRNA decoding and translation. Also, drosophila lacking DNMT2 are more sensitive to heat and oxidative stress, further suggesting a role for Q_{34}, in combination with m^5C_{38}, in stress tolerance at least in this species [86].

In addition to uridine and guanosine, cytidine at the tRNA wobble position 34 is another stress-sensitive ribonucleotide. Cytidine in position 34 can be modified to m^5C by the action of TRM4(NSUN2). In yeast, m^5C_{34} increases following oxidative stress, leading to the selective translation of UUG-enriched mRNAs among which are represented ribosomal and stress responsive genes [87]. Accordingly, yeast *trm4* mutants are hypersensitive to H_2O_2 [87]. The global tRNA m^5C level also varies in yeast following exposure to alkylating agents and during heat and salt stress [5,27,28] and following plant exposure to cold, drought and salt [31]. However, since m^5C can be introduced in six tRNA positions (34, 38, 48–50, 72), it is not known to which proportion these variations affect position 34. In nematodes, m^5C_{34} modification of tRNA leucine (CAA) facilitates the translation of leucine UUG codons upon heat stress and supports the animal fitness at high temperature suggesting that this modification is involved in the adaptation to heat stress [88].

Finally, adenosine in position 34 can be deaminated to inosine (I) by the TAD2(ADAT2)/TAD3(ADAT3) complex. Inosine at position 34 (I_{34}) expands the tRNA decoding capacity as it can pair with U-, C- and A-ending codons [89]. Lack of I_{34} modifications is associated with several human diseases [90] and, in plants, to slower chloroplast translation, thereby affecting development [91]. In yeast, the global tRNA inosine level varies in the presence of oxidative or alkylating agents [5,27,29,30], but it is not clear if these variations impact positions 34, 37 or both and how they affect translation.

Stress-responsive modifications of tRNA position 37

Position 37, with position 34, are the two major modified positions in tRNA anticodon loops. All tRNAs harbour a purine at position 37 that is often modified into more complex derivates. A modified base in position 37 is proposed to stabilize, by base stacking, weaker (A:U) interactions between tRNA's position 36 and mRNA's first codon position [92]. Also, modification of position 37 impairs interactions with position U_{33} that would otherwise negatively affect the anticodon loop [92]. Modifications at position 37 are mainly known to be important for proper mRNA decoding and to prevent frameshift during translation [93].

N6-threonylcarbamoyladenosine (t^6A), N6-isopentenyladenosine (i^6A), as well as related ribonucleotides [1], are universally conserved stress-sensitive modifications found at position 37 that are crucial to translational accuracy. t^6A_{37} is found in nearly all tRNAs that decode ANN codon [94] and its general level was shown to vary following yeast exposure to oxidative and alkylating agents [5,27], as well as during heat stress [28]. In drosophila, variations in the amount of t^6A_{37} impact protein synthesis homoeostasis and can favour or inhibit translation of specific open reading frames [93]. In human cell lines, the amount to t^6A_{37} is regulated by the intracellular levels of CO_2 and bicarbonate, and hypomodification of t^6A_{37} in mitochondrial tRNAs was shown to downregulate mitochondrial translation in a codon-specific manner [95]. Variations in tRNA t^6A_{37} content in relation to CO_2 levels are proposed to regulate oxidative phosphorylation under hypoxic conditions, a process particularly important for solid tumour cell proliferation [95]. As such, t^6A_{37} is used as a prognostic marker for breast cancer [24]. Surprisingly, lowering the proportion of t^6A_{37}-modified

initiator methionyl-tRNA ($tRNAi^{Meti}$) in drosophila was shown to downregulate TOR kinase activity, inhibiting translation and growth [96]. This led to the suggestion that t^6A_{37}-modified $tRNAi^{Meti}$ could be a limiting factor for growth that is under the control of external stimuli [96].

i^6A_{37} is another important tRNA stress-sensitive modification, helping to properly decode the first codon position forming an A:U or U:A base pair [92]. In yeast, i^6A_{37} levels vary following salt and heat stress and exposure to oxidative and alkylating agents [5,27,28,30] and strains deficient in i^6A_{37} fail to sporulate [97]. In *S. pombe*, strains deficient in i^6A production present a mitochondrial dysfunction, mainly related to a lower content of i^6A-modified cytosolic tRNA tyrosine [98], and a reduced amount of several polysomal mRNAs enriched in i^6A-dependent codons [99]. Also, these strains are hypersensitive to rapamycin suggesting again, as for t^6A, mcm^5U and mcm^5s^2U, the existence of a crosstalk between the level of i^6A-containing tRNA and the TOR pathway [99]. Accordingly, in nematodes, the loss of i^6A results in slower growth and development [100].

In plants, tRNA isopentenyltransferase 2 and 9 (IPT2 and IPT9) can generate i^6A in position 37 of tRNA recognizing codons beginning with U [101]. AtIPT2 and 9 are indispensable for the biosynthesis of *cis*-zeatin, a stress-regulating plant cytokinin [101]. This is due to the fact that *cis*-zeatin can only be produced by the degradation of tRNAs containing the hydroxylated form of i^6A (io^6A) [101]. *Cis*-zeatin is important to maintain minimal cytokinin activity under growth-limiting conditions, including abiotic stress [102–104]. In these conditions, *cis*-zeatin replaces *trans*-zeatin for a lower promotion of cell division activities and an efficient set-up of the stress-responsive genetic programme. Heat, cold, drought and salt stress as well as nitrogen deficiency all lead to peaks of *cis*-zeatin with a strong decrease in *trans*-zeatin [102–104]. Accordingly, plants with higher levels of i^6A and io^6A in their tRNAs are proposed to be more resistant to abiotic stress as they can produce higher amounts of free *cis*-zeatin following stress-induced tRNA turnover [102]. Based on these observations, it has been suggested that plant stress tolerance could potentially be improved by increasing the content of endogenous i^6A/io^6A tRNAs [103].

It is interesting to note that the amount of tRNAs containing t^6A and i^6A (including their derivates) can also vary in relation to nutritional signals. The formation of t^6A (and derivates) uses threonine, an essential amino acid that must be salvage from bacteria in eukaryotes. Therefore, as for Q, this is another way by which environmental nutrients can feedback on the regulation of protein translation. The biosynthesis of i^6A (and derivates) depends on dimethylally pyrophosphate that itself is derived from acetyl-CoA [1]. Since acetyl-CoA levels depend on glycolysis or fatty acid beta-oxidation, this suggests that modifying tRNA i^6A levels could be a way to adjust the translation of specific mRNAs to the cell metabolic status. Taking into consideration that Q_{34}, $mcm^5s^2U_{34}$ and m^1A_{58} (see below) levels are also controlled by the cell nutrient status, a picture is emerging in which connections between tRNA modifications and the cell translational output is not limited to environmental exceptional situations but is also part of the cell's normal metabolism and growth programmes [105].

Wybutosine (yW) is a complex stress-responsive guanine modification found only in position 37 of eukaryotes tRNA phenylalanine (GAA) [1]. In yeast, this modification requires the retrograde nuclear import of tRNA phenylalanine to be synthetized [106]. In yeast and plants, the level of yW depends on cell growth conditions [107,108] and, in yeast, varies upon exposure to oxidative and alkylating agents as well as following heat and salt stress [5,27,28,30]. These observations suggest that the level of yW is modulated in response to environmental conditions and the cell's metabolomic requirements. yW is important to limit frameshifting particularly at 'U' stretches [107] and its loss results in a fourfold increase in −1 frameshift in yeast and animals [109,110]. It remains to be seen if the translation of some stress-responsive mRNAs could benefit from 'programmed' frameshifting as this is the case for many viruses that use this strategy to generate multiples viral proteins [110]. This 'frameshifting potential' that depends on the amount of yW37-modified tRNA phenylalanine was proposed as the evolutionary driving force behind the emergence of this modification from the m^1G_{37} platform [105].

Deamination of adenosine in position 37 by TAD1 (ADAT1) results in the formation of inosine (I) that can be further transformed to 1-methylinosine (m^1I) by TRM5. TRM5 can also directly modify guanosine in position 37 to generate 1-methylguanosine (m^1G). The I, m^1I and m^1G tRNA content was shown to vary upon yeast exposure to oxidative and alkylating agents [5,27,29,30] and, for m^1I, in heat and salt stress conditions [28]. In plants, the *tad1* mutant is hypersensitive to heat and cold stress [111] suggesting that I_{37} and/or m^1I_{37} are playing a role in plant acclimation to these temperature variations. Also, in Arabidopsis, the *trm5* mutant is slow-growing, late flowering, has reduced lateral roots, and accumulates fewer proteins involved in photosynthesis and ribosome biogenesis [112]. At the molecular level, the loss of AtTRM5 leads to aberrant protein translation and disturbed hormone homoeostasis. Since TRM5 is responsible for m^1G_{37} and m^1I_{37} methylation, it is not known if the loss of one, the other or both modifications are leading to the observed phenotypes. Nevertheless, based on the impact of m^1G/m^1I deficiencies at position 37, it was suggested that hypomodified tRNA would be unable to efficiently decode their cognate codons or induce frameshifts, resulting in a global reduction of protein output [113]. In yeast, TRM5 is downregulated by exposure to alkylating agents [30] and m^1I was shown to oscillate throughout the cell cycle [114], suggesting a role for m^1I in cell cycle regulation and response to at least this stress condition.

Stress-responsive modifications of tRNA position 32

In the anticodon-loop region, 3-methylcytidine (m^3C) in position 32 was recently shown to be an important stress-sensitive modification directly regulating mRNA translation in yeast and mouse [30,115]. m^3C occurs at position 32 of all tRNAs decoding serine and threonine and of two tRNAs decoding arginine, and its global level was found to vary upon yeast exposure to oxidative and alkylating agents as well as in heat

and salt stress conditions [5,27,28,30]. The upregulation of m^3C content upon yeast exposure to alkylating agents led to the selective translation of mRNAs enriched in four specific threonine codons, suggesting that these codons are differentially recognized by m^3C-modified $tRNA^{Thr}$ [30,116]. TRM140(METTL2) and TRM141(METTL6) are responsible for the m^3C_{32} modification [115,117]. In human, METTL6 was identified as a crucial regulator of tumour cell growth, and its deletion in mouse stem cells results in changes in mRNA ribosome occupancy and impairs pluripotency [115]. These results suggest that m^3C_{32} is a key modification required to adapt translation to various cell growth and stress conditions. Interestingly, the m^3C_{32} modification of three *S. pombe* tRNAs is dependent on the synthesis of i^6A_{37} [118], suggesting that these two modifications can be interconnected. Also, in *Trypanosoma brucei*, m^3C_{32} can be further converted to m^3U_{32} by the action of the TAD2/TAD3 complex [119].

Stress-responsive modifications outside of the tRNA anticodon-loop region

Not all stress-sensitive tRNA modifications directly impacting translation occur in the anticodon-loop region. One example is the modification by the TRM61/TRM6 complex of $tRNAi^{Meti}$ adenosine 58 to generate m^1A. In all eukaryotes, this modification is critical to ensure the stability of $tRNAi^{Meti}$ and is a way to control translation initiation [4,5,120,121]. In mammals, the ALKBH1 demethylase can demethylate m^1A_{58} in response to variations in nutritional conditions [122]. For example, in glucose deprivation condition, *ALKBH1* expression is up-regulated leading to a reduction of m^1A_{58}, $tRNAi^{Meti}$ and translation [122]. On the contrary, the knockdown of ALKBH1 results in higher m^1A_{58} levels of specific tRNAs (including $tRNAi^{Meti}$) and favour translation initiation and elongation from corresponding codons [122]. In addition of being more stable, m^1A_{58}-methylated tRNAs are preferentially recognized and delivered to actively translating ribosomes [122]. In eukaryote, m^1A can also be present at two other tRNA positions (9, and 14) [1]. In yeast, global m^1A levels vary upon exposure to oxidative and alkylating agents [5,27] and in plants upon exposure to cold, drought and salt stress [31]. It is not known if m^1A in position 58 is mainly affected in these conditions, but if this is the case, then translation could also be efficiently modulated by m^1A_{58} levels following stress.

In addition to its presence in position 37, m^1G is also found in position 9 of many cytosolic and mitochondrial tRNAs. In human, the TRM10A methylase is responsible for installing this modification on a large number of tRNAs (21) [123]. Recently, a very interesting link was established between tRNA m^1G_9 and mRNA m^6A modifications [123]. TRM10A and the m^6A demethylase FTO were shown to collaborate to target a specific subset of m^6A-containing mRNAs whose efficient translation requires the presence of m^1G_9-containing tRNAs. In the presence of both FTO and TRM10A, the m^6A level of targeted mRNAs is maintained low, preventing efficient binding of the m^6A reader protein YTHDF2. This situation contributes to maintain the targeted mRNAs stable while their translation is favoured by the presence of m^1G_9-modified tRNAs. In the absence of TRM10A, FTO would less efficiently demethylate these mRNA targets, leading to hyper m^6A methylation, YTHDF2 binding and mRNA instability. In addition, these unstable hypermethylated mRNAs would be poorly translated due to the absence of m^1G_9-modified tRNAs. Recently, the lack of m^1G_9 methylation was also shown to cause a decrease in the steady-state amount of human $tRNAi^{Meti}$ suggesting that this modification, as for m^1A_{58}, could be involved in regulating translation initiation [124]. Global m^1G levels are known to vary in different environmental situations (see earlier) and it remains to be determined if these modifications affect positions 9, 37 or both.

The modification of guanosine to m^7G in position 46 is one of the most prevalent tRNA modifications found in eukaryotes and concerns a large number of different tRNAs (11 in yeast, 22 in human) [125]. The m^7G_{46} level was found to vary in yeast upon oxidative and alkylating treatments [5,27] and, in plants, in cold, drought and high salt conditions [31]. TRM8/TRM82 in yeast and METTL1/WDR4 in human are responsible for this modification. m^7G_{46} is important to stabilize tRNAs, accordingly the *trm8* or *trm82* mutants have an increased sensitivity to high temperature [126]. In human cells, depletion of METTL1 results in the loss of m^7G_{46} and causes a global reduction in translation. Furthermore, in this mutant, mRNAs having low translation efficiency (TE) compared to wt have a significantly higher frequency of codons decoded by m^7G_{46}-modified tRNAs [125]. A ribosome occupancy study in the *mettl1* mutant also revealed an increase ribosome pausing at codons whose translation is dependent on the presence of m^7G_{46}-containing tRNAs [125]. These results suggest that the amount of m^7G_{46} in tRNAs can regulate the translation of a subpopulation of mRNAs in response to various environmental conditions.

Several other common tRNA modifications are stress-sensitive, like 2-methylguanosine (m^2G) and N^2,N^2-dimethylguanosine ($m^{2,2}G$) (in positions 10 and 26), 5-methyluridine (m^5U) (in position 54), dihydrouridine (D) (in positions 16–20) and (Ψ in 14 possible tRNA positions apart from position 34) [5,27,31]. These modifications are mainly associated with the stabilization of the tRNA tertiary structure and to prevent tRNA misfolding [1]. Dihydrouridine is more specifically important to maintain tRNA conformational flexibility, especially in low-temperature conditions [127]. Increased D levels are also observed in several cancer cell types [25]. On the contrary, Ψ is able to stabilize RNA, improving base-stacking by forming additional hydrogen bonds with water through its extra imino group [128]. For example, Ψ in position 55 was proposed to stabilize the tertiary structure of tRNA, particularly in extremely high-temperature conditions [1]. Ψ as D, has been found to increase in some cancers [129]. It remains to be seen if stress-induced variations of these modifications can adapt translation to specific cellular and environmental conditions.

Chemical modifications affecting the production of biologically functional tRNA fragments: an indirect way to adapt translation to stress?

tRNAs are generally considered as stable molecules, but this high stability greatly relies on the acquisition of a proper tertiary structure. Miss-folded tRNA molecules are targeted for degradation by the nuclear surveillance pathway or by the rapid tRNA decay (RTD) pathway [130,131]. Several chemical marks are important for tRNA proper folding (see above for numerous examples), so that hypomodified tRNAs are preferential targets of tRNA decay pathways [132–134]. For example, precursors of initiator tRNA methionine lacking m^1A_{58} are rapidly turned over by the nuclear surveillance pathway [135], while mature tRNAs valine (AAC) lacking both m^7G and m^5C (in position 34 and/or 48 and 49) are degraded by the RTD pathway at high (37°C) temperature in yeast [132].

While the nuclear surveillance and RDT pathways are expected to completely degrade tRNAs, relatively stable tRNA-derived RNA fragments (tRFs) of different sizes have been found in many different organisms [130,134]. Half-tRNAs (5′-halves (tRF5A) and 3′-halves (tRF3A)) are produced primarily upon different stresses by an endonucleotidic cleavage in the anticodon loop. Also, in normal physiological conditions, numerous short tRFs (around 15–25 nucleotides) are produced from mature tRNAs, mainly by cleavage in the D (tRF-5D) and T loops (tRF-3 T). tRFs have many proposed biological activities, one of which is to modulate translation [134]. Mechanisms by which such regulation can be achieved are still under study, but they could involve blocking access of eIF4F to the mRNA cap structure [136], directly interacting with the small ribosomal subunit to inhibit translation [137] or more specifically acting on specific mRNAs, in a microRNA-like manner [138,139]. We focus in the following on the few known situations in which key tRNA chemical decorations were shown to influence the biogenesis and/or function of tRFs and, doing so, potentially regulate translation.

Angiogenin (ANG) is a stress-inducible, vertebrate-specific, endonuclease of the RNase A family that can cleave the anticodon loop of a subset of tRNAs (i.e. those with a CA-motif in the anticodon) to generate tRF5A and tRF3A fragments [140,141]. ANG cleavage is inhibited by the presence of m^5C in position 38 (deposited by DNMT2) or in position 34 and/or 48 and 49 (deposited by TRM4 (NSUN2)) [134]. Therefore, stress conditions leading to variations in tRNA m^5C levels can not only directly adapt ribosome mRNA decoding properties (see above) but, by influencing ANG cleavage activity, also produce variable amounts of tRFs. In turn, this stress-specific tRF population could potentially contribute to adapt translation to the situation. Another enzyme responsible for generating tRFs is RNase L, a mammalian-specific endonuclease that can cleave the anticodon loop of tRNA histidine depending on the presence of a specific tRNA modification [142]. RNase L is activated upon detection of double-stranded RNA, a hallmark of viral infection, and cleaves single stranded viral and cellular RNAs at the very promiscuous recognition site UNN. The presence of Q in position 34 is protecting most tRNAs from RNase L cleavage, except for tRNA histidine where, on the contrary, it stimulates cleavage at position 37, leading to the synthesis of stable tRNA histidine fragments and to a general decrease in protein synthesis [142]. Modifications in tRNA Q_{34} levels could therefore affect this situation, leading to the synthesis of new populations of tRNA fragments with different impacts on translation. tRNAs decorated with specific chemical marks can also be the target of eukaryotic toxin ribonucleases for competitive purposes. For example, the subunit of the zymocin toxin from *Kluyveromyces lactis* is a ribonuclease that, once introduced in competitor yeast cells, can down-regulate translation by cleaving several tRNAs presenting the mcm^5s^2U modification in position 34 [143]. In response, adjusting tRNA $mcm^5s^2U_{34}$ levels in yeast could potentially dampen this negative influence on translation. RNases from the T2 and (to a lesser extent) DICER families are also responsible for generating long and short stable tRNA fragments [139,144,145]. Certain tRNAs are more susceptible than others to cleavage by these enzymes and one largely understudied determinant of this selectivity could be the nature of chemical decorations on each tRNAs. Whether tRFs biological activity could be influenced by the nature of chemical marks they contain, is also largely unexplored. Indeed, in a single case, the presence of a modified ribonucleotide (Ψ in position 8) on small tRFs, issued from three different tRNAs, was shown to be essential to exert translation inhibition in a human stem cell line [146]. Clearly, more work is needed to establish the global impact of tRNA epitranscriptomic marks on the production and biological activity of tRFs and their impact on translation.

Variations in rRNA modifications and impact on translation

Diverse ribosome populations exist within cells and this heterogeneity can be due to variations in their rRNA and protein compositions, but also to post-transcriptional/translational modifications of these components (reviewed in Guo [147]). To what extent these variations in composition influence ribosome properties, thereby changing the output of translation, with some specialized ribosomes displaying differential affinities for particular mRNAs, is the subject of intense debates (reviewed in Ferretti and Karbstein [148]). We specifically review here evidence for ribosome functional specialization linked to variations in their rRNA chemical composition. Since rRNA modifications are generally installed during ribosome assembly and are considered to be irreversible [6,13], ribosome turnover would be needed to remove an existing ribosome population to the profit of a different one. This implies that ribosome functionalization by changing rRNA chemical composition would be a slow process, potentially useful as a long-term strategy of cell adaptation but not pertinent for rapid acclimation processes [148,149].

Variation in rRNA 2′-*O*-methylation and pseudouridylation levels and impact on translation

In certain situations, 2′-*O*-methylated nucleotides and pseudouridines are deposited by snoRNAs in substochiometric amounts, generating heterogeneous ribosome populations [6,38,150]. In human, the recent remapping of all 2′-*O*-methylated nucleotides allowed the identification of 'vulnerable' sites, particularly affected by fibrillarin and anti-tumoural p53 levels, and most likely to undergo specific regulation [150]. In human, snoRNAs are differentially expressed in cancers and some of them have been associated with oncogenesis [151,152]. Accordingly, levels of 2′-*O*-methylated nucleotides and Ψ are altered in cancer lines [17,18], although it is not clear at the moment if these changes always result of corresponding changes of snoRNA expression. Also, whether 2′-*O*-methylation and pseudouridylation rRNA profiles can vary under non-pathological conditions remains to be determined. Interestingly, ribosomes with reduced amount of 2′-*O*-methylation levels present a fourfold reduction in their capacity to initiate translation using internal ribosome entry sites (IRES) [17,39]. Reducing the amount of pseudourydilated rRNAs in ribosomes was also shown to impact IRES-dependent translation, either by increasing or reducing its efficiency depending on the studied mRNA [18,153,154]. IRES-dependent translation concerns many important cellular mRNAs, including growth factors and receptors, apoptosis regulators, oncogenes and tumour suppressors [155], and modulating its efficiency, by increasing or reducing 2′-*O*-methylation and pseudouridylation levels, could represent a way to adapt translation to specific cellular conditions. In addition to IRES-containing mRNAs, modulating the amount of 2′-*O*-methylation was also shown to impact (positively or negatively) the cap-dependent TE of several mRNAs [39]. However, since removing 2′-*O*-methylation over a certain threshold can impact ribosome biogenesis [156], it is possible that these effects are simply due to a general reduction of ribosome availability and not to ribosome specialization per see [148]. Therefore, it is unclear at the moment if global variations in 2′-*O*-methylation and pseudouridylation contribute or not to generate specialized ribosomes affected in their capacity to initiate cap-dependent translation on mRNA subsets.

A key evolutionary conserved Ψ present on 18S rRNA (position 1248 in human and 1191 in yeast) and structurally located at the ribosome P site, can be further modified by a methyltransferase and an aminocarboxyl propyl transferase (respectively named EMG1 and TSR3 in human) to generate 1-methyl-3-amino-carboxyl-propyl Ψ (m^1acp^3 Ψ) [19]. This modification is involved in 18S rRNA processing [13]. Also, by interacting with the 40S ribosomal protein RPS16 and tRNA, it can directly impact the ribosome P site function [157]. Recently, a large subset of human tumours was found to possess hypo-$m^1acp^3Ψ$-modified 'onco-ribosomes'[19]. In these tumour cells, while global protein translation was unaffected, the TE of a subset of mRNAs coding for ribosomal proteins increased leading to the higher accumulation of corresponding proteins [19]. The same observation was made for *tsr3* mutant cell lines presenting low $m^1acp^3Ψ$ levels [19]. This suggests that ribosomes lacking $m^1acp^3Ψ$ can specifically promote the translation of a subset of mRNAs. It remains to be determined if non-pathological conditions can also result in the production of specialized $m^1acp^3Ψ$-free ribosomes.

m^5C rRNA variations and impact on translation

The yeast RNA methyltransferase RCM1 is responsible for converting the cytidine in position 2278 of 25S rRNA in m^5C [149]. The nematode-corresponding position (m^5C_{2381}) is also targeted by NSUN5, the ortholog of RCM1. In these two organisms, as well as in drosophila, the loss of RCM1(NSUN5) confers increased lifespan and resistance to different types of stress [149]. In *RCM1*-knockout cells, ribosome lacking m^5C_{2278} are more efficient to translate several stress-responsive genes [149]. Since RCM1 is localized in the nucleoli [10], a stress-mediated response involving the down-regulation of RCM1 enzymatic activity is likely to be slow, involving the exchange of methylated ribosomes for unmethylated ones so that this mechanism would preferentially modulate long-term chronic stress [149]. In human, high NSUN5 expression promotes the progressing of cancer cells through cell cycle regulation [158]. Accordingly, the epigenetic silencing of NSUN5 in human glioma cells generates ribosomes lacking 28S C_{3761} methylation (the equivalent of yeast 25S C_{2278}) that promote the selective translation of stress-responsive genes and limit global protein synthesis and cell growth [159]. Also, NSUN5 knockout in mice leads to reduce body weight and reduced protein synthesis in many tissues [160].

Another conserved methyltransferase, NOP2(NSUN1), is involved in converting a second large subunit rRNA cytidine (in position 2870 for yeast, 2982 for nematodes and 4417 for human) in m^5C. In yeast and human, NOP2(NSUN1) is essential for rRNA processing and synthesis of the large ribosome subunit, a function that is independent of its m^5C modification activity [161–163]. Accordingly, NOP2 (NSUN1) is essential for yeast growth and mammalian embryo development [161,162]. This is not the case for nematodes, as *nsun1* worms are viable and not significantly affected in ribosome biogenesis nor in global translation [164] (a situation analogous to what is observed in *nsun5* worms [149]). *nsun1* worms have a longer lifespan and were shown to remodel the translation of specific mRNA transcripts [164]. Therefore, the level of NSUN1 in nematodes is likely important for the synthesis of specialized ribosomes more or less adapted to the translation of different mRNA subsets.

At the moment, it is not clear exactly what environmental signals could regulate NOP2(NSUN1) and RCM1(NSUN5) levels. The fact that the human NSUN5 CpG island promoter can be epigenetically regulated [159] may be a way environmental cues could achieve such regulation. Overall, these observations suggest that RCM1(NSUN5) and NOP2 (NSUN1) (at least in nematodes), by adjusting ribosome m^5C levels, adapt translation to different physiological conditions such that, in fast growth conditions, highly m^5C-modified ribosomes are preferred

while m^5C-hypomodified ribosomes are favoured in stress situations.

m^6A rRNA variations and impact on translation

Another important rRNA modification that affects ribosome translation in animals (globally and/or on mRNA subsets) is m^6A [165–167]. In human and nematodes, 18S and 28S/26S rRNAs are decorated each by one m^6A, installed by METTL5(METL5) on 18S [12,165,166] and by ZCCHC4 on 28S/26S [12,167,168]. In nematodes, the loss of METL5 does not globally affect translation while the TE of cyp-29A3, a transcript coding for a cytochrome P450, is reduced 10-fold, suggesting that ribosome 18S m^6A methylation levels can regulate the translation of specific mRNAs [166]. *metl-5* worms have an increased lifespan and are more resistant to several abiotic stresses [166]. These phenotypes are proposed to be the direct result of reduced CYP-29A3 translation and CYP-29A3-dependent synthesis of eicosanoid lipids in the mutant. In contrast to nematodes, in human cells, knocking out METTL5 results in a general decrease in TE, but whether some specific mRNAs are more affected than others has yet to be investigated [165]. In human cells, knocking out ZCCHC4, also results in a general decrease in TE (of about 25%), but in that case, a subset of 311 mRNAs were shown to be much more affected than others, including transcripts coding for membrane protein targeting, mRNA catabolic process, ER localization and translation initiation, here again suggesting that 28S m^6A levels can affect the translation of specific mRNAs [167]. The identification of physiological and/or environmental conditions leading to the accumulation of ribosome population with substochiometric amount of m^6A-modified rRNA is still needed to firmly established rRNA m^6A level as a new regulation layer of the animal stress response.

m^1A rRNA variations and impact on translation

Another key rRNA modifying enzyme is the methylase RRP8 that generates m^1A in position 645 of yeast 25S rRNA [169]. The loss of m^1A_{645} results in the production of ribosomes altered in their general ability to initiate translation, possibly linked to a reduced competence for the 60S subunit lacking m^1A_{645} to bind to the 40S subunit [169]. Surprisingly, despite having a reduced translation initiation efficiency, most proteins are produced in similar amounts in wt and *rrp8* mutant lines. Exceptions to this rule concern several enzymes involved in carbohydrate metabolism that are either up or down regulated in *rrp8* mutant compared to wt, suggesting that ribosomes lacking m^1A_{645} translate corresponding mRNAs more or less efficiently [169]. This suggests that, under some growth conditions, ribosomes lacking m^1A_{645} could be synthesized to specifically regulate the translation of mRNAs involved in producing key carbohydrate metabolism enzymes. In human, m^1A-modified nucleotides are elevated in the urine of cancer patients [20] and lowering the level of 28S m^1A_{1309} (the equivalent of yeast 25S m^1A_{645}) leads to the downregulation of cell proliferation in a p53-dependent manner [170]. These results suggest that methylation at this position is a way to control cell proliferation in mammals. Finally, in nematodes, T07A9.8 (the orthologue of the yeast RRP8 enzyme) methylate position A_{674} of 26S rRNA (the equivalent of yeast 25S m^1A_{645}) [171]. Impairing this function leads to an extending life span for nematodes, again linking m^1A modification at this position to cell cycle regulation [171].

m^7G rRNA variations and impact on translation

BUD23 is an important protein involved in the biosynthesis of the translational apparatus, firstly by processing the pre-18S RNA into its mature form and secondly by modifying an 18S rRNA guanosine (in position 1639 for human and 1575 for yeast) to m^7G [172,173]. Since the methyltransferase activity is not needed to process pre-18S RNA, these two functions are considered to be independent of each other [173,174]. In human cell lines, 18S m^7G has been proposed to be present in substochiometric amount in ribosome populations, which may indicate a selective role in ribosome function [174]. Furthermore WBSCR22, the human ortholog of BUD23, is found to be overexpressed in breast cancer and has been proposed as a cancer biomarker [174]. In human cells, 48 h after knocking down BUD23, no global impact on protein translation rate was observed. Yet, the TE of more than 700 mRNAs was affected in this condition, including a strong TE decrease for mRNAs coding for mitochondrial proteins [172]. Also, mRNAs with contrasting GC 5′UTR content were differentially translated following BUD23 knockdown. Transcripts having a low GC 5′UTR content also had a low TE, while the opposite was true for transcripts having a high GC 5′UTR content [172]. These results suggest that variations in 18S m^7G levels could generate ribosomes with different affinities for mRNAs having contrasting GC 5′UTR content. However, it is not clear for the moment if cell translation occurring 48 h after knocking down BUD23 mainly results from ribosomes lacking m^7G or if the loss of BUD23 could impact translation independently of ribosome m^7G levels.

Conclusion

A large and convincing body of evidence exists to conclude that tRNA and rRNA chemical modifications are critical for the biogenesis, stabilization and proper decoding functions of the constitutive translation apparatus (reviewed in Sloan et al. and Sharma and Lafontaine [6,13]). However, whether variations in the level of these modifications, in some cell and environmental conditions, can be used to adapt this apparatus to target physiologically relevant mRNA subsets, possibly still await further experiments. At the molecular level, demonstrations that changing the nature and stoichiometry of many tRNA modifications, in yeast, nematodes, drosophila, plants and mammals, can indeed favour the translation of specific mRNAs are more and more numerous and convincing. Although less numerous, reports of heterogeneous ribosome populations, specialized to target specific mRNAs due to changes in the stoichiometry of one or several rRNA chemical marks, have been lately published using different eukaryotic systems. So, what is missing to firmly establish tRNA and

rRNA epitranscriptomic variations as a new layer of eukaryote gene regulation? First, it is not always clear in which (non-pathological) physiologically relevant conditions these variations can occur and what could be the impact of these changes at the organism level. In other words, can these variations significantly impact nutritional, developmental or stress-responses leading to acclimation and/or adaptation of individuals? Also, studies of these variations in natural populations coming from contrasting environments are clearly missing to ensure that this regulatory process is indeed under selection *in natura* and therefore meaningful as a regulatory process. Plants as complex organisms that can be studied at the physiological and molecular levels, as well as in natural environments, may represent good systems to try to solve these issues.

Acknowledgments

We thank Cécile Bousquet-Antonelli, Rémy Merret and Julio Saez-Vasquez for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS, the University of Perpignan (UPVD) and the Institut Universitaire de France (IUF). This study is set within the framework of the "Laboratoires d'Excellences (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41) and of the "École Universitaire de Recherche (EUR)" TULIP-GS (ANR-18-EURE-0019). AD is the recipient of a PhD grant from the Occitanie Region. This paper was based upon work from COST Action CA16120 EPITRAN, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology).

Disclosure of conflicts of interest Statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique; Région Occitanie; École Universitaire de Recherche TULIP-GS [ANR-18-EURE-0019]; LabEx TULIP [ANR-10-LABX-41]; Institut Universitaire de France (IUF); and Université de Perpignan Via Domitia EPITRAN Cost Action (CA16120).

References

[1] McCown PJ, Ruszkowska A, Kunkler CN, et al. Naturally occurring modified ribonucleosides. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2020;11:e1595.
[2] Roignant JY, Soller M. m(6)A in mRNA: an ancient mechanism for fine-tuning gene expression. Trends Genet. 2017;33:380–390.
[3] Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR. Reading, writing and erasing mRNA methylation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019;20:608–624.
[4] Barraud P, Tisne C. To be or not to be modified: miscellaneous aspects influencing nucleotide modifications in tRNAs. IUBMB Life. 2019;71:1126–1140.
[5] Huber SM, Leonardi A, Dedon PC, et al. The versatile roles of the tRNA epitranscriptome during cellular responses to toxic exposures and environmental stress. Toxics. 2019;7(1):17.
[6] Sloan KE, Warda AS, Sharma S, et al. Tuning the ribosome: the influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. RNA Biol. 2017;14:1138–1152.
[7] Polikanov YS, Melnikov SV, Soll D, et al. Structural insights into the role of rRNA modifications in protein synthesis and ribosome assembly. Nat Struct Mol Biol. 2015;22:342–344.
[8] Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, et al. Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. Nucleic Acids Res. 2018;46:9289–9298.
[9] Bachellerie JP, Cavaille J, Huttenhofer A. The expanding snoRNA world. Biochimie. 2002;84:775–790.
[10] Sharma S, Yang J, Watzinger P, et al. Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. Nucleic Acids Res. 2013;41:9062–9076.
[11] Peifer C, Sharma S, Watzinger P, et al. Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m1A 645 base modification of 25S rRNA. Nucleic Acids Res. 2013;41:1151–1163.
[12] van Tran N, Ernst FGM, Hawley BR, et al. The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. Nucleic Acids Res. 2019;47:7719–7733.
[13] Sharma S, Lafontaine DLJ. 'View from a bridge': a new perspective on eukaryotic rRNA base modification. Trends Biochem Sci. 2015;40:560–575.
[14] Popis MC, Blanco S, Frye M. Posttranscriptional methylation of transfer and ribosomal RNA in stress response pathways, cell differentiation, and cancer. Curr Opin Oncol. 2016;28:65–71.
[15] Barbieri I, Kouzarides T. Role of RNA modifications in cancer. Nat Rev Cancer. 2020;20:303–322.
[16] Yanas A, Liu KF. RNA modifications and the link to human disease. Methods Enzymol. 2019;626:133–146.
[17] Belin S, Beghin A, Solano-Gonzalez E, et al. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. PLoS One. 2009;4:e7147.
[18] Jack K, Bellodi C, Landry DM, et al. rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. Mol Cell. 2011;44:660–666.
[19] Babaian A, Rothe K, Girodat D, et al. Loss of m(1)acp(3)Psi ribosomal RNA modification is a major feature of cancer. Cell Rep. 2020;31:107611.
[20] Itoh K, Mizugaki M, Ishida N. Preparation of a monoclonal antibody specific for 1-methyladenosine and its application for the detection of elevated levels of 1-methyladenosine in urines from cancer patients. Jpn J Cancer Res. 1988;79:1130–1138.
[21] Krogh NA, F, Côme C, Fibiger Munch-Petersen H, et al. Profiling of ribose methylation in ribosomal RNA from diffuse larger B-cell lyphoma patients for evaluation of ribosomes as drug targets. NAR Cancer. 2020;2:1–11.
[22] Marcel J, Marchand V, Natchiar KS, et al. Ribosome RNA 2′ O-methylation as a novel layer of inter-tumor heterogneity in breast cancer. NAR Cancer. 2020;2:1–12.
[23] Dong C, Niu L, Song W, et al. tRNA modification profiles of the fast-proliferating cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016;476:340–345.
[24] Vold BS, Kraus LE, Rimer VG, et al. Use of a monoclonal antibody to detect elevated levels of a modified nucleoside, N-[9-(beta-D-ribofuranosyl)purin-6-ylcarbamoyl]-L-threonine, in the urine of breast cancer patients. Cancer Res. 1986;46:3164–3167.
[25] Kato T, Daigo Y, Hayama S, et al. A novel human tRNA-dihydrouridine synthase involved in pulmonary carcinogenesis. Cancer Res. 2005;65:5638–5646.
[26] Endres L, Dedon PC, Begley TJ. Codon-biased translation can be regulated by wobble-base tRNA modification systems during cellular stress responses. RNA Biol. 2015;12:603–614.
[27] Chan CT, Dyavaiah M, DeMott MS, et al. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. PLoS Genet. 2010;6:e1001247.
[28] Rose RE, Pazos MA 2nd, Curcio MJ, et al. Global epitranscriptomics profiling of RNA post-transcriptional modifications as an effective tool for investigating the epitranscriptomics of stress response. Mol Cell Proteomics. 2016;15:932–944.
[29] Dedon PC, Begley TJ. A system of RNA modifications and biased codon use controls cellular stress response at the level of translation. Chem Res Toxicol. 2014;27:330–337.
[30] Chan CT, Deng W, Li F, et al. Highly predictive reprogramming of tRNA modifications is linked to selective expression of codon-biased genes. Chem Res Toxicol. 2015;28:978–988.

[31] Wang Y, Pang C, Li X, et al. Identification of tRNA nucleoside modification genes critical for stress response and development in rice and Arabidopsis. BMC Plant Biol. 2017;17:261.
[32] Torrent M, Chalancon G, de Groot NS, et al. Cells alter their tRNA abundance to selectively regulate protein synthesis during stress conditions. Sci Signal. 2018;11(546):eaat6409
[33] Su D, Chan CT, Gu C, et al. Quantitative analysis of ribonucleoside modifications in tRNA by HPLC-coupled mass spectrometry. Nat Protoc. 2014;9:828–841.
[34] Alings F, Sarin LP, Fufezan C, et al. An evolutionary approach uncovers a diverse response of tRNA 2-thiolation to elevated temperatures in yeast. RNA. 2015;21:202–212.
[35] Huang HY, Hopper AK. Multiple layers of stress-induced regulation in tRNA biology. Life (Basel). 2016;6(2):16.
[36] Gu C, Begley TJ, Dedon PC. tRNA modifications regulate translation during cellular stress. FEBS Lett. 2014;588:4287–4296.
[37] Deng W, Babu IR, Su D, et al. Trm9-catalyzed tRNA modifications regulate global protein expression by codon-biased translation. PLoS Genet. 2015;11:e1005706.
[38] Monaco PL, Marcel V, Diaz JJ, et al. 2′-O-methylation of ribosomal RNA: towards an epitranscriptomic control of translation? Biomolecules. Biomolecules. 2018;8(4):106.
[39] Erales J, Marchand V, Panthu B, et al. Evidence for rRNA 2′-O-methylation plasticity: control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114:12934–12939.
[40] Penzo M, Rocchi L, Brugiere S, et al. Human ribosomes from cells with reduced dyskerin levels are intrinsically altered in translation. FASEB J. 2015;29:3472–3482.
[41] Michaud M, Cognat V, Duchene AM, et al. A global picture of tRNA genes in plant genomes. Plant J. 2011;66:80–93.
[42] Nedialkova DD, Leidel SA. Optimization of codon translation rates via tRNA modifications maintains proteome integrity. Cell. 2015;161:1606–1618.
[43] Carpentier MC, Deragon JM, Jean V, et al. Monitoring of XRN4 targets reveals the importance of cotranslational decay during arabidopsis development. Plant Physiol. 2020;184:1251–1262.
[44] Karlsborn T, Tukenmez H, Mahmud AK, et al. Elongator, a conserved complex required for wobble uridine modifications in eukaryotes. RNA Biol. 2014;11:1519–1528.
[45] Kalhor HR, Clarke S. Novel methyltransferase for modified uridine residues at the wobble position of tRNA. Mol Cell Biol. 2003;23:9283–9292.
[46] Dewez M, Bauer F, Dieu M, et al. The conserved Wobble uridine tRNA thiolase Ctu1-Ctu2 is required to maintain genome integrity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:5459–5464.
[47] Abbassi NE, Biela A, Glatt S, et al. How elongator acetylates tRNA bases. Int J Mol Sci. 2020;21.
[48] Leihne V, Kirpekar F, Vagbo CB, et al. Roles of Trm9- and ALKBH8-like proteins in the formation of modified wobble uridines in Arabidopsis tRNA. Nucleic Acids Res. 2011;39:7688–7701.
[49] Walker J, Kwon SY, Badenhorst P, et al. Role of elongator subunit Elp3 in Drosophila melanogaster larval development and immunity. Genetics. 2011;187:1067–1075.
[50] Chen YT, Hims MM, Shetty RS, et al. Loss of mouse Ikbkap, a subunit of elongator, leads to transcriptional deficits and embryonic lethality that can be rescued by human IKBKAP. Mol Cell Biol. 2009;29:736–744.
[51] Mehlgarten C, Jablonowski D, Wrackmeyer U, et al. Elongator function in tRNA wobble uridine modification is conserved between yeast and plants. Mol Microbiol. 2010;76:1082–1094.
[52] Chen C, Tuck S, Bystrom AS. Defects in tRNA modification associated with neurological and developmental dysfunctions in Caenorhabditis elegans elongator mutants. PLoS Genet. 2009;5:e1000561.
[53] Silva KJP, Brunings AM, Pereira JA, et al. The Arabidopsis ELP3/ELO3 and ELP4/ELO1 genes enhance disease resistance in Fragaria vesca L. BMC Plant Biol. 2017;17:230.
[54] Pereira JA, Yu F, Zhang Y, et al. The arabidopsis elongator subunit ELP3 and ELP4 confer resistance to bacterial speck in tomato. Front Plant Sci. 2018;9:1066.
[55] Nakai Y, Horiguchi G, Iwabuchi K, et al. tRNA wobble modification affects leaf cell development in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. 2019;60:2026–2039.
[56] John F, Philipp M, Leiber RM, et al. Ubiquitin-related modifiers of Arabidopsis thaliana influence root development. PLoS One. 2014;9:e86862.
[57] Pedrioli PG, Leidel S, Hofmann K. Urm1 at the crossroad of modifications. 'protein modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO Rep. 2008;9:1196–1202.
[58] Xu Y, Zhang L, Ou S, et al. Natural variations of SLG1 confer high-temperature tolerance in indica rice. Nat Commun. 2020;11:5441.
[59] Philipp M, John F, Ringli C. The cytosolic thiouridylase CTU2 of Arabidopsis thaliana is essential for posttranscriptional thiolation of tRNAs and influences root development. BMC Plant Biol. 2014;14:109.
[60] Leiber RM, John F, Verhertbruggen Y, et al. The TOR pathway modulates the structure of cell walls in Arabidopsis. Plant Cell. 2010;22:1898–1908.
[61] Tyagi K, Pedrioli PG. Protein degradation and dynamic tRNA thiolation fine-tune translation at elevated temperatures. Nucleic Acids Res. 2015;43:4701–4712.
[62] Fernandez-Vazquez J, Vargas-Perez I, Sanso M, et al. Modification of tRNA(Lys) UUU by elongator is essential for efficient translation of stress mRNAs. PLoS Genet. 2013;9:e1003647.
[63] Laxman S, Sutter BM, Wu X, et al. Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. Cell. 2013;154:416–429.
[64] Goehring AS, Rivers DM, Sprague GF Jr. Attachment of the ubiquitin-related protein Urm1p to the antioxidant protein Ahp1p. Eukaryot Cell. 2003;2:930–936.
[65] Chan TF, Carvalho J, Riles L, et al. A chemical genomics approach toward understanding the global functions of the target of rapamycin protein (TOR). Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:13227–13232.
[66] Otsubo Y, Kamada Y, Yamashita A. Novel links between TORC1 and traditional non-coding RNA, tRNA. Genes (Basel). 2020;11(9):956
[67] Yousef GM, Borgono CA, Michael IP, et al. Molecular cloning of a new gene which is differentially expressed in breast and prostate cancers. Tumour Biol. 2004;25:122–133.
[68] Simos G, Tekotte H, Grosjean H, et al. Nuclear pore proteins are involved in the biogenesis of functional tRNA. EMBO J. 1996;15:2270–2284.
[69] Khonsari B, Klassen R. Impact of Pus1 pseudouridine synthase on specific decoding events in Saccharomyces cerevisiae. Biomolecules. 2020;10(5):729
[70] Davis DR. Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. Nucleic Acids Res. 1995;23:5020–5026.
[71] Hayashi S, Mori S, Suzuki T, et al. Impact of intron removal from tRNA genes on Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. 2019;47:5936–5949.
[72] Schwartz S, Bernstein DA, Mumbach MR, et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. Cell. 2014;159:148–162.
[73] Fergus C, Barnes D, Alqasem MA, et al. The queuine micronutrient: charting a course from microbe to man. Nutrients. 2015;7:2897–2929.
[74] Boland C, Hayes P, Santa-Maria I, et al. Queuosine formation in eukaryotic tRNA occurs via a mitochondria-localized heteromeric transglycosylase. J Biol Chem. 2009;284:18218–18227.
[75] Chen P, Jager G, Zheng B. Transfer RNA modifications and genes for modifying enzymes in Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biol. 2010;10:201.
[76] Hayes P, Fergus C, Ghanim M, et al. Queuine micronutrient deficiency promotes warburg metabolism and reversal of the mitochondrial ATP synthase in hela cells. Nutrients. 2020;12(3):871

[77] Rakovich T, Boland C, Bernstein I, et al. Queuosine deficiency in eukaryotes compromises tyrosine production through increased tetrahydrobiopterin oxidation. J Biol Chem. 2011;286:19354–19363.
[78] Pathak C, Jaiswal YK, Vinayak M. Queuine promotes antioxidant defence system by activating cellular antioxidant enzyme activities in cancer. Biosci Rep. 2008;28:73–81.
[79] Pathak C, Jaiswal YK, Vinayak M. Queuine mediated inhibition in phosphorylation of tyrosine phosphoproteins in cancer. Mol Biol Rep. 2008;35:369–374.
[80] Beier H, Barciszewska M, Sickinger HD. The molecular basis for the differential translation of TMV RNA in tobacco protoplasts and wheat germ extracts. EMBO J. 1984;3:1091–1096.
[81] Muller M, Legrand C, Tuorto F, et al. Queuine links translational control in eukaryotes to a micronutrient from bacteria. Nucleic Acids Res. 2019;47:3711–3727.
[82] Zaborske JM, DuMont VL, Wallace EW, et al. A nutrient-driven tRNA modification alters translational fidelity and genome-wide protein coding across an animal genus. PLoS Biol. 2014;12: e1002015.
[83] Tuorto F, Legrand C, Cirzi C, et al. Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. EMBO J. 2018;37:e99777.
[84] Muller M, Hartmann M, Schuster I, et al. Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine. Nucleic Acids Res. 2015;43:10952–10962.
[85] Tuorto F, Herbst F, Alerasool N, et al. The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. EMBO J. 2015;34:2350–2362.
[86] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. Genes Dev. 2010;24:1590–1595.
[87] Chan CT, Pang YL, Deng W, et al. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. Nat Commun. 2012;3:937.
[88] Navarro IC, Tuorto F, Jordan D, et al. Translational adaptation to heat stress is mediated by RNA 5-methylcytosine in Caenorhabditis elegans. EMBO J (2021);40:e105496.
[89] Crick FH. Codon–anticodon pairing: the wobble hypothesis. J Mol Biol. 1966;19:548–555.
[90] Torres AG, Pineyro D, Rodriguez-Escriba M, et al. Inosine modifications in human tRNAs are incorporated at the precursor tRNA level. Nucleic Acids Res. 2015;43:5145–5157.
[91] Delannoy E, Le Ret M, Faivre-Nitschke E, et al. Arabidopsis tRNA adenosine deaminase arginine edits the wobble nucleotide of chloroplast tRNAArg(ACG) and is essential for efficient chloroplast translation. Plant Cell. 2009;21:2058–2071.
[92] Schweizer U, Bohleber S, Fradejas-Villar N. The modified base isopentenyladenosine and its derivatives in tRNA. RNA Biol. 2017;14:1197–1208.
[93] Rojas-Benitez D, Eggers C, Glavic A. Modulation of the proteostasis machinery to overcome stress caused by diminished levels of t6A-modified tRNAs in drosophila. Biomolecules : 2017; 7(1): 25
[94] Thiaville PC, Iwata-Reuyl D, de Crecy-Lagard V. Diversity of the biosynthesis pathway for threonylcarbamoyladenosine (t(6)A), a universal modification of tRNA. RNA Biol. 2014;11:1529–1539.
[95] Lin H, Miyauchi K, Harada T, et al. CO2-sensitive tRNA modification associated with human mitochondrial disease. Nat Commun. 2018;9:1875.
[96] Rojas-Benitez D, Thiaville PC, de Crecy-Lagard V, et al. The levels of a universally conserved tRNA modification regulate cell growth. J Biol Chem. 2015;290:18699–18707.
[97] Laten H, Gorman J, Bock RM. Isopentenyladenosine deficient tRNA from an antisuppressor mutant of Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. 1978;5:4329–4342.
[98] Lamichhane TN, Arimbasseri AG, Rijal K, et al. Lack of tRNA-i6A modification causes mitochondrial-like metabolic deficiency in S. pombe by limiting activity of cytosolic tRNATyr, not mito-tRNA. RNA. 2016;22:583–596.
[99] Lamichhane TN, Blewett NH, Crawford AK, et al. Lack of tRNA modification isopentenyl-A37 alters mRNA decoding and causes metabolic deficiencies in fission yeast. Mol Cell Biol. 2013;33:2918–2929.
[100] Lemieux J, Lakowski B, Webb A, et al. Regulation of physiological rates in Caenorhabditis elegans by a tRNA-modifying enzyme in the mitochondria. Genetics. 2001;159:147–157.
[101] Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, et al. Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:16598–16603.
[102] Schafer M, Brutting C, Meza-Canales ID, et al. The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. J Exp Bot. 2015;66:4873–4884.
[103] Liu Y, Zhang M, Meng Z, et al. Research progress on the roles of cytokinin in plant response to stress. Int J Mol Sci. 2020; 21 (18):6574.
[104] Hai NN, Chuong NN, Tu NHC, et al. Role and regulation of cytokinins in plant response to drought stress. Plants (Basel) 2020; 9(4):422.
[105] Helm M, Alfonzo JD. Posttranscriptional RNA MODIFICATIONS: playing metabolic games in a cell's chemical Legoland. Chem Biol. 2014;21:174–185.
[106] Ohira T, Suzuki T. Retrograde nuclear import of tRNA precursors is required for modified base biogenesis in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:10502–10507.
[107] Urbonavicius JD L, Armengaud J, Grosjean H. Deciphering the complex enzymatic pathway for biosynthesis of wyosine derivates in anticodon of tRNAPhe. In: Grosjean H, editor. DNA and RNA modification enzymes: structure, mechanism, function and evolution: landes Bioscience, Austin, TX. 2009. p. 423–435.
[108] Hienzsch A, Deiml C, Reiter V, et al. Total synthesis of the hypermodified RNA bases wybutosine and hydroxywybutosine and their quantification together with other modified RNA bases in plant materials. Chemistry. 2013;19:4244–4248.
[109] Carlson BA, Lee BJ, Hatfield DL. Ribosomal frameshifting in response to hypomodified tRNAs in Xenopus oocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2008;375:86–90.
[110] Waas WF, Druzina Z, Hanan M, et al. Role of a tRNA base modification and its precursors in frameshifting in eukaryotes. J Biol Chem. 2007;282:26026–26034.
[111] Zhou W, Karcher D, Bock R. Importance of adenosine-to-inosine editing adjacent to the anticodon in an Arabidopsis alanine tRNA under environmental stress. Nucleic Acids Res. 2013;41:3362–3372.
[112] Guo Q, Ng PQ, Shi S, et al. Arabidopsis TRM5 encodes a nuclear-localised bifunctional tRNA guanine and inosine-N1-methyltransferase that is important for growth. PLoS One. 2019;14:e0225064.
[113] Jin X, Lv Z, Gao J, et al. AtTrm5a catalyses 1-methylguanosine and 1-methylinosine formation on tRNAs and is important for vegetative and reproductive growth in Arabidopsis thaliana. Nucleic Acids Res. 2019;47:883–898.
[114] Patil A, Dyavaiah M, Joseph F, et al. Increased tRNA modification and gene-specific codon usage regulate cell cycle progression during the DNA damage response. Cell Cycle. 2012;11:3656–3665.
[115] Ignatova VV, Kaiser S, Ho JSY, et al. METTL6 is a tRNA m(3)C methyltransferase that regulates pluripotency and tumor cell growth. Sci Adv. 2020;6:eaaz4551.
[116] Noma A, Yi S, Katoh T, et al. Actin-binding protein ABP140 is a methyltransferase for 3-methylcytidine at position 32 of tRNAs in Saccharomyces cerevisiae. RNA. 2011;17:1111–1119.
[117] Xu L, Liu X, Sheng N, et al. Three distinct 3-methylcytidine (m(3)C) methyltransferases modify tRNA and mRNA in mice and humans. J Biol Chem. 2017;292:14695–14703.
[118] Arimbasseri AG, Iben J, Wei FY, et al. Evolving specificity of tRNA 3-methyl-cytidine-32 (m3C32) modification: a subset of tRNAsSer requires N6-isopentenylation of A37. RNA. 2016;22:1400–1410.
[119] Rubio MA, Gaston KW, McKenney KM, et al. Editing and methylation at a single site by functionally interdependent activities. Nature. 2017;542:494–497.

[120] Tang J, Jia P, Xin P, et al. The Arabidopsis TRM61/TRM6 complex is a bona fide tRNA N1-methyladenosine methyltransferase. J Exp Bot. 2020;71:3024–3036.
[121] Zhang C, Jia G. Reversible RNA modification N(1)-methyladenosine (m(1)A) in mRNA and tRNA. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2018;16:155–161.
[122] Liu F, Clark W, Luo G, et al. ALKBH1-mediated tRNA demethylation regulates translation. Cell. 2016;167:1897.
[123] Ontiveros RJ, Shen H, Stoute J, et al. Coordination of mRNA and tRNA methylations by TRMT10A. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117:7782–7791.
[124] Vilardo E, Amman F, Toth U, et al. Functional characterization of the human tRNA methyltransferases TRMT10A and TRMT10B. Nucleic Acids Res. 2020;48:6157–6169.
[125] Lin S, Liu Q, Lelyveld VS, et al. Mettl1/Wdr4-mediated m(7)G tRNA methylome is required for normal mRNA translation and embryonic stem cell self-renewal and differentiation. Mol Cell. 2018;71:244–55 e5.
[126] Alexandrov A, Martzen MR, Phizicky EM. Two proteins that form a complex are required for 7-methylguanosine modification of yeast tRNA. RNA. 2002;8:1253–1266.
[127] Dalluge JJ, Hamamoto T, Horikoshi K, et al. Posttranscriptional modification of tRNA in psychrophilic bacteria. J Bacteriol. 1997;179:1918–1923.
[128] Arnez JG, Steitz TA. Crystal structure of unmodified tRNA(Gln) complexed with glutaminyl-tRNA synthetase and ATP suggests a possible role for pseudo-uridines in stabilization of RNA structure. Biochemistry. 1994;33:7560–7567.
[129] Penzo M, Guerrieri AN, Zacchini F, et al. RNA pseudouridylation in physiology and medicine: for better and for worse. Genes (Basel). 2017; 8(11):301.
[130] Megel C, Morelle G, Lalande S, et al. Surveillance and cleavage of eukaryotic tRNAs. Int J Mol Sci. 2015;16:1873–1893.
[131] Wilusz JE. Controlling translation via modulation of tRNA levels. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2015;6:453–470.
[132] Alexandrov A, Chernyakov I, Gu W, et al. Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications. Mol Cell. 2006;21:87–96.
[133] Chernyakov I, Whipple JM, Kotelawala L, et al. Degradation of several hypomodified mature tRNA species in Saccharomyces cerevisiae is mediated by Met22 and the 5′-3′ exonucleases Rat1 and Xrn1. Genes Dev. 2008;22:1369–1380.
[134] Lyons SM, Fay MM, Ivanov P. The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage. FEBS Lett. 2018;592:2828–2844.
[135] Anderson J, Phan L, Cuesta R, et al. The essential Gcd10p-Gcd14p nuclear complex is required for 1-methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA. Genes Dev. 1998;12:3650–3662.
[136] Ivanov P, Emara MM, Villen J, et al. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. Mol Cell. 2011;43:613–623.
[137] Gebetsberger J, Wyss L, Mleczko AM, et al. A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress. RNA Biol. 2017;14:1364–1373.
[138] Wang Q, Lee I, Ren J, et al. Identification and functional characterization of tRNA-derived RNA fragments (tRFs) in respiratory syncytial virus infection. Mol Ther. 2013;21:368–379.
[139] Martinez G, Choudury SG, Slotkin RK. tRNA-derived small RNAs target transposable element transcripts. Nucleic Acids Res. 2017;45:5142–5152.
[140] Fu H, Feng J, Liu Q, et al. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. FEBS Lett. 2009;583:437–442.
[141] Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, et al. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. J Cell Biol. 2009;185:35–42.
[142] Donovan J, Rath S, Kolet-Mandrikov D, et al. RNase L-driven arrest of protein synthesis in the dsRNA response without degradation of translation machinery. RNA. 2017;23:1660–1671.
[143] Lu J, Esberg A, Huang B, et al. Kluyveromyces lactis gamma-toxin, a ribonuclease that recognizes the anticodon stem loop of tRNA. Nucleic Acids Res. 2008;36:1072–1080.
[144] Thompson DM, Parker R. The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol. 2009;185:43–50.
[145] Megel C, Hummel G, Lalande S, et al. Plant RNases T2, but not Dicer-like proteins, are major players of tRNA-derived fragments biogenesis. Nucleic Acids Res. 2019;47:941–952.
[146] Guzzi N, Ciesla M, Ngoc PCT, et al. Pseudouridylation of tRNA-derived fragments steers translational control in stem cells. Cell. 2018;173:1204–16 e26.
[147] Guo H. Specialized ribosomes and the control of translation. Biochem Soc Trans. 2018;46:855–869.
[148] Ferretti MB, Karbstein K. Does functional specialization of ribosomes really exist? RNA. 2019;25:521–538.
[149] Schosserer M, Minois N, Angerer TB, et al. Methylation of ribosomal RNA by NSUN5 is a conserved mechanism modulating organismal lifespan. Nat Commun. 2015;6:6158.
[150] Sharma S, Marchand V, Motorin Y, et al. Identification of sites of 2′-O-methylation vulnerability in human ribosomal RNAs by systematic mapping. Sci Rep. 2017;7:11490.
[151] Mei YP, Liao JP, Shen J, et al. Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. Oncogene. 2012;31:2794–2804.
[152] Yoshida K, Toden S, Weng W, et al. SNORA21 - an oncogenic small nucleolar RNA, with a prognostic biomarker potential in human colorectal cancer. EBioMedicine. 2017;22:68–77.
[153] Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, et al. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. Science. 2006;312:902–906.
[154] Rocchi L, Pacilli A, Sethi R, et al. Dyskerin depletion increases VEGF mRNA internal ribosome entry site-mediated translation. Nucleic Acids Res. 2013;41:8308–8318.
[155] Weingarten-Gabbay S, Elias-Kirma S, Nir R, et al. Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. Science 2016; 351 (6270):aad4939.
[156] Liang XH, Liu Q, Fournier MJ. Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. RNA. 2009;15:1716–1728.
[157] Jindal S, Ghosh A, Ismail A, et al. Role of the uS9/yS16 C-terminal tail in translation initiation and elongation in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. 2019;47:806–823.
[158] Jiang Z, Li S, Han MJ, et al. High expression of NSUN5 promotes cell proliferation via cell cycle regulation in colorectal cancer. Am J Transl Res. 2020;12:3858–3870.
[159] Janin M, Ortiz-Barahona V, de Moura MC, et al. Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program. Acta Neuropathol. 2019;138:1053–1074.
[160] Heissenberger C, Liendl L, Nagelreiter F, et al. Loss of the ribosomal RNA methyltransferase NSUN5 impairs global protein synthesis and normal growth. Nucleic Acids Res. 2019;47:11807–11825.
[161] Wang H, Wang L, Wang Z, et al. The nucleolar protein NOP2 is required for nucleolar maturation and ribosome biogenesis during preimplantation development in mammals. FASEB J. 2020;34:2715–2729.
[162] Hong B, Brockenbrough JS, Wu P, et al. Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. Mol Cell Biol. 1997;17:378–388.
[163] Bourgeois G, Ney M, Gaspar I, et al. Eukaryotic rRNA modification by yeast 5-methylcytosine-methyltransferases and human proliferation-associated antigen p120. PLoS One. 2015;10: e0133321.
[164] Heissenberger C, Rollins JA, Krammer TL, et al. The ribosomal RNA m(5)C methyltransferase NSUN-1 modulates healthspan and oogenesis in Caenorhabditis elegans. eLife 2020;9:e56205.
[165] Rong B, Zhang Q, Wan J, et al. Ribosome 18S m(6)A methyltransferase METTL5 promotes translation initiation and breast cancer cell growth. Cell Rep. 2020;33:108544.
[166] Liberman N, O'Brown ZK, Earl AS, et al. N6-adenosine methylation of ribosomal RNA affects lipid oxidation and stress resistance. Sci Adv. 2020;6:eaaz4370.

[167] Ma H, Wang X, Cai J, et al. N(6-)Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation. Nat Chem Biol. 2019;15:88–94.
[168] Ren W, Lu J, Huang M, et al. Structure and regulation of ZCCHC4 in m(6)A-methylation of 28S rRNA. Nat Commun. 2019;10:5042.
[169] Sharma S, Hartmann JD, Watzinger P, et al. A single N(1)-methyladenosine on the large ribosomal subunit rRNA impacts locally its structure and the translation of key metabolic enzymes. Sci Rep. 2018;8:11904.
[170] Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, et al. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. J Cell Sci. 2016;129:2382–2393.
[171] Yokoyama W, Hirota K, Wan H, et al. rRNA adenine methylation requires T07A9.8 gene as rram-1 in Caenorhabditis elegans. J Biochem. 2018;163:465–474.
[172] Baxter M, Voronkov M, Poolman T, et al. Cardiac mitochondrial function depends on BUD23 mediated ribosome programming. eLife 2020;9:e50705.
[173] White J, Li Z, Sardana R, et al. Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. Mol Cell Biol. 2008;28:3151–3161.
[174] Haag S, Kretschmer J, Bohnsack MT. WBSCR22/Merm1 is required for late nuclear pre-ribosomal RNA processing and mediates N7-methylation of G1639 in human 18S rRNA. RNA. 2015;21:180–187.

4.3 - Impact du stress thermique sur les ARNt

La biologie des ARNt est très complexe : leur synthèse nécessite beaucoup d'étapes, leurs structures varient, leurs modifications sont diverses et leurs rôles sont capitaux pour la traduction. De plus, comme le présente l'article de revue ci-dessus, ces phénomènes peuvent être différentiellement régulés en réponse à des stress. À travers cette partie, je décrirai plus précisément quels sont les différents impacts du ST sur les ARN de transfert.

Au sein de la littérature, les ARNt ont été montré comme sensibles à la dégradation en réponse au ST, conduisant à la formation de fragments d'ARNt impliqués dans des mécanismes de régulation de l'expression génique [289]. Ce sujet a été décrit dans la revue présentée précédemment dans ce rapport et par conséquent pour plus d'informations sur ce sujet j'invite le lecteur ou la lectrice à se référer à la revue (présentée ci-dessus).

4.3.1 – L'impact du stress thermique sur l'homéostasie des ARNt

Les techniques de biologie moléculaire qui permettent de quantifier les taux d'ARNt se sont d'abord basées sur l'utilisation de northern-blot couplés à des sondes spécifiques pour chaque ARNt. Une étude qui se base sur ce type d'approche a permis la quantification de cinq ARNt en réponse à un ST chez *Saccharomyces cerevisiae* : $ARNt_i^{met}$, $ARNt^{met}$, $ARNt^{Lys}$, $ARNt^{Leu}$ et $ARNt^{Pro}$. Les résultats montrent que seul l'$ARNt_i^{met}$ présente une baisse significative de son taux d'enrichissement. Les auteurs proposent alors que les défauts d'initiation de la traduction observés en réponse au stress puissent être dépendants de la chute du taux d'$ARNt_i^{met}$ [290]. Mais ces techniques de quantification sont limitées : il est très compliqué d'obtenir le comportement de l'ensemble des populations d'ARNt en réponse au ST en se basant sur ce type d'approches. Récemment, les nouvelles techniques de séquençage ont permis de surpasser ses limitations et quantifier les niveaux d'ARNt à l'équilibre :

Le tRNA structurome-seq, élaboré afin de caractériser la structure des ARNt, peut tirer avantage des données qu'il fournit pour quantifier les niveaux d'ARNt. Cette technique a montré chez *Escherichia coli*, que l'abondance globale des ARNt en réponse soit à un ST long

soit à un choc thermique, n'est que très peu impactée. En effet sur les 48 ARNt testés, seulement cinq sont sur surexprimés et quatre sont réprimés. De façon intéressante, les ARNt appauvris sont aussi impactés dans leur structure par le ST, ce qui permet de prédire leur dégradation [291].

Une autre technique de séquençage des petits ARN a montré des résultats similaires chez l'humain. En réponse au ST, les taux globaux d'ARNt cellulaires ne varient que très peu (46 isoaccepteurs testés). Et de façon très intéressante, l'abondance globale des ARNt associés aux polysomes n'est elle aussi que très peu impactée par le ST [292].

Récemment plusieurs laboratoires se sont tournés vers la technique nanopore qui permet à la fois de séquencer, détecter et positionner les modifications des ARNt. Une étude basée sur cette approche montre qu'en réponse à un ST, le taux global d'ARNt à l'équilibre n'est que très peu affecté d'un point de vue quantitatif : Lucas *et al.,* montrent qu'un seul isoaccepteur sur les 69 testés est significativement appauvri [272]. Les conclusions de ces différentes études indiquent que les taux d'ARNt cellulaires et polysomaux ne sont que très peu impactés par le ST, suggérant d'autres niveaux de régulation de ces molécules.

4.3.2 - Le stress thermique impacte la structure des ARNt

Dans la partie 4.2.2 nous avions discuté de l'importance de la structure des ARNt, pouvant réguler leur stabilité qui *in fine* impacte l'expression des gènes. Puisque la structure des ARNt est si importante pour leur biologie, la question de l'impact du stress thermique sur cette dernière est cruciale. Bien que de nombreuses études aient tenté de percer les mystères des structures des ARN, les ARNt ont longtemps résisté aux chercheurs. Cela est principalement dû à leur structure secondaire complexe ainsi qu'au fort taux de modifications de cette molécule. Mais récemment d'importantes avancées dans ce domaine d'étude ont permis l'obtention de données structurales de plus en plus précises, donnant naissance au terme « structurome » [293]. En adaptant cette nouvelle technique sur les ARNt (tRNA structure-seq), *Yamagami et al., ont montré* que le ST induit de nombreux changements de conformation sur les ARNt en réponse au ST [289]. Leur étude basée sur le modèle *Escherichia coli* indique que la boucle T - et en particulier la position 58 - est particulièrement sensible à l'élévation de température : l'interaction entre les bases U_{54} et A_{58} est perturbée. Le ST va aussi empêcher les interactions entre G_{19} et U_{54}, qui permettent le contact entre les boucles C et T. La perte de ces interactions induit des défauts de repliement et empêche l'ARNt de parvenir à la conformation en trèfle (Figure 31). Le tRNA structure-seq, permet de quantifier les taux d'ARNt présentant des défauts de repliement : en réponse au ST, ce sont environ 59% des $ARNt^{Ala}$-GGC qui présentent des défauts de repliement. Ainsi, faire varier les états structuraux pourrait être un moyen pour l'organisme de réguler ses populations d'ARNt fonctionnelles, sans avoir la nécessité d'en synthétiser de nouveaux [291].

En conclusion nous avons vu que le taux global d'ARNt n'est que très peu enrichi ou appauvri par le stress thermique. On peut supposer que la cellule ne choisit donc pas de dégrader massivement ses ARNt pour s'adapter mais de faire varier leurs caractéristiques, notamment en impactant leur structure ou leurs modifications. De nombreuses études ont pointé l'existence d'une modulation de certaines modifications de l'épitranscriptome des ARNt en réponse au ST. C'est dans ce contexte que s'insère le sujet de ma thèse : quel est l'impact du ST sur l'épitranscriptome d'Arabidopsis, et comment ces variations peuvent réguler la traduction ?

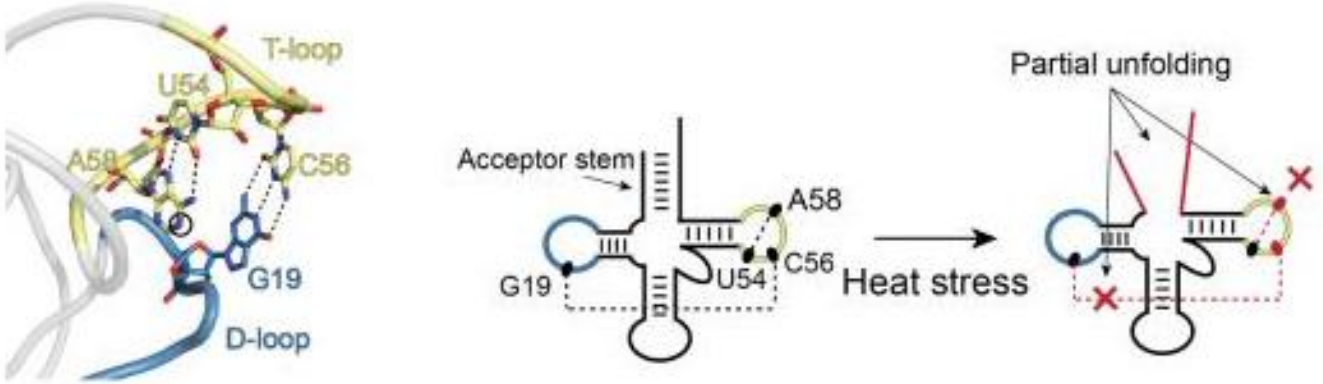


Figure 31. Le stress thermique impacte les niveaux de modifications impliquées dans le repliement des ARNt. *Lors d'un stress thermique, une perte de modification en position 54, 56 et 58 est observée. Cela conduit à des défauts d'interactions entre les boucles C et T et in fine à des défauts de repliement de la molécule d'ARNt. Adapté de "Genome-wide analysis of the in vivo tRNA structurome reveals RNA structural and modification dynamics under heat stress."* [289].

5 – Objectifs de la thèse

Au cours de cette introduction nous avons traité trois grands axes : la reprogrammation de l'expression des gènes en réponse au stress thermique, la traduction chez les organismes eucaryotes et les ARNt (en mettant l'accent sur leurs modifications chimiques). Ces trois axes ont pour but d'introduire les travaux de ma thèse qui peuvent se séparer en trois objectifs principaux :

Première partie : **Etude de la variabilité naturelle des modifications des ARNt chez Arabidopsis.** L'objectif de la première partie de ce cette thèse est d'étudier la variabilité naturelle des modifications des ARNt au sein de différentes populations d'Arabidopsis, sélectionnées sur la base de leurs habitats aux conditions contrastées. En utilisant une approche de LC-MS/MS, nous caractériserons les variations des profils épitranscriptomiques des ARNt entre les différentes populations. Nous chercherons à élucider les liens entre ces variations épitranscriptomiques et l' adaptation des plantes à leurs environnement respectifs. Considérant l'absence de données au sein de la littérature sur ce sujet, cette étude est considérée comme pilote et débutera avec l'étude d'un nombre limité de populations.

Deuxième partie : **Le rôle des mécanismes polysomaux dans l'acclimatation au stress thermique et l'effet mémoire chez Arabidopsis.**

La deuxième partie de cette thèse portera sur l'étude du rôle des mécanismes traductionnelles (tels que l'engagement polysomal des transcrits et la dégradation co-traductionnelle) dans l'acclimatation d'Arabidopsis au stress thermique et l'établissement de l'effet mémoire. Nous étudierons comment les variations de ces phénomènes contribuent à ces deux réponses. En combinant différentes approches NGS, nous chercherons à élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'adaptation des mécanismes polysomaux à des conditions de stress thermique.

Troisième partie : **Les modifications épitranscriptomiques des ARNt et leur impact sur la traduction en réponse au stress thermique.**

La dernière partie de cette thèse se concentrera sur les variations des modifications chimiques des ARNt induites par le stress thermique et leur impact sur la traduction chez Arabidopsis. Toujours en se basant sur des approches de LC-MS/MS, nous étudierons comment les modifications des ARNt varient au cours d'un stress thermique. En combinant ces données à celles obtenues dans la deuxième partie, nous proposerons un modèle permettant d'explorer comment la reprogrammation de l'épitranscriptome permettrait de réguler la traduction afin de s'acclimater lors d'un stress thermique. De plus nous posons dans cette partie la question de l'implication des modification chimiques des ARNt dans l'effet mémoire chez Arabidopsis.

CHAPITRE 2 - Résultats

1 - Variabilité épitranscriptomique naturelle des ARNt

1.1 - Contexte et objectif

La diversité naturelle est omniprésente en biologie. C'est un élément essentiel à l'évolution selon la théorie de Darwin [294]. On peut la trouver à l'échelle de clades, d'espèces, de populations, d'individus, de tissus, de cellules et même d'organites. Il est courant d'utiliser des données génétiques pour évaluer la diversité entre espèces, populations et individus. En effet, l'utilisation de polymorphismes de nucléotides simples (SNP) a été largement privilégiée pour construire les arbres du vivant et évaluer la diversité évolutive entre espèces. Mais de nouvelles découvertes ont montré que la diversité peut être présente à d'autres niveaux moléculaires tels que l'épigénétique, et plus récemment l'épitranscriptomique.

Aujourd'hui, la plupart des études d'épitranscriptomique se concentrent sur des nombres restreints de modifications et en grande majorité chez la levure et l'Homme, principalement parce qu'elles ont été associées à de graves pathologies telles que les cancers. Ainsi, la diversité épitranscriptomique décrite dans la littérature actuelle est majoritairement celle appartenant à ces espèces. Au cours de ce projet, nous proposons de tirer avantage de la diversité génétique connue d'Arabidopsis *thaliana* (projet 1001 génomes, https://1001genomes.org/), afin de faire d'Arabidopsis un modèle prometteur pour étudier la diversité épitranscriptomique naturelle pouvant exister au sein d'une espèce. Notre objectif est de caractériser les épitranscriptomes de différents écotypes d'Arabidopsis et de déterminer dans quelle mesure le fond génétique (lui-même sous pression de l'environnement) peut influencer les épitranscriptomes de cinq écotypes aux conditions environnementales éloignées.

Une des forces de notre étude repose sur le large panel de modifications ciblées. Au total 25 modifications seront étudiées et quantifiées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), au sein de quatre populations d'ARN : ARNtotaux, ARN

messagers (ARNm), ARN ribosomiques (ARNr) et ARN de transfert (ARNt). En utilisant la LC-MS/MS, nous fournissons pour la première fois un instantané de la variabilité épitranscriptomique naturelle présente entre cinq écotypes d'une même espèce végétale. Enfin, de la même manière que des études évaluent la diversité entre différents écotypes sur des bases génétiques, nous utiliserons ce type d'approche en se basant sur nos données épitranscriptomiques (Figure 32).

Cette étude représente un projet secondaire au sein de ma thèse, et il est important de garder à l'esprit son caractère « pilote » : en effet l'absence de données dans la littérature et le faible nombre de populations étudiées (n = 5) ne permettent pas de réaliser une étude à l'échelle de l'espèce. Néanmoins comme nous le verrons, les résultats sont très encourageants et pourraient conduire à l'approfondissement de la problématique via une seconde étude plus poussée.

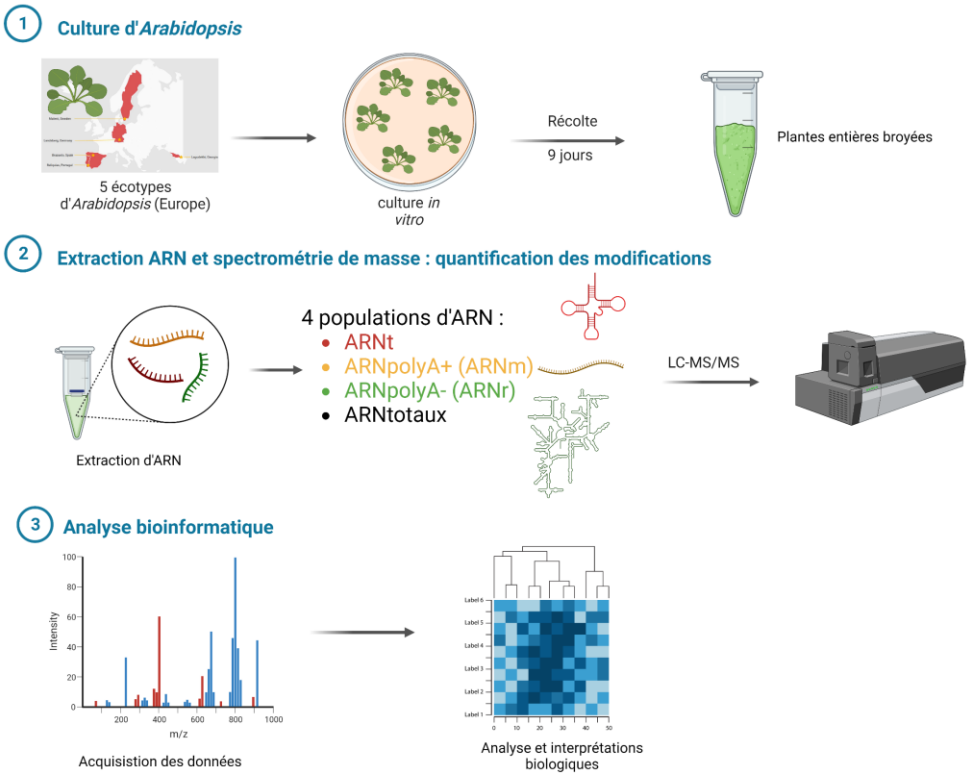


Figure 32. *Schéma simplifié décrivant l'approche choisie pour étudier la variabilité épitranscriptomique naturelle. Rapidement, cinq écotypes d'Arabidopsis provenant d'environnements contrastés sont cultivés en culture in vitro et récoltés après neufs jours. Pour chaque écotype, quatre populations d'ARN sont purifiées (ARNt, ARNr, ARNm, ARNtotaux) et leurs modifications chimiques sont analysées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Des analyses bio-informatiques sont ensuite réalisées afin d'en tirer des conclusions biologiques.*

1.2 - Présentation des cinq écotypes naturels d'Arabidopsis

Afin de mesurer la variabilité naturelle au sein de l'espèce Arabidopsis, nous avons sélectionné cinq écotypes. Ce choix s'est basé principalement sur un critère : leurs habitats naturels possèdent des conditions environnementales très contrastées. Ces cinq écotypes sont répartis à travers l'Europe, provenant d'Allemagne (Col-0), du Portugal (Rei-0), d'Espagne (Bra-0), de Géorgie (Lerik-1.3) et de Suède (T1110) (Figure 33). Les données météorologiques associées à leurs habitats (températures, pourcentage d'humidité, précipitation et ensoleillement) sont présentées dans le Tableau Supplémentaire S1.

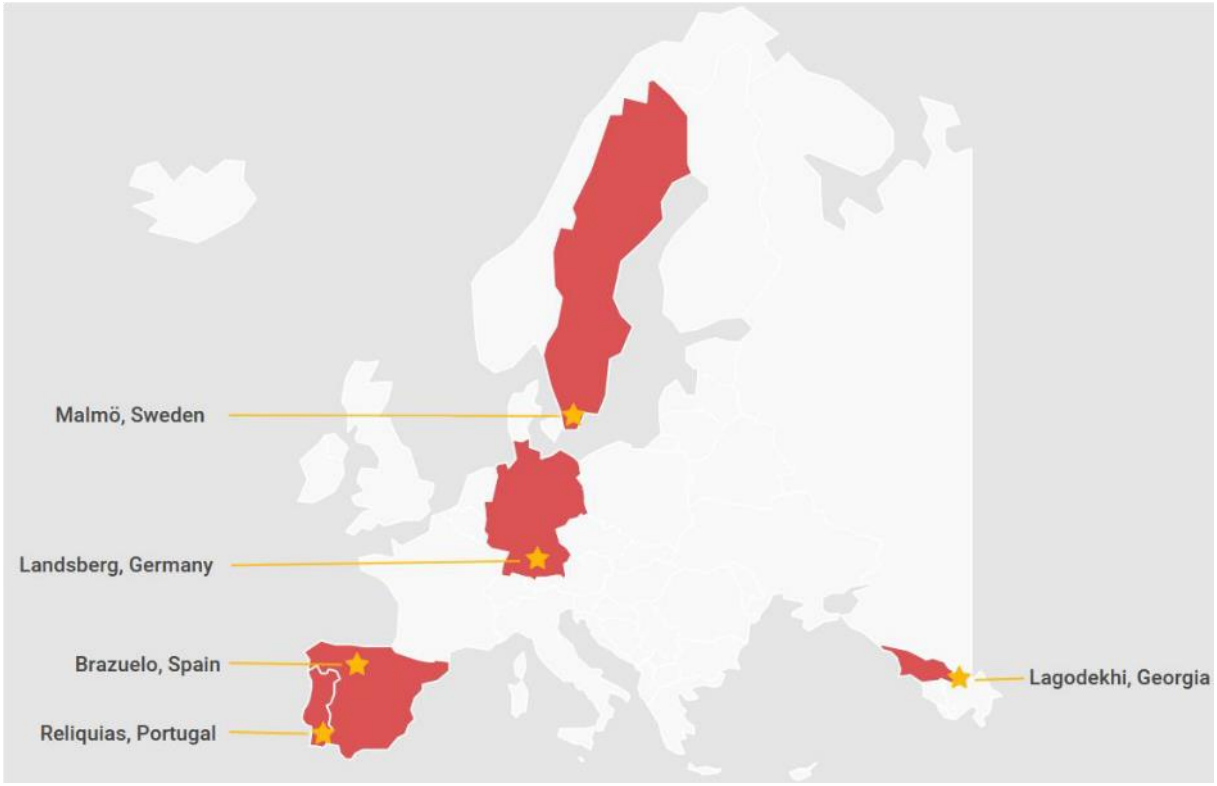


Figure 33. *Localisation géographique des habitats naturels des cinq écotypes d'Arabidopsis thaliana sélectionnés : Landsberg Allemagne (Col-0), Malmö Suède (T1110), Brazuelo Espagne (Bra-0), Reliquias Portugal (Rei-0), Lagodekhi Géorgie (Lag1.5).*

L’analyse des données météorologiques montre que l’écotype Rei-0 (Portugal-Reliquias) est celui faisant face aux plus hautes températures avec un été extrêmement chaud. Les trois écotypes Bra-0, Col-0 et T1110 (Espagne-Brazuelo , Allemagne-Columbia , Suède-Malmö) subissent des étés tempérés ou les températures ne dépassent pas la moyenne de 24,2°C mais des hivers pouvant être rigoureux où le mercure peut descendre sous la barre du zéro. L’écotype Lag1.5 (Géorgie-Lagodekhi) quant à lui présente de très forts écarts de températures avec un été chaud et un hiver très froid.

Le taux d’ensoleillement est un paramètre possédant une forte variabilité entre les cinq écotypes . Notamment dû à sa latitude, l’écotype Malmö (Suède) présente le plus faible ensoleillement annuel. On peut notamment relever que durant les trois mois de novembre, décembre et janvier, les taux de rayonnement solaire sont extrêmement faibles et ne dépassent pas 93 heures par mois (soit environ 3 heures par jour). L’écotype espagnol quant à lui possède un taux d’ensoleillement intermédiaire alors que les trois autres présentent de forts taux de rayonnement solaire.

La ressource hydrique est aussi un paramètre très variable entre les cinq écotypes. L’écotype *Columbia* subit des taux de précipitations très élevés (84mm par mois en moyenne) avec notamment un été très pluvieux. Les quatre autres écotypes Reliquias, Brazuelo, Malmö et Lagodekhi possèdent des moyennes de précipitations comparables les uns aux autres (environ 50mm par mois en moyenne). En revanche, malgré une moyenne annuelle comparable aux autres écotypes, l’été de l’écotype Reliquias est extrêmement sec avec des taux de précipitations ne dépassant pas les 2mm pour l’ensemble du mois de juillet.

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes ci-dessus, les conditions environnementales des cinq écotypes sélectionnés diffèrent fortement. Pour la suite de l’étude, les écotypes ont été récupérés au sein du laboratoire afin d’être cultivées en condition contrôlée (chambre *in vitro*). Ce point est crucial dans l'étude : nous travaillons avec des écotypes d'Arabidopsis provenant d'environnements contrastés, mais tous cultivés dans les mêmes conditions contrôlées en laboratoire (depuis plusieurs générations). Il est important de prendre en considération ce paramètre car il signifie que les différences de profils épitranscriptomiques que nous avons observées entre ces populations (voir ci-dessous) ont

principalement comme origine des phénomènes adaptatifs et ne représentent pas des variations transitoires liées à des phénomènes d'acclimatation à une condition de culture spécifique. Cela dit, on ne peut pas complètement exclure que nos conditions de culture *in vitro* (20°C, 16h/8h) soient perçues comme des conditions de faible stress par certains écotypes.

1.3 - Comparaison des épitranscriptomes d'écotypes naturels d'Arabidopsis

Les paramètres environnementaux très variés de ces cinq écotypes suggèrent qu'ils ont dû évoluer de façons distinctes afin de pouvoir s'adapter et survivre aux différentes contraintes présentées par leurs environnements respectifs. C'est dans cette optique que nous posons la question d'une potentielle variabilité épitranscriptomique naturelle : est-ce que cette adaptation se traduit par des différences de profils épitranscriptomiques ? Est-ce que certaines marques sont hautement variables, d'autres stables ? Au sein de quelle population d'ARN (ARNm, ARNt, ARNr) se trouverait la plus forte variabilité épitranscriptomique ?

Afin de répondre à ces questions, les cinq écotypes d'Arabidopsis ont été cultivés en chambre *in vitro* et récoltés après neufs jours de culture. Puis les quatre populations d'ARN ont été extraites (pour chaque écotypes en trois réplicas biologiques ont été réalisé). Enfin 25 modifications épitranscriptomiques ont été analysées par LC-MS/MS pour chacune des populations d'ARN (Figure 34).

Les 25 modifications chimiques sélectionnées sont retrouvées de façon hétérogène dans les différentes populations d'ARN : 23 sont présentes chez les ARNt, 16 chez les ARNr, 3 chez les ARNm et 7 sont trouvées au sein d'autres populations d'ARN (Figure 34). Le choix de ces cibles n'a pas été fait au hasard et trois critères principaux se basant sur l'état de l'art ont été utilisés pour retenir cette liste : les modifications doivent être décrites comme présentant des variations en réponse à des signaux internes et/ou externes, ayant un impact possible sur la traduction ou encore ayant été intensivement étudiées et décrites dans la littérature.

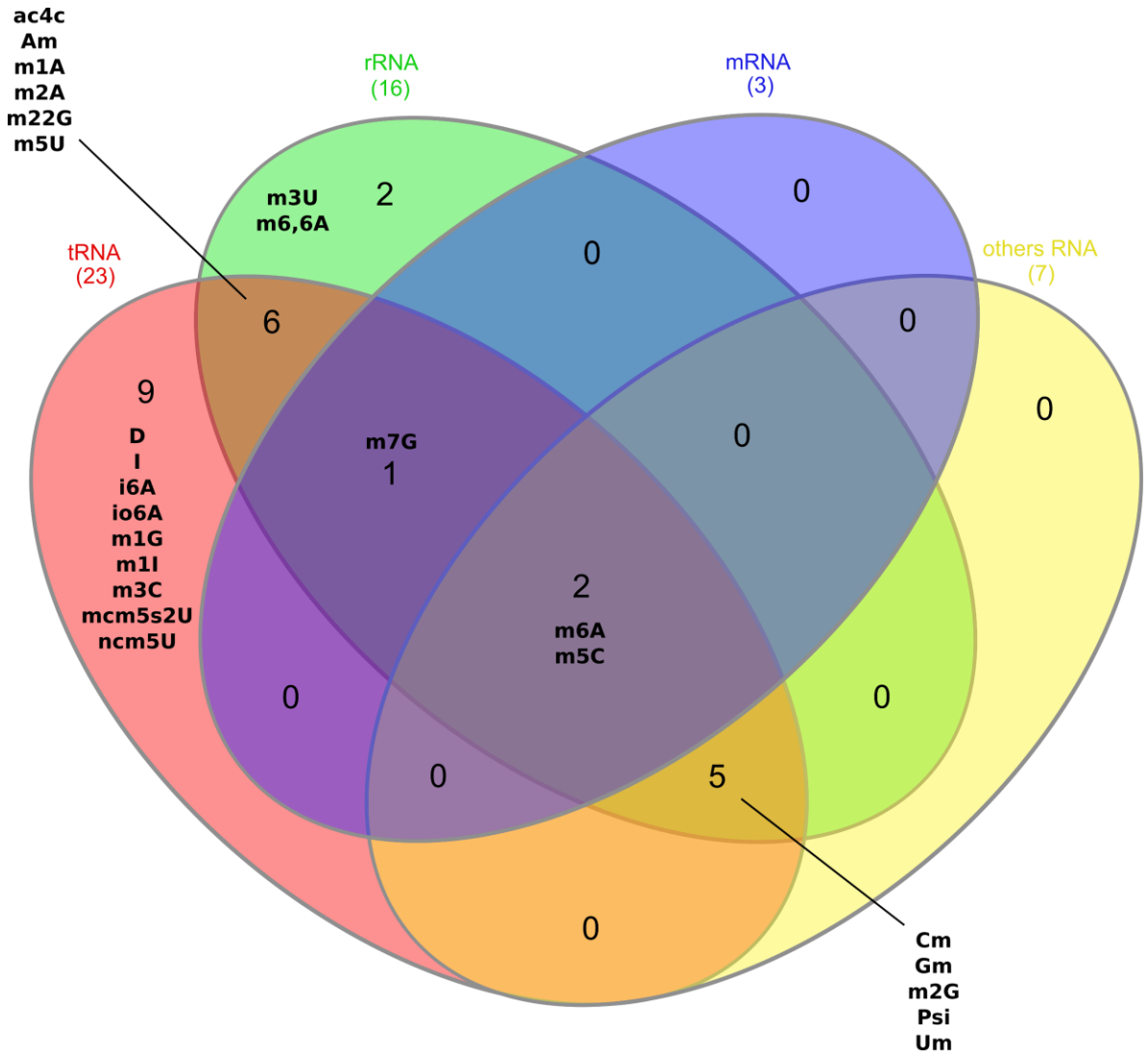


Figure 34. *Diagramme de Venn représentant la répartition des 25 décorations chimiques étudiées entre 4 populations d'ARN (ARN de transfert en rouge, ARN ribosomaux en vert, ARN messagers en bleu et autres ARN en jaune).*

1.3.1 - Existe-t-il une variabilité naturelle des modifications des ARNt ?

En se basant sur la littérature et sur les résultats préliminaires obtenus, nous avons observé que la majorité de la diversité épitranscriptomique de nos données est présente au sein de la population d'ARNt [139]. Une analyse en composantes principales incluant l'ensemble des quatre espèces d'ARN testées (ARNt, ARNm, ARNr, ARNtotaux), confirment que les ARNt représentent le groupe possédant le plus de variabilité (Figure 35B – ACP par population d'ARN). Sur cette ACP, les trois premières composantes permettent d'expliquer 93,3% de la variance observée (voir Figure Supplémentaire S1A). On observe que les ARNt représentent la population la plus éloignée sur le premier axe (qui capture à lui seul 66.89% de la variabilité). Les groupes d'ARNr et ARNtotaux quant à eux sont très proches dans cette analyse (cela est dû au fait que les ARNr représentent environ 85% du pool d'ARN total). Puisque nos résultats corroborent ceux de la littérature, et montrent que les épitranscriptomes des ARNt sont ceux présentant le plus de variabilité, nous avons fait le choix de concentrer nos travaux sur cette population d'ARN. Les résultats des analyses épitranscriptomiques pour les trois autres populations d'ARN seront eux aussi présentés dans la partie 1.6, mais ont fait l'objet d'une étude moins détaillée.

Au sein de la population d'ARN de transfert, on retrouve 23 des 25 modifications testées (Figure 34). Elles sont réparties sur différentes positions de l'ARNt à la fois dans le corps de l'ARNt et au niveau de la boucle de l'anticodon (Figure 35A). Seules les modifications m^3U et $m^{6,6}A$ sont exclusivement retrouvées sur les ARNr [295].

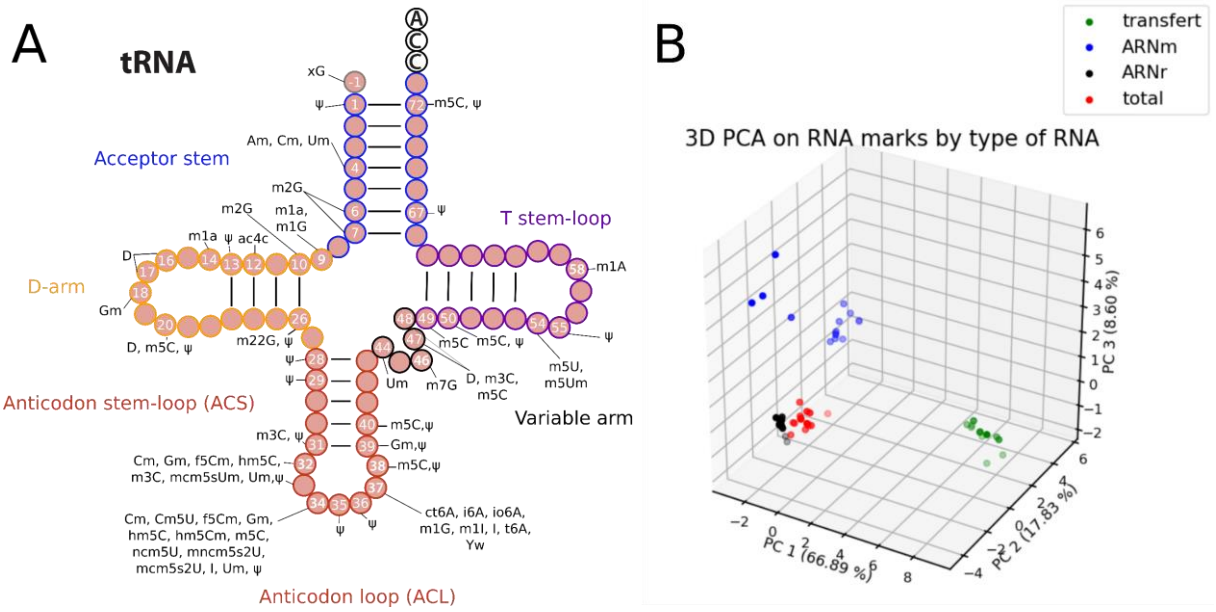


Figure 35. La population des ARNt est celle qui présente la plus forte diversité épitranscriptomique. *A. Schéma représentant les 25 modifications analysées et leurs positions respectives sur un ARN de transfert. B. ACP en trois dimensions sur la base des données épitranscriptomiques des quatre populations d'ARN étudiées (ARNt en vert, ARNm en bleu, ARNr en noir et ARNtotaux en rouge) au sein des cinq écotypes. Chaque point représente un réplicat pour un écotype. ACP réalisée par Eric Rivals (LIRMM, Montpellier).*

Dans un premier temps nous avons testé la qualité de nos résultats. Pour cela nous nous somme basés sur une étude récente qui, à partir de résultats de spectrométrie de masse, permet d'estimer la bonne qualité des échantillons d'ARNt [295]. En effet, aujourd'hui la majorité des articles publiés sur l'étude des modifications des ARN de transfert utilisent des méthodes de purification qui nécessitent une étape de migration et de purification sur gel (dans notre étude une migration sur gel d'agarose nous a permis de séparer les ARNt des autres populations d'ARN). Or, au cours de cette migration, des ARN de plus grande taille dégradés ou bien en cours de dégradation peuvent alors « polluer » la fraction d'ARNt, notamment avec des ARNr tronqués (Figure 36A). Puisque certaines modifications sont communes aux ARNt et ARNr (ac^4C, Am, D, m^1A, m^2A, $m^{2,2}G$, m^5U) (Figure 34), leur quantification peut être biaisée par la présence d'ARNr. Dans ce sens, l'évaluation des niveaux de modifications exclusivement présentent sur les ARNr est un bon contrôle permettant d'évaluer la qualité des échantillons : la modification $m^{6,6}A$ est proposée pour être un bon marqueur de la pollution par des fractions d'ARNr.

La modification $m^{6,6}A$ est détectée dans nos données sur les ARNt mais de manière très faible (Figure 36B), attestant de la bonne qualité de nos échantillons. Afin de déterminer si la détection de certaines marques communes aux deux populations d'ARN (ARNt et ARNr) était due à une pollution par la fraction des ARNr, nous avons appliqué un filtre : toute modification présente à la fois chez les ARNt et les ARNr dont la moyenne d'enrichissement est inférieure à 3 fois celle de $m^{6,6}A$ dans au moins un écotype est retirée de l'étude. Sur les 16 modifications communes aux deux populations (ARNt et ARNr), seulement 3 ne passent pas ce filtre et ont donc été retirées de l'étude : Am, m6A et Um (Figure 36B).

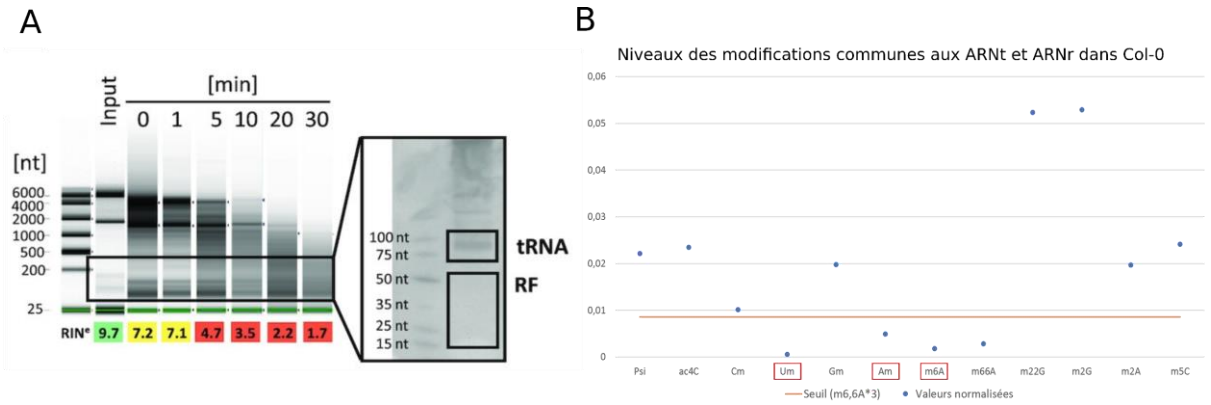


Figure 36. Contrôle qualité des données épitranscriptomiques des ARNt *A) Données de bioanalyzer d'ARNtotaux avec des profils de dégradation croissants : plus les ARNtotaux sont dégradés, plus la portion correspondant aux ARNt est polluée par d'autres ARN. Adapté de « RNA marker modifications reveal the necessity for rigorous preparation protocols to avoid artifacts in epitranscriptomic analysis »*[292] *B) Graphique représentant les niveaux de modifications communes aux ARNt et ARNr dans l'écotype Col-0 (normalisées par la somme des bases non-modifiées U+C+G). La courbe orange représente le taux de* $m^{6,6}A$ *multiplié par un facteur 3. Les trois modifications ne dépassant pas ce seuil et ayant été retirées sont : Am,* m^6A *et Um (encadrées en rouge). Afin de pouvoir visualiser ces résultats les modifications* m^1A *et* m^7G *ont été retirées (car très enrichies par rapport aux autres et empêchent la visualisation des résultats). Les résultats sont uniquement présentés pour l'écotype Col-0 (représentatif des cinq écotypes testés).*

En nous concentrant sur les données épitranscriptomiques des ARNt, nous avons cherché à vérifier que les différents réplicats biologiques étaient bel et bien équivalents. Pour cela nous avons construit une nouvelle ACP nous basant uniquement sur les données des ARNt (Figure 37). Les résultats sont représentés sous la forme d'une analyse en composantes principales (ACP) en trois dimensions (réalisée par Eric Rivals, LIRMM), où les trois premières composantes permettent de capturer 80,21% de la variance observée (Figure supplémentaire S1B). Sur l'ACP, où chaque réplicat est représenté par un point, on observe que certains d'entre eux ne semblent pas formés de cluster avec les deux autres réplicats respectifs. Après avoir analysé les données brutes plus en détail nous nous sommes rendus compte que trois réplicats (R1-Col-0, R2-T1110 et R1-Lag1.5) présentaient des valeurs aberrantes et il a donc été décidé de retirer ces valeurs pour la suite de l'étude (Figure 37).

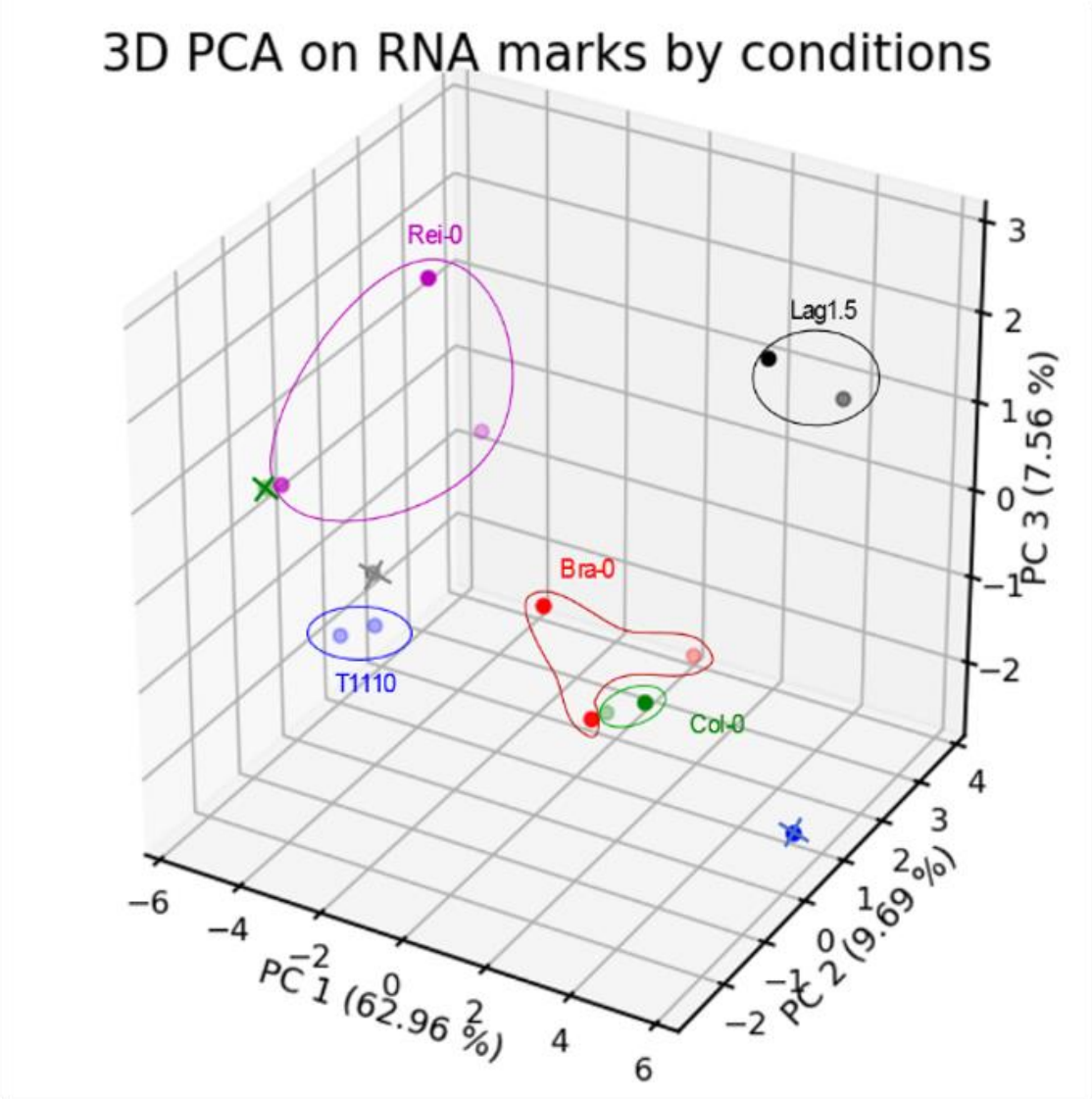


Figure 37. *Analyse en composante principale en trois dimensions basée sur les données épitranscriptomiques des ARNt des cinq écotypes d'Arabidopsis thaliana (réalisée par Eric Rivals, LIRMM). Les points barrés représentent les réplicats aux valeurs aberrantes qui ont été retirés de l'étude par la suite.*

Une fois le contrôle qualité réalisé et les données aberrantes retirées, pour comparer les niveaux de modifications entre les différents écotypes, nous avons effectué une double normalisation. Chaque modification a d'abord été normalisée par la somme des bases non modifiées C + G + U (« A » a été exclu, car les données montrent que la détection de cette marque sature dans plusieurs des échantillons). Puis, pour chaque modification nous avons calculé la somme de cette modification au sein des cinq écotypes et nous avons normalisé par cette somme [295]. Ainsi les données représentées dans la Figure 38 correspondent à des variations d'enrichissement par rapport à la moyenne des cinq écotypes. La modification m^5U est extrêmement enrichie dans un écotype (Lag1.5), et empêche la visualisation des résultats sur la heatmap. Il a donc été décidé de représenter cette modification séparément (Figure supplémentaire S2) afin de visualiser au mieux les variations des autres modifications entre les écotypes.

Les résultats de la heatmap (Figure 38) montrent des variations de l'enrichissement des modifications, attestant de l'existence d'une variabilité épitranscriptomique naturelle entre différents écotypes d'Arabidopsis. De façon intéressante, certaines marques présentent des différences marquées entre les écotypes alors qu'à l'inverse d'autres semblent être beaucoup plus stables : par exemple les modifications ac^4C, i^6A et mcm^5s^2U présentent de plus fortes variations entre les échantillons testés. *À* l'inverse la dihydrouridine (D) ne présente que très peu de variations.

On peut aussi noter que certains écotypes sont plus enclins à présenter des forts taux de variations : si l'on compare globalement l'ensemble de l'épitranscriptome de Col-0, on peut noter que la majorité des modifications ne diffèrent que très peu par rapport à la moyenne des cinq écotypes. À l'inverse, les écotypes T1110 et Rei-0 présentent d'importantes variations de modifications par rapport à la moyenne des cinq écotypes : certaines enrichies (mcm^5S^2U, m^5C) alors que d'autres y sont appauvries (i^6A, ac^4c).

En comparant les résultats des écotypes Bra-0 avec T1110 et Rei-0, l'image générale qui se dégage de cette heatmap est que l'écotype Bra-0 possède un épitranscriptome plutôt hypomodifié alors qu'à l'inverse les écotypes Rei-0 et T1110 ont plus tendance à être enrichis en modifications de ses ARNt. Il est intéressant de noter que malgré cet épitranscriptome globalement hypermodifié, certaines marques chimiques sont moins présentes dans ces deux écotypes (comme ac^4C, i^6A, io^6A, m^3C).

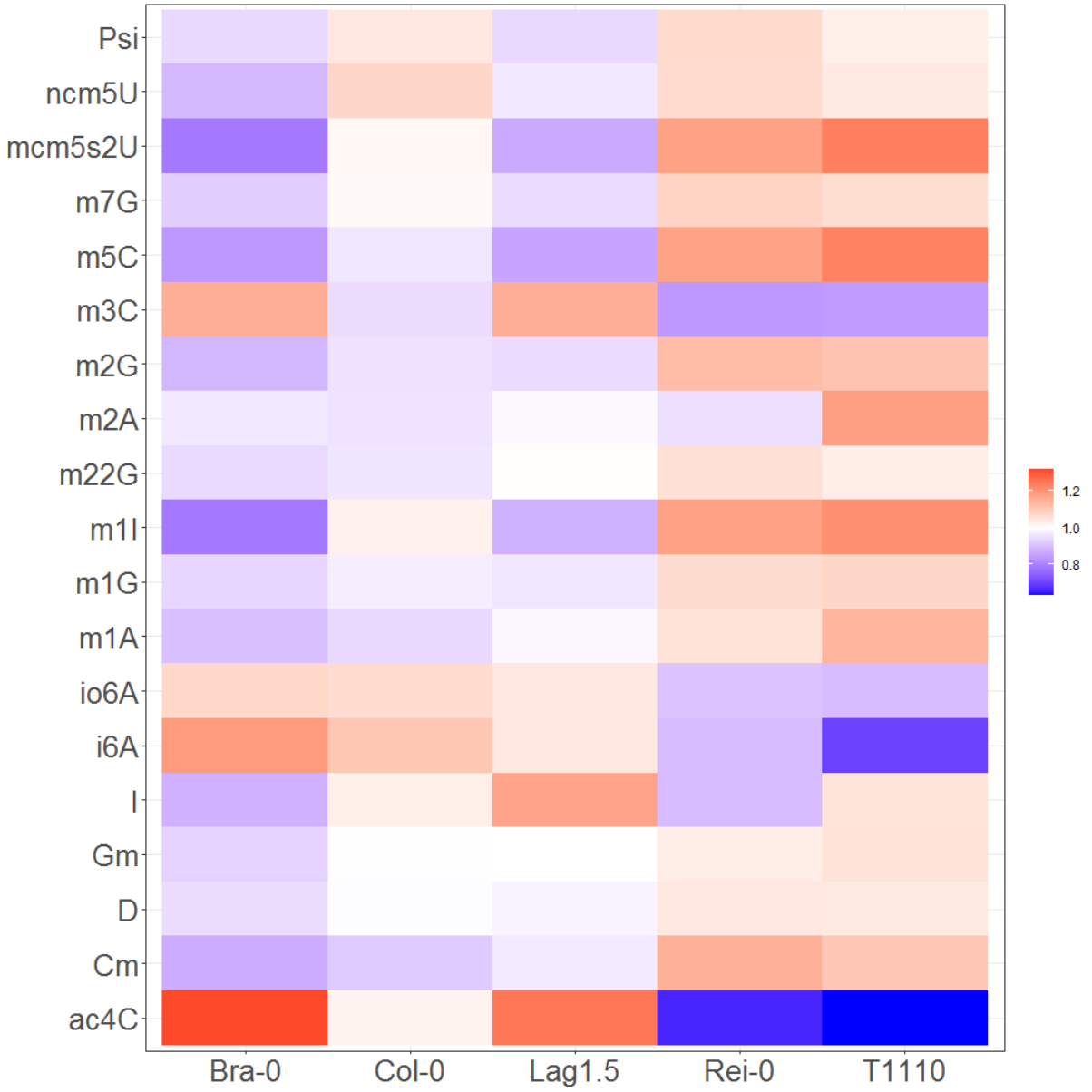


***Figure 38**. Heatmap représentant l'enrichissement des 19 modifications des ARNt pour les 5 écotypes d'Arabidopsis. Pour chaque écotype, 3 réplicats biologiques et techniques ont été compilés (sauf pour les écotypes Col-0, Lag1.5 et T1110 où un réplicat biologique a été retiré). Les données ont d'abord été normalisées par la somme des bases non modifiées U + G + C. Ensuite, une deuxième étape de normalisation a été appliquée pour rendre les différentes modifications comparables : chaque modification est normalisée par la moyenne de sa ligne.*

Afin de déterminer quelles modifications permettraient d'expliquer majoritairement la variabilité observée, elles ont été comparées une à une entre les 5 populations et la significativité de leurs variations a été testée se basant sur l'utilisation de tests de Wilcoxon. Les résultats sont représentés sous forme de boxplots (Figure 39) et les niveaux de significativité sont indiqués dans le Tableau Supplémentaire 2. Les tests statistiques affirment que chacune des modifications testées, présente au moins une différence significative entre deux populations (p-value < 0.05). Ces résultats indiquent donc que l'ensemble de l'épitranscriptome des ARNt peut varier en fonction du patrimoine génétique/épigénétique des écotypes. Afin de déterminer si certaines marques étaient plus variables que d'autres, nous avons augmenté le seuil de significativité et sélectionné uniquement les modifications avec une p-value < 0.0001. Avec ce nouveau filtre, ce sont 11 modifications qui présentent au moins une variation hautement significative entre deux écotypes et composent donc la partie la plus variable de l'épitranscriptome (Figure 39) : ac^4C, Cm, Gm, i6A, m^1A, m^1I, m^2G, m^3C, m^5C, m^7G, , mcm^5S^2U.

En conclusion, la heat-map (Figure 38) et les boxplots (Figure 39) présentés mettent en évidence pour la première fois l'existence d'une variabilité des niveaux de modifications des ARNt entre différentes populations naturelles d'Arabidopsis.

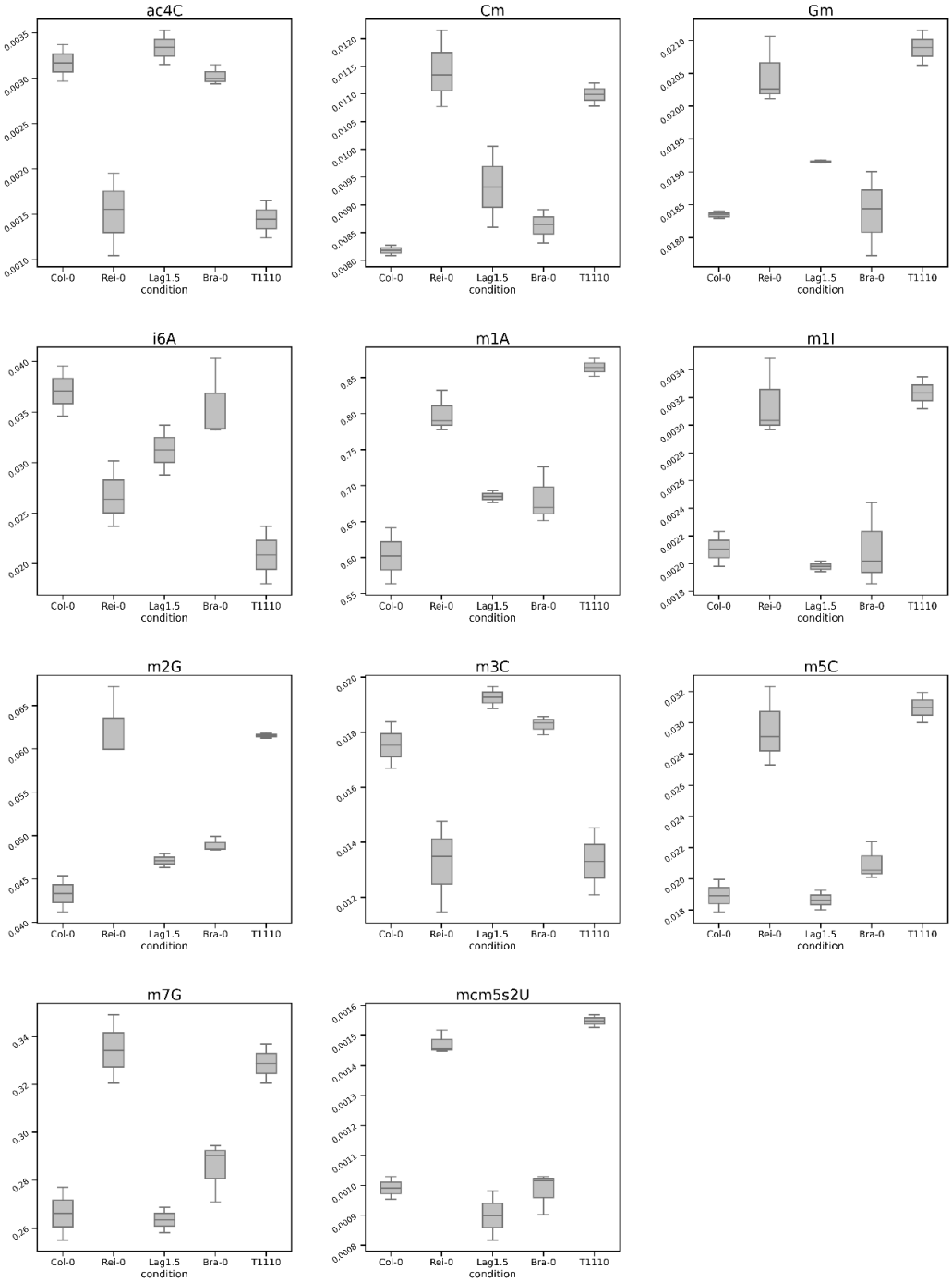


Figure 39. *Boxplots représentant les enrichissements relatifs pour les 11 modifications identifiées comme hypervariables par l'analyse statistique. Pour chaque échantillon, 3 réplicats biologiques et techniques ont été compilés (sauf pour les écotypes Col-0, Lag1.5 et T1110 où un réplicat a été retiré). Les données ont été normalisées par la somme des bases non modifiées U + G + C. En ordonné sont représentés les ratios entre signal de la modification et somme des bases non-modifiées U+G+C. Les résultats des tests significatifs associés à ces boxplots sont présentées dans le Tableau Supplémentaire 2.*

1.4 - Peut-on classer les écotypes sur la base de leurs profils épitranscriptomiques d'ARNt ?

Après avoir démontré l'existence de la variabilité épitranscriptomique naturelle des ARNt, nous nous sommes demandés s'il serait possible d'utiliser cette variabilité pour retracer les relations évolutives entre ces différentes populations.

Une fois les données aberrantes retirées, une nouvelle ACP en trois dimensions, basée sur les données épitranscriptomiques des ARNt des cinq populations, a été réalisée (Eric Rivals, LIRMM, Montpellier) (Figure 40A). Les trois premières composantes permettent de capturer la majorité de la variabilité de nos données (avec les trois axes capturant 83,31% de la variabilité) (Figure supplémentaire S1C). Ces résultats permettent d'abord de confirmer l'existence d'une importante diversité épitranscriptomique naturelle (des ARNt) chez Arabidopsis. De plus on observe que les écotypes Bra-0 et Col-0 se trouvent proches au sein de l'ACP, indiquant qu'ils présentent une faible variabilité. *À* l'inverse les trois autres écotypes diffèrent fortement les uns des autres. L'observation de ces résultats nous montre qu'il est possible de classer les 5 écotypes sur la base de leur profil épitranscriptomique (Figure 40A).

Malgré le fait que ces écotypes proviennent d'environnements aux conditions météorologiques contrastées, ils ont tous été cultivés dans les mêmes conditions en chambre *in vitro*. *É*tant donné que les modifications chimiques portées par les ARNt sont connues pour être hautement dynamiques et répondre de manière contrôlée aux variations environnementales, nous aurions pu nous attendre que dans nos conditions de cultures stables, aucune variation ne soit observée. Or nos résultats expérimentaux affirment le contraire, suggérant qu'il existe un autre paramètre dictant l'épitranscriptome. Notre première hypothèse s'est portée sur une régulation génétique. Pour appuyer ce postulat, nous avons récupéré des données génétiques des cinq écotypes d'Arabidopsis. Sur la base de données des 1001 génomes d'Arabidopsis (https://1001genomes.org/), les données des SNPs de Col-0, Bra-0, Rei-0, Lag1.5 et T1110 ont été récupérées afin de réaliser une seconde ACP en deux dimensions (Figure 40B, réalisée par Joris Bertrand, LGDP). Les résultats de cette seconde ACP montrent que les écotypes Col-0 et Bra-0 sont génétiquement très proches alors que les trois autres écotypes diffèrent fortement. Il est très intéressant de noter que ces résultats

corrèlent avec ceux de l'ACP des modifications des ARNt : où les deux écotypes Bra-0 et Col-0 se trouvent très proches alors que les trois autres divergent.

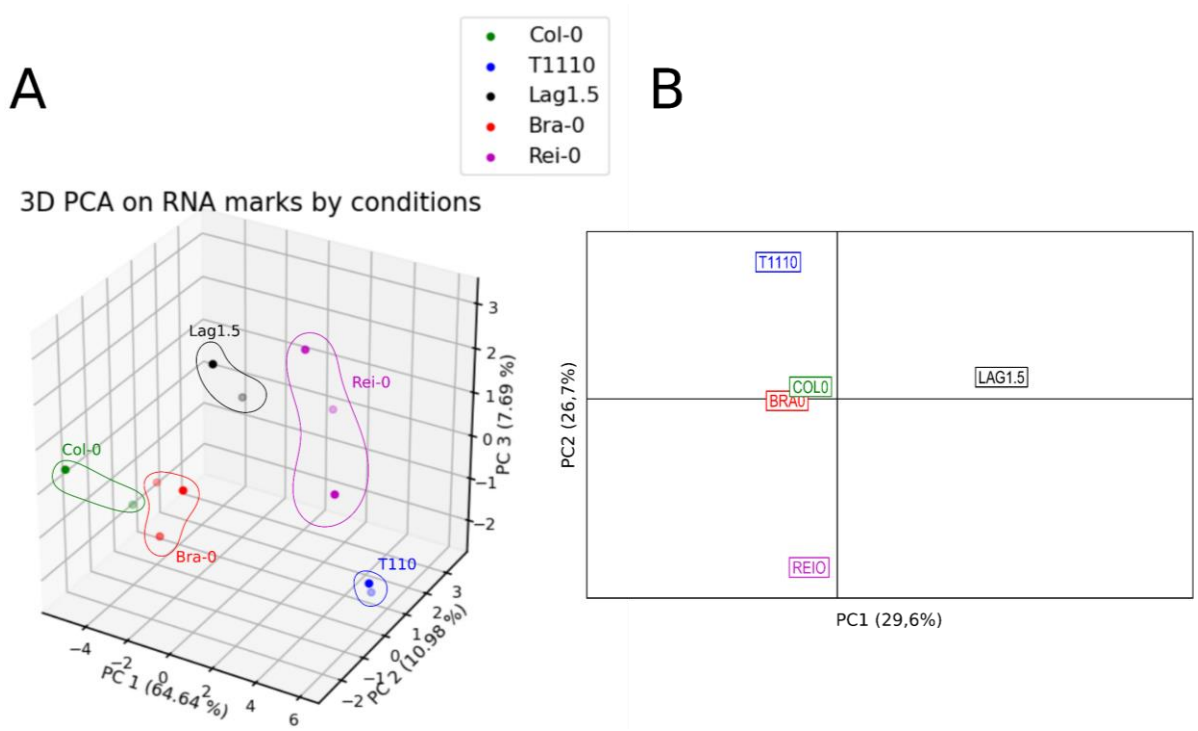


Figure 40. Les données épitranscriptomiques permettent de classer les écotypes. A) *Analyse en composante principale en trois dimensions basée sur les données épitranscriptomiques des ARNt des cinq écotypes d'Arabidopsis thaliana (réalisée par Eric Rivals, LIRMM) après avoir retiré les réplicats aux valeurs aberrantes. B) Analyse en composante principale en deux dimensions basée sur les données génétiques (SNPs) récupérées sur la base de données des 1001 génomes d'Arabidopsis (réalisée par Joris Bertrand, LGDP).*

Ces résultats soutiennent donc notre hypothèse impliquant un déterminisme génétique dans la variabilité épitranscriptomique naturelle observée. On peut alors faire l'hypothèse que dans les conditions de culture utilisées, un des facteurs déterminant la nature de l'épitranscriptome des cinq écotypes est d'ordre génétique. De plus on ne peut pas exclure la possibilité que des facteurs épigénétiques sous forme d'épimutations stables puissent aussi jouer un rôle dans le déterminisme de l'épitranscriptome

1.5 - Des corrélations positives entre les conditions environnementales et les modifications des ARNt ?

L'objectif final de ce type d'approche serait de pouvoir assimiler un profil épitranscriptomiques à un climat. Comme indiqué précédemment, notre étude peut être qualifiée de pilote et n'a pas vocation à répondre à cette question (pour cela plus d'écotypes devraient être testés, dans leurs conditions naturelles, avec une caractérisation beaucoup plus fine des conditions environnementales). Néanmoins d'intéressantes corrélations ont été trouvées entre conditions climatiques (principalement températures) et l'enrichissement en modifications chimiques et seront énoncées dans cette partie. L'écotype Rei-0 fait face à des températures extrêmement élevées couplées à des taux de précipitations très faibles au cours de l'été (Figure 41B). L'écotype T1110 fait lui aussi face à des contraintes de températures (températures extrêmement basses), ainsi qu'à des taux d'ensoleillement extrêmement faibles (Figure 41B). Ces deux écotypes sont ceux faisant face aux conditions climatiques les plus périlleuses pour la survie des plantes et par conséquent, nécessitant une importante capacité d'adaptation.

Une corrélation positive est alors observée entre ces conditions environnementales plus rigoureuses et une accumulation de modifications chimiques ayant été montrées comme impliquées dans les réponses au stress : mcm^5s^2U, m^7G, m^5C, $m^{2,2}G$, m^1A, Cm (Figure 41A) [296,297]. En comparaison, l'écotype Bra-0 qui provient d'un environnement aux conditions météorologiques plus stables avec moins d'extrêmes, ne présentent pas de telles accumulations de ces modifications et présentent un profil plutôt hypomodifié.

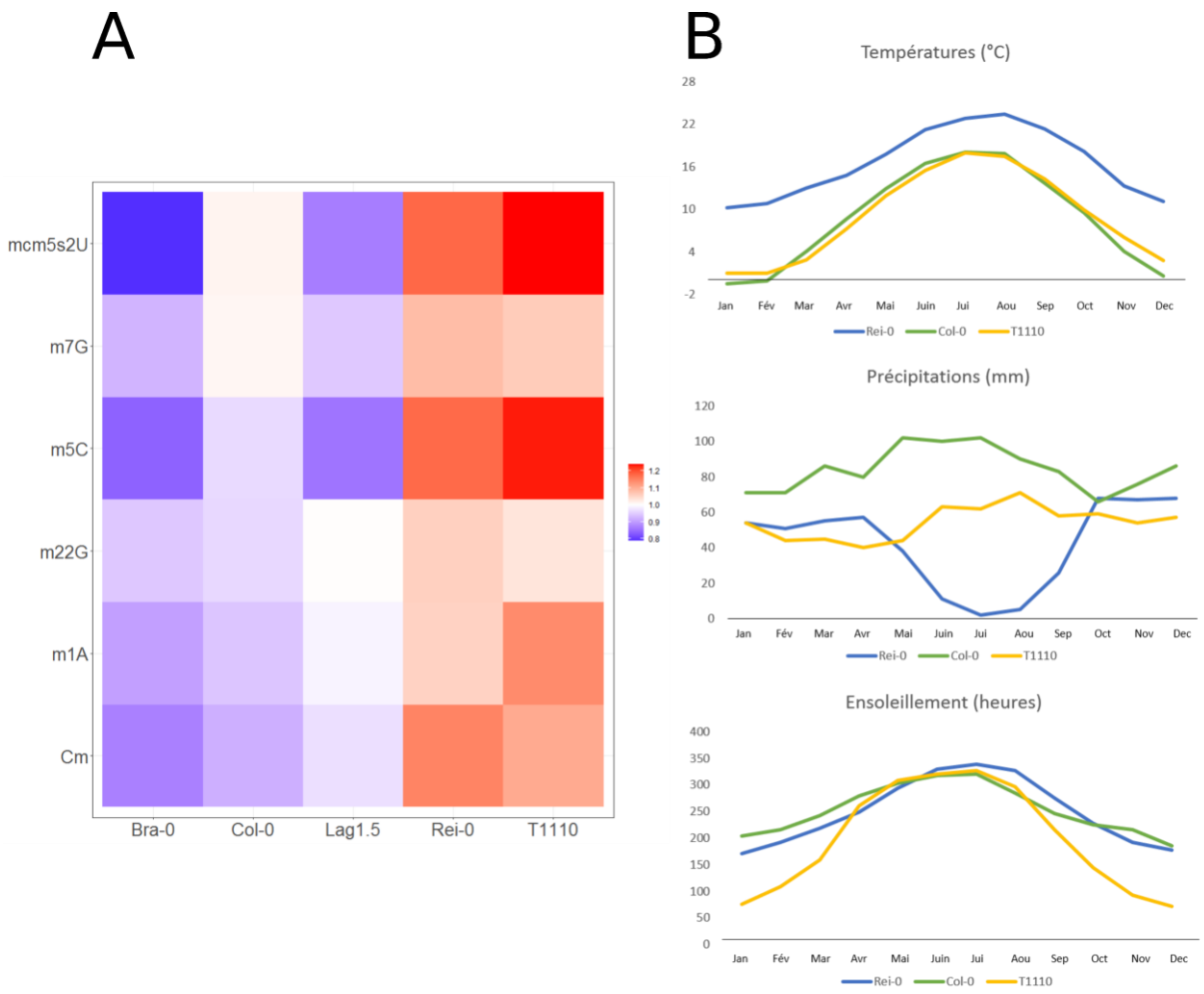


Figure 41. Une corrélation positive entre les données épitranscriptomiques et les données météorologiques ? A) *Heatmap représentant l'enrichissement des six modifications des ARNt pour les cinq écotypes d'Arabidopsis thaliana proposées comme impliquées dans la réponse au stress. Pour chaque échantillon, trois réplicats biologiques et techniques ont été compilés (sauf pour les écotypes Col-0, Lag1.5 et T1110 où un réplicat a été retiré, partie résultat 1.3). Les données ont d'abord été normalisées par la somme des bases non modifiées U + G + C. Ensuite, une deuxième étape de normalisation a été appliquée pour rendre les différentes modifications comparables : chaque ligne a été normalisée par sa moyenne. B) Données représentant les moyennes mensuelles des températures, des taux de précipitations et de l'ensoleillement pour les écotypes Rei-0 (bleu), Col-0-0 (vert) et T1110 (jaune) (source : World Meteorological Organization).*

1.6 - Résultats épitranscriptomiques des autres populations d'ARN

Bien que nous ayons concentré la majorité de nos travaux sur l'étude des épitranscriptomes des ARNt, nous nous sommes aussi intéressés à trois autres populations d'ARN. Ainsi, nous avons obtenu des données épitranscriptomiques pour les ARN ribosomiques, les ARN messagers et la fraction contenant l'ensemble des ARN des cellules (ARNtotaux), pour les cinq écotypes d'Arabidopsis précédemment cités.

Néanmoins les techniques de purification d'ARN n'étaient pas suffisantes afin de purifier efficacement les différentes populations d'ARNm. Il est important d'en tenir compte lors de l'étude des résultats : afin de séparer les ARNm des ARNr, une purification basée sur la capture des transcrits arborant une queue polyA a été réalisée. Ainsi deux fractions ont été récupérées : une enrichie en ARN possédant une queue polyA (fraction polyA+, enrichie en ARN messagers), et une seconde fraction déplétée en ARN polyA ainsi qu'en petits ARN inférieurs à 200nt (fraction polyA-, enrichie en ARNr). Le contrôle qualité de ces échantillons au bioAnalyzer montrent effectivement que les fractions polyA+ ne sont pas parfaitement pures et indiquent la présence d'ARNr parasites (Figure Supplémentaire 3). Puisque l'étude des épitranscriptomes des autres populations d'ARN n'étaient pas un projet central de ma thèse, nous avons décidé de ne pas chercher à purifier plus efficacement ces fractions d'ARNm. Néanmoins la fraction polyA- quant à elle peut être analysée et interprétée avec plus de certitude car les ARN ribosomiques, déplétés en ARNt vont représenter jusqu'à 95% du pool analysé.

1.6.1 - Les ARNr possèdent aussi une variabilité naturelle

Sur les 25 modifications qui sont analysées à travers notre étude, 16 sont retrouvées sur les ARNr (Figure 34). Dans le but d'étudier leur variabilité, la même approche que pour les ARNt a été utilisée : les données ont tout d'abord été normalisées par la somme des bases non modifiées C + G + U (« A » a été sorti de la normalisation, car il est saturant dans plusieurs échantillons). Puis une seconde normalisation est réalisée, cette fois par la somme de la modification pour les cinq écotypes. Ainsi, tout comme pour la heatmap des ARNt, les données

représentées sur la Figure 42 correspondent à des variations d'enrichissement de modification des ARNr par rapport à la moyenne des cinq écotypes.

Les résultats de cette heatmap (Figure 42) montrent qu'il existe aussi une variabilité épitranscriptomique naturelle au sein des modifications des ARN ribosomiques chez Arabidopsis. On observe notamment que la N2,N2-dimethylguanosine ($m^{2,2}G$), la 1-methylguanosine (m^1G) et la 5-methyluridine (m^5U) (à noter que la m^5U est présente uniquement sur les ARNt et ARNr mitochondriaux) sont les modifications les plus variables entre nos cinq écotypes. On peut aussi relever le comportement intéressant des quatre 2'-O-méthylations du ribose (Am, Cm, Gm et Um) qui ne varient que très peu. Par la suite, afin de déterminer quelles sont les modifications les plus variables au sein de la population d'ARNr, des tests statistiques ont été réalisés (test de Wilcoxon, tous les écotypes ont été comparés ensemble un à un pour chacune des modifications). Sur les seize modifications d'ARNr testées, sept présentent au moins une variation significative entre deux écotypes : m^1A, m^2G, $m^{2,2}G$, m^5C, m^5U, $m^{6,6}A$, m^7G. Les résultats des tests statistiques sont présentés dans le Tableau Supplémentaire S3.

Alors qu'au sein des ARNt, les tests statistiques ont montré que l'entièreté de leur épitranscriptome est variable (partie 1.3), sur les ARNr seulement 44% des modifications testées présentent des variations significatives entre les cinq écotypes. De plus, les niveaux de significativité sont moins élevés : aucune modification ne dépasse le filtre que nous avions utilisé dans la partie précédente afin de rendre les tests plus stricts et déterminer quelles modifications pouvaient être considérées comme hypervariables.

Bien que les échantillons manquent de pureté l'enrichissement en ARNr est tel que ces résultats nous permettent de proposer une première image de la diversité épitranscriptomique naturelle des ARNr chez Arabidopsis. Néanmoins, une étude plus poussée se basant sur une meilleure technique d'extraction et de purification est nécessaire pour pouvoir tirer de solides conclusions et affirmer que, tout comme les ARNt, les épitranscriptomes des ARNr présentent eux aussi une variabilité naturelle pouvant dépendre de leur génotype.

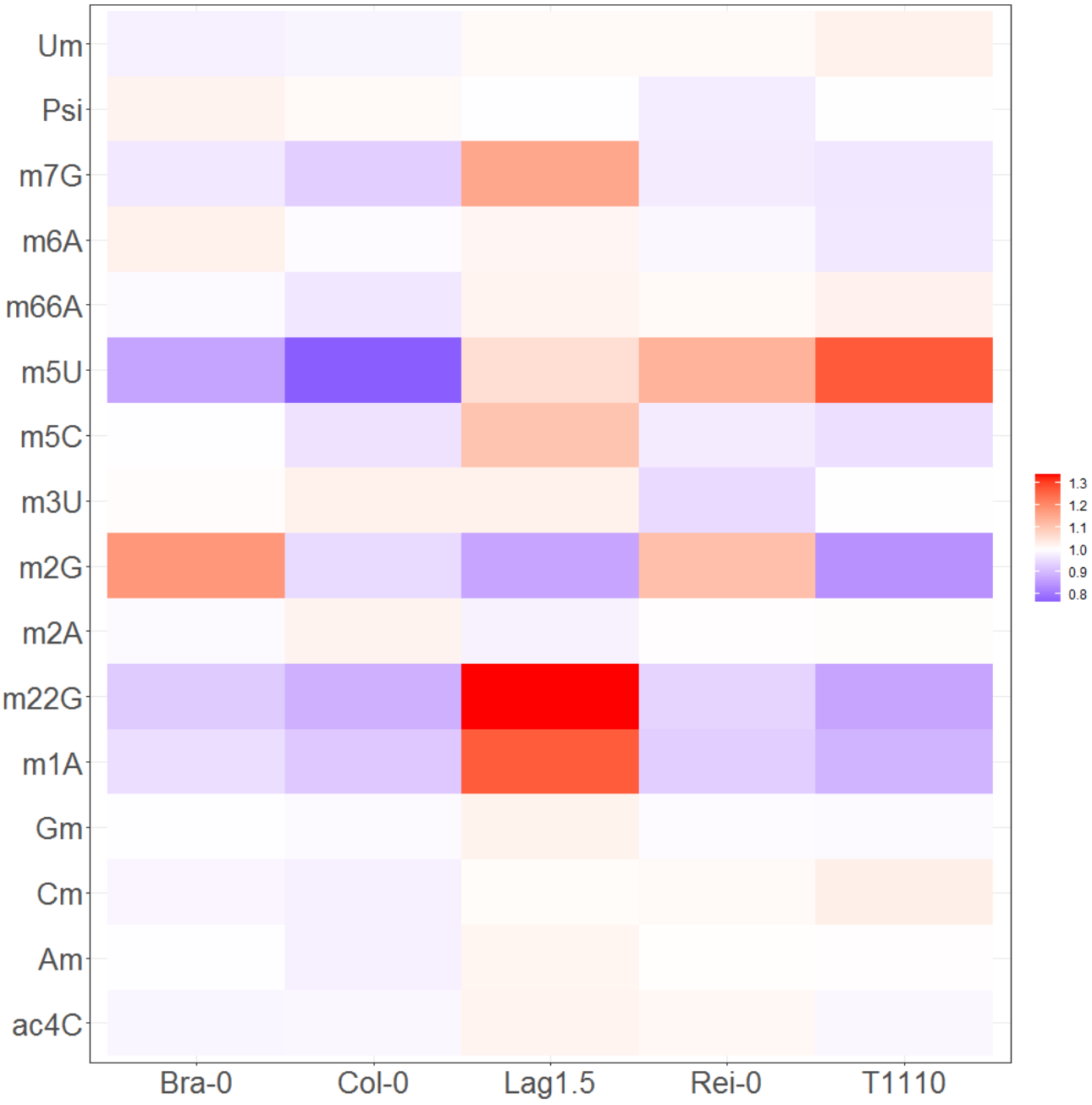


Figure 42. *Heatmap représentant l'enrichissement des seize modifications des ARNr pour les cinq écotypes d'Arabidopsis thaliana. Pour chaque échantillon, trois réplicats biologiques et techniques ont été compilés. Les données ont d'abord été normalisées par la somme des bases non modifiées U + G + C. Ensuite, une deuxième étape de normalisation a été appliquée pour rendre les différentes modifications comparables : chaque ligne a été normalisée par sa moyenne.*

1.7 - Conclusion

Les résultats présentés dans les Figures 38 et 40 permettent d'affirmer l'existence d'une variabilité épitranscriptomique naturelle des ARNt entre différentes populations d'une même espèce. Ces données ont montré que l'ensemble de l'épitranscriptome des ARNt testé est considéré comme variable, mais que certaines des modifications ont été détectées comme hautement variables. Il est important ici de rappeler que le choix des populations cibles se basait notamment sur leur habitat aux conditions environnementales très contrastées, ce qui pourrait notamment expliquer ce fort taux de variabilité. À ma connaissance, nos résultats représentent la première étude faisant état d'une variabilité épitranscriptomique au sein de populations naturelles, et ce, chez tout organisme confondu.

Nos résultats ont également permis de montrer que les données épitranscriptomiques et génétiques permettent de classifier de façon similaire les cinq écotypes d'Arabidopsis. En effet il est très intéressant d'observer que des données basées sur les SNPs et sur un large panel de modifications chimiques des ARNt conduisent aux mêmes conclusions. Finalement d'intéressantes corrélations ont pu être observées entre l'enrichissement de certaines modifications au sein des épitranscriptomes des ARNt et les conditions environnementales naturelles des écotypes, bien que ces résultats restent préliminaires à ce stade.

2 – Impact du stress thermique sur la traduction et la dégradation co-traductionnelle, un rôle clé dans l'effet mémoire ?

2.1 – Contexte et objectifs.

Dans cette partie nous avons laissé de côté les différents écotypes naturels d'Arabidopsis afin de poser la question de l'implication des phénomènes polysomaux (taux d'engagement dans les polysomes et dégradation co-traductionnelle) dans la réponse au stress thermique et l'effet mémoire chez Arabidopsis (écotype Col-0). Afin de travailler sur le phénomène de l'effet mémoire nous nous sommes basés sur l'étude de deux régimes de stress thermique : l'un possédant un évènement d'amorçage et l'autre sans. Dans le but d'étudier les phénomènes polysomaux, une étude globale se basant sur l'analyse intégrative de trois techniques NGS a été réalisée. Ces trois approches nous ont permis de quantifier à des étapes clés des deux régimes de stress thermique, les taux d'ARNm globaux à l'équilibre, les taux d'ARNm engagés dans les polysomes et enfin les taux d'ARNm ciblés par la dégradation co-traductionnelle. L'analyse intégrative de ces trois jeux de données au sein des deux régimes de stress thermique avait comme but d'élucider l'importance des régulations traductionnelles dans l'effet mémoire. Enfin, il a été proposé que le ratio entre les données d'ARNm engagés dans les polysomes et les taux de dégradation co-traductionnelle permettent d'obtenir une image plus précise de l'efficacité de traduction (TE) [206].

Cette étude ayant conduit à l'obtention de résultats innovants, ils ont été analysés en profondeur et ont donné lieu à l'élaboration d'une publication dont je suis le premier auteur. Au sein de cette étude nous avons mis en lumière que l'amorçage permet de rétablir efficacement la traduction lors des étapes de récupération à la suite d'un stress thermique, permettant de préparer la plante à des évènements de stress plus aigus. Puis en se basant sur l'analyse des données NGS nous sommes parvenus à montrer l'importance des mécanismes polysomaux (engagement polysomale et dégradation co-traductionnelle) dans la mise en place de la réponse au stress thermique. De plus, nous avons souligné que ces mécanismes de régulation sont impactés par l'amorçage : cet évènement va conduire à engager plus

efficacement dans les polysomes les transcrits nécessaires à la réponse au stress, tout en défavorisant la traduction des transcrits non-nécessaires. Nous avons aussi montré pour la première fois que l'étape d'amorçage est nécessaire pour la mise en place efficace de la réponse UPR à 44°C, pouvant expliquer en partie les phénotypes d'acclimatation. Enfin, nos résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle la dégradation co-traductionnelle doit être considérée comme un mécanisme actif de régulation de l'expression des gènes au même titre que la transcription et l'engagement polysomal. Ces résultats seront présentés dans la partie suivante sous forme d'article (en cours de soumission) : Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency.

Par la suite une partie sera consacrée à l'étude de résultats additionnels n'ayant pas été inclus dans l'article.

2.2 – Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency

Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency

Arnaud Dannfald[1,2], Marie-Christine Carpentier[1,2], Rémy Merret[1,2], Jean-Jacques Favory[1,2] and Jean-Marc Deragon[1,2,@]

Author affiliations :

[1] CNRS LGDP-UMR5096, 58 Av. PFaul Alduy 66860 PERPIGNAN, FRANCE.

[2] Université de Perpignan Via Domitia, LGDP-UMR5096, 58 Av. Paul Alduy 66860 PERPIGNAN, FRANCE.

[@]**Corresponding author:**

jean-marc.deragon@univ-perp.fr

Short Title: Polysome processes regulate plant heat stress

Keywords: Arabidopsis, cotranslational decay, heat stress priming and memory, Unfolded Protein Response

The author(s) responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article is Jean-Marc Deragon (jean-marc.deragon@univ-perp.fr)

Abstract

Acquired thermotolerance (also known as priming) is the ability of cells or organisms to better survive an acute heat stress if it is preceded by a milder one. In plants, acquired thermotolerance has been studied mainly at the transcriptional level, including recent descriptions of sophisticated regulatory circuits that are essential for this learning capacity. In this work, we tested the involvement of polysome-related processes (translation and cotranslational mRNA decay (CTRD)) in plant thermotolerance using two heat stress regimes with and without a priming event. We found that priming is essential to restore the general translational potential of plants shortly after acute heat stress. We observed that mRNAs not involved in heat stress suffer from a reduction in translation efficiency at high temperature, whereas heat stress-related mRNAs are translated more efficiently under the same condition. We also show that the induction of the unfolded protein response (UPR) pathway in acute heat stress requires a previous priming event and that, in the absence of priming, ER-translated mRNAs become preferential targets of CTRD. Finally, we present evidence that CTRD can specifically regulate more than a thousand genes during heat stress and should be considered as an independent gene regulatory mechanism.

Introduction

Global climate change is a reality, day-to-day impacting our capacity to ensure food security worldwide (Duchenne-Moutien and Neetoo, 2021). Human activity is directly responsible for warming the world's climate by 1.1°C compared to pre-industrial levels, and global warming is expected to reach 1.5°C by the early 2030s (IPCC, 2023). A direct consequence of these rises is an increase in the number of days per year with extremely high temperatures, a situation that threatens plant survival. Understanding how plants reprogram gene expression in response to heat is therefore crucial to developing the next generation of heat-stress resistant crops.

The reprogramming of gene expression involves many steps, from transcription and translation to post-translational modifications and degradation of RNA and proteins. To obtain an integrated view of the mechanisms regulating gene expression during heat stress, it is essential to obtain information on all these steps and the way they influence each other. Our current understanding of how plant gene expression is reprogrammed after a single heat stress event mainly concerns the gene transcription step. (Kotak et al., 2007; Scharf et al., 2012; Jacob et al., 2017; Kerbler and Wigge, 2023). Briefly, upon heat stress, heat shock proteins (HSP)90/70 are redirected to unfolded proteins, allowing heat shock factor (HSF)A1 to enter the nucleus to displace histone variant H2A.Z and stimulate transcription of target genes (in cooperation with other transcription factors such as DRB2A and ABFs/AREBs). Induced proteins include secondary transcription factors (such as HSFA2, and HSFA3) that positively feedback on HSF and HSP transcription. An important function of HSP and other chaperone proteins is to restore protein homeostasis by preventing the accumulation of misfolded proteins in the cytosol via the cytosolic protein response (CPR) pathway (Sugio et al., 2009), and in the endoplasmic reticulum (ER), through the Unfolded Protein Response (UPR) pathway (Howell, 2021; Yu et al., 2022). The CPR and UPR pathways are also linked to protein degradation, preventing the precipitation of irremediably unfolded proteins (Chen et al., 2022; Krshnan et al., 2022; Lochli et al., 2022).

An important aspect of plant heat stress response is the ability of plants to withstand a severe heat stress if they have previously been exposed to a milder one (Baurle, 2016; Crisp et al., 2016; Shekhawat et al., 2022; Charng et al., 2023). This priming event allows plants to respond to a second acute event with a faster and stronger defense response, i.e. plants can 'learn' from the previous event. Plant stress memory (PSM) is defined as the ability of plants to maintain this primed state over time (Charng et al., 2023). The "memory phase" (i.e. the time

between the first and second stress) can last from several hours to several days. Our understanding of the mechanisms leading to priming and PSM is mostly limited to the transcriptional and post-translational steps (Shekhawat et al., 2022; Charng et al., 2023). Following priming, HSFA1 can activate the transcription of genes that produce "effectors" (such as HSP101 and HSP21 (Harndahl et al., 1999; Queitsch et al., 2000)) that are responsible for maintaining the primed state in the memory phase and for modifying the outcome of the second acute stress. HSFA1 can also initiate the transcription of genes that produce secondary transcription factors (such as HSFA2 and HSFA3) and "regulators" that can either positively regulate effectors (maintainers, such as HSA32 (Wu et al., 2013)) or negatively (erasers, such as the protease FtsH6 (Sedaghatmehr et al., 2016)). Specific chromatin modifications allow the transcriptional re-induction of effector genes at the end of the memory phase (Lamke et al., 2016), while small RNAs are involved in the post-transcriptional regulation of heat-induced mRNAs throughout the heat stress period (Stief et al., 2014; Shekhawat et al., 2022). Therefore, sustained transcriptional activity driven by multiple integrated regulatory circuits and small RNAs is essential to establish PSM and acclimate plants. Recently, alternative splicing has also been shown to be involved in priming and PSM (Ling et al., 2018). Upon priming, splicing is repressed, leading to the accumulation of stress-responsive transcripts containing introns. Subsequent exposure to heat triggers the correct splicing of these transcripts and the production of the corresponding stress-responsive proteins (Ling et al., 2018; Ling et al., 2021).

Very little is known about the potential contribution of other post-transcriptional regulatory mechanisms (i.e. mRNA decay and translation) to priming and PSM. A recent report using yeast cells showed for the first time that both nuclear and cytoplasmic mRNA degradation contribute to gene expression memory (Li et al., 2023), but a similar role for mRNA decay in plants has not yet been explored. However, it has been reported that one of the fastest ways (within minutes) for plants to adapt their genetic program to rapidly fluctuating temperatures is to modulate global mRNA populations by inducing decay processes (Merret et al., 2013; Crisp et al., 2016). We have previously observed that a single brief heat stress can induce the partial decay of nearly 25% of the Arabidopsis transcriptome within a few minutes (Merret et al., 2013). This process, which is critical for plant survival, mainly targets "growth and development" functions and is likely to contribute to the establishment of the new incoming "heat stress" program. Another unexplored possibility is that heat stress simultaneously alters the ability of these destabilized mRNAs to produce corresponding proteins by reducing their translation efficiency. Thus, heat stress could not only reduce the global abundance of specific mRNAs by targeting them for degradation, but also reduce their capacity to produce corresponding proteins by limiting their translation efficiency. In contrast, the translation

efficiency of pre-existing heat stress-responsive mRNAs could be favored under these conditions.

Recently, it has been shown that mRNAs associated with polysomes can undergo 5'-3' exonucleolytic decay in a process called mRNA co-translational decay (CTRD) (Pelechano et al., 2015). This process, first discovered in yeast (Hu et al., 2009) but conserved in mammals and plants, affects all transcripts (Pelechano et al., 2015; Yu et al., 2016; Carpentier et al., 2020; Guo et al., 2023). It proceeds by decapping polysomal mRNAs, producing a 5'-monophosphate (5'P) end. The exonuclease XRN1/XRN4 then degrades the mRNAs as they are translated, following the last ribosomes. 5'P sequencing (5'P-seq) is an approach that allows the capture and sequencing of mRNA presenting a free 5'-phosphate end and is therefore used to measure CTRD intensity (Carpentier et al., 2021; Zhang and Pelechano, 2021). A 3 nucleotide periodicity is observed for 5'P-seq reads (also called degradome reads), reflecting the protection provided by elongating ribosomes. There is also a general accumulation of reads 16-17 nucleotides upstream of stop codons due to translation termination, which is slower than elongation. As 5'P-seq can reveal ribosome footprints *in vivo*, it can also be used to assess ribosome dynamics at the initiation, elongation, and termination steps (Nersisyan et al., 2020; Carpentier et al., 2021; Zhang and Pelechano, 2021). The discovery of the CTRD process also means that the translation efficiency of a given mRNA is best measured as the ratio of its amount in polysomes divided by the number of molecules actively degraded by CTRD, rather than by its amount in polysomes alone (Carpentier et al., 2020). However, it is not yet clear whether CTRDs represent a new regulatory mechanism that could regulate translational output independently of the total amount of mRNA in polysomes and whether this process could contribute to priming and PSM.

The aim of this work is to evaluate the importance of translation and CTRD in the regulation of plant gene expression under two heat stress regimes with or without priming. We found that priming preserves the global translational potential of the plant and differentially affects the translational efficiency of stress and non-stress related genes. We also found that priming is essential for up-regulating the UPR pathway and protecting ER-associated mRNA from CTRD. Finally, we provide evidence that CTRD intensity is not simply a consequence of more or less association with polysomes but acts independently during heat stress to regulate the expression of more than a thousand genes.

Results

Effect of priming on plant global translation potential

Variations in polysome gradient profiles are often used as a proxy to assess the overall translational potential at different stages of development or environmental conditions (Chasse et al., 2017). In a first attempt to measure the effect of priming on the global translational potential of plants, we used polysome gradient profiles to assess polysome levels at different time points of two heat stress regimes, with and without a priming event (Figure 43A). The Short Acquired Thermotolerance (SAT) and Basal Thermotolerance (BT) heat stress regimes have previously been used to study the physiological effects of priming (Yeh et al., 2012). For the SAT regime (Figure 43A), Arabidopsis plants were grown in vitro for 5 days at 20°C and collected 3 hours after daylight, just before exposure to the 1-hour 37°C priming event (p1). Plants were also collected after 15 min at 37°C (p2), after 2 h recovery at 20°C (p3), after 15 min of the 30 min 44°C heat stress period (p4), and after 7.5 h recovery at 20°C (p5). For the BT regime (Figure 43A), plants were collected before the 30 min 44°C heat stress period (pA), after 15 min at 44°C (pB) and after 7.5 h recovery at 20°C (pC).

Plants at p5 and pC as well as control plants (i.e. always grown at 20°C) have the same global phenotype (Figure 43B and S4). However, as expected (Yeh et al., 2012), plants exposed to SAT have better long-term survival than plants exposed to BT (Figure 43B and S4). Four days after heat stress, cotyledons of plants exposed to BT are bleached, while plants exposed to SAT show only reduced growth compared to the control without any bleaching effects (Figure 43B and S4). Eight days after heat stress, most cotyledons of BT plants are dead, but a significant proportion of these plants can still recover (Figure 43B) and produce new leaves after ten days of recovery (Figure S4). These results indicate that Arabidopsis (Col0) can survive both heat stress regimes, but in contrasting ways.

Next, we generated polysome profiles using sucrose gradient sedimentation and OD_{254nm} measurement for each time point of SAT and BT and measured the proportion of polysomes at each time point compared to the 20°C condition (Figure 43A and C). As expected, heat stress induces a decrease in translational activity by dissociating polysomes from mRNA (Merret et al., 2015). Treatment at 37°C for 15 minutes (p2) induces a decrease in polysomes to about 25% of the amount present at 20°C. However, after two hours at 20°C (p3), plants can recover almost the total amount of polysomes present in the initial 20°C control condition.

Interestingly, when we compared polysomes present in plants exposed to 44°C for 15 min after priming at 37°C (p4, blue) or without priming (pB, red), we observed that polysome levels are significantly higher in the primed condition (Wilcoxon test, *p-value* < 0.05) (Figure 43C). This suggests that the 37°C priming step somehow protects the translational potential of the plant by limiting polysome dissociation at 44°C. However, the most striking effect is observed after 7.5 hours of recovery at 20°C. In the primed condition (p5, blue), polysomes are back to about 75% of the amount found in the 20°C control condition. However, this significant recovery is not observed in the non-primed condition (pC, red), as the polysome levels are still low and identical to the stressed 44°C condition (compare pB and pC). This result suggests that without priming, plants exposed to 44°C for 15 min cannot recover their translational potential after 7.5 h at 20°C and are probably still in a stressed state.

As described previously (Garre et al., 2018) we also used our 5'P-seq data (see Figure 45 and below) to monitor plant translation potential via SAT and BT (Figure 44). In the 5'P-seq meta-analysis an increased amount of protected fragments upstream of the start site and a decreased amount of the 16-17nt peak upstream of the stop sites are diagnostic of reduced translational potential (Garre et al., 2018). This is what is observed at 37°C (p2) with a return to an almost normal situation after 2 hours of recovery at 20°C (p3) (Figure 44A). At 44°C, a strong reduction in translation is observed for both situations (p4 and pB), with a slightly stronger effect for pB (Figure 44B). After 7.5h at 20°C without priming, translation is still mainly down (pC), but is functional again at p5, although at a lower level than the initial 20°C situation (Figure 44C). These 5'P-seq results are consistent with our polysome profile quantification data, confirming that priming has a strong positive effect on the overall translational potential of plants in response to severe heat stress.

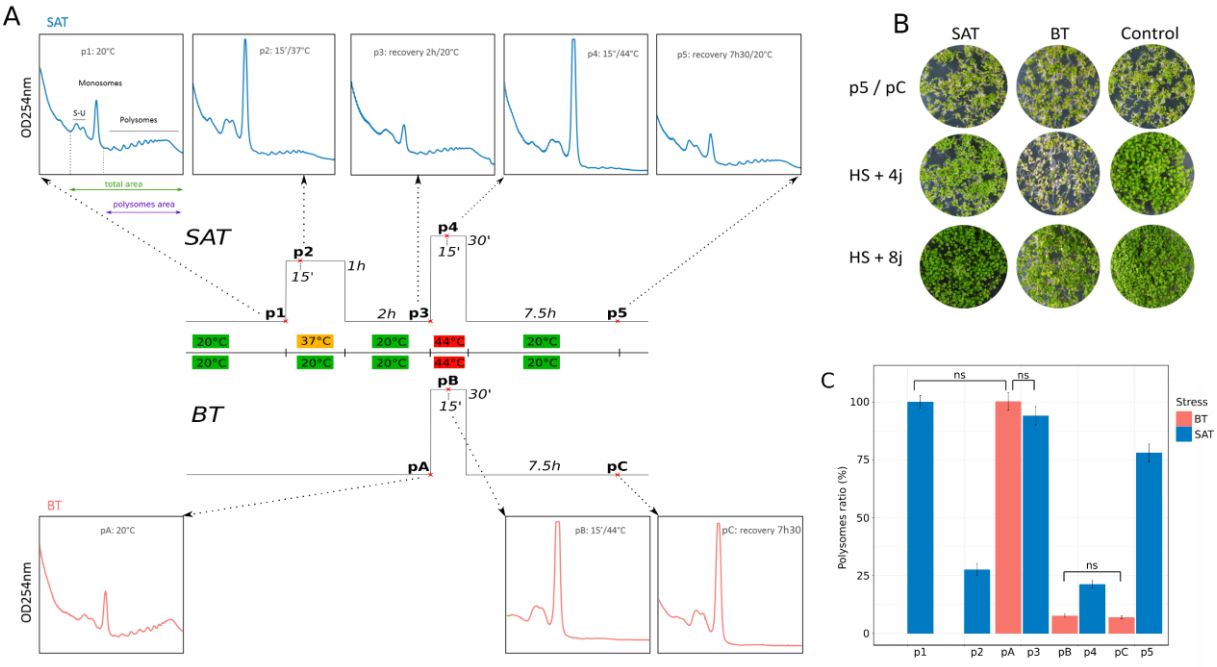


Figure 43. A 37°C priming step positively affects polysome levels at 44°C and during recovery. A) Scheme of SAT (Short-term Acquired Thermotolerance) and BT (Basal Thermotolerance) heat-stress regimes (Yeh et al., 2012). Plant samples were taken at different times during SAT (p1 to p5) and BT (pA to pC). B) Phenotype of seedlings after SAT or BT treatment at time point p5 and pC, four and eight days after heat stress compared to control (same time points for plants always maintained at 20°C). C) Estimation of the proportion of polysomes at the different time points of SAT and BT compared to the 20°C situation (arbitrarily fixed at 100%). At each time point, the amount of polysomes was normalized to the total amount of ribosomes (i.e. 40S, 60S monosomes and polysomes) and both values were estimated by measuring the corresponding area above the baseline in our sucrose gradient (see Figure S4A). Data are the mean of three biological replicates. All variations are significant (Wilcoxon test, *p-value* < 0.05) except where indicated.

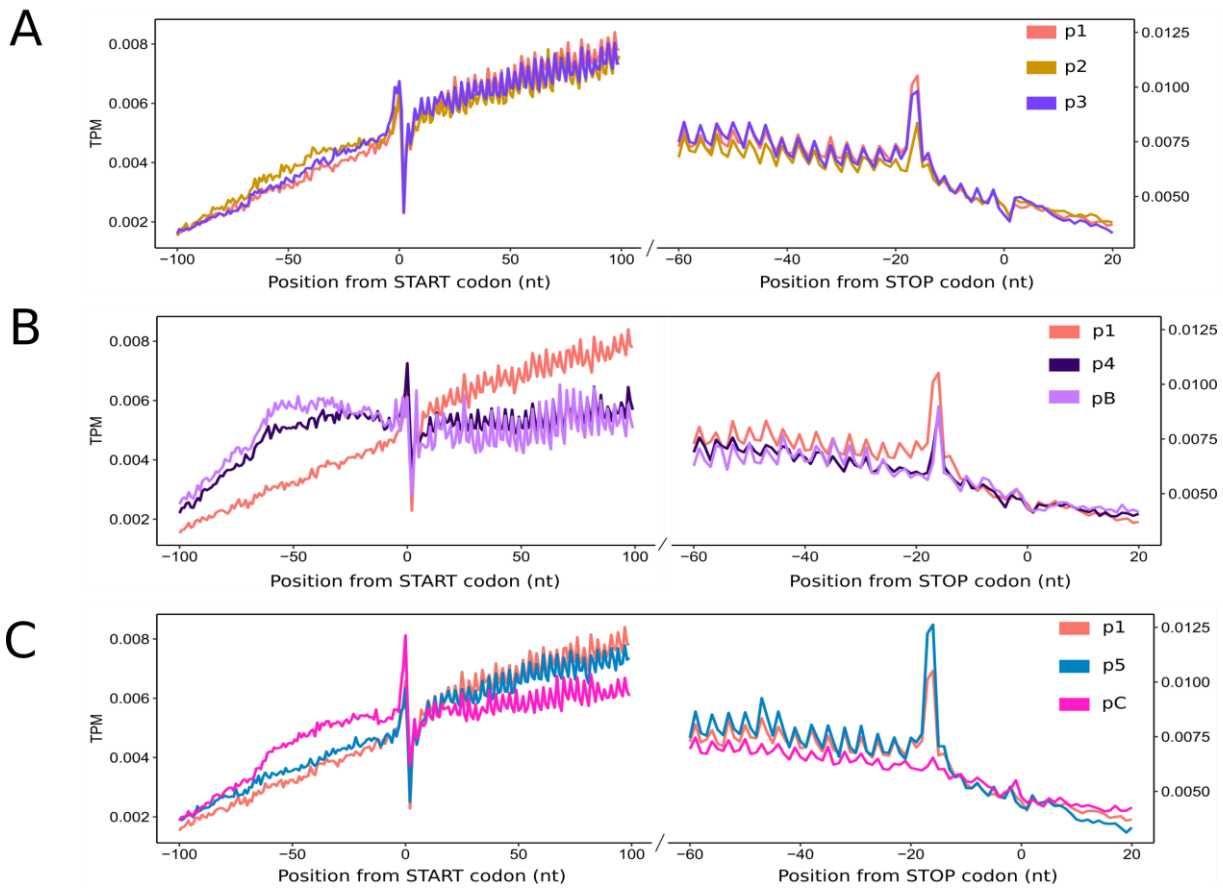


Figure 44. 5'PSeq meta-analysis confirms the positive impact of priming on general translation levels.

Meta-analysis of our 5'P-seq data. An increased amount of protected fragments upstream of the start site and a decreased amount of the 16-17nt peak upstream of the stop sites are diagnostic of a reduction in translation potential (Garre et al., 2018). A) This is what is observed at 37°C (p2) with a return to a near normal situation after 2h of recuperation at 20°C (p3). B) At 44°C a strong reduction of translation is observed for both situations (p4 and pB) with a slightly stronger effect for pB. C) Translation is still mainly down after 7.5h at 20°C without priming (pC) but is working again in p5 although at a lesser level than the 20°C initial situation. Globally the 5'P-seq results (A to C) confirm the polysome quantification data (Figure 43C).

Genome-wide analyses of the effect of priming on gene regulation: how important are polysome-related processes?

Next, we wanted to evaluate the importance of polysome-related processes (translation and CTRD) in the regulation of gene expression at different stages of SAT and BT heat stress. To this end, we performed a multiomics approach using a triple NGS strategy to analyze RNA samples collected at each SAT and BT time point (p1 to p5 and pA to pC) (see Figure S5 for a description of the experimental design and filtering strategy). We used an mRNA-seq approach to measure steady-state total mRNA levels, a polysomal mRNA-seq strategy to measure the global amount of mRNA associated with polysomes, and a degradome approach (i.e., 5'P-seq) to measure the amount of CTRD products (Figure 45A, in blue, green and red, respectively). A Principal Component Analysis (PCA) was used to evaluate the quality of replicates (Figure S6).

While most studies use polysomal mRNA-seq to assess translation efficiency (TE), the combination with a degradome provides a more realistic assessment of TE (Carpentier et al., 2020). Furthermore, the use of degradome data should allow us to determine whether CTRD represent an independent gene regulatory process or are merely a consequence of association with ribosomes.

In order to compare variations in the distribution of mRNAs produced by the same set of genes in SAT and BT, we decided to apply a filter to retain only those mRNAs that were present in at least 1 TPM (mean of replicates) in all conditions (p1 to p5 and pA to pC) (see Figures S5). Of these, 13123 genes were retained and used for further analysis (representing 50.3% of the total Arabidopsis genes number). GO analysis of these 13123 genes revealed that they are enriched in general functions involved in development and growth (i.e. major GO/Molecular Function terms: catalytic activity 10^{E-104}, structural molecule activity 10^{E-52}, structural component of ribosomes 10^{E-34}; major GO/Biological Process terms: Metabolic process 10^{E-112}, Cellular component organization 10^{E-88}). This is to be expected in such a meta-analysis, as stress-responsive genes are in minority compared to other non-stress-responsive functions, and some stress-responsive genes will be filtered out of our gene set because they are not present at least at 1 TPM in all conditions.

Using these 13123 mRNAs, we performed a meta-analysis of their distribution compared to control distributions at 20°C (Figure 45A). This allowed us to measure variations in the

distribution of total mRNAs, polysome-associated mRNAs and co-translational degradation products, thought to be SAT and BT. The specific effect of priming was also evaluated.

After 15 min exposure at 37°C (p2), there is a general tendency for a rapid decrease in the steady-state global mRNA level compared to the 20°C condition. As previously reported, this decrease is probably due to a general increase in global mRNA decay during heat stress, mainly targeting general functions involved in development and growth (Merret et al., 2013). We also observed a corresponding reduction in polysome-associated mRNAs and a smaller reduction in CTRD products, leading to a reduced TE level (Figure 45B, p1 vs. p2). This result shows for the first time that the previously observed decay at 37°C of a significant proportion of mRNAs (mainly involved in development and growth) is likely to correlate with a global reduction in their translational efficiency. Interestingly, after two hours of recovery at 20°C (p3), global and polysome-associated mRNA levels are almost back to their initial levels, while the rate of CTRD remains low. These results challenge the idea that CTRD is a passive mechanism that simply follows the rate of binding to polysomes and support the hypothesis that CTRD is an active/independent regulatory mechanism. Indeed, under these conditions, keeping the CTRD low while increasing the level of polysome-associated mRNA is a way to increase TE to even higher levels than in the initial 20°C situation (see p3 in Figure 45B, compare p1 to p3).

At 44°C, as at 37°C, a general reduction is observed for the three distributions in the unprimed (pB, light colors) and primed (p4, dark colors) conditions (Figure 45A). At this temperature, the strongest effect of priming is observed for polysome-associated mRNAs, whose level is lower compared to the unprimed condition (Wilcoxon test, *p-value* < 0.001), while the opposite is true for CTRD (Wilcoxon test, *p-value* < 0.001). Priming therefore has an effect by lowering the TE of our gene set at 44°C, a regulation that is less efficient without the priming step (Figure 45B, compare p1 to p4 and p1 to pB). After 7.5 hours of recovery at 20°C, the effect of priming (p5, dark colors) is very strong (Figure 45A). In the primed SAT regime, global and polysome-associated mRNA as well as CTRD are up, resulting in a TE almost back to the initial 20°C condition (p5 in Figure 45B). In the unprimed BT regime (pC, light colors), global and polysome-associated mRNA levels are still down (almost identical to the 44°C situation), while CTRD increases, leading to a decrease in TE (pC, Figure 45B). Again, polysomal mRNA levels and CTRD variations are anticorrelated, supporting the hypothesis that both processes could operate independently. We conclude that priming has a significant effect on gene expression,

in part by decreasing the TE of our gene set (mainly non-stress related genes) at 44°C and increasing it during the recovery period.

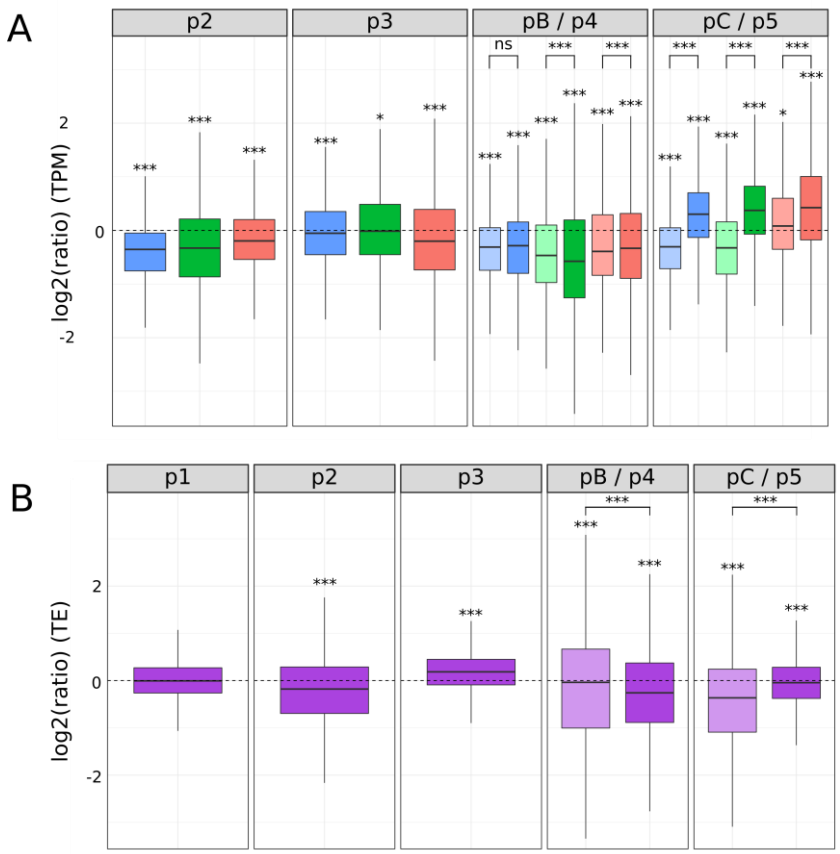


Figure 45. Variation in the distribution of total mRNAs, polysome-associated mRNAs, co-translational degradation products and translation efficiency levels at different time points of the SAT and BT heat stress regimes. A) Distribution (log2 (TPM ratio)) of a set of 13123 gene products present in at least 1 TPM (mean of three replicates) in all conditions (p1 to p5 and pA to pC) at different SAT and BT time points compared to the p1 situation (log2(TPM ratio) = 0). The distribution of total mRNAs is shown in blue, polysome-associated mRNAs in green and CTRD products in red. For p4/pB (44°C) and p5/pC (20°C recovery), light colored box plots represent unprimed conditions (pB and pC) and dark colored box plots represent primed conditions (p4 and p5). A Kolmogorov test was used to determine whether the distributions differ from 0 (stars above each distribution). A Wilcoxon test was used to compare primed and unprimed distributions (brackets above distribution pair) (* = p-value < 0.05, ** = p-value < 0.01, *** = p-value < 0.001). B) Variation in translation efficiency (polysomal mRNAs divided by degradation products) for the set of 13124 genes used in A at different SAT and BT time points compared to the p1 situation. A Wilcoxon test was used to compare P1 with the other distributions (stars above distributions) and to compare primed and non-primed distributions (brackets above distribution pair) (* = p-value < 0.05, ** = p-value < 0.01, *** = p-value < 0.001).

Effect of priming on heat stress-responsive genes

Another way in which priming could affect gene expression is by affecting the global composition of heat-inducible mRNAs that are up-regulated at 44°C. To test this, we first selected from our 13123 mRNAs in Figure 45 those that have a higher global steady-state level at 44°C (compared to the 20°C control condition) in a primed (N=730) or unprimed (N=197) regime. Surprisingly, a Venn diagram revealed that only 108 of these mRNAs are common to the primed and unprimed conditions (Figure 46A), demonstrating that the priming step has a very strong influence on the composition of heat-inducible mRNA populations following a 15-min exposure to 44°C. GO analysis of these common mRNAs identified "response to temperature stimulus" (GO: 0009266 P-value 7.28 10^{E-38}) and "response to heat" (GO: 0009408, P-value 5.46 10^{E-37}) as the most statistically supported GO terms. A closer look revealed that mRNAs of genes involved in the cytosolic protein response (CPR), a subcomponent of the general heat stress response (Sugio et al., 2009), were particularly enriched in this group (including HSP101, cytosolic HSP70s, HSP90s and HSP20s-like; see Supplementary Table 4). The CPR, as the unfolded protein response (UPR) occurring in the endoplasmic reticulum (ER), is induced by the accumulation of misfolded proteins in the cytosolic compartment and regulates protein folding and degradation, especially after stress.

A similar GO analysis, this time on the 621 genes whose mRNAs specifically accumulate after priming, revealed that "protein folding" (GO:0006457, P-value 8.38 10^{E-17}) and "response to endoplasmic reticulum stress" (GO:0034976, P-value 9.73 10^{E-14}) are the most statistically supported GO terms. Major UPR players such as key regulators (AtbZIP60; ANAC089), key chaperones (BIP1 and 2, CALNEXIN 1 and 2, SHEPERD) and key members of the ERAD system (HRD1, DERLIN-1, CDC48 and UBPC6) are found in this group (Supplementary Table 5). This result suggests that 15 min of 44°C stress can induce the general and CPR heat stress response, at least at the global mRNA level, but that a previous 37°C priming event is required to additionally induce the UPR response.

GO analysis of the 89 genes whose mRNAs specifically accumulate without priming shows that "response to decreased oxygen levels" (GO:0036294, P-value 2.93 10^{E-11}) and "response to stress" (GO:006950, P-value 1.14 10^{E-10}) are among the most supported terms (Supplementary Table 6). Note that only two of these 89 genes can be directly associated with heat stress, suggesting that the 44°C stress, without priming, increases the range of stress-related genes induced.

We next decided to determine whether or not the observed increase in global mRNA levels at 44°C in SAT and BT was correlated with a corresponding increase in translational efficiency. For the 621 mRNAs whose accumulation is dependent on a priming event, the increase in steady-state mRNA levels at 44°C is associated with an increase in polysome-associated mRNAs and degradome fragments (p4, Figure 46B), leading to a small but significant (Wilcoxon test, *p-value* < 0.05) global increase in TE compared to the 20°C situation (Figure 46C, compare p1 to p4). This is in sharp contrast to the situation of non-stress-related genes, whose steady-state levels and translational efficiency are both downregulated at 44°C (Figure 45A). We then focused on this subset of mRNAs throughout the SAT (Figure 46B). Surprisingly, we observed that in contrast to the 44°C situation (p4), these mRNAs do not show an increase in steady state mRNA levels at 37°C (p2). However, they show a strong increase in TE (Figure 46C, compare p1 to p2), which is mainly due to a strong increase in mRNA polysome association without a corresponding increase in co-translational degradation products (p2, Figure 46B). Therefore, the up regulation of these genes at 37°C is only due to positive regulation at the translational level, a situation not detectable by simple transcriptomic analysis. This situation also illustrates again that CTRD is not the simple consequence of being associated with polysomes, since in this case the increase in polysomal mRNA does not lead to an increase in CTRD products. In the first recovery period (p3), all three distributions are up with a TE back to the initial 20°C situation (Figure 46B and C). The strong increase in steady-state mRNA levels observed in this first recovery period (p3) is likely due to positive feedback from at least some of the mRNAs that were massively involved in polysomes at 37°C (P2) (Figure 46B). In the final recovery period (7.5 h at 20°C, P5), all three distributions are still up, but TE is back to its initial level (p1), probably as the plants gradually switch from stress to a more balanced genetic program.

In contrast to the 621 mRNAs, the 108 mRNAs that globally accumulate to a higher level at 44°C in the SAT and BT regime (Figure 46D, pB/p4) do the same at 37°C (Figure 46D, p2). Furthermore, the TE level of these genes is increased at all stages of SAT and BT, with a higher increase in the unprimed (BT) compared to the primed (SAT) condition (Figure 46E). This higher increase in TE in the unprimed condition is mainly due to a lower level of CTRD degradation fragments compared to the primed condition at 44°C (pB/p4) and during the recovery period (pC/p5) (Figure 46D).

Finally, looking at the 89 mRNAs whose accumulation only occurs at 44°C in the BT regime (without priming), we observed an increase in TE (pB in Figure 46G), mainly due to a strong increase in the association of mRNAs in polysomes combined with the stability of the degradome fragments (pB in Figure 46F). During the recovery period (pC), the TE of these genes are still increased compared to the initial situation at 20°C (Figure 46G).

We conclude that the increase in global mRNA levels observed at 44°C in either SAT or BT is associated with an increase in TE, which is likely to lead to an increase in the production of corresponding heat stress responsive proteins.

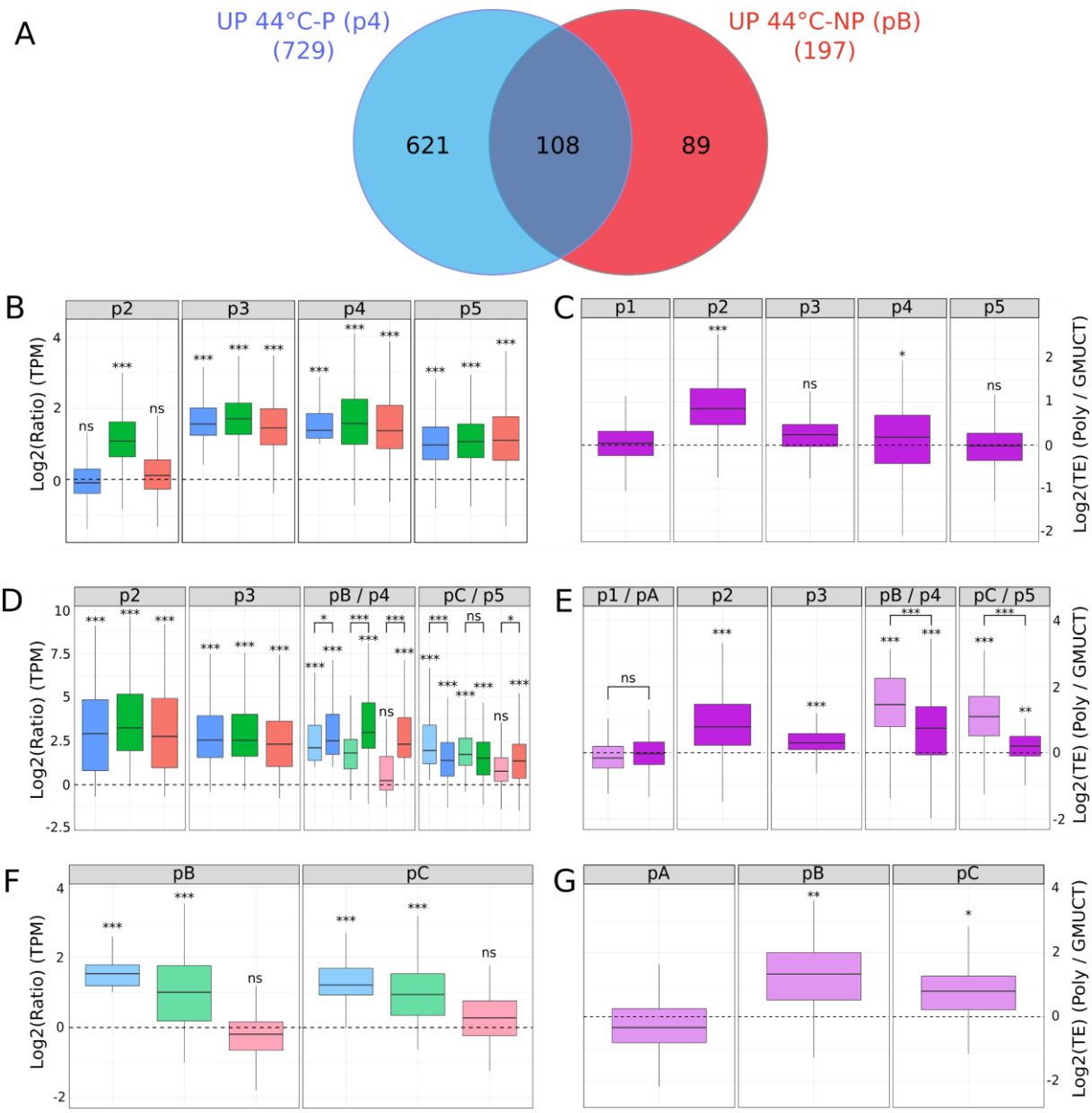


Figure 46. Effect of a 37°C priming step on mRNA populations and translation efficiency levels after 15 minutes of 44°C exposure. A) Venn diagram showing the number of mRNAs whose steady-state level is increased at 44°C after priming (p4), without priming (pB) and at the intersection of the two conditions. Only mRNAs with at least 1 TPM in all SAT and BT points were considered as starting material (see Figure S5). B) Distribution (log2(TPM ratio)) of a set of 621 mRNAs (only at 44°C after priming) at different SAT time points compared to the p1 situation (log2(TPM ratio) = 0). C) Boxplots showing the variation in translation efficiency (TE) of the 621 mRNAs during SAT (compared to p1). D) Distribution (log2(TPM ratio)) of a set of 108 mRNAs (up to 44°C with or without priming) at different SAT (dark colors) or BT (light colors) time points compared to the p1 situation (log2(TPM ratio) = 0). E) Box plots showing the variation of TE (compared to p1) of the 108 mRNAs during SAT and BT. F) Distribution (log2(TPM ratio)) of a set of 89 mRNAs (only up to 44°C without priming) at different BT time points compared to the p1 situation (log2(TPM ratio) = 0). G) Boxplots showing the variation in TE (compared to p1) of the 89 mRNAs throughout the BT regime. The distribution of total mRNAs is shown in blue, polysome-associated mRNAs in green and CTRD products in red. For B, D and F, A Kolmogorov test was used to determine whether the distributions differ from 0 (stars above each distribution), and a Wilcoxon test was used to compare primed and unprimed distributions (brackets above distribution pairs in D). For C, E and G, a Wilcoxon test was used to compare p1 with other distributions (stars above distributions) and to compare primed and unprimed distributions (brackets above distribution pairs in D). In all cases, p1 was used as the reference, as p1 and pA were compared and found to be equivalent (E). * = p-value < 0.05, ** = p-value < 0.01, *** = p-value < 0.001.

Co-translational decay regulates different subsets of transcripts through heat stress and recovery.

Since we observed that CTRD does not necessarily correlate with mRNA levels in polysomes (Figures 45 and 46), we wondered to what extent CTRD could be used as a major mechanism to regulate gene expression in our two heat stress regimes. To answer this question, we applied a new filter to our initial mRNA set (N=13123), retaining only those mRNAs whose steady-state levels do not vary significantly during SAT and BT. This dataset (N=7929) was further subdivided into a new dataset, which we named CTRD-DB. To obtain the CTRD-DB, we first removed all transcripts that were differentially regulated in the polysomal mRNA database in at least one point of SAT and BT (i.e., 3929 transcripts). From the remaining 4000 transcripts, we kept only those whose abundance in the degradome database was significantly altered (compared to the 20°C control) in at least one SAT or BT step (p2 to p5 and/or pB to pC). We considered the resulting 1126 transcripts that make up the CTRD-DB to be the main targets of the CTRD pathway, as their levels vary significantly only in the degradome database during SAT and BT (see Figure S5).

Using the CTRD-DB, we generated a heat map to visualize how these mRNA clusters and their CTRD levels vary during SAT and BT (Figure 47A). We found three significant clusters that were differentially regulated by CTRD. Cluster 1 mRNAs (N=602) are mainly degraded by CTRD during the 7.5 h recovery period, more so in SAT (p5) compared to BT (pC), while they are mostly preserved from CTRD at 44°C (pB/p4). GO analysis revealed an enrichment in this cluster for genes whose end products are localized in chloroplasts (GO: 0009507, 8.64 10^{E-54}) and involved in small molecule metabolism (GO: 0044281, 4.68 10^{E-27}). Cluster 2 mRNAs (N=223) are preferentially targeted by CTRD at 37°C but not at 44°C. GO analysis again revealed an enrichment for genes whose end products are localized in chloroplasts (GO: 0009507, 1.24 10^{E-49}) and are involved in the generation of precursor metabolites and energy (GO: 0006091, 5.62 10^{E-19}).

Cluster 4 is particularly interesting as it shows a clear difference in CTRD targeting at 44°C between SAT and BT (Figure 47A). Indeed, cluster 4 contains 259 transcripts that are actively targeted by CTRD at 44°C in the BT regime (without priming) but not in the SAT regime (with priming) (compare cluster 4, pB and p4). GO analysis revealed that cluster 4 gene products are mainly localized in the endomembrane system (GO:0012505 endomembrane system, P-value 1.02 10^{E-18}) and more specifically in the endoplasmic reticulum (GO:0005783, P-value

7.93 10^{E-16}). A boxplot analysis of these 259 mRNAs confirms that they are degraded much more in BT than in SAT at 44°C (Figure 47B).

Previous work in human and mouse cell lines, as well as in Arabidopsis, has established a clear link between severe heat stress and early elongation ribosome pausing (when the nascent peptide emerges from the ribosomal exit tunnel), especially when this peptide is hydrophobic (Liu et al., 2013; Shalgi et al., 2013; Merret et al., 2015). This pause is likely due to the redistribution of HSP70 chaperones away from ribosomes during heat stress, as it can be alleviated by overexpressing HSP70 or exacerbated by HSP70 inhibitors (Liu et al., 2013; Shalgi et al., 2013; Merret et al., 2015). Hydrophobic nascent peptides are more dependent on HSP70s for proper folding and are therefore more affected by this pausing step. Since ribosome pausing is associated with the induction of CTRD and cluster 4 mRNAs are major targets of CTRD after severe heat stress in the absence of priming (Figure 47A), we decided to determine the hydrophobicity (Figure 47D) and HSP70 affinity scores (Figure 47E) of cluster 4 N-terminal peptides. We observed that cluster 4 genes encode highly hydrophobic nascent peptides with high HSP70 scores (Figure 47D, E). This result suggests that the high hydrophobicity of cluster 4 nascent peptides and their high requirement for HSP70s is probably the reason why they are preferential targets of CTRD at 44°C in the BT regime. But why does priming in the SAT regime prevent this? We have shown in this study that priming is necessary to induce the UPR response at 44°C, including the upregulation of ER-specific HSP70s (Bip1 and Bip2) (Figure 46, Table S5). This increase in ER-specific HSP70s could limit ribosome pausing, explaining why CTRD is alleviated in the SAT regime for cluster 4 mRNAs. This conclusion is supported by Western blot analysis showing that XRN4, the major CTRD enzyme (Merret et al., 2015), localizes more efficiently to polysomes at 44°C in BT compared to SAT (Figure 46F and G).

Finally, we decided to see if this finding using cluster 4 genes could be generalized to all mRNAs in our initial dataset (N=13123) that are annotated as being translated in the RE (N= 944). We observed that indeed all RE translated mRNAs are more efficiently targeted by CTRD in BT compared to SAT (Figure 47C). This suggests that although cluster 4 mRNAs are major targets of CTRD during BT, most mRNAs translated in the RE are likely to be at least partially regulated by CTRD in the same heat stress regime.

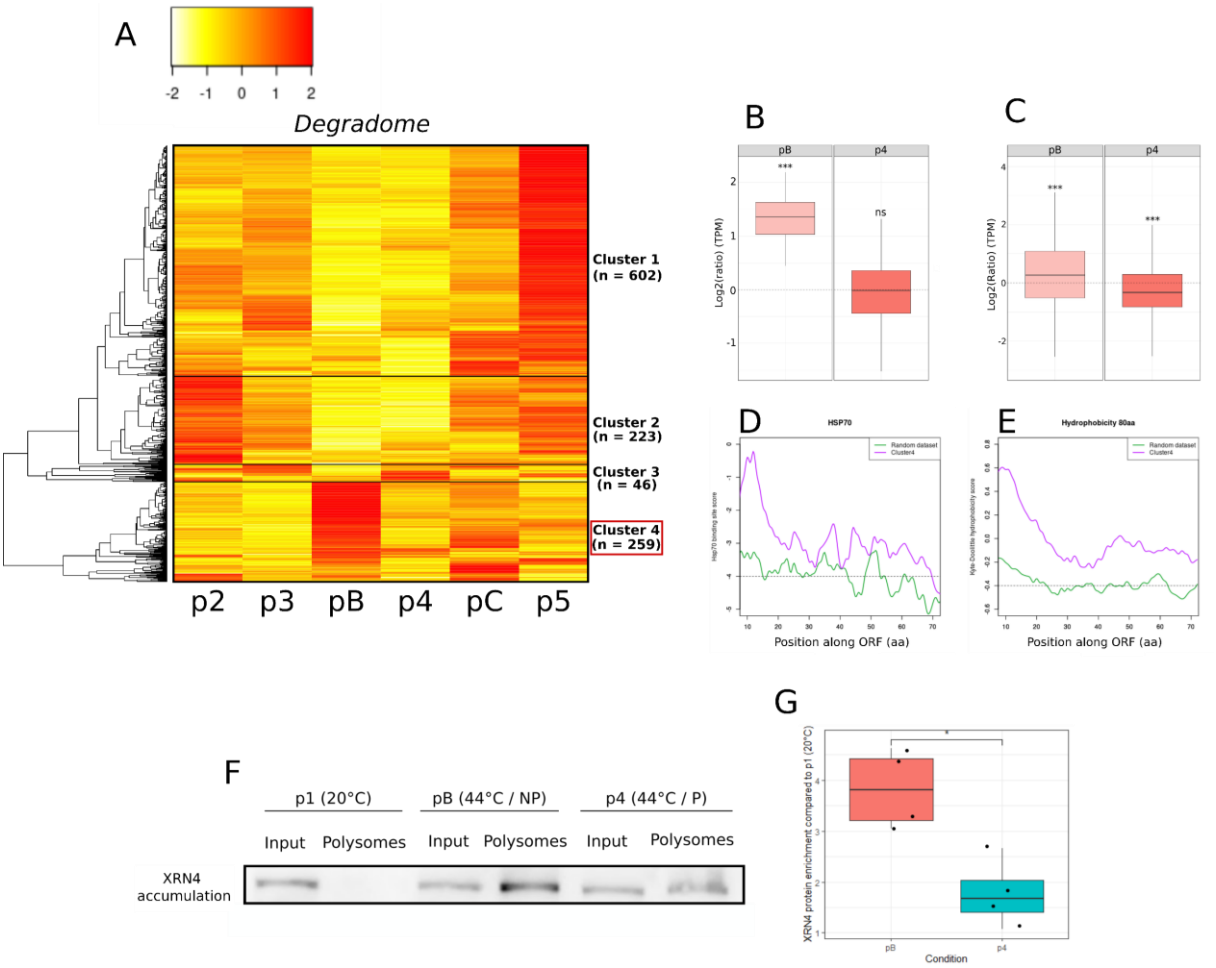


Figure 47. Co-translational decay regulates different subsets of transcripts through heat stress and recovery. A) Heat map of CTRD levels (n = 1126) at different stages of SAT and BT stress. Data are normalized to 20°C, red and yellow correspond to higher and lower CTRD levels, respectively, compared to the 20°C situation. B) Box plots showing the distribution of CTRD fragments of mRNAs from cluster 4 at 44°C in BT (pB) and SAT (p4). C) Boxplots showing the distribution of CTRD fragments of all mRNAs associated with the GO term "endoplasmic reticulum" (n = 944). D) Hydrophobicity scores of nascent peptides (10 to 70 aa) predicted for cluster 4 mRNAs and a control data set consisting of 259 randomly selected mRNAs. T-test was used to determine significant variations between two sets of genes (p-value = 2.64e-24) E) HSP70 binding score of nascent peptides (10 to 70 aa) predicted for cluster 4 mRNAs and a control data set composed of 259 randomly selected mRNAs. T-test was used to determine significant variation between two sets of genes (p-value = 3.19e-15). F) XRN4 enrichment in polysome fractions at 44°C in SAT and BT. G) Box plot showing the values for the 4 replicates of XRN4 enrichment (Western blot). A Wilcoxon test was used to assess the significance of the difference (* : p-value < 0.05).

Discussion

Thermotolerance (also known as priming) is a well-known phenomenon first discovered more than 40 years ago and defined as the ability of a mild heat shock treatment to protect cultured human cells from a more severe one (Gerner and Schneider, 1975). Mild heat shock has been shown in various animal cell culture systems to be important for the induction of HSP70 chaperones (Lindquist, 1981) and the stimulation of translation under severe heat shock conditions (Lindquist, 1980), two important features of thermotolerance. More recently, in mouse cells, pre-treatment with mild heat stress has been shown to limit the ribosome pausing effect induced by more severe heat stress (Shalgi et al., 2013). Thermotolerance is also well studied in plants, particularly the transcriptional regulation of heat shock proteins and their impact on plant survival (Martinez-Medina et al., 2016; Mauch-Mani et al., 2017; Charng et al., 2023). In this work, we used a multiomics approach with a three-pronged NGS strategy to investigate the role of polysome-related processes (translation and co-translational decay) in the acquisition of plant thermotolerance. First, using polysome gradient quantification and meta-analysis of 5P-seq data, we show that priming has a small positive effect on global translation in plants at 44°C, but a much stronger effect in the early recovery period (Figure 43 and 44). This priming-dependent spectacular rescue of plant translation potential only 7.5 h after severe heat stress was unexpected and is likely to be involved in the better long-term survival of plants exposed to SAT compared to BT. Indeed, the early increase in translation potential (almost to its 20°C level) is likely to be the key to restoring the growth and development program in SAT plants. This "solution" is not available to BT plants, which at the same time still have a very low translation potential (identical to the 44°C condition).

To further elucidate the importance of polysome-related processes in the regulation of gene expression, we generated transcriptome, translatome and degradome databases at all stages of the SAT and BT heat stress regimes. We started with a large dataset of genes that produce mRNAs that are present in at least 1 TPM at all SAT and BT steps (N=13123). This allowed us to monitor the regulatory behavior of ubiquitously expressed, mainly non-stress-related genes at the 5-day seedling development stage. As expected, we found that the steady-state level of these mRNAs decreases at 37°C, reflecting the decay process previously described under these conditions (Merret et al., 2013). We show here for the first time that this decrease in steady-state mRNA levels is associated with a significant decrease in translational efficiency (Figure 45). We suggest that down-regulation of these mRNAs at the translational level, rather than simply reducing their levels by decay, is important to switch from the "growth and development" to the "heat stress" program within minutes of exposure to 37°C. At 44°C,

translation efficiency is again reduced, with a stronger effect for SAT than for BT, but the strongest effect of priming is in the recovery period, where translation efficiency can return almost to its 20°C level, a situation not observed for BT (Figure 45). In the SAT regime, the rescue of translation efficiency observed in our mRNA dataset, combined with the strong overall increase in plant translation potential at this stage (Figure 43 and 44), is likely to be important for restarting the "growth and development" program.

We next used the same strategy, but this time focusing on ubiquitously expressed genes whose steady-state level is significantly increased at 44°C in the SAT and/or BT. In contrast to the situation described above, these 44°C heat stress-inducible mRNAs (N=818) are not degraded at 37°C and show a clear increase in translation efficiency (and not a decrease as seen for non-stress-related genes). An increase in translation efficiency is also observed at 44°C, in combination with the observed increase in their global mRNA abundance. These results again point to a significant contribution of translation in positively regulating the onset of the heat stress response. However, the mechanism by which translation efficiency is increased is not equivalent for mRNAs up-regulated at 44°C only in the SAT regime (N=621) compared to those regulated only by BT (N=89) or by both regimes (N=108) (Figure 46A). Surprisingly, mRNAs up-regulated at 44°C only in the SAT regime are not up-regulated at 37°C in the transcriptomic database (Figure 46B). Nevertheless, the translational efficiency of these mRNAs is strongly enhanced due to their increased presence in the polysome without a corresponding increase in the corresponding degradation fragments (p2 in Figure 46B). Thus, this population of mRNAs is only up regulated at the translational level after a single 37°C exposure, a regulation that is not detectable by transcriptomic analysis. This 37°C translational up-regulation is likely to affect subsequent steps, as these mRNAs have increased steady-state levels in the first 20°C recovery period (p3) and through the SAT. We conclude from these analyses (Figures 45 and 46) that translation is an important regulatory step that contributes to the establishment of plant thermotolerance.

GO analysis of the 621 mRNAs that require priming for induction at 44°C revealed that they include a large proportion of genes involved in the UPR pathway (Howell, 2021) (Table S5). This contrasts with the 108 mRNAs upregulated in both SAT and BT, which consist mainly of general heat stress genes and, more specifically, genes involved in the CPR pathway (Sugio et al., 2009) (Table S4). This result suggests that the upregulation of the UPR in acute heat stress is dependent on a previous priming event, which is not the case for CPR. This is an

unexpected consequence of priming that has not been previously documented and is likely to contribute to the thermotolerance property of the plant.

In this work, as previously recommended, we used a ratio between the translatome and degradome databases to better estimate translation efficiency (Carpentier et al., 2020). In addition, this allowed us to test whether the accumulation of CTRD fragments always correlated with the amount of mRNAs measured in polysomes. In many cases we observed a clear anticorrelation between the amount of mRNAs detected in polysomes and the accumulation of the corresponding CTRD fragments (the most obvious situations are Figure 45A, p2, p3, pC; Figure 46B, p2; Figure 46D, pB, pC; Figure 46F, pB, pC). These observations suggest that CTRD is not simply a neutral consequence of the presence of mRNAs in polysomes but could be used as an independent mechanism to regulate gene expression. In support of this proposition, we found that 1126 transcripts vary only in the degradome database in SAT and/or BT (Figure 47), suggesting that these mRNAs are exclusively regulated by CTRD in our experimental setting. Among these preferential targets of CTRD, we found a group of mRNAs (Figure 47, cluster 4) that are predominantly translated in the ER. These mRNAs are targeted by CTRD at 44°C in BT but not in SAT (Figures 47A and B). We propose that this difference between SAT and BT results from the inability to induce the UPR pathway in BT and to increase the amount of HSP70s (BIPs) chaperones in the ER (see above). Indeed, cluster 4 mRNAs encode proteins with highly hydrophobic nascent peptides that require HSP70s for folding (Figures 47D and E). In the SAT regime, the increased concentration of BIPs in the ER due to UPR induction helps to fold these hydrophobic nascent peptides, preventing ribosome pausing and the induction of CTRD for these messages (Liu et al., 2013; Shalgi et al., 2013; Merret et al., 2015). This cannot occur in BT because the UPR pathway is not stimulated in this condition, leading to a higher level of CTRD. We also observed that the situation described for cluster 4 mRNAs, which are likely to be regulated only by CTRD in SAT/BT (N=259), can be extended to all mRNAs translated in the RE (N= 944) (Figure 47C). In support of this model, we observed that XRN4, the major enzyme responsible for CTRD (Merret et al., 2015), is present at higher levels in the BT polysome at 44°C compared to SAT (Figure 47F and G).

In conclusion, we show here that polysome-related processes (translation and CTRD) are important to regulate gene expression after heat stress with or without a priming event. We observed that induction of the UPR in acute heat stress requires a previous priming event at a milder temperature and that in the absence of priming, ER-translated mRNAs become

preferential targets of CTRD. Finally, we present evidence that CTRD should be considered as a novel gene regulatory mechanism that does not necessarily correlate with mRNA polysome association.

Methods

Plant material, growth conditions and heat stress

In all experiments, the wild-type Columbia ecotype was used. Plants were grown *in vitro* for 5 days on synthetic Murashige and Skoog (MS) medium (MS0213, Duchefa) containing 1% sucrose and 0.8% plant agar at 20°C under a 16h light (120 µmol.m-2.s-1)/8h dark cycle. Heat stress was applied in a water bath. For SAT, plates were transferred from the *in vitro* chamber to the water bath for 1 hour at 37°C, then transferred back to the chamber for 2 hours before returning to the water bath for 30 minutes at 44°C. Plates were then returned to the chamber for recovery. For BT, plants were transferred directly from the chamber to the water bath for 30 minutes at 44°C and then returned to the chamber for recovery. The different heat stresses were carried out in the dark and recovery was carried out under the same conditions as initial growth.

Polysome gradients

Polysome profiling was performed as previously described (Merret et al., 2013). For polysome quantification, 100 mg ground powder (5-day-old seedlings) was incubated for 10 min on ice with 3 volumes of lysis buffer (200 mM Tris-HCl, pH: 9, 200 mM KCl, 25 mM EGTA, 35 mM MgCl2, 1% [v/v] detergent mixture [1% {v/v} Tween 20, 1% {v/v} Triton, 1% {w/v} Brij35 and 1% {v/v} Igepal], 1% [w/v] sodium deoxycholate, 0. 5% [w/v] polyoxyethylene tridecyl ether, 5 mM dithiothreitol, 50 µg mL-1 cycloheximide, 50 µg mL-1 chloramphenicol and 1% [v/v] protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich]). The extract was centrifuged at 16,000g for 10 min, and 300 µL of the supernatant was loaded onto 9 mL 15-60% sucrose gradients. Ultracentrifugation was performed at 38,000 rpm (180,000g) for 3 hours using an SW41 rotor. Polysome profiles were recorded using an ISCO absorbance detector at 254nm and sucrose gradients were collected in 12 fractions of 650µL each: fractions 1-4 containing free mRNPs, fractions 5-8 containing ribosomal subunits and monosomes and fractions 9-12 containing polysomes. Absorbance at 254 nm was recorded using PeakTrack software and polysome profiles were plotted using Excel. The total amount of ribosomes was evaluated by measuring the area between the 40S, 60S, monosomes and polysomes profile and the basal lines, while the number of polysomes was evaluated by measuring the area on the polysome part of the profile only. The ratio of polysomes to total ribosomes at 20°C was arbitrarily set to 100%. Values represent the mean of three biological replicates.

For polysomal RNA extraction, 400 mg of ground powder (5-day seedlings) was used, following the same procedure as described above for purification of polysome fractions. The polysome fractions were pooled and SDS and EDTA were added to a final concentration of 0.1% and 4mM respectively. One volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) was then added, the solution vortexed for 1 minute and centrifuged at 16,000g for 15 minutes. The phenolic phase was retained and one volume of chloroform/isoamyl alcohol (25:1) was added, the solution was vortexed for one minute and centrifuged at 16,000g for 15 minutes. The phenolic phase was retained and 2 volumes of 100% ethanol were added, followed by centrifugation at 16,000g for 15 minutes. All centrifugations were performed at room temperature to avoid sucrose precipitation. The pellets were washed twice with 70% ethanol and resuspended in 30 µL of cold RNAse-free water.

Total RNA extraction and NGS librairies

For total RNA extraction, 50 mg of ground powder (5 day seedlings) was used. One volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) was added, the solution was vortexed for one minute and centrifuged at 16,000g for 15 minutes. The phenolic phase was retained and one volume of chloroform/isoamyl alcohol (25:1) was added, the solution was vortexed for one minute and centrifuged at 16,000g for 15 minutes. The phenolic phase was retained and 2 volumes of 100% ethanol were added followed by centrifugation at 16,000g for 15 minutes. The pellets were washed twice with 70% ethanol and resuspended in 50 µL of cold RNAse-free water.

All NGS experiments were performed in biological triplicates (i.e. different batches of plantlets collected and stressed at 1-week intervals), either on total RNA fractions or on polysomal RNA fractions (see above). All purified RNA extracts were DNAse treated using the Ambion Turbo DNAse Kit (Life technology). Quantities and quality of RNA were assessed using the Qubit Agilent 2100 Bioanalyzer and Plant RNA Nano Chip, respectively.

For RNA-Seq (total and polysomal), 1 µg of RNA was used for RNA library preparation using either total or polysomal RNA. Libraries were prepared using a NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module and a NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New Enlgand Biolabs, #E7760S/L).

The 5P-seq libraries were prepared as described previously (Carpentier et al., 2021). Briefly, 50 µg of total RNA was subjected to two rounds of poly(A+) purification. After ligation of 5' adaptors, excess adaptors were removed by a new round of poly(A+) purification. Reverse transcription was performed using the SuperScript IV system according to the manufacturer's instructions. cDNAs were amplified by 11 cycles of PCR. Libraries were purified using SPRIselect beads prior to quality control and normalization. Library quality was checked using an Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent). Libraries were normalized, multiplexed and sequenced on NextSeq 550 (Illumina) in 75 pb single reads.

Statistical analyses

All data presented were tested for normality using the Shapiro test. Depending on the result, a parametric (t-test) or non-parametric (Wilcoxon test) test was used to compare significance between conditions. For the quantification of polysome profiles (Figure 43C), t-tests were performed to test for significant differences between conditions. For Figure 44, two-sample Kolmogorov-Smirnov tests were used to compare distributions against 20°C and non-parametric Wilcoxon tests were used to compare distributions between primed and non-primed conditions (pB vs. p4 and pC vs. p5). All tests were performed using RStudio software.

Bioinformatic analysis

Raw reads were trimmed using Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014). For RNA-Seq data, adapters and low-quality reads were removed. For 5'PSeq data, reads were trimmed to 50nt. Trimmed reads were filtered from reads corresponding to chloroplast, mitochondrial, ribosomal and small RNA sequences using bowtie2 v2.4.4 (Langmead and Salzberg, 2012) in 'sensitive-local' mode. Remaining reads were mapped to the TAIR10 genome and corresponding gtf file annotations (Araport11) using Hisat2 v2.2.1 (Kim et al., 2019) with standard parameters. Only unique mapped reads were retained using samtools v1.13 with the '-q 10' option (Li et al., 2009). Read counts were performed using htseq-count v1.99.2 in 'union' mode (Anders et al., 2015). Transcripts per million (TPM) values for each gene were calculated using the following methods: First, the read counts are divided by the length of each gene in kilobases (rpk), second, all rpk values in a sample are summed and divided by 1,000,000 ('per million' scaling factor) and third, divide the rpk values by the per million scaling factor (TPM). For 5P-seq data, unique alignment bam files are analyzed by the FivePSeq software (Nersisyan et al., 2020). Five TAIR10 chromosomes and Araport11 gtf are used as reference files.

A first filter was applied to the original dataset of 37,390 genes: only transcripts containing ≥ 1 TPM in all studied conditions (p1 to p5 and pA to pC) were retained, resulting in the dataset of 13 123 genes used in Figure 44. Differential gene expression (DEG) analysis was performed on this dataset using DESeq2 (BiocManager) for statistical analysis (*p-value* < 0.05). Only DEG genes with TPM fold-change (FC) values > 2 at 44°C (compared to 20°C reference) were declared as significantly up-regulated and used in Figure 45.

To generate the CTRD-specific database of Figure 46, DEGs (up or down) in the RNASeqTotal database (5194 genes) or the RNASeqPolysomal database (3929 genes) were filtered out, resulting in a new dataset of 4000 genes. A further DEG analysis was then performed on these 4000 genes using the 5P-seq database and 1126 genes were found to be differentially regulated, retained and considered to be major targets of CTRD. All GO analyses were performed using the Gprofiler website (Raudvere et al., 2019).

Heat map, hydrophobicity and HSP70 scores

Hydrophobicity and HSC/HSP70 scoring were performed as described previously (Shalgi et al., 2013). Protein sequences encoded by cluster 4 (which are targets of XRN4 in the pB state) and a random population (of equal size; n = 258) were downloaded from TAIR10 and scores were calculated. Briefly, Kyte-Doolittle hydrophobicity scores and HSC/HSP70 binding scores were each calculated on 13 amino acid long windows shifted by one amino acid from the N-terminus to the C-terminus of the first 80 amino acids of each protein encoded by the two datasets examined (cluster 4 and random dataset). Mean values were calculated in each class from the values obtained for each gene, and the curves were fitted with the cubic spline interpolation mathematical function. A T-test was performed between each pair of populations.

Western blot analyses

For Polysomal-XRN4 Western blots, proteins were extracted from sucrose fractions (1 to 12) after sucrose gradient sedimentation (see above) using 4 volumes of Laemmli buffer (0.25M Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS (v/v), 40% glycerol (v/v) and 0.002% bromophenol blue (w/v), 5% beta-mercapto-ethanol (v/v)) followed by incubation at 95°C for 5 minutes. Proteins were separated on SDS-PAGE gels and electrotransferred to polyvinylidene fluoride membranes. Immunoblotting was performed in Tris-buffered saline (TBS), 5% skimmed milk (w/v), 1% Tween (v/v). Primary antibodies were diluted 1/5 000 and 1/40 000 for XRN4 and RPL13

respectively and incubated overnight at 4°C with agitation. After incubation, the membranes were washed six times in TBS, 1% Tween (v/v). Secondary antibody (rabbit) was incubated in TBS, 5% skim milk (w/v), 1% (Tween) (v/v) for one hour at room temperature with agitation. The membranes were washed six times with TBS, 1% Tween (v/v). Development was performed using the Millipore Immobilon-P kit. Images were captured using the Fusion FX imaging system (Vilber). All blots were prepared and immunoblotted in parallel and simultaneously exposed for chemiluminescence quantification. For each condition, the input normalized values for XRN4 were divided by the input normalized value for RPL13 from the same blot.

Databases accession numbers:

Author Contributions

A.D., R.M., J.J.F. and J.M.D designed the research. A.D., R.M. and J.J.F. performed the experiments. A.D., M.C.C., R.M., J.J.F and J.M.D. analyzed the data. A.D., R.M., J.J.F and J.M.D. wrote the article.

Acknowledgments and funding

This work was supported by a grant from the Agence National de la Recherche (ANR-22-CE20-0023-01), by a "New Frontier" grant from the Laboratoires d'Excellences (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41), by the CNRS and Université de Perpignan via Domitia. A.D. Salary was financed by the Occitanie Region. This study is set within the framework of the École Universitaire de Recherche TULIP-GS (ANR-18-EURE-0019)

References

Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics **31,** 166-169.

Baurle, I. (2016). Plant Heat Adaptation: priming in response to heat stress. F1000Res **5**.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics **30,** 2114-2120.

Carpentier, M.C., Bousquet-Antonelli, C., and Merret, R. (2021). Fast and Efficient 5'P Degradome Library Preparation for Analysis of Co-Translational Decay in Arabidopsis. Plants (Basel) **10**.

Carpentier, M.C., Deragon, J.M., Jean, V., Be, S.H.V., Bousquet-Antonelli, C., and Merret, R. (2020). Monitoring of XRN4 Targets Reveals the Importance of Cotranslational Decay during Arabidopsis Development. Plant Physiol **184,** 1251-1262.

Charng, Y.Y., Mitra, S., and Yu, S.J. (2023). Maintenance of abiotic stress memory in plants: Lessons learned from heat acclimation. Plant Cell **35,** 187-200.

Chasse, H., Boulben, S., Costache, V., Cormier, P., and Morales, J. (2017). Analysis of translation using polysome profiling. Nucleic Acids Res **45,** e15.

Chen, Q., Wu, Y., Yu, F., and Xie, Q. (2022). Coordinative regulation of ERAD and selective autophagy in plants. Essays Biochem **66,** 179-188.

Crisp, P.A., Ganguly, D., Eichten, S.R., Borevitz, J.O., and Pogson, B.J. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. Sci Adv **2,** e1501340.

Duchenne-Moutien, R.A., and Neetoo, H. (2021). Climate Change and Emerging Food Safety Issues: A Review. J Food Prot **84,** 1884-1897.

Garre, E., Pelechano, V., Sanchez Del Pino, M., Alepuz, P., and Sunnerhagen, P. (2018). The Lsm1-7/Pat1 complex binds to stress-activated mRNAs and modulates the response to hyperosmotic shock. PLoS Genet **14,** e1007563.

Gerner, E.W., and Schneider, M.J. (1975). Induced thermal resistance in HeLa cells. Nature **256,** 500-502.

Guo, R., Yu, X., and Gregory, B.D. (2023). The identification of conserved sequence features of co-translationally decayed mRNAs and upstream open reading frames in angiosperm transcriptomes. Plant Direct **7,** e479.

Harndahl, U., Hall, R.B., Osteryoung, K.W., Vierling, E., Bornman, J.F., and Sundby, C. (1999). The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. Cell Stress Chaperones **4,** 129-138.

Howell, S.H. (2021). Evolution of the unfolded protein response in plants. Plant Cell Environ **44,** 2625-2635.

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

IPCC. (2023). Sixth Assessment Report.

Jacob, P., Hirt, H., and Bendahmane, A. (2017). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. Plant Biotechnol J **15,** 405-414.

Kerbler, S.M., and Wigge, P.A. (2023). Temperature Sensing in Plants. Annu Rev Plant Biol **74,** 341-366.

Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S.L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat Biotechnol **37,** 907-915.

Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Doring, P., Vierling, E., and Scharf, K.D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. Curr Opin Plant Biol **10,** 310-316.

Krshnan, L., van de Weijer, M.L., and Carvalho, P. (2022). Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation. Cold Spring Harb Perspect Biol **14**.

Lamke, J., Brzezinka, K., Altmann, S., and Baurle, I. (2016). A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. EMBO J **35,** 162-175.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods **9,** 357-359.

Li, B., Zeis, P., Zhang, Y., Alekseenko, A., Furst, E., Sanchez, Y.P., Lin, G., Tekkedil, M.M., Piazza, I., Steinmetz, L.M., and Pelechano, V. (2023). Differential regulation of mRNA stability modulates transcriptional memory and facilitates environmental adaptation. Nat Commun **14,** 910.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and Genome Project Data Processing, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics **25,** 2078-2079.

Lindquist, S. (1980). Varying patterns of protein synthesis in Drosophila during heat shock: implications for regulation. Dev Biol **77,** 463-479.

Lindquist, S. (1981). Regulation of protein synthesis during heat shock. Nature **293,** 311-314.

Ling, Y., Mahfouz, M.M., and Zhou, S. (2021). Pre-mRNA alternative splicing as a modulator for heat stress response in plants. Trends Plant Sci **26,** 1153-1170.

Ling, Y., Serrano, N., Gao, G., Atia, M., Mokhtar, M., Woo, Y.H., Bazin, J., Veluchamy, A., Benhamed, M., Crespi, M., Gehring, C., Reddy, A.S.N., and Mahfouz, M.M. (2018). Thermopriming triggers splicing memory in Arabidopsis. J Exp Bot **69,** 2659-2675.

Liu, B., Han, Y., and Qian, S.B. (2013). Cotranslational response to proteotoxic stress by elongation pausing of ribosomes. Mol Cell **49,** 453-463.

Lochli, K., Torbica, E., Haile-Weldeslasie, M., Baku, D., Aziz, A., Bublak, D., and Fragkostefanakis, S. (2022). Crosstalk between endoplasmic reticulum and cytosolic unfolded protein response in tomato. Cell Stress Chaperones.

Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C.M.J., Pozo, M.J., Ton, J., van Dam, N.M., and Conrath, U. (2016). Recognizing Plant Defense Priming. Trends Plant Sci **21,** 818-822.

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., and Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. Annu Rev Plant Biol **68,** 485-512.

Merret, R., Descombin, J., Juan, Y.T., Favory, J.J., Carpentier, M.C., Chaparro, C., Charng, Y.Y., Deragon, J.M., and 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 Rep **5,** 1279-1293.

Merret, R., Nagarajan, V.K., Carpentier, M.C., Park, S., Favory, J.J., Descombin, J., Picart, C., Charng, Y.Y., Green, P.J., Deragon, J.M., and Bousquet-Antonelli, C. (2015). Heat-induced ribosome pausing triggers mRNA co-translational decay in Arabidopsis thaliana. Nucleic Acids Res **43,** 4121-4132.

Nersisyan, L., Ropat, M., and Pelechano, V. (2020). Improved computational analysis of ribosome dynamics from 5'P degradome data using fivepseq. NAR Genom Bioinform **2,** lqaa099.

Pelechano, V., Wei, W., and Steinmetz, L.M. (2015). Widespread Co-translational RNA Decay Reveals Ribosome Dynamics. Cell **161,** 1400-1412.

Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E., and Lindquist, S. (2000). Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. Plant Cell **12,** 479-492.

Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., and Vilo, J. (2019). g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). Nucleic Acids Res **47,** W191-W198.

Scharf, K.D., Berberich, T., Ebersberger, I., and Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. Biochim Biophys Acta **1819,** 104-119.

Sedaghatmehr, M., Mueller-Roeber, B., and Balazadeh, S. (2016). The plastid metalloprotease FtsH6 and small heat shock protein HSP21 jointly regulate thermomemory in Arabidopsis. Nat Commun **7,** 12439.

Shalgi, R., Hurt, J.A., Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist, S., and Burge, C.B. (2013). Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. Mol Cell **49,** 439-452.

Shekhawat, K., Almeida-Trapp, M., Garcia-Ramirez, G.X., and Hirt, H. (2022). Beat the heat: plant- and microbe-mediated strategies for crop thermotolerance. Trends Plant Sci **27,** 802-813.

Stief, A., Brzezinka, K., Lamke, J., and Baurle, I. (2014). Epigenetic responses to heat stress at different time scales and the involvement of small RNAs. Plant Signal Behav **9,** e970430.

Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., and Maule, A.J. (2009). The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. Plant Cell **21,** 642-654.

Wu, T.Y., Juan, Y.T., Hsu, Y.H., Wu, S.H., Liao, H.T., Fung, R.W., and Charng, Y.Y. (2013). Interplay between heat shock proteins HSP101 and HSA32 prolongs heat acclimation memory posttranscriptionally in Arabidopsis. Plant Physiol **161,** 2075-2084.

Yeh, C.H., Kaplinsky, N.J., Hu, C., and Charng, Y.Y. (2012). Some like it hot, some like it warm: phenotyping to explore thermotolerance diversity. Plant Sci **195,** 10-23.

Yu, C.Y., Cho, Y., Sharma, O., and Kanehara, K. (2022). What's unique? The unfolded protein response in plants. J Exp Bot **73,** 1268-1276.

Yu, X., Willmann, M.R., Anderson, S.J., and 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. Plant Cell **28,** 2385-2397.

Zhang, Y., and Pelechano, V. (2021). High-throughput 5'P sequencing enables the study of degradation-associated ribosome stalls. Cell Rep Methods **1,** 100001.

2.3 – Résultats complémentaires de “Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency”

Dans la publication présentée ci-dessus nous réalisons plusieurs filtres permettant de cibler uniquement les transcrits différentiellement régulés par la dégradation co-traductionnelle (i.e CTRD-DB). Nous avons montré qu’environ un millier de gènes voient leurs taux transcrits régulés exclusivement par ce mécanisme dans notre design expérimental. Cela nous a conduit à proposer l’hypothèse que la dégradation co-traductionnelle n’est pas un phénomène passif dépendant de l’engagement des transcrits dans les polysomes, mais est bel et bien un mécanisme de régulation post-transcriptionnel à part entière.

2.3.1 – Un sous-groupe de transcrits est exclusivement régulé par leur engagement polysomal

Afin de déceler s’il existait des gènes exclusivement sous le contrôle du phénomène d’engagement polysomal nous sommes partis du jeu de données initial de 13 123 gènes. Ont ensuite été conservés tous les gènes dont les niveaux d’ARNm à l’équilibre ne varient pas au cours de la SAT et la BT, conduisant à l’obtention d’un nouveau jeu de données de 7 929 gènes. À partir de ces 7 929 gènes, un deuxième filtre a été appliqué, afin de garder tous les transcrits dont les niveaux de dégradation co-traductionnelle ne varient pas tout au long des deux régimes de stress SAT et BT. Ce nouveau jeu de données, composé de 3 837 gènes, a été soumis à un dernier filtre afin de conserver uniquement les transcrits dont l’engagement polysomal est différentiellement régulé à au moins un point de la SAT ou la BT. Cela nous a conduit à l’obtention de 1 119 transcrits différentiellement régulés uniquement via leur engagement polysomal dans notre design expérimental, un sous-groupe que nous avons nommé PE-DB (Figure 48).

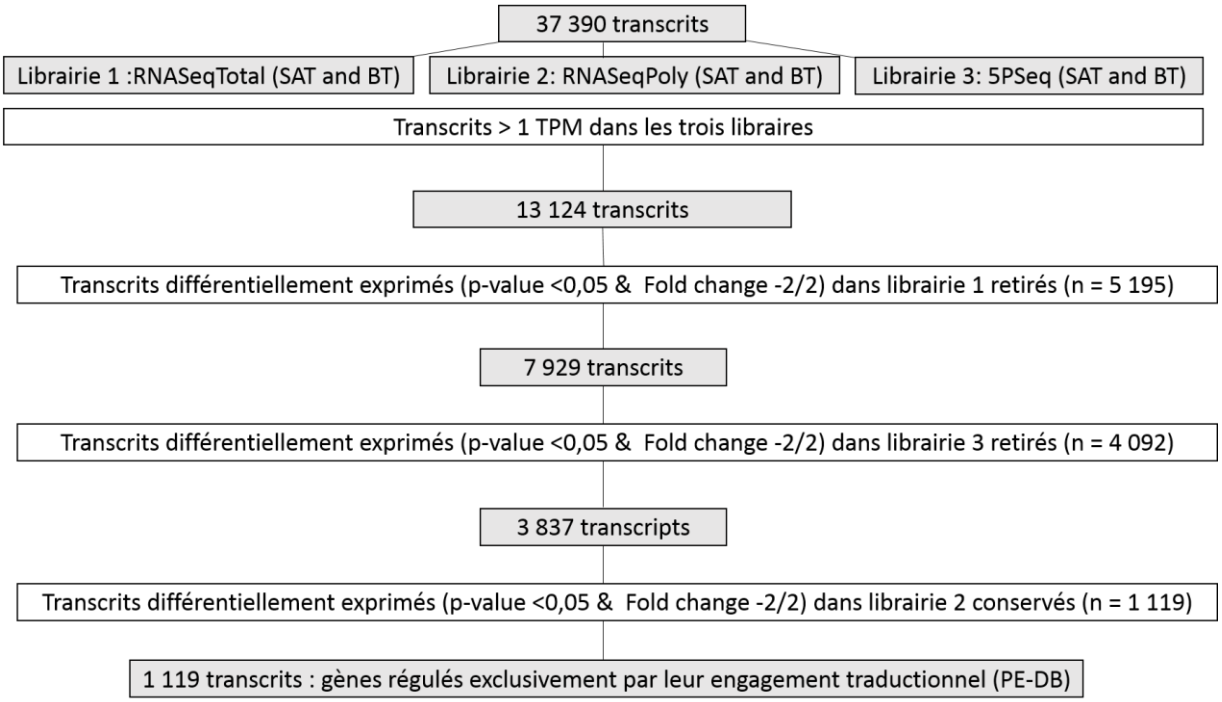


Figure 48. Pipeline utilisé pour déterminer la population de transcrits exclusivement sous contrôle de l'engagement traductionnel. *Trois librairies ont été constituées à l'aide de différentes techniques NGS. Un premier filtre a été utilisé pour ne conserver que les transcrits ayant > 1TPM dans les trois librairies, générant un nouvel ensemble de données de 13 124 transcrits. Ensuite, tous les transcrits différentiellement régulés (p-value <0,05 & FC -2/2) dans les librairies 1 et 3 ont été retirés, générant un ensemble de données de 3 837 gènes. Finalement, seuls les transcrits différentiellement régulés dans la deuxième librairie ont été conservés et considérés comme exclusivement sous régulation traductionnelle dans les conditions testées (PE-DB, n = 1 119).*

Afin de visualiser le taux d'engagement de ces transcrits dans les polysomes à des étapes clés de la SAT et la BT, une heatmap se basant sur le jeu de données PE-DB a été réalisée (Figure 49). L'analyse de cette heatmap montre quatre clusters de gènes corégulés. Le premier cluster regroupe 628 transcrits dont l'engagement polysomal est hautement favorisé au cours de la phase de récupération 7h30 après le stress thermique, majoritairement au cours de la SAT (p5). Une analyse GO a été conduite sur ces 628 gènes, révélant qu'ils sont enrichis dans les termes « ribosome » (GO : 0005840, $2.7*10^{-4}$) et « structural composant of ribosome » (GO : 0003735, 1.3^{E-4}). Le second cluster est composé de 266 transcrits dont l'engagement polysomal est favorisé à différents points de la SAT (p3, p4, p5) mais pas de la BT. L'analyse GO de ce groupe indique que ces gènes sont impliqués dans « protein transport » (GO : 0015031, 6.5^{E-3}). Les clusters 3 et 4 ont des effectifs plus réduits et contiennent 119 et 106 gènes respectivement. L'engagement polysomal des transcrits du cluster 3 est favorisé uniquement au cours de la BT (pB et pC). Concernant le cluster 4, ces transcrits sont très fortement engagés dans les polysomes à 37°C au cours de la SAT (p2). L'analyse GO du cluster 3 indique que ces gènes sont associés au terme « endoplasmic reticulum » (GO : 0005783 : 1.1^{E-5}). Pour le cluster 4, l'analyse GO ne conduit pas à l'obtention de résultats significatifs.

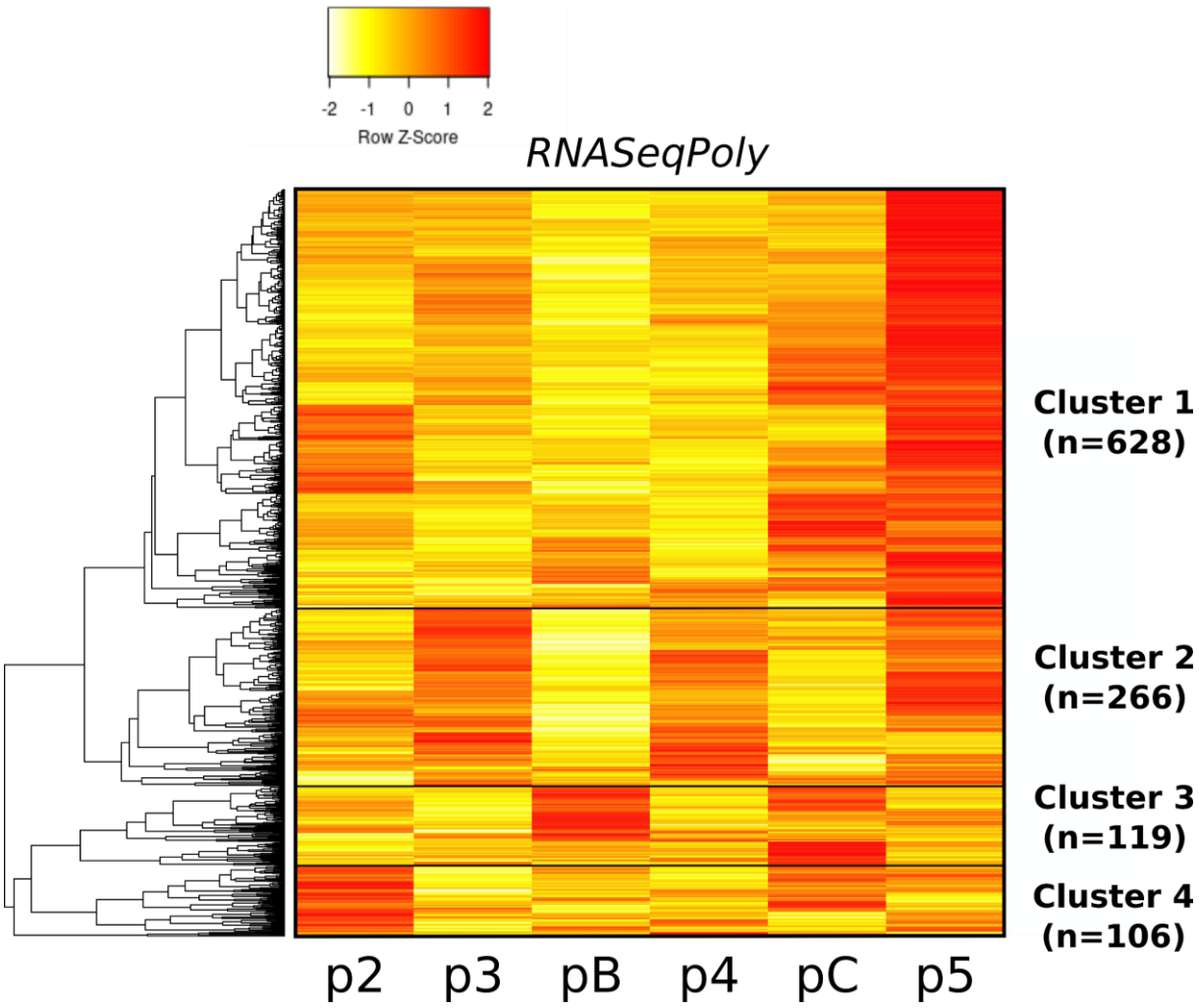


Figure 49. L'engagement polysomal corégule différents groupes de transcrits au cours de la SAT et la BT. *Heatmap des niveaux d'engagement polysomaux des transcrits exclusivement sous contrôle traductionnel à différents stades des stress SAT et BT (PE-DB, n = 1 119). Les données sont normalisées par rapport à 20°C, le rouge et le jaune correspondent respectivement à de forts taux d'engagement et de faibles taux d'engagement.*

2.3.2 – L'amorçage permet-il de réguler différentiellement des sous-populations de protéines ribosomales ?

En étudiant de plus près les différents clusters, le cluster 1-PE (Figure 49) a fortement retenu notre attention pour deux raisons principales :

Premièrement, le profil d'expression de ces transcrits indique qu'ils sont spécifiquement plus engagés dans les polysomes au cours de la période de récupération 7h30 après le stress. Ce profil est intéressant car il ne rentre pas dans la classification actuelle des gènes mémoire de type I et II (Figure 12). En effet l'augmentation de l'engagement traductionnel de ces transcrits n'a lieu qu'en période de récupération (Figure 49), suggérant l'existence d'un troisième groupe de gènes mémoire dont la traduction est activée au cours des phases de récupération. On peut émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'efficacité d'engagement traductionnel de ces transcrits au cours de la phase de récupération contribue à la survie de la plante.

Deuxièmement, une analyse GO indique qu'une partie de ces gènes sont liés au terme « ribosomes » (GO : 0005840, $2.7*10^{-4}$). Ce sont 22 PR qui sont retrouvées ici, majoritairement cytoplasmiques (quelques-unes sont mitochondriales) (Tableau S7). Cela suggère que lorsque la période de récupération est assez longue, ou bien en réponse à un stress aigu (car ce phénomène n'est pas observé au point p3 lors de la première récupération mais uniquement au point p5 lors de la seconde récupération), la plante favorise la traduction de certains ARNm codants pour des protéines ribosomales (PR). Merret *et al.*, ont précédemment montré que lors d'un stress thermique, des transcrits codants pour des protéines ribosomales sont pris en charge par HSP101 afin d'être protégés de la dégradation [144]. Puis lors de la période de récupération, ces transcrits sont libérés de l'interaction avec HSP101 et peuvent rapidement être traduits afin de synthétiser de nouvelles PR pour relancer l'appareil traductionnel. Il est intéressant de noter que les 22 PR détectées dans le cluster 1 font parties de celles protégées par HSP101 au cours d'un stress thermique dans les travaux de Merret *et al.*, suggérant qu'en période de récupération d'un stress thermique, la plante traduit activement certaines PR afin de relancer sa traduction [144].

Un autre aspect nous a fortement interpellé : au sein de l'article présenté précédemment dans ce rapport (partie résultats 2.2), nous avons mis en évidence l'existence de transcrits exclusivement sous le contrôle de la dégradation co-traductionnelle (CTRD-DB). Quatre clusters de transcrits différentiellement régulés ont été observés, dont un (le cluster 1-CTRD) présentant des forts taux de dégradation durant la période de récupération 7h30 après la fin du stress thermique (p5) (Figure 47A). Il est très intéressant de noter qu'une analyse GO du cluster 1-CTRD montre aussi un enrichissement de gènes associés au terme « ribosome » (GO : 0005840, $8.1*10^{E-3}$). On trouve dans ce cluster 16 PR, dont certaines sont cytoplasmiques et d'autres chloroplastiques (voir Tableau Supplémentaire S4). Si l'on se concentre sur les PR cytosoliques des deux clusters (cluster 1-CTRD et cluster 1-PE), ces résultats sont très intéressants car ils suggèrent que l'efficacité de traduction de transcrits codant pour certaines populations de PR varie lors de la période de récupération : certaines favorisées (et régulées positivement via leur engagement polysomal) et d'autres défavorisées (et régulées négativement par la dégradation co-traductionnelle). Ces résultats suggèrent la mise en place d'une population différenciée de ribosomes lors de la récupération qui est dépendante d'une étape d'amorçage. En effet aujourd'hui le ribosome n'est plus perçu comme une entité invariable et de plus en plus d'études soutiennent la théorie qu'ils peuvent être spécialisés. Cette hypothèse propose que les différents composants du ribosome peuvent varier : modifications post-transcriptionnelles des ARNr, des PR et modifications post-traductionnelles des PR. Il est proposé que ces variations confèrent aux ribosomes différentes caractéristiques favorisant la traduction de sous-groupe de transcrits. Néanmoins cette hypothèse reste encore débattue au sein de la communauté scientifique [298,299].

D'autre part, nos résultats suggèrent également des différences de régulation des PR des organelles, ce qui pourrait signifier que la traduction organellique est aussi réorganisée au cours de cette période de récupération après amorçage.

En conclusion, à travers cette partie nous avons montré l'importance des phénomènes polysomaux (taux d'engagement dans les polysomes et taux de dégradation co-traductionnelle) dans la réponse au stress thermique ainsi que dans l'établissement de l'effet mémoire. De plus nous avons montré le rôle crucial de l'amorçage dans l'induction efficace de la voie UPR. Lors d'un stress aigu sans amorçage au préalable, l'absence de la voie UPR va

conduire la CTRD à cibler fortement les transcrits en cours de traduction associés au RE. Nos résultats supportent que la dégradation co-traductionnelle est un mécanisme actif de la régulation de l'expression génique. Enfin les résultats complémentaires de la publication nous indiquent que plus de mille transcrits sont régulés via l'engagement polysomal dans nos conditions expérimentales, soulignant l'importance des mécanismes polysomaux dans la réponse au stress thermique.

3 - L'impact du stress thermique et de la mémoire sur l'épitranscriptome des ARNt. Un rôle dans la régulation de la traduction chez Arabidopsis ?

3.1 - Contexte et objectif

Cette troisième partie peut être séparée en deux grands axes : le premier vise à décrire d'un point de vue quantitatif les variations induites par le stress thermique ainsi que l'amorçage sur l'épitranscriptome des ARNt. Le second pose la question de l'impact de ces variations sur la traduction, pouvant conduire à une régulation fine de l'expression de sous-populations de gènes.

Afin de réaliser une étude la plus globale possible, 24 modifications portées par les ARNt ont été mesurées et quantifiées par LC-MS/MS, au sein de deux populations d'ARNt : les $ARNt^{TOTAUX}$ et les $ARNt^{POLYSOMAUX}$ (Figure 50). L'étude des épitranscriptomes de ces deux populations d'ARNt nous permettra de comparer le taux de modifications de l'ensemble des ARNt à celui de ceux associés aux ribosomes. Ainsi, nous pourrons voir si la machinerie de traduction opère une sélection d'un sous-ensemble d'ARN de transfert ayant un état épitranscriptomique différent de l'ensemble des ARNt. La caractérisation de ces deux épitranscriptomes sera réalisée dans un contexte de stress thermique et l'impact de l'amorçage sera étudié en utilisant les mêmes régimes de stress qu'au sein de la partie précédente, chez des plantules d'Arabidopsis âgées de cinq jours (SAT et BT, voir Figure 43).

Dans une seconde partie, une approche intégrative basée sur les données épitranscriptomiques et les des données NGS (chapitre résultats 2.2), a été réalisée afin d'explorer l'impact potentiel des modifications sur la régulation traductionnelle de l'expression des gènes.

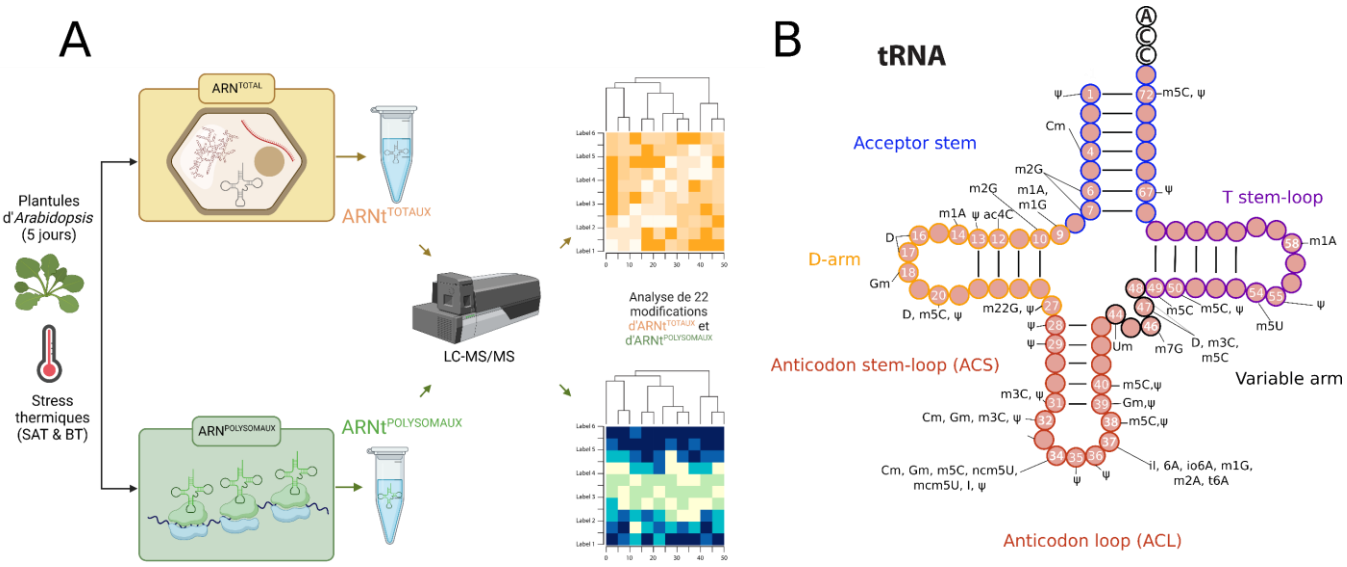


Figure 50. Approche choisie pour étudier les épitranscriptomes des ARNt en réponse au stress thermique*. A) Schéma récapitulatif de l'approche : des plantules d'Arabidopsis âgées de cinq jours ont été soumises à la SAT et à la BT. Au total huit points de récoltes (p1 à p5 et pA à pC) ont été sélectionnés afin de caractériser ces régimes (Figure 43). À chaque point, deux populations d'ARN ont été extraites : ARN^{TOTAUX} et $ARN^{POLYSOMAUX}$. À partir de ces extraits, deux populations d'ARNt ont été purifiées sur gel : $ARNt^{TOTAUX}$ et $ARNt^{POLYSOMAUX}$. 24 modifications ont ensuite été analysées par LC-MS/MS et les résultats ont été traités informatiquement. B) Schéma représentant la conformation en trèfle d'un ARNt avec les positions des 24 modifications mesurées dans cette étude (hm^5C n'est pas présente car sa position n'a pas encore été déterminée) : 2'-O-methyladenosine (Am), N4-acetylcytidine (ac^4C), 2'-O-methylcytidine (Cm), dihydrouridine (D), 2'-O-methylguanosine (Gm), 5-hydroxymethylcytidine (hm^5C), inosine (I), N6-isopentenyladenosine (i^6A), N6-(cis-hydroxyisopentenyl)adenosine (io^6A), 1-methyladenosine (m^1A), 1-methylguanosine (m^1G), N2,N2-dimethylguanosine ($m^{2,2}G$), 2-methyladenosine (m^2A), N2-methylguanosine (m^2G), 3-methylcytidine (m^3C), 5-methylcytidine (m^5C), 5-methyluridine (m^5U), N6-methyladenosine (m^6A), 7-methylguanosine (m^7G), 5-methoxycarbonylmethyluridine (mcm^5U), 5-carbamoylmethyluridine (ncm^5U), pseudouridine (ψ), N6-threonylcarbamoyladenosine (t^6A), 2'-O-methyluridine (Um).*

3.2 - L'impact du stress thermique sur l'épitranscriptome des ARNt

3.2.1 - Contrôle qualité

Afin d'évaluer la qualité de nos réplicats biologiques d'ARNt deux analyses ont été conduites. Dans un premier temps deux ACP basées sur les données épitranscriptomiques au cours des stress SAT et BT ont été réalisées : une pour les ARNt^{TOTAUX} et une pour les ARNt^{POLYSOMAUX}. Les résultats présentés sur les Figures 51A et 51B nous montrent que certains réplicats divergent (7 échantillons sur les 48 collectés au total). Après avoir analysé en profondeur les données brutes, nous avons décidé des supprimer les réplicats contenant des données aberrantes pour la suite de l'étude (Tableau Supplémentaire 1).

Une fois les données aberrantes retirées, afin d'évaluer la qualité des échantillons d'ARNt, l'approche proposée dans la publication [295] a été conduite sur nos données. Dans le but de séparer les ARNt des autres populations d'ARN, une étape de purification sur gel d'acrylamide est réalisée. Le taux de pollution de nos fractions d'ARNt par des fragments d'ARNr a été évalué comme décrit précédemment (niveau de $m^{6,6}A$, voir section résultats 1.3.1).

Afin d'être quantifiées et comparées entre les différents échantillons, les données ont été normalisées par la somme des bases non-modifiées U+C+G. Puis les taux d'enrichissement de la marque spécifique au 18S ($m^{6,6}A$) sont comparés avec les modifications potentiellement présentes à la fois sur les ARNt et les ARNr. Toute modification à la fois présentes dans les ARNt et dans les ARNr et dont le niveau normalisé est inférieur à trois fois (3X) le niveau de la modification $m^{6,6}A$ est retirée de l'étude. Pour nos deux populations d'ARNt (totaux et polysomaux), nos résultats indiquent que seules trois modifications ne passent pas ce filtre et ont donc été retirées : Am, m^6A et Um (Figure 51C et 51D). Nous estimons donc que les variations observées pour les 21 autres modifications analysées résultent principalement (ou exclusivement pour certaines) de changements au niveau des ARNt.

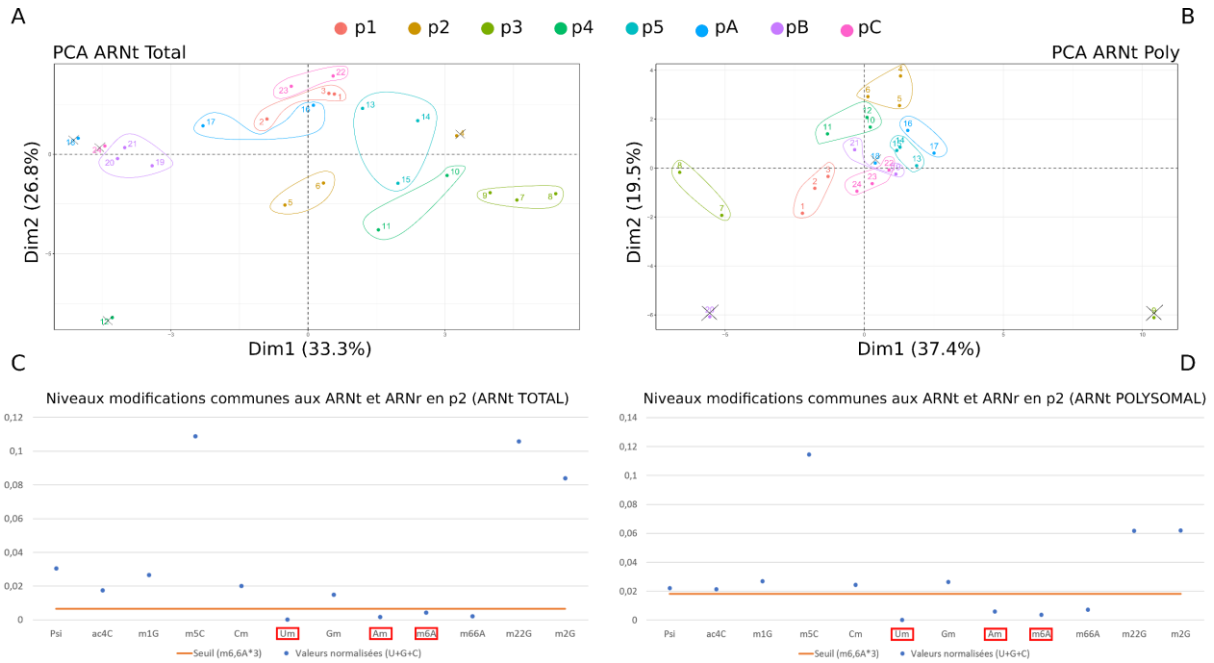


Figure 51. Contrôle qualité des données épitranscriptomiques des ARNt^{TOTAUX} et ARNt^{POLYSOMAUX}. *A) ACP en deux dimensions basée sur les données épitranscriptomiques des ARNt^{TOTAUX}. Les deux axes de l'ACP permettent d'expliquer 60,1% de la variance observée. Les quatre points barrés correspondent aux échantillons ayant été retirés de l'étude. B) ACP en deux dimensions basée sur les données épitranscriptomiques des ARNt^{POLYSOMAUX}. Les deux axes de l'ACP permettent d'expliquer 56,9% de la variance observée. Les trois points barrés correspondent aux échantillons ayant été retirés de l'étude. C) Graphique représentant les niveaux de modifications communes aux ARNt et ARNr dans la fraction d'ARNt^{TOTAL} (normalisées par la somme des bases non-modifiées U+C+G). La courbe orange représente le taux de m^{6,6}A multiplié par un facteur 3. Les trois modifications ne dépassant pas ce seuil et ayant été retirées sont : Am, m^{6}A et Um (encadrées en rouge). Afin de pouvoir visualiser ces résultats les modifications m^{1}A et m^{7}G ont été retirées (car très enrichies par rapport aux autres et empêchent la visualisation des résultats). D) Même figure qu'en C pour la population d'ARNt^{POLYSOMAUX}. Ici aussi trois modifications ne dépassent pas le seuil imposées et sont retirées de l'étude : Am, m^{6}A et Um (encadrées en rouge). Les résultats sont uniquement présentés pour le point p2 (représentatif des huit points testés).*

3.2.2 - Impact d'un stress thermique simple sur l'épitranscriptome des ARNt

Nous nous sommes d'abord penchés sur l'impact d'un stress thermique simple sur les épitranscriptomes des deux populations d'ARNt : $ARNt^{TOTAUX}$ et $ARNt^{POLYSOMAUX}$. Pour cela nous avons tiré avantage de nos conditions d'études afin de caractériser l'impact que pourrait avoir deux intensités de températures différentes : 15' à 37°C (p2) et 15' à 44°C (pB). Afin de déterminer si l'intensité du stress thermique peut avoir une influence sur l'épitranscriptome, les données ont été comparées à leur condition de référence à 20°C et représentées sous forme de heatmap (représentant donc des ratios d'appauvrissement ou d'enrichissement par rapport à 20°C). Les résultats nous montrent que globalement, les stress à 37°C et 44°C n'ont pas la même incidence sur les épitranscriptomes. Même si la majorité des modifications présentent la même tendance, leur intensité peut varier. On observe aussi que les deux populations d'ARNt (le pool total et ceux engagés en traduction) présentent des réponses très variées et ne sont pas impactées de la même manière par ces deux stress thermique (Figure 52).

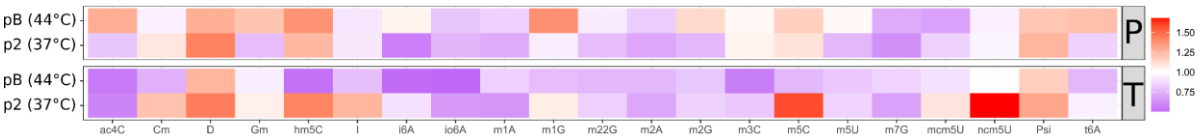


Figure 52. Heatmap des ratios des 21 modifications à 37°C (p2) et 44°C (pB) par rapport à la condition de référence (20°C) au sein des deux populations d'ARNt : totale (T) et polysomal (P). Les données ont été une première fois normalisées par la somme des bases non-modifiées (U+G+C) puis une seconde fois par la condition de référence à 20°C (p2/p1 et pB/pA). En rouge : enrichissement par rapport à 20°C, en bleu : appauvrissement par rapport à 20°C.

Du fait de la complexité de nos données (deux populations d'ARNt, 21 modifications chimiques, dans huit conditions au sein de deux régimes de stress thermique) la visualisation et l'interprétation des résultats sont compliquées (Figure 52). Il a été décidé de les simplifier en séparant les modifications dans trois groupes sur la base de leurs positions au sein des ARNt : le groupe I est composé des modifications présentes exclusivement sur la boucle de l'anticodon (en rouge sur la Figure 53B), le groupe II regroupe les modifications présentes uniquement dans le corps de l'ARNt (en bleu sur la Figure 53B) et le groupe III comporte celles pouvant être trouvées à la fois sur la boucle de l'anticodon et dans le corps des ARNt (en noir dans la Figure 53B) : on trouve dans chacun de ces groupes sept modifications (Figure 53).

A

Modification	Groupe	Position(s)
ac4C	II	12
Cm	III	4, 32, 34
D	II	16, 17, 20, 47, 48
Gm	III	18, 32, 34
hm5C	III	?
I	I	34, 37
I6A	I	37
Io6A	I	37
m1A	II	9, 14, 58
m1G	III	9, 37
m2,2G	II	27
m2A	I	37
m2G	II	6, 7
m3C	III	31, 32, 47, 48
m5C	III	20, 34, 38, 40, 47, 48, 49, 50, 72
m5U	II	54
m7G	II	46
mcm5U	I	34
ncm5U	I	34
Psi	III	1, 13, 20, 27, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 50, 55, 67, 72
t6A	I	37

B

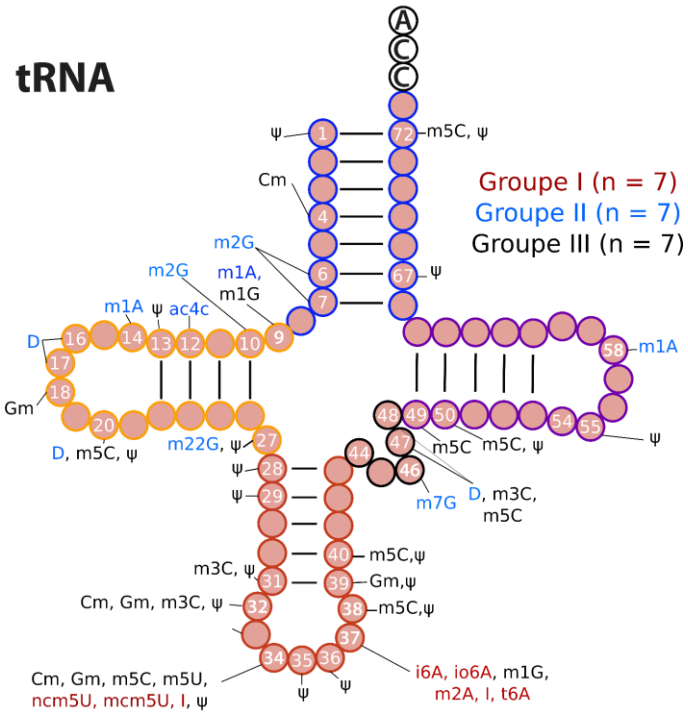


***Figure 53**. **Les modifications des ARNt ont été séparées en trois groupe, sur la base de leurs positions.** A) Liste des 21 modifications des ARNt étudiées ainsi que leurs positions et le groupe attribué à chacune. Les modifications du groupe I sont exclusivement présentes sur la boucle de l'anticodon, les modifications du groupe II sont exclusivement trouvées dans le corps de l'ARNt et le groupe III regroupe les modifications pouvant être à la fois sur la boucle de l'anticodon et sur le corps de l'ARNt. (La position de hm^{5}C n'étant pas connue elle a été assignée au groupe III).* B) *Position des 21 modifications étudiées. En rouge les modifications du groupe I, en bleu les modifications du groupe II et en noir les modifications du groupe III. La modification hm5C n'est pas présentée sur cette figure car sa position n'a pas encore été déterminée.*

Dans un premier temps nous nous sommes concentrés sur l'étude du groupe I. Les données sont représentées sous forme de ratio, comparées par rapport à 20°C. Le profil de la heatmap dans la Figure 54A nous montre que les modifications présentes sur la boucle de l'anticodon ont majoritairement tendance à être appauvries à 37°C et 44°C pour les ARNt^{TOTAUX} et ARNt^{POLYSOMAUX}. Cependant, ce n'est pas le cas pour les modifications I, et ncm^{5}U à 37°C dans la fraction d'ARNt^{TOTAUX} puisque l'on observe un enrichissement de ces deux modifications, un phénomène non observé à 44°C.

Le groupe II, regroupant les modifications présentent uniquement dans le corps de l'ARNt présentent un profil également hypomodifié (Figure 54B). Une seule modification est enrichie (D) à la fois à 37°C et 44°C dans la fraction d'ARNt^{TOTAUX}, mais uniquement à 37°C dans la fraction d'ARNt^{POLYSOMAUX}.

Enfin les variations des modifications du groupe III sont plus disparates (Figure 54C), la tendance étant une augmentation de ces marques au niveau des ARNt^{POLYSOMAUX} à 37°C et 44°C. Ici, plus de divergences sont observées entre taux de modifications d'ARNt^{TOTAUX} et ceux des ARNt^{POLYSOMAUX}. Cela est peut-être dû au fait que les modifications de ce groupe peuvent toucher de nombreuses positions présentent sur l'ensemble de l'ARNt, rendant ce groupe plus hétérogène. Néanmoins l'élévation à 37°C de la marque m^{5}C dans la fraction totale et à 37°C et à 44°C dans la fraction polysomale est intéressante : en effet la présence de cette marque a été montrée comme cruciale pour adapter la traduction chez C. elegans afin de traduire efficacement des sous-ensembles de transcrits nécessaires à la réponse au stress thermique [300].

En conclusion, ces résultats nous indiquent que les stress à 37°C et 44°C ont des incidences différentes sur les variations des épitranscriptomes et que les ARNt^{TOTAUX} semblent globalement plus affectés que les ARNt^{POLYSOMAUX}. Les différences observées entre ARNt^{TOTAUX} et ARNt^{POLYSOMAUX} suggèrent qu'une sélection s'opère au niveau du ribosome et que seul un sous-ensemble des ARNt^{TOTAUX} disponibles serait utilisé par la machinerie de traduction.

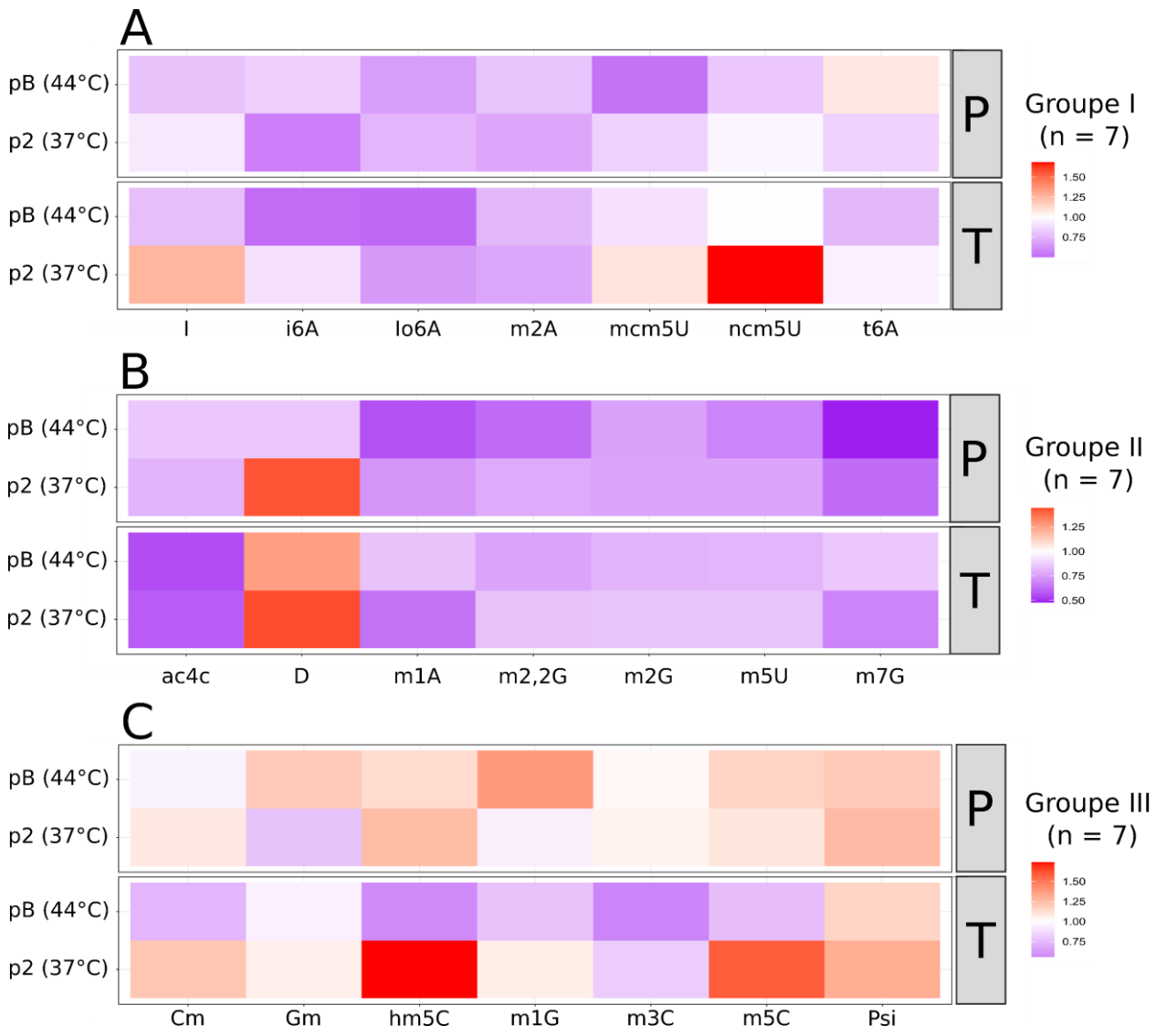


Figure 54. L'intensité du stress thermique impacte différentiellement les épitranscriptomes des ARNt. *A) Heatmap représentant les ratios d'enrichissement des modifications du groupe I à 37°C (p2) et 44°C (pB) par rapport à 20°C (référence) au sein des ARNt^{TOTAUX} (T) et des ARNt^{POLYSOMAUX} (P). B) Du groupe II. C) Du groupe III. Les données ont été une première fois normalisées par la somme des bases non-modifiées (U+G+C) puis une seconde fois par la condition de référence à 20°C.*

3.2.3 - L'amorçage induit des changements de profils épitranscriptomiques

Pour poser la question de l'impact de l'amorçage sur les profils épitranscriptomiques en utilisant les trois mêmes sous-groupes de modifications (Figure 53), nous avons comparé les variations des marques chimiques à 44°C et dans la période de récupération, avec ou sans amorçage.

3.2.3.1 - Impact de l'amorçage sur l'épitranscriptome des ARNt à 44°C

Nous avons mesuré dans un premier temps les variations des marques chimiques de nos trois groupes à 44°C avec ou sans amorçage (Figure 55). Tout d'abord, concernant le groupe I (Figure 55A), comme observé précédemment, la tendance générale est l'hypomodification avec très peu d'impact de l'amorçage et une correspondance entre fraction totale et polysomale (la seule exception étant la marque ncm5U dont le niveau augmente uniquement dans la fraction totale sans amorçage).

Dans le second groupe (Figure 55B), même constat que pour le groupe I, une tendance générale à la baisse des taux de modification, peu d'effet de l'amorçage et une correspondance entre fractions totales et polysomales. La seule exception concerne D dont le niveau augmente, mais cette augmentation n'est plus visible dans la fraction polysomale en absence d'amorçage. Il est intéressant de noter que le profil épitranscriptomique des ARNt du groupe II dans la condition 44°C amorcée (p4) rappelle fortement celui de la condition à 37°C (p2, Figure 54B). Cela suggère que l'amorçage atténue l'impact de la hausse de température, du moins pour ce sous-groupe de modifications.

Concernant le groupe III (Figure 55), la situation est plus contrastée. La tendance est bien à la baisse pour la fraction totale avec et sans amorçage (p4 et pB) ainsi que pour la fraction polysomale avec amorçage (à l'exception des marques m^5C et ψ qui elles sont à la hausse). Cependant, pour la fraction polysomale sans amorçage (pB), on peut observer une tendance générale à la hausse (sauf pour Cm et m^3C).

En conclusion nous observons sur la Figure 55, que l'impact de l'amorçage est plutôt faible sur la condition à 44°C et que les différences entre fractions polysomales et totales sont limités (sauf possiblement pour les marques du groupes III).

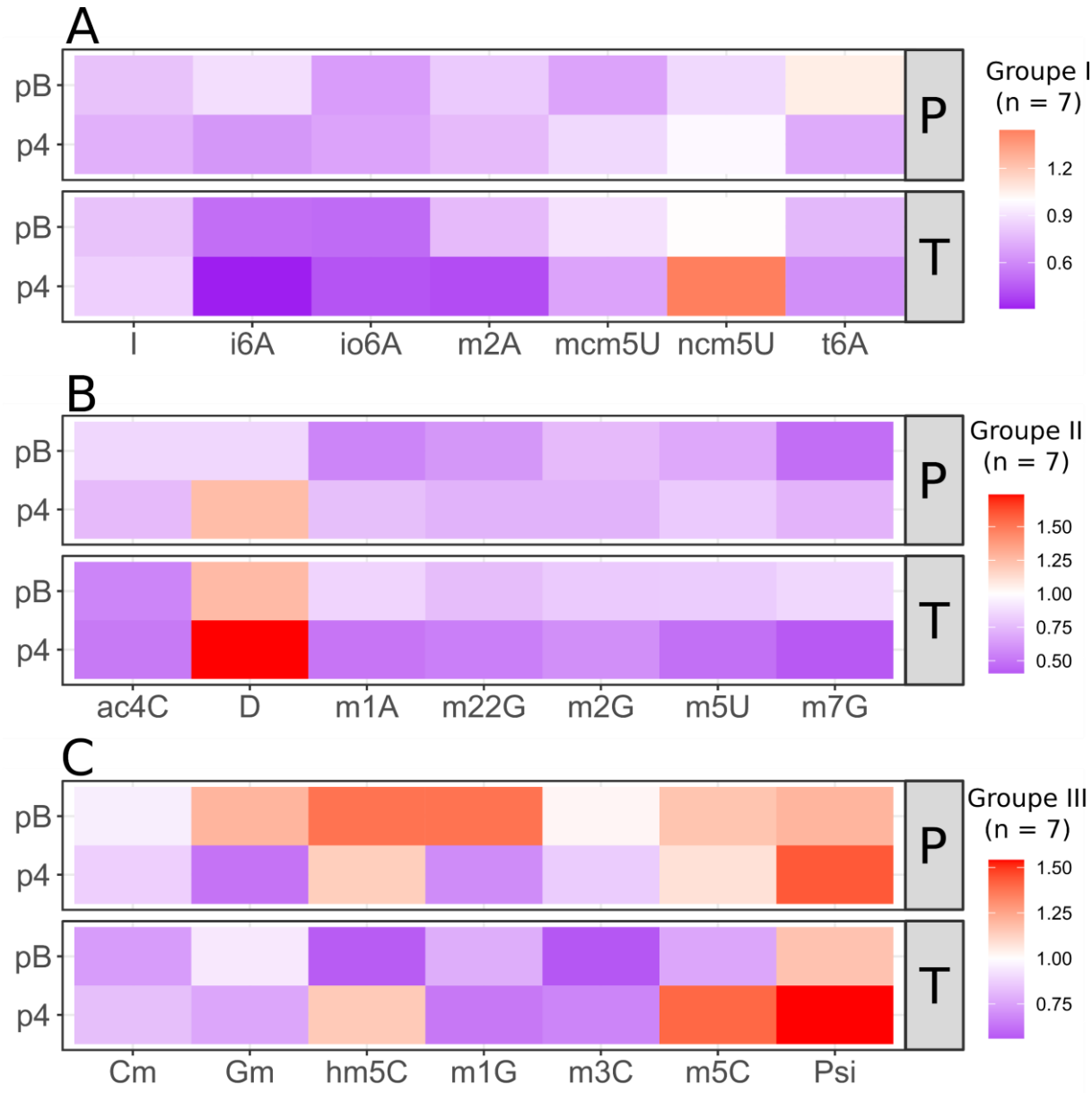


Figure 55. ***Impact de l'amorçage sur les épitranscriptomes des ARNt à 44°C.*** *A) Heatmap représentant les ratios d'enrichissement des modifications du groupe I à 44°C-non amorcé (pB) et 44°C amorcé (p4) par rapport à 20°C (référence) au sein des ARNt^{TOTAUX} (T) et des ARNt^{POLYSOMAUX} (P). B) Du groupe II. C) Du groupe III. Les données ont été une première fois normalisées par la somme des bases non-modifiées (U+G+C) puis une seconde fois par la condition de référence à 20°C.*

3.2.3.2 - Impact de l'amorçage sur l'épitranscriptome des ARNt en période de récupération

L'impact de l'amorçage sur l'épitranscritome des ARNt^{TOTAUX} et des ARNt^{POLYSOMAUX} a ensuite été analysé lors des périodes de récupération (pC et p5) (Figure 56). Tout d'abord, concernant le groupe I (Figure 56A), les épitranscriptomes des ARNt^{TOTAUX} sont majoritairement hypomodifiés par rapport à la situation de départ, une tendance globalement accentuée par l'amorçage. Cependant l'inosine et mcm^{5}U se comportent différemment. Pour l'inosine, on observe au contraire un enrichissement, accentué par l'amorçage. Pour mcm^{5}U, l'enrichissement n'est visible qu'en absence d'amorçage. La comparaison avec les ARNt^{POLYSOMAUX} ne fait pas apparaitre de grandes différences, sinon que l'augmentation de l'inosine n'est plus visible qu'en présence d'amorçage. La variation du niveau d'inosine est intéressante car, lorsque présente en position 34, elle est essentielle pour décoder plusieurs codons (voir ci-dessous).

Concernant le groupe II (Figure 56B), un fort effet de l'amorçage est visible pour les ARNt^{TOTAUX} conduisant à une hypomodification de l'ensemble des marques sauf pour D qui est au contraire enrichie. En revanche, cette tendance ne se retrouve par pour les ARNt^{POLYSOMAUX}. En effet, ici l'amorçage produit plutôt une augmentation des marques ac^{4}c et m^{5}U. Une étude a démontré que la modification ac^{4}c permet d'impacter l'efficacité de traduction du codon AUG [301]. La modification m^{5}U$_{54}$ joue quant à elle de nombreux rôles dans la stabilité des ARNt, notamment en favorisant le dépôt de m^{1}A$_{58}$ mais aussi en empêchant la formation de fragments d'ARNt [302,303].

Concernant le groupe III (Figure 56C), bien que la tendance générale soit à la baisse du niveau de ces marques chimiques, l'amorçage a un effet important à la hausse sur la marque ψ au niveau des ARNt^{TOTAUX}, effet que l'on ne retrouve pas pour les ARNt^{POLYSOMAUX}. On observe aussi un enrichissement de la modification m^{5}C dans la fraction d'ARNt^{POLYSOMAUX} uniquement dans la condition non-amorcée. Il est intéressant de noter que cette modification a été montrée comme cruciale dans la réponse au stress chez C. elegans [300] et était déjà plus représentée dans les deux conditions de stress thermique, à 37°C et à 44°C (Figure 54C).

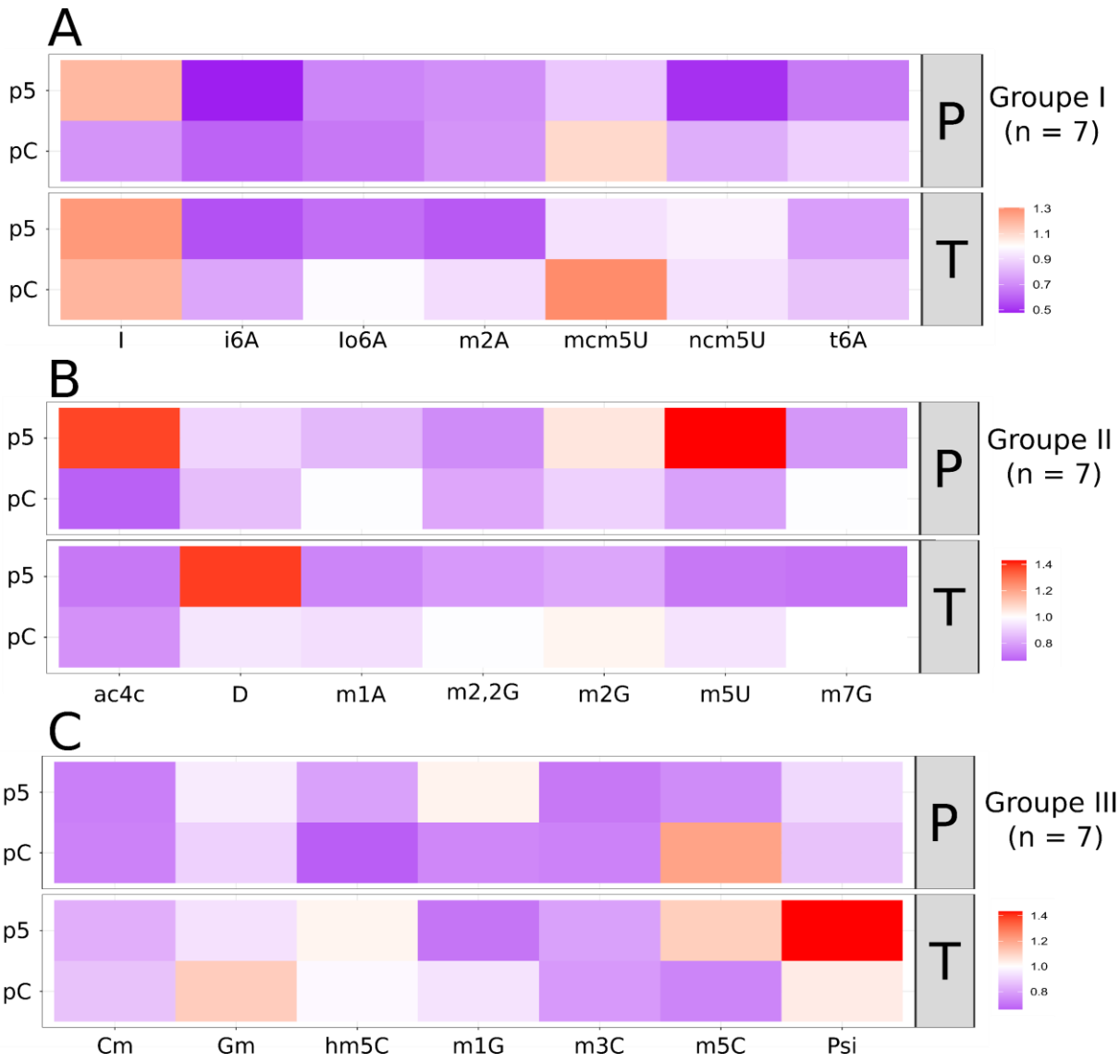


Figure 56. L'amorçage impacte différentiellement les épitranscriptomes des ARNt en période de récupération. *A) Heatmap représentant les ratios d'enrichissement des modifications du groupe I en récupération entre les conditions amorcées (p5) et non-amorcées (pC), par rapport à 20°C (référence) au sein des ARNt^{TOTAUX} (T) et des ARNt^{POLYSOMAUX}(P). B) Du groupe II. C) Du groupe III. Les données ont été une première fois normalisées par la somme des bases non-modifiées (U+G+C) puis une seconde fois par la condition de référence à 20°.*

En conclusion, au cours de la récupération, on peut observer un effet important de l'étape d'amorçage qui permet de modifier significativement l'épitranscriptome des ARNt. On peut aussi relever des différences plus marquées entre fractions totales et polysomales suggérant une réorganisation de la traduction à cette étape et induisant une sélection plus importante des populations d'ARNt directement associées aux ribosomes. Ces résultats soutiennent nos observations et résultats précédents (chapitre résultats 2.2), supposant que dans la condition non-amorcée, la plante est encore dans un état de stress lors de l'étape de la récupération, ce qui n'est plus le cas dans la condition amorcée ou elle tend à remettre en place un programme de croissance.

3.3 - L'impact des modifications chimiques des ARNt sur la régulation de la traduction

Dans la partie précédente nous avons montré que les deux régimes de stress thermique ainsi que l'amorçage impactent les niveaux de modifications des ARNt. Au sein de cette partie nous chercherons à évaluer l'impact de ces variations épitranscriptomiques sur la traduction : comment les nouveaux épitranscriptomes peuvent induire une régulation fine de l'expression des gènes au niveau traductionnel ? De plus nous poserons la question d'une potentielle implication des mécanismes épitranscriptomiques dans l'élaboration et la conservation de l'effet mémoire. Pour cela nous nous baserons à la fois sur les données épitranscriptomiques (chapitre résultats 3.2) et sur les données traductionnelles (chapitre résultats 2.2).

Une modification a particulièrement retenu notre attention. Au cours de la phase de récupération 7h30 après l'évènement de stress thermique, les plantes ayant été amorcées présentent une hausse significative de leur niveau d'inosine (I) dans la fraction d'ARNt^{POLYSOMALE}. Un résultat non-observé dans la condition non-amorcée (Figure 56A et 58A). En d'autres termes, les ARNt ayant été sélectionnés et engagés en traduction sont significativement enrichis en inosine. L'inosine est une modification répandue et retrouvée en position 34 sur huit ARNt différents (Ala$^{A(I)GC}$, Arg$^{A(I)CG}$, ILe$^{A(I)AU}$, Leu$^{A(I)AG}$, Pro$^{A(I)GG}$, Ser$^{A(I)GA}$, Thr$^{A(I)GU}$, Val$^{A(I)AC}$) [304]. Elle provient de la déamination de l'adénosine (Figure 57A) et peut être aussi présente en position 37 chez Arabidopsis [305]. Cette réaction d'hydrolyse est catalysée par des adénosines désaminase (chez Arabidopsis TAD1, pour la position 37 et TAD2 et TAD3 pour la position 34). En position 34 elle est nécessaire chez Arabidopsis et sa perte totale conduit à la mort de l'embryon [305]. Ce phénotype est notamment dû au fait que l'inosine permet d'étendre la capacité de décodage de certains ARNt : alors que A est uniquement capable de décoder U, une fois désaminé, l'inosine en position 34 a la capacité de décoder les bases U, C et A de l'ARNm (Figure 57B) [306]. Or, il est important de souligner qu'il n'existe pas d'ARNt codés dans le génome d'Arabidopsis dont l'anticodon possède la séquence $G_{34}N_{35}N_{36}$, alors qu'il existe de nombreux de nombreux codons terminant par -C. Ainsi le décodage des codons se terminant par C nécessite la présence d'ARNt modifiés en I34.

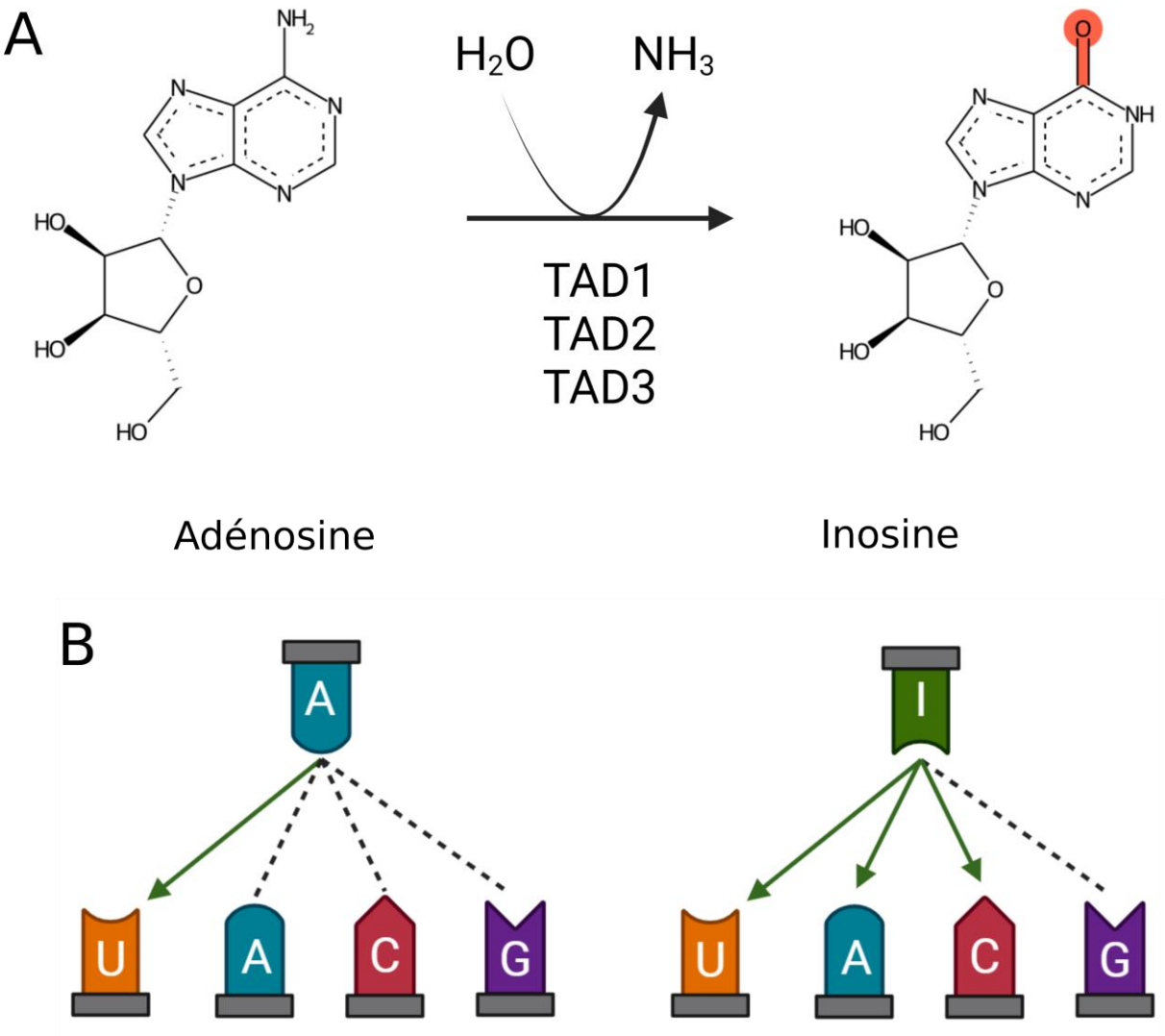
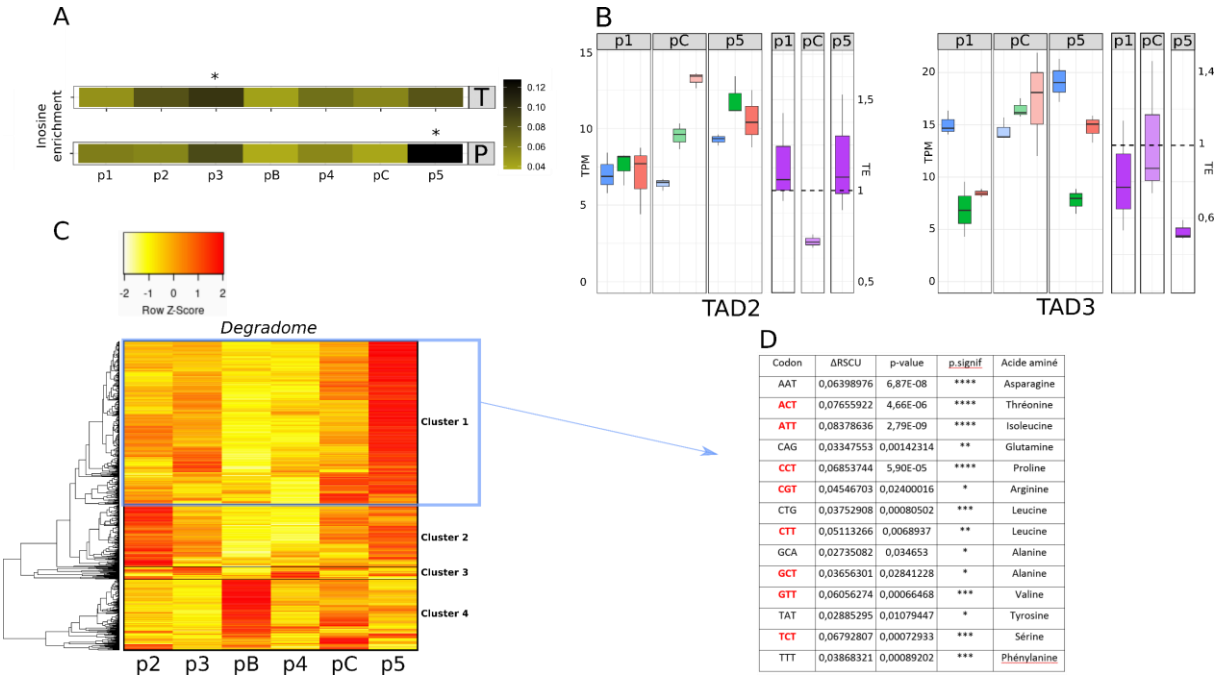


Figure 57. L'inosine permet d'éteindre la capacité de décodage de certains ARNt. *A) Structure chimique de l'adénosine et l'inosine. B) Schéma représentant les capacités de décodage des nucléotides adénosine (A) et Inosine (I) lorsque ces derniers sont retrouvés en position 34 de l'anticodon. En trait plein, les interactions favorisées et en pointillé les interactions défavorisées.*

Les niveaux d'expression des gènes TAD2 et TAD3 ont été compilés (Figure 58B). Le gène TAD2 présente, en phase de récupération après amorçage (p5), une augmentation de son niveau d'ARNm à l'équilibre associé à une augmentation de son efficacité de traduction ce qui probablement permet une augmentation de la quantité d'enzyme disponible. Ceci est parfaitement corrélé avec l'augmentation du taux d'inosine dans les ARNt à cette étape (Figure 56A). La situation est moins claire pour le gène TAD3 : bien que son niveau d'ARNm à l'équilibre soit très élevé en p5, son efficacité de traduction chute due à une augmentation du taux de dégradation co-traductionnelle (Figure 58B). Néanmoins, puisque *TAD2* et *TAD3* ont une fonction redondante, même s'il n'est pas clair que *TAD3* augmente à cette étape, l'augmentation probable de la quantité de *TAD2* pourrait à elle seule expliquer l'augmentation observée d'inosine dans les ARNt. Il serait intéressant de confirmer ces résultats en mesurant directement le taux de ces deux protéines.

Lors de la caractérisation de la traduction au cours des deux régimes de stress thermiques (SAT et BT), nous avions mis en avant quatre clusters de gènes corégulés par la dégradation co-traductionnelle (CTRD). Les données de CTRD pouvant être utilisées comme proxy pour mesurer la dynamique des ribosomes, nous nous sommes basés dessus afin de chercher des corrélations avec les variations épitranscriptomiques. Le cluster 1, composé de 602 gènes (Figure 47), a particulièrement retenu notre attention car ces transcrits sont ciblés par la dégradation co-traductionnelle lors de la période de récupération 7h30 après le stress (avec un effet plus marqué dans la condition amorcée que non-amorcée). Ainsi, afin de savoir s'il pouvait exister un lien entre l'accumulation d'inosine et la dégradation de ces transcrits, nous nous sommes intéressés aux biais de codons présents au sein du cluster 1. Afin de quantifier les potentiels biais de codons nous avons utilisé une analyse bio-informatique : le relative synonymous codon usage (RSCU) score [205]. Pour chaque codon, cette méthode va déterminer le ratio de la fréquence observée d'un codon par rapport à la fréquence attendue si tous les codons synonymes étaient employés de façon homogène [307]. Nous avons calculé ce score pour le groupe de gènes du cluster 1 ainsi que pour un groupe de gènes de même taille (n = 602) généré de manière aléatoire. Puis un ratio est réalisé (ΔRSCU) pour chacun des codons entre le RSCU du cluster 1 et de la population générée aléatoirement. Enfin, sont conservés uniquement les ΔRSCU positifs et significatifs (attestant d'un enrichissement dans le cluster 1) (Figure 58D). Sur les 59 codons analysés (les codons START, STOP et Trp sont retirés) 14 codons

sont significativement enrichis dans le cluster 1. De façon très remarquable, sur ces 14 codons, nous retrouvons 8 codons dont la proportion d'inosine en position 34 peut impacter leur traduction (ACU, AUU, CCU, CGU, CUU, GCU, GUU, UCU). En effet, bien que ces codons se terminant par U ne nécessitent pas directement de modifier A34 en I34 pour être décodés, ils pourront être impactés négativement par une augmentation du niveau de I34. En effet, en augmentant la capacité de décoder les codons synonymes se terminant par C, la modification I34 va (à quantité d'ARNt constante) mécaniquement défavoriser la vitesse de décodage des codons se terminant en U. Ce ralentissement du décodage de ces 8 codons pourrait être en partie responsable de l'augmentation du niveau de dégradation co-traductionnelle observée pour les ARNm du cluster 1.



Codon	ΔRSCU	p-value	p.signif	Acide aminé
AAT	0,06398976	6,87E-08	****	Asparagine
ACT	0,07655922	4,66E-06	****	Thréonine
ATT	0,08378636	2,79E-09	****	Isoleucine
CAG	0,03347553	0,00142314	**	Glutamine
CCT	0,06853744	5,90E-05	****	Proline
CGT	0,04546703	0,02400016	*	Arginine
CTG	0,03752908	0,00080502	***	Leucine
CTT	0,05113266	0,0068937	**	Leucine
GCA	0,02735082	0,034653	*	Alanine
GCT	0,03656301	0,02841228	*	Alanine
GTT	0,06056274	0,00066468	***	Valine
TAT	0,02885295	0,01079447	*	Tyrosine
TCT	0,06792807	0,00072933	***	Sérine
TTT	0,03868321	0,00089202	***	Phénylanine

Figure 58. L'amorçage impacte les niveaux d'inosines des ARNt polysomaux, induisant une traduction spécifique de certains transcrits. *A) Heatmap représentant les niveaux d'inosines dans les fractions d'ARNt^{TOTAUX} (T) et ARNt^{POLYSOMAUX} (P) au cours de la SAT et la BT. Sont représentés en noir les niveaux élevés d'inosine et en vert les faibles niveaux. Les étoiles représentent les résultats de tests de Wilcoxon pour deux échantillons non appariés, comparés par rapport à la condition à 20°C (* : p-value < 0.05). B) Niveaux d'expression des gènes TAD2 et TAD3 dans les trois libraires (bleu : RNASeqTotal, vert : RNASeqPolysomal et rouge : 5'P-seq)*

aux points p1, pC et p5. Les données sont représentées en TPM. En violet est présenté l'efficacité de traduction, résultant du ratio $\frac{RNASeqPolysomal}{5'P\ seq}$ *aux points p1, pC et p5. C) Heatmap présentée dans la figure 47. Entouré en bleu, le cluster 1-CTRD dont les transcrits sont principalement ciblés par la CTRD au point p5. D) Analyse du RSCU du cluster 1-CTRD par rapport à une population aléatoire de même taille. Uniquement les codons avec un ΔRSCU positifs et significatifs ont été conservés. Les 8 codons potentiellement impactés par des variations des niveaux d'inosine en position 34 sont indiqués en rouge (* : p-value < 0.05, ** : p-value < 0.01, *** : p-value < 0.001, **** : p-value < 0.0001).*

En conclusion nous avons décrit l'impact de stress thermiques courts (15') à différentes intensités (37°C et 44°C) sur l'épitranscriptome des ARNt d'un point de vue quantitatif. Nous avons aussi montré que l'amorçage peut induire des changements des profils épitranscriptomiques de façon faible à 44°C mais bien plus marqué lors de la période de récupération. Finalement nous avons évoqué l'hypothèse que ces variations et en particulier celle de l'inosine en position 34 puisse impacter les niveaux de traduction d'un sous-groupe de transcrits. Néanmoins ces résultats restent à consolider (voir discussion).

CHAPITRE 3 – DISCUSSION GÉNÉRALE

I – Il existe une variabilité épitranscriptomique naturelle chez Arabidopsis

À travers la première partie de cette thèse nous avons pu montrer qu'il existait une importante diversité des épitranscriptomes des ARNt entre différentes populations d'Arabidopsis cultivées dans les mêmes conditions de laboratoire. De façon assez surprenante, nos résultats indiquent que l'ensemble des marques sont potentiellement « variables » : c'est-à-dire que leurs niveaux diffèrent de manière significative entre au moins deux des cinq populations testées. Néanmoins, en augmentant la stringence des tests statistiques, nous obtenons 11 modifications considérées comme hautement variables. Cette importante diversité peut s'expliquer par deux critères que nous avions imposés : le choix des modifications s'était basé sur une étude bibliographique visant à choisir en priorité les marques dont la dynamique était connue (principalement en réponse à des variations de conditions intra- et extracellulaires et majoritairement chez d'autres espèces). De plus nous avions choisi des écotypes d'Arabidopsis provenant d'environnements aux conditions climatiques très diverses.

Nos résultats montrent que la diversité épitranscriptomique des ARNt observée pour ces écotypes semble corrélée avec leur diversité génétique. En effet, de façon très intéressante, les analyses en composantes principales basées sur les deux types de données (génétiques et épitranscriptomiques) fournissent des résultats similaires, proposant que les écotypes Col-0 et Bra-0 présentent moins de diversité entre eux comparés aux trois autres écotypes Rei-0, T1110 et Lerik1-3 (Figure 40). Ces résultats supposent que l'épitranscriptome des ARNt pourrait être sous le contrôle de paramètres génétiques (ou épigénétiques sous forme d'épimutations fixées) et serait impliqué dans l'adaptation (et pas uniquement l'acclimatation ponctuelle) des populations naturelles. Cet aspect est très innovant car actuellement la littérature décrit les modifications des ARNt comme étant surtout impliquées dans des mécanismes d'acclimatation à court terme et ne sont pas en général considérées dans les mécanismes permettant des phénomènes d'adaptation.

Aussi, d'intéressantes corrélations ont pu être observées entre l'enrichissement de certaines modifications et les conditions environnementales naturelles des écotypes. Les écotypes Rei-0 et T1110, tous deux soumis à des conditions environnementales très contraignantes, possèdent des ARNt hypermodifiés. De plus, si l'on se concentre sur Rei-0 (faisant face à des chaleurs extrêmes), ses ARNt sont enrichis en modifications impliquées dans la thermotolérance chez d'autres organismes (majoritairement la levure [308]). À l'inverse, un écotype tel que Bra-0 où le climat est plus stable avec des variations de températures et de précipitations plus faibles.

Ces résultats nécessitent néanmoins d'être consolidés car nous avons travaillé avec un nombre très réduits d'écotypes et la caractérisation des conditions environnementales associées à ces écotypes n'est pas assez poussée. Pour aller plus loin et confirmer les résultats présentés dans cette partie, il serait très pertinent d'augmenter considérablement le nombre d'écotypes à tester afin de renforcer les tests statistiques. Puisque nous comparons systématiquement un écotype par rapport à la moyenne des cinq testés, augmenter l'échantillon permettrait d'avoir une moyenne plus représentative de la diversité naturelle et ainsi les écarts observés seraient plus facilement interprétables. Il est aussi toujours intéressant d'enrichir la gamme de modifications à détecter afin de s'approcher au plus près de l'intégralité de l'épitranscriptome. En conclusion, nous manquons de données pour pouvoir étoffer ces hypothèses et être en capacité d'affirmer une causalité entre condition environnementale et variation des épitranscriptomes des ARNt.

Aussi, pour aller plus loin, il pourrait être intéressant de déplacer cette étude du laboratoire vers les environnements naturels. Cela permettrait de relever de manière précise les données environnementales, de réaliser une caractérisation phénotypique des écotypes au sein de leurs environnements naturels et caractériser leurs épitranscriptomes en condition naturelle à différents moments de leur cycle de vie.

Enfin, il est crucial pour toutes études épitranscriptomiques, de purifier avec précision et reproductibilité les ARN à étudier. En effet dans notre approche seuls les ARNt avaient été purifiés de manière efficace, et nous avons très vite conclu que les résultats obtenus pour la population d'ARNm ne sont pas interprétables, principalement à cause d'une importante contamination en ARNr (Figure Supplémentaire 3). Pour pallier cela, il serait intéressant de réaliser une seconde étape de polyA+ ainsi qu'une ribodéplétion (pour se débarrasser des

ARNr restants). Concernant les ARNt de nombreuses questions se sont posées sur la qualité des échantillons. En effet la méthode de purification utilisée (découpe sur gel et élution des ARNt) peut être critiquée car elle peut légèrement varier d'un échantillon à l'autre en fonction de la découpe sur gel. Pour pallier cette imprécision, il serait possible d'utiliser une technique de chromatographie par filtration sur gel afin de purifier avec une meilleure précision les ARNt. De plus il est important de noter que le clivage des ARNt est très sensible aux conditions extérieures et peut survenir rapidement après la collecte de l'échantillon et impacter l'épitranscriptome [309].

En somme, ces résultats présentent pour la première fois les profils épitranscriptomiques d'ARNt de différentes populations d'une même espèce. De plus, nous montrons que ces épitranscriptomes ne sont pas stables mais présentent de nombreuses variations entre les écotypes testés. Nos résultats attestent que le modèle Arabidopsis est très bien adapté pour ce type d'approche et nous proposons que nos résultats puissent être utilisés afin d'élaborer un nouveau projet à plus large échelle.

II – L'impact du stress thermique sur les phénomènes polysomaux et leurs rôles dans l'effet mémoire chez Arabidopsis

Afin d'étudier les impacts du stress thermique et de l'amorçage sur les phénomènes polysomaux nous avons combiné plusieurs approches de biologie moléculaire au sein de deux régimes de stress thermique présentant ou non un épisode d'amorçage. En premier lieu nous avons montré, sur la base de la quantification des taux de polysomes (gradients de sucrose) et suite à la méta-analyse 5P-seq, que l'amorçage impacte positivement la traduction à la fois à 44°C et en période de récupération post-stress. À 44°C, le taux de polysomes est supérieur dans la condition amorcée, suggérant que cette étape limite la dissociation des ribosomes lors du stress aigu. En récupération l'effet est encore plus marqué. Alors que les plantules non-amorcées présentent encore des niveaux de polysomes extrêmement faibles et une augmentation des produits de dégradation CTRD en 5' combinée à une perte des produits en 3' (symptomatique d'une baisse globale du niveau de traduction), les plantules amorcées ont quant à elles retrouvées des niveaux de traduction proches de ceux de la condition témoin (environ 75% des taux de polysomes de base, Figure 43). Ces résultats attestent que l'amorçage permet de préparer la traduction à un stress aigu et facilite la récupération du potentiel traductionnel après l'événement de stress. Il pourrait être intéressant de se demander quels sont les facteurs mis en place au cours de l'amorçage qui permettent cette protection des ribosomes par la suite. Pour cela il serait pertinent de caractériser les impacts du stress thermique sur les composants des ribosomes, pouvant impacter leur stabilité. Par exemple les ARN ribosomiques sont impactés par le stress thermique, ainsi nous pourrions analyser leur stabilité (par exemple en marquant les ARNr avec des sondes et en suivant leur dégradation sur la base de ce marquage). Pour aller plus loin nous pourrions chercher à comprendre quels sont les facteurs impactant cette stabilité, par exemple en caractérisant l'épitranscriptome des ARNr (par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse) au cours d'un stress thermique. Aussi, nous pourrions nous intéresser aux modifications post-traductionnelles portées par les protéines ribosomales telles que les phosphorylations, ubiquitinylations ou glycosylations (par spectrométrie de masse), pouvant influencer la stabilité des protéines et donc *in fine* le complexe ribosomal. Enfin, aux vues des résultats

obtenus sur les populations de protéines ribosomales différentiellement régulées, nous pourrions nous intéresser de plus près à ce phénomène en caractérisant la composition protéique des ribosomes aux différents points des stress thermique SAT et BT.

Par la suite trois techniques NGS ont été combinées afin d'obtenir une image de l'impact de l'amorçage sur la régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et traductionnel. Il a été récemment proposé dans la littérature que, la combinaison des données de RNASeq sur les fractions d'ARN polysomaux avec les données de 5P-seq (CTRD) permettent d'obtenir une image plus réaliste de l'efficacité de traduction [206]. En appliquant cette mesure aux différents points des deux régimes de stress thermique SAT et BT nous avons montré que l'amorçage permet une régulation contrastée entre gènes de croissance et gènes de stress. Merret *et al.,* ont précédemment publié qu'environ 25% du transcriptome est soumis à une forte dégradation lors d'un évènement de stress thermique et que ces gènes codent des protéines impliquées dans le développement et la croissance [211]. Ils proposent qu'il est nécessaire de dégrader ces ARNm afin de réaliser efficacement la transition de l'état de croissance vers l'état de réponse au stress. Dans nos résultats, nous montrons que ce sous-groupe de gènes a une efficacité de traduction qui baisse au cours du stress thermique. On observe donc un effet additif où les gènes du programme de croissance et développement sont à la fois plus fortement dégradés et moins efficacement traduits. Au contraire, les gènes de réponses au stress quant à eux vont être favorisés par la machinerie traductionnelle et leurs transcrits vont présenter des niveaux d'efficacité de traduction accrus en réponse au stress. Ces résultats montrent que la traduction est capable de réguler de manière spécifique l'efficacité de traduction de sous-populations de transcrits afin d'adapter la réponse de la plante. En effet, jusqu'à aujourd'hui l'implication des régulations traductionnelles dans la réponse au stress thermique n'était que très peu étudiée et leurs rôles dans l'effet mémoire totalement omis. Ainsi, à travers cette étude nous mettons en avant pour la première fois l'importance des régulation traductionnelles dans la réponse au stress thermique et particulièrement l'effet mémoire chez Arabidopsis.

L'analyse des données NGS a pointé du doigt que l'évènement d'amorçage permet la mise en place efficace de la voie UPR lors d'un stress aigu, un phénomène que nous n'avons pas observé dans la condition non-amorcée. Cette voie permet d'aider au repliement des

protéines dans le réticulum endoplasmique (RE) et est importante pour la réponse des plantes au stress thermique. Dans le stress BT (condition non-amorcée), les ARNm codant pour les protéines du RE sont préférentiellement ciblées par la CTRD. Ces transcrits codent des protéines possédant une partie C-terminale hautement hydrophobe, qui nécessite la présence des chaperonnes de la voie UPR pour être correctement repliées lorsqu'elles émergent du tunnel du ribosome. Nous proposons que dans la condition non-amorcée, l'absence de l'activation de la voie UPR, conduit à une mauvaise prise en charge des protéines naissantes au niveau du RE et par conséquent induit des défauts de repliement de ces protéines. Les défauts de repliement au niveau du tunnel du ribosome induisent des ralentissement de traduction. Ce ralentissement du ribosome est un signal de recrutement de XRN4 sur ces transcrits (Figure 21). Une fois recrutée cette enzyme va dégrader les transcrits en cours de traduction. Il est donc intéressant de postuler que l'activation de la voie UPR permettrait en partie d'expliquer les phénotypes d'acclimatation.

Afin de valider les données NGS qui suggèrent une activation de la voie UPR seulement après amorçage, plusieurs approches moléculaires que je n'ai pas eu le temps de conduire pourraient être testées. De nombreuses études se basent sur le taux d'épissage du facteur bZiP60 comme proxy du niveau d'activation de la voie UPR. En cas de réponse au stress thermique, bZiP60 est rapidement épissé afin d'être activé. La visualisation de cet épissage peut être évaluée par RT-PCR avec des amorces adaptées. Une autre voie d'activation de la voie UPR implique les protéines bZiP17 et bZiP28. Afin d'être actives, ces protéines doivent être hydrolysées dans l'appareil de Golgi. Avec l'aide d'un anticorps adapté, il est possible de mesurer le taux d'hydrolyse de ces protéines et donc mesurer l'activation de la voie UPR. Enfin plusieurs publications se basent sur des techniques de quantification (RT-qPCR, westernblot) des cibles des bZiP60, bZiP17 et BZiP28 [310,311].

Ensuite, il serait intéressant de confirmer par d'autres approches le rôle de la voie UPR dans le phénomène d'acclimatation observé. Si nos hypothèses sont validées, l'utilisation de mutants de la voie UPR (tels que les doubles mutants *ire1a/b et bzip26/60*) devraient montrer des phénotypes de thermosensibilité plus similaires entre les conditions SAT et BT. Puisque l'amorçage permet l'induction de la voie UPR, un mutant ayant perdu la capacité d'induire la voie UPR, perd l'avantage conféré par l'amorçage. Ainsi nous pouvons faire l'hypothèse qu'un mutant impacté dans la voie UPR présentera des phénotypes moins contrastés entre les

conditions amorcée et non-amorcée. Le phénotype du mutant pourrait alors être proche entre les conditions amorcées ou non. Une autre expérience intéressante consisterait à activer la voie UPR des plantes à l'aide de traitement chimiques (tunicamycin, thapsigargin, Brefedin A, dithiothreitol et MG132) et tester si cela conduit à une meilleure thermotolérance des plantules face à un stress thermique aigu : en d'autres termes, est-il possible d'amorcer chimiquement les plantes afin qu'elles soient mieux acclimatées au stress thermique ?

Dans la publication présentée dans cette thèse (partie résultats 2.2), nous avons montré un enrichissement significatif de la protéine XRN4 dans les polysomes quand la plante n'a pas subi d'évènement d'amorçage. Ces résultats corrèlent avec nos observations, indiquant que la voie UPR n'étaient pas efficacement activée dans cette condition et conduisant à une hausse du taux de dégradation des transcrits associés au RE. Pour aller plus loin dans cette validation fonctionnelle, il serait pertinent de quantifier le taux de protéine de XRN4 dans les polysomes spécifiquement associés au RE. Si notre hypothèse se confirme, un enrichissement plus important de XRN4 dans les polysomes associés au RE (par rapport aux fractions polysomales totales) devrait être observé dans la condition non-amorcée.

Nos données ont montré que dans notre design expérimental (plantules entières de cinq jours, régime de stress thermique SAT et BT), près de 5% du transcriptome d'Arabidopsis est régulé exclusivement via l'engagement polysomal de leur ARNm. De plus, le phénomène de dégradation co-traductionnelle régule aussi 5% du transcriptome. Ces résultats attestent donc qu'environ 10% des transcrits d'Arabidopsis sont sous contrôle exclusif des phénomènes polysomaux pour réguler leur taux d'expression dans les conditions expérimentales que nous avons testées. De plus, nos résultats avancent que la dégradation co-traductionnelle n'est pas qu'un phénomène passif mais doit être considérée, dans certains cas, comme un mécanisme permettant de réguler l'expression des gènes au même titre que la transcription et l'engagement polysomal.

Enfin, une analyse approfondie des transcrits dont l'expression est exclusivement sous contrôle traductionnel a montré qu'un certain nombre de gènes codant des protéines ribosomales y étaient retrouvés. À la suite d'une étape d'amorçage, au cours de la période de récupération, une sous-population de protéines ribosomales est ciblé par la CTRD et

fortement dégradé, faisant chuter leur efficacité de traduction . À l'inverse, des transcrits codant une autre sous-population de protéines ribosomales sont quant à eux plus fortement engagés dans les polysomes favorisant leur efficacité de traduction. Il est possible d'imaginer que ces différences d'expression des protéines ribosomales est un des moyens utilisé par les cellules permettant la mise en place des ribosomes spécialisés [299,312]. Mais cette notion de ribosome spécialisé n'étant elle-même pas établie comme un consensus au sein de la communauté scientifique, nos résultats n'ont pas vocation à affirmer que les plantules mettent en place ces ribosomes spécialisés. Ainsi ces résultats sont préliminaires et il reste à démontrer si des ribosomes spécialisés sont effectivement utilisés pour répondre au stress thermique.

III - Le stress thermique et l'amorçage impactent l'épitranscriptome des ARNt d'Arabidopsis

Dans cette partie nous avons cherché à comprendre comment les stress thermiques BT et SAT (et donc l'amorçage) induisent des variations de l'épitranscriptome des ARNt^{TOTAUX} et ARNt^{POLYSOMAUX} d'Arabidopsis. Pour cela, nous avons conduit une approche basée sur la LC MS/MS, qui nous a permis de déterminer les variations de 21 modifications chimiques tout au long des deux régimes de stress. De plus, la caractérisation des épitranscriptomes des deux populations d'ARNt (que sont les ARNt^{TOTAUX} et ARNt^{POLYSOMAUX}) nous a permis de déceler comment étaient impactés à la fois l'épitranscriptome globale (ARNt^{TOTAUX}) ainsi que celui des ARNt favorisés par la machinerie traductionnelle (ARNt^{POLYSOMAUX}).

À plusieurs occasions, nous avons observé des différences de profils épitranscriptomiques entre la population des ARNt^{TOTAUX} et celle des ARNt^{POLYSOMAUX}. Ces résultats sont très intéressants car ils suggèrent qu'il existe, au niveau polysomal, une sélection préférentielle de certains ARNt avec un profil épitranscriptomique qui diffère de celui du profil cellulaire global. Il serait intéressant de questionner les causes de ces recrutements préférentiels. Ont-ils lieu lors du chargement de l'acide aminé ? Lors de l'interaction avec le facteur d'élongation de la traduction eEF1 ? Lors de l'interaction avec le ribosome ? (ou, selon le cas, à une ou l'autre de ces étapes ?).

Pour répondre à la question du chargement de l'acide aminé, il serait intéressant de bloquer chimiquement le processus d'aminoacylation, avec des aminoacyl-sulfanomides (ces composés ont des structures similaires à celles des acides aminés et vont bloquer l'aminoacylation de certains ARNt en se fixant sur les aminoacyl-ARNt synthétases). En bloquant l'aminoacylation avant le stress, nous pourrions observer si les discordances observées entre les profils épitranscriptomiques des ARNt^{TOTAUX} et ARNt^{POLYSOMAUX} sont encore présentes [313].

Afin de tester avec des approches moléculaires les différences d'interactions avec les facteurs de traduction ou bien le ribosome, nous pourrions réaliser des expériences de co-immunoprécipitation en ciblant le facteur d'élongation eEF1 ou des protéines ribosomales

suivi d'une purification des ARNt. Une quantification des modifications par spectrométrie de masse permettrait d'observer si à certains points de la SAT, l'amorçage va induire un enrichissement de certaines marques chimiques associées à eEF1 ou à des protéines ribosomales.

Cette étude a aussi montré que l'intensité du stress thermique (15' à 37°C/p2 et 15' à 44°C/pB) n'induit pas les mêmes variations, attestant de la sensibilité de l'épitranscriptome. En effet les variations observées entre les profils épitranscriptomiques à 37°C et à 44°C diffèrent (Figure 54). De plus nos résultats montrent pour la première fois que l'amorçage a un impact sur la composition de l'épitranscriptome à la fois lors du second stress aigu (15' à 44°C) (Figure 55), et encore plus au cours de la période de récupération (après 7h30 à 20°C) (Figure 56). Ici il est intéressant de noter que nos résultats concordent avec les effets de l'amorçage sur la traduction : alors que son effet est observé à 44°C, il reste néanmoins assez faible (les profils épitranscriptomiques entre p4 et pB diffèrent assez peu) (Figure 55). En revanche on trouve de nouveau un impact important de l'amorçage au cours de la période de récupération (p5 et pC) (Figure 56)

Parmi tous ces résultats, une modification a particulièrement retenu notre attention : l'inosine. Nous avons observé une augmentation du taux d'inosine dans la fraction d'ARNt^{POLYSOMAUX} au cours de la phase de récupération uniquement dans la condition amorcée (p5) (Figures 56 et 58). En parallèle nous avons cherché à savoir s'il existait des biais de codons dans des populations différentiellement régulées au cours de la phase de récupération (p5). De façon intéressante nous avons trouvé une population de transcrits exclusivement sous-contrôle de la dégradation co-traductionnelle et fortement soumise à la dégradation au cours la phase de récupération dans la condition amorcée (cluster 1-CTRD, Figure 47 et 58). Une analyse bio-informatique permettant de déceler et quantifier des biais de codons au sein de sous-population de transcrits a été réalisée (score RSCU). Cette analyse a montré que 14 codons sont enrichis dans cette population. Parmi ces 14 codons, il a été très surprenant d'y trouver les 8 codons dont le décodage peut être impacté par des variations des niveaux d'inosine en position 34 (ACU, AUU, CCU, CGU, CUU, GUU et UCU) (Figure 58). Comme expliqué précédemment, le décodage de ces codons est indirectement impacté par la présence d'inosine en position 34. En absence d'I34 ces codons sont préférentiellement

traduits, mais lors d'une augmentation d'I34, la diversité de codons pouvant être traduits par les mêmes ARNt augmente, engendrant une compétition pour le décodage de ces codons. Ces résultats nous ont permis de proposer l'hypothèse d'un rôle de l'inosine dans la régulation fine de l'expression de ces gènes via la dégradation co-traductionnelle.

Puisque la délétion totale de I34 est létale chez Arabidopsis, il est nécessaire pour étudier l'impact de cette modification de travailler avec des mutants hypomorphes. Plusieurs expériences complémentaires pourraient être imaginées pour tester notre hypothèse. Nous pourrions alors réaliser une nouvelle approche GMUCT (5-Pseq) sur les doubles mutants hypomorphes *tad2/tad3.* Si notre hypothèse est confirmée, alors ces transcrits ne devraient plus être des cibles préférentielles de la dégradation co-traductionnelle au cours de la période de récupération. De plus, les données GMUCT pourraient être utilisées pour étudier les vitesses de décodage des 8 codons cités ci-dessus : si notre hypothèse est validée, le double mutant *tad2/tad3* devrait avoir une vitesse de décodage de ces codons supérieures à celle du sauvage lors de la récupération dans la condition amorcée.

Notre approche possède aussi ses limites. À travers cette étude nous avons quantifié les épitranscriptomes des plantules entières d'Arabidopsis. De fait, quand nous analysons les résultats nous les interprétons à l'échelle de l'organisme entier. Or, même après cinq jours de croissance, différents tissus et types cellulaires sont présents (les méristèmes, les cotylédons, les organes racinaires, etc…). Nous pouvons supposer que les épitranscriptomes ne sont pas parfaitement identiques entre les différents types cellulaires, et par conséquent il est possible que nous observions et étudions une combinaison de plusieurs épitranscriptomes. Pour pallier ce problème, il pourrait être intéressant dans une étude future, de séparer les tissus racinaires des tissus aériens.

Une autre limite concerne la variabilité observée entre certains réplicats, qui ont dû être retirés de l'étude. Par conséquent certaines analyses statistiques n'étaient pas assez robustes. Ainsi il faudrait augmenter le nombre de réplicats afin d'accroitre la puissance des tests statistiques de façon à valider les variations observées de marques chimiques au cours de la SAT et BT. L'analyse des biais de codon par le score RSCU devra également faire l'objet d'une

étude statistique plus poussée avant une validation finale, en modifiant et/ou augmentant le nombre de(s) groupe(s) témoin(s).

Les données de spectrométrie de masse devront aussi être validées par l'utilisation, idéalement, de deux autres techniques (mimi-tRNASeq et nanopore, introduction chapitre 4.3.1). Le séquençage des ARNt par ces techniques permettrait de mesurer les quantités d'ARNt à l'équilibre et la position de certaines marques chimiques. Nous pourrions ainsi confronter ces données avec celles obtenues par spectrométrie de masse et voir si les variations observées lors du stress thermique se confirment et qu'elle en est la cause probable. En effet, il serait intéressant de savoir si les variations des taux de modifications détectées sont liées à une dégradation d'ARNt, à une hausse de la production d'ARNt différentiellement modifiés ou alors à un changement de novo de marques chimiques impliquant des ARNt préexistants. Finalement, Il serait très intéressant par la suite d'aller jusqu'au niveau protéique. En effet pour compléter cette approche multi-omique innovante, nous pourrions analyser le protéome d'Arabidopsis au cours des stress SAT et BT et déterminer la part de chacun des mécanismes de régulation, évoqués plus tôt, dans l'expression des gènes.

Le contexte climatique actuel nécessite de comprendre comment les organismes végétaux (et en particulier ceux cultivés pour l'alimentation) se comportent, s'acclimatent et s'adaptent en réponse aux élévations de températures. En effet, il est nécessaire pour établir de nouvelles générations de plantes possédant de meilleures caractéristiques face aux hausses de températures, de comprendre comment les plantes intègrent et régissent leur réponse à différent niveaux. Jusqu'à aujourd'hui l'aspect de régulation traductionnelle manque cruellement de données et son implication dans les phénomènes d'acclimatation (mais aussi d'adaptation) n'avait jamais été documenté. De nos jours, de nombreuses approches biotechnologiques ont cherché à améliorer les caractéristiques de résistance à la chaleur (sans impacter les rendements) majoritairement via des approches ciblant des régulations de la transcription. Mais très souvent, ces études se heurtent à des phénomènes épigénétiques de type "silencing", ou à des boucles de rétroaction compensatoire qui rendent difficile ce type d'approche. Nos résultats montrent que la part des phénomènes polysomaux n'est pas négligeable (puisque 10% du transcriptome est uniquement sous contrôle de phénomènes

polysomaux dans notre design expérimental) et nous proposons que réguler de façon précise ces phénomènes pourrait être une voie prometteuse pour l'établissement de nouvelles générations de plantes résistantes à de fortes chaleurs. Par exemple, le remplacement des codons d'un gène par des codons synonymes (via une approche d'édition de gène) pourrait permettre d'augmenter son efficacité de traduction (et le taux de protéines produites) sans avoir à modifier son niveau de transcription, évitant ainsi les difficultés mentionnées plus haut. En conclusion, nos résultats soutiennent que l'étude de la traduction dans les mécanismes de réponses aux stress est un domaine prometteur qui pourrait permettre de dynamiser les approches modernes d'amélioration variétale se traduisant ainsi par d'importants bénéfices socio-économiques.

Matériel et méthodes

L'ensemble du matériel et méthode en lien avec l'article « Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency » a déjà été décrit au sein de la publication et ne sera pas de nouveau mentionné dans cette partie. Pour toute information en lien avec les expérimentations présentées dans l'article, j'invite le lecteur ou la lectrice à se référer à ce dernier.

Matériel végétal

Toutes les études conduites dans cette thèse ont été menées sur la plante modèle Arabidopsis *thaliana*. Dans le cas de l'étude de la diversité épitranscriptomique naturelle, les écotypes sauvages Columbia (Col-0, Allemagne, CS1092), Reliquias (Rei-0, Portgual, CS77208), Brazuelo (Bra-0, Espagne, CS76721), Malmö (T1110, Suède, CS76236) et Lagodechi (Lag1.5, Géorgie, CS77000) ont été utilisés. Pour le matériel végétal utilisé dans les parties 2 et 3, j'invite le lecteur ou la lectrice à se référer à l'article « Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency » présenté dans la partie 2 des résultats.

Conditions de culture

Pour la partie 1 des résultats, les graines des cinq écotypes ont été stérilisées en les incubant 5' dans l'éthanol 70% suivi de deux lavages à l'éthanol 100%. Puis les graines sont semées sur milieu synthétique Murashige et Skoog (MS) (MS0213 de Duchefa) contenant 1% de saccharose et 0,8% d'agar. Les graines sont ensuite stratifiées 48h à 4°C avant d'être cultivées pendant 9 jours à 20°C avec un cycle de 16h de lumière / 8h d'obscurité (120 µmol.m-2.s-1) en chambre *in vitro*. Une fois âgées de 9 jours les plantules ont été récoltées, congelées à l'azote liquide et cryobroyées à l'aide du cryobroyer Retsch MM400. Pour les conditions de culture et de stress thermique utilisés dans les parties 2 et 3, j'invite le lecteur à se référer à l'article « Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency » présenté dans la partie 2 des résultats.

Extraction d'ARN total et polysomal

Pour la partie 1 des résultats, 100mg de poudre de plantules broyées sont resuspendues dans 1mL de solution de RNAzol®RT (Sigma-Aldrich). La solution est homogénéisée puis 0,4mL d'H_2O RNAse-free y est ajouté. La solution est ensuite centrifugée pendant 15' à 12000g. Le surnageant est conservé et 1 volume d'isopropanol y est ajouté. Après 15' d'homogénéisation à température ambiante (RT), une seconde centrifugation de 15' à 12000g est réalisée. Le culot est lavé deux fois à l'éthanol 75%, puis les ARNtotaux sont resuspendus dans 20 µL d'H_2O RNAse-free.

Pour les extractions d'ARN total et d'ARN polysomal des parties 2 et 3 des résultats, j'invite le lecteur à se référer à l'article « Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency » présenté dans la partie 2 des résultats.

Extraction d'ARNr et ARNm

100mg de poudre de plantules broyées sont resuspendus dans 1mL de solution de RNAzol®RT. La solution est homogénéisée puis 0,4mL d'H_2O RNAse-free y est ajouté. La solution est ensuite centrifugée pendant 15' à 12000g. Le surnageant est conservé et 0,4mL d'éthanol à 75% y est ajouté. Après 10' d'homogénéisation à RT, une seconde centrifugation de 8' à 12000g est réalisée. Le culot est lavé deux fois à l'éthanol 75%. Cette étape d'extraction permet de conserver uniquement les ARN avec une taille supérieure à environ 200 nucléotides. On appellera cette fraction les ARNLarge. Enfin, les ARNLarge sont resuspendus dans 20µL d'H_2O RNAse-free.

Cette fraction d'ARNLarge est ensuite utilisée afin de séparer les ARN polyA+ (fractions enrichies en ARNm possédant une queue polyA) et les ARN polyA- (fraction appauvrie en ARN possédant une queue polyA). Pour cela le kit polyAtract®mRNA Isolation Systems III and IV est utilisé. 0,1mg d'ARNLarge est déposé dans un volume final de 500µL. Les ARNLarge sont dénaturés en chauffant 10' à 65°C puis 3µL d'oligo(DT)-biotinylés et 13µL de SSC 20X sont ajoutés. La solution est homogénéisée à l'aide de la pipette et incubée à RT jusqu'à ce que la solution soit homogène. D'autre part, les particules paramagnétiques de streptavidin (SA-PMP) sont placées sur un portoir magnétique et le surnageant est retiré afin de ne conserver que les particules. Les SA-PMP sont lavées deux fois en ajoutant 300µL SSC 0.5X, puis elles

sont resuspendues dans 100µL de SSC 0.5X. Dans le tube contenant les SA-PMP, sont ajoutés les ARNLarge associés aux oligo(DT)-biotinylés. Cette solution est incubée 10' puis mélangée par inversion toutes les 2'. Le tube est ensuite placé sur un portoir magnétique et le surnageant est retiré (les ARN polyA+ se trouvent associés aux billes). Ce surnageant est conservé car il contient la fraction d'ARN polyA- (fortement enrichie en ARNr). Les particules sont ensuite lavées quatre fois avec 300µL de SSC 0,1X. Pour éluer, les particules sont resuspendus dans 100µL de H_2O RNase-free et homogénéisées à l'aide de la pipette. Le tube est de nouveau placé sur le portoir magnétique afin de récupérer le surnageant. Cette étape d'élution est répétée une seconde fois en rajoutant 150µL d'H_2O dans le tube contenant les particules. Le tube est de nouveau placé sur le portoir et les 150µL d'H_2O sont récupérés. Les deux élutions sont fusionnées, donnant un volume final de 250µL. Ce tube contient la fraction d'ARN polyA+ (enrichie en ARNm) conservés à -80°C.

Extraction d'ARNt

Pour les extractions des ARNt de la partie 1 des résultats : 100mg de poudre de plantules broyées sont resuspendues dans 1mL de solution de RNAzol®RT. La solution est homogénéisée puis 0,4mL d'H_2O RNAse-free y est ajouté. La solution est ensuite centrifugée pendant 15' à 12000g. Le surnageant est conservé et 0,4mL d'éthanol à 75% y est ajouté. Après 10' d'homogénéisation à RT, une seconde centrifugation de 8' à 1000g est réalisée. Le surnageant est conservé et 0,8 volume d'isopropanol y est ajouté. La solution est incubée 30' à RT puis une centrifugation de 15' à 12000g est réalisée. Le surnageant est retiré et le culot est lavé avec 0,4mL d'isopropanol à 70% (cette étape de lavage est répétée une seconde fois). Cette étape permet de purifier les ARN de petites tailles (inférieurs à 200 nucléotides) que l'on appellera ARNsmall. Le culot contenant les ARNsmall est resuspendu dans 20µL d'H_2O RNAse-free.

Puis *2*µg d'ARNsmall sont déposés sur un gel d'agarose 2% TBE 1X. Après migration, la bande correspondant aux ARNt est excisée et les ARNt sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin®Gel and PCR clean-up. Rapidement *: 200*µL de tampon NTI sont ajoutés à la bande d'agarose excisée puis incubés 10' à 50°C pour dissoudre l'agarose. La mixture est ensuite déposée dans un tube percé en son bout et centrifugée afin de séparer l'agarose de la solution. Puis la solution est déposée sur une colonne NucleoSpin® et centrifugée 30'' à 11000g. La colonne

est conservée car les ARN y sont fixés. 700µL de tampon NT3 sont ajoutés sur la colonne, qui est centrifugé 30'' à 11000g. Le surnageant est jeté (cette étape est répétée une seconde fois). Les ARNt sont élués en ajoutant 15µL d'H_2O RNAse-free sur la colonne. Après être incubés 1', ils sont centrifugés 1' à 11000g. Les ARNt sont conservés à -80°C avant d'être analysés en LC-MS /MS.

Pour les extractions de la partie 3 des résultats : pour purifier les $ARNt^{TOTAUX}$, 4µg d'ARN totaux sont chargés sur des gels PAGE 10% (8M d'urée, 1X TBE). Les ARN totaux sont au préalable dénaturés 2' à 70°C et chargés directement sur le gel (il ne faut pas les refroidir sur la glace). L'électrophorèse est réalisée à 300V pendant 3 heures à température ambiante . Pour visualiser les ARN, 5µL de SybrGold (concentré à 10 000X) sont ajoutés dans une cuve remplie de 50mL de TBE 0,5X . Après la migration, le gel y est incubé durant 15' sous agitation. Le gel est ensuite révélé et la bande correspondant aux ARNt est excisée à l'aide d'un scalpel stérile. Les ARNt présents dans la bande excisée sont extraits à l'aide du kit ZR small-RNA™ PAGE Recovery Kit Clean-up RNA from polyacrylamide gels. Les $ARNt^{TOTAUX}$ sont élués dans 12µL d'eau RNAse-free et leur concentration est mesurée à l'aide du Qubit. Les $ARNt^{TOTAUX}$ sont conservés à -80°C avant d'être analysés en LC- MS /MS.

Les $ARNt^{POLYSOMAUX}$ sont extraits à partir des fractions d'ARN $totaux^{POLYSOMAUX}$ (voir partie Matériel et Méthode de la publication « *Plant response to intermittent heat stress involves modulation of mRNA translation efficiency »). Puis* 10µg d'ARN $totaux^{POLYSOMAUX}$ sont déposés sur des gels PAGE 10% (8M d'urée, 1X TBE). Pour la suite, la procédure est la même que celle suivi dans le paragraphe précédent. Les $ARNt^{POLYSOMAUX}$ sont élués dans 12µL d'H_2O RNAse-free et leur concentration est mesurée à l'aide du Qubit. Les $ARNt^{POLYSOMAUX}$ sont conservés à -80°C avant d'être analysés en LC- MS /MS.

Quantification des ARN

Les ARN totaux et ARN ribosomiques ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre : NanoDrop 2000 / 2000c. 1µL d'échantillon a été utilisé pour le dosage. Les ARNt et les ARNm ont été dosés à l'aide du Qubit RNA Assay kit. Pour chacun des échantillons, 1µL est utilisé.

Contrôle qualité

Le contrôle qualité des échantillons d'ARN (ARNt, ARNm, ARNr, ARNtotaux) est réalisé à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent). Pour cela 1µL de chaque échantillon est déposé sur une puce « RNA plant nano ».

Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Dans la première partie résultats, pour digérer les extraits d'ARN : 150ng d'extraits d'ARNt purifiés sont déposés dans un volume final de 20µL. Y sont ajoutés 3µL d'acétate d'ammonium 100mM, pH 5,3 et 1µL de nucléase p1 (1U/mL). Cette solution est incubée à 42°C pendant 1h puis 3µL d'acétate d'ammonium 1M et 1µL de phosphatase alcaline (E. coli) (1U/mL) y sont ajoutés. La solution est ensuite incubée à 37°C pendant 2h. Puis y sont ajoutés 60µL de phase A (5mM acétate d'ammonium pH 5,3). Les échantillons sont filtrés avec des filtres 0,22µm (SLGVR04NL, Millipore) et le filtra est transféré dans des tubes. Les échantillons sont prêts à être chargés pour l'analyse LC-MS/MS.

Puis 5µL de chaque échantillon de nucléosides sont injectés et séparés par chromatographie liquide ultra-performante en phase inverse, comme décrit dans [314] .

Dans la troisième partie des résultats, le même protocole a été utilisé mais cette fois-ci ce sont 100ng d'extrait d'ARNt purifiés qui ont été utilisés pour la digestion et l'analyse.

Analyses bio-informatique

Les données brutes d'épitranscriptomiques représentent l'aire totale sous la courbe extraite à l'aide du logiciel Skyline 21.1.0. Seuls les pics ayant une forme normale et un rapport signal/bruit minimal de 3 dans au moins un des échantillons comparés ont été pris en compte dans la suite de l'analyse.

Afin de réaliser les heatmaps de la partie 1 des résultats, les données d'épitranscriptomiques ont subi une double normalisation. Tout d'abord le ratio de l'aire totale du nucléoside modifié est normalisé par la somme des aires totales des nucléotides non-modifiés C+U+G (l'adénosine est exclue de la normalisation car son signal sature chez certains échantillons). Puis la seconde normalisation calcule la moyenne d'une modification pour les cinq écotypes

et la modification est normalisée par cette moyenne. Les ratios sont calculés séparément pour chaque réplicat puis la moyenne des réplicats est réalisée et représentée sur les heatmap. Toutes les étapes de normalisation ont été réalisées avec le logiciel Rstudio.

Afin de réaliser les heatmap de la partie 3 des résultats, les données d'épitranscriptomiques ont subi une première normalisation : le ratio de l'aire totale du nucléoside modifié est normalisé par la somme des aires totales des nucléotides non-modifiés C+U+G (l'adénosine est exclue de la normalisation car son signal sature chez certains échantillons). Puis un second ratio est calculé par rapport à la condition de référence à 20°C : ces ratios sont calculés séparément pour chaque réplicat puis la moyenne des réplicats est réalisée et représentée sur les heatmap.

Les tests statistiques ont été réalisés sur le logiciel R à l'aide du package rstatix.

Les ACP en trois dimensions basées sur les données épitranscriptomiques ont été réalisées par Eric Rivals (LIRMM) comme décrites dans la publication [315]. L'ACP en deux dimensions basée sur les données génétiques a été réalisée par Joris Bertrand (LGDP). Les données des SNP utilisées sont celles du fichier VCF des 1001 génomes d'Arabidopsis pour les cinq écotypes étudiés (Col-0, Bra-0, Rei-0, T1110 et Lag1.5) (https://1001genomes.org/).

L'analyse RSCU a été conduite par Marie-Christine Carpentier (LGDP). Le score RSCU a été calculé comme présenté dans la publication [204].

Annexes

Figures Supplémentaires

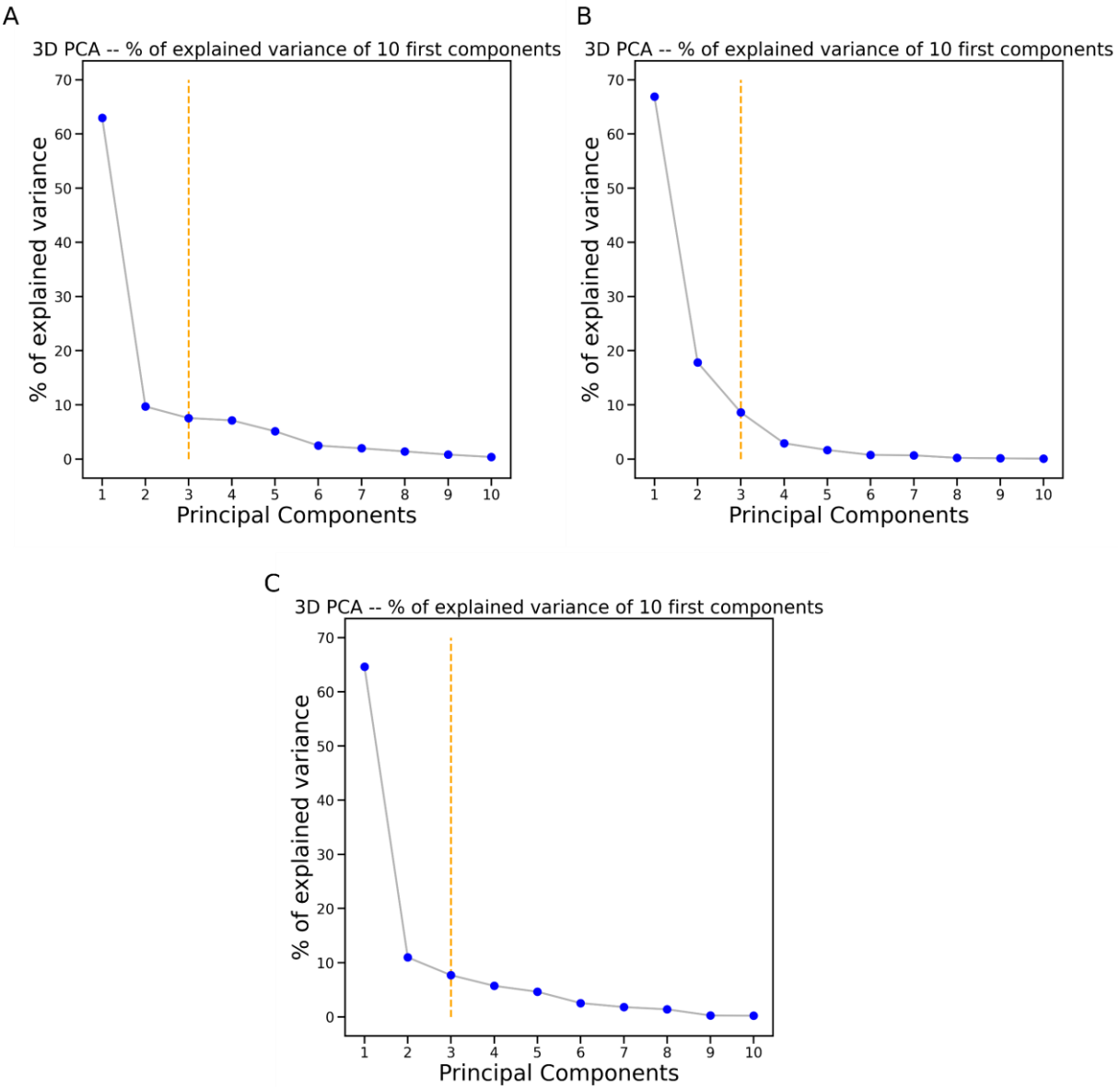


Figure Supplémentaire 1. *A) Graphique représentant le taux de variabilité expliqué par les 10 premières composantes pour l'ACP de la Figure 35. B) Graphique représentant le taux de variabilité expliqué par les 10 premières composantes pour l'ACP de la Figure 37. C) Graphique représentant le taux de variabilité expliqué par les 10 premières composantes pour l'ACP de la Figure 40.*

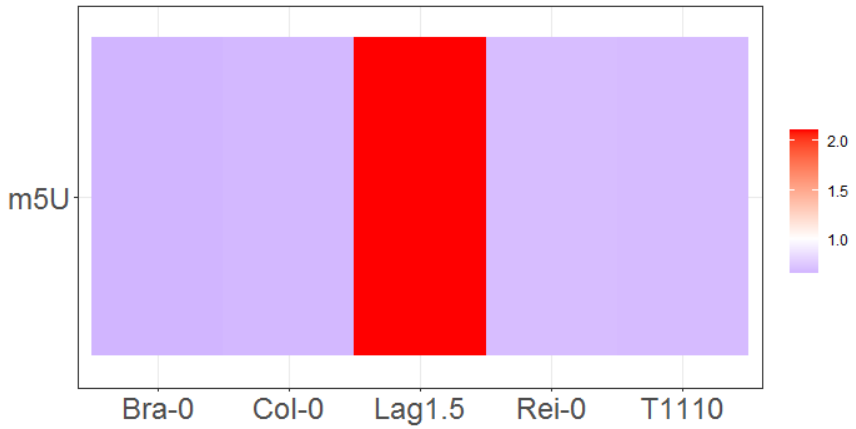


Figure Supplémentaire 2. Heatmap représentant l'enrichissement de m^5U dans les fractions d'ARNt des cinq écotypes d'*Arabidopsis*. *Pour chaque écotype, trois réplicats biologiques et techniques ont été compilés (sauf pour les écotypes Col-0, Lag1.5 et T1110 où un réplicat biologique a été retiré). Les données ont d'abord été normalisées par la somme des bases non modifiées U + G + C. Ensuite, une deuxième étape de normalisation a été appliquée pour pouvoir comparer les enrichissements (normalisation par la moyenne des enrichissements de m^5U pour les cinq écotypes). On observe que m^5U est fortement enrichie dans l'écotype Lag.15 comparé aux quatre autres écotypes. Son enrichissement est tel qu'il empêchait toute visualisation des résultats sur la heatmap (Figure 42) et a donc été présenté séparément ici.*

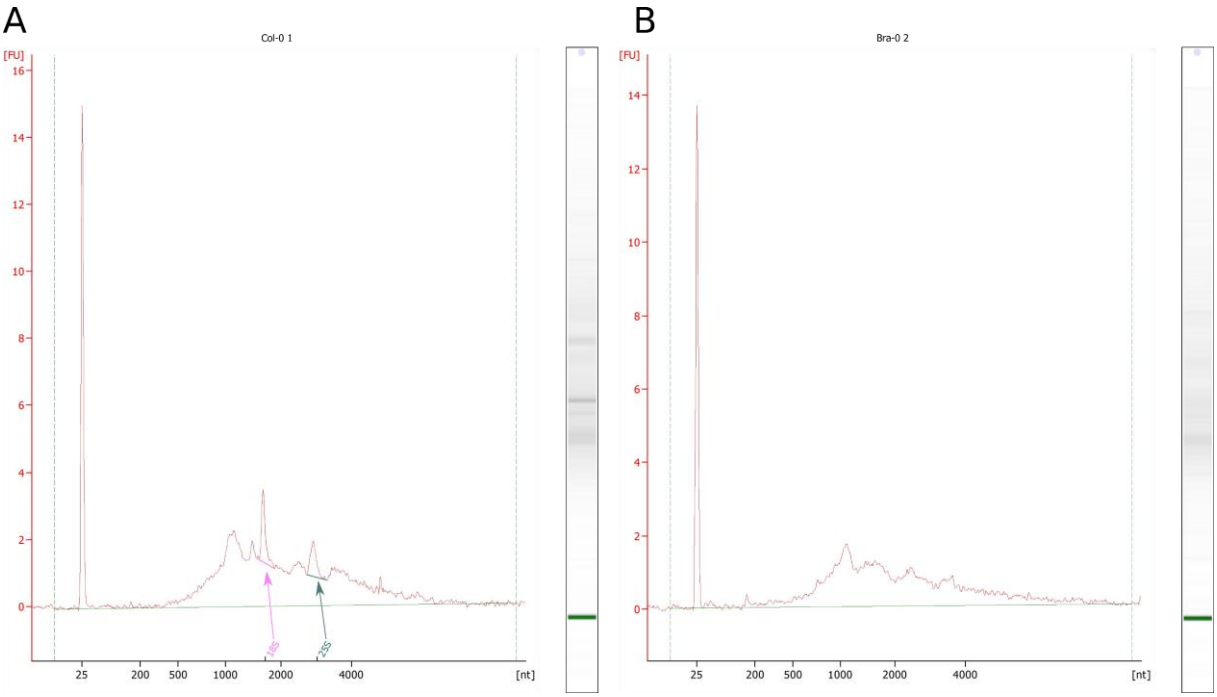


Figure Supplémentaire 3. Les fractions d'ARNm sont contaminées par des ARNr. *Résultats de l'analyse qualité des échantillons d'ARN messagers au bioanalyzer (Agilent) pour les réplicats 1 de Col-0 (A) et réplicats 2 de Bra-0 (B). Ces deux échantillons ont été choisis pour illustrer la contamination en ARNr dans certaines fractions d'ARNm purifiés. L'électrophérogramme de l'échantillon Col-0.1 (A) présente deux pics correspondants à une contamination en ARNr 18S et 25S.*

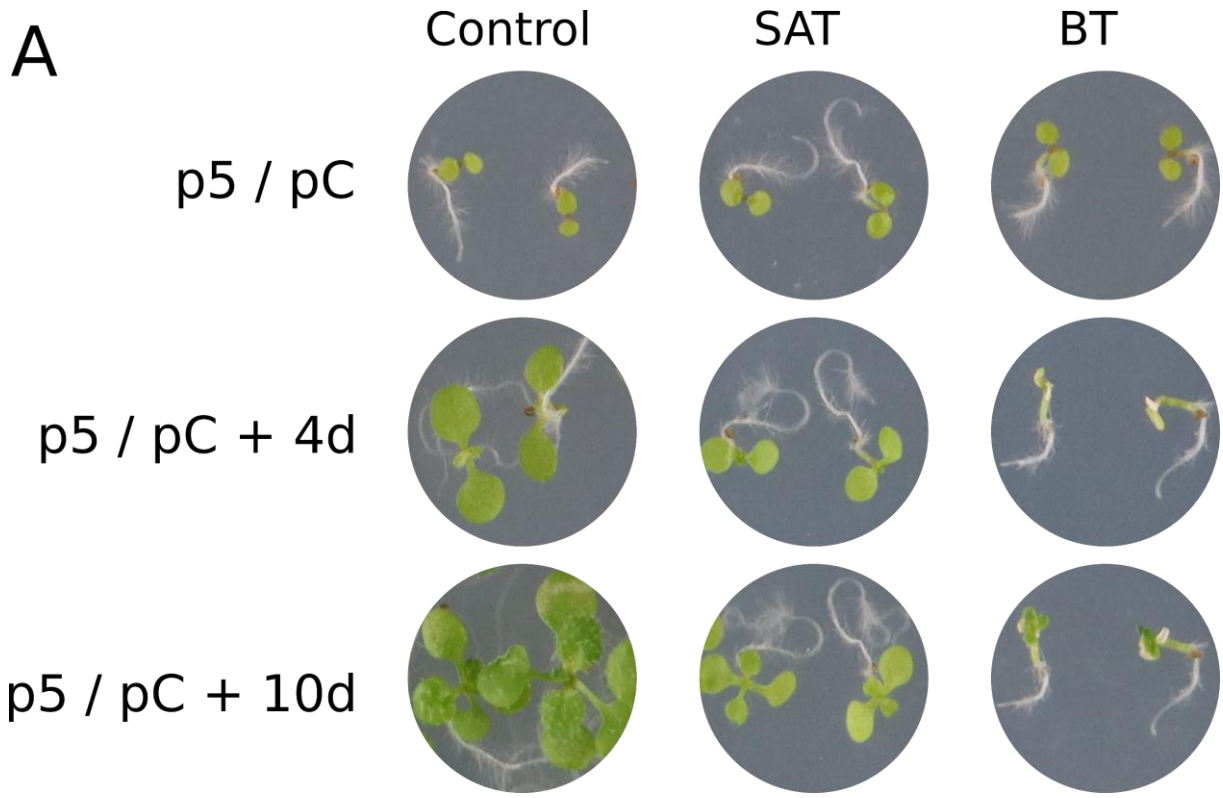


Figure Supplémentaire 4. Priming impact phenotypically the phenotypes of *Arabidopsis* plantlets. *Arabidopsis* picture were taken at the end the day after the stress event (p5 / pC), then 4 days and 10 days after the stress event, for control condition (left), SAT condition (middle) and BT condition (right).

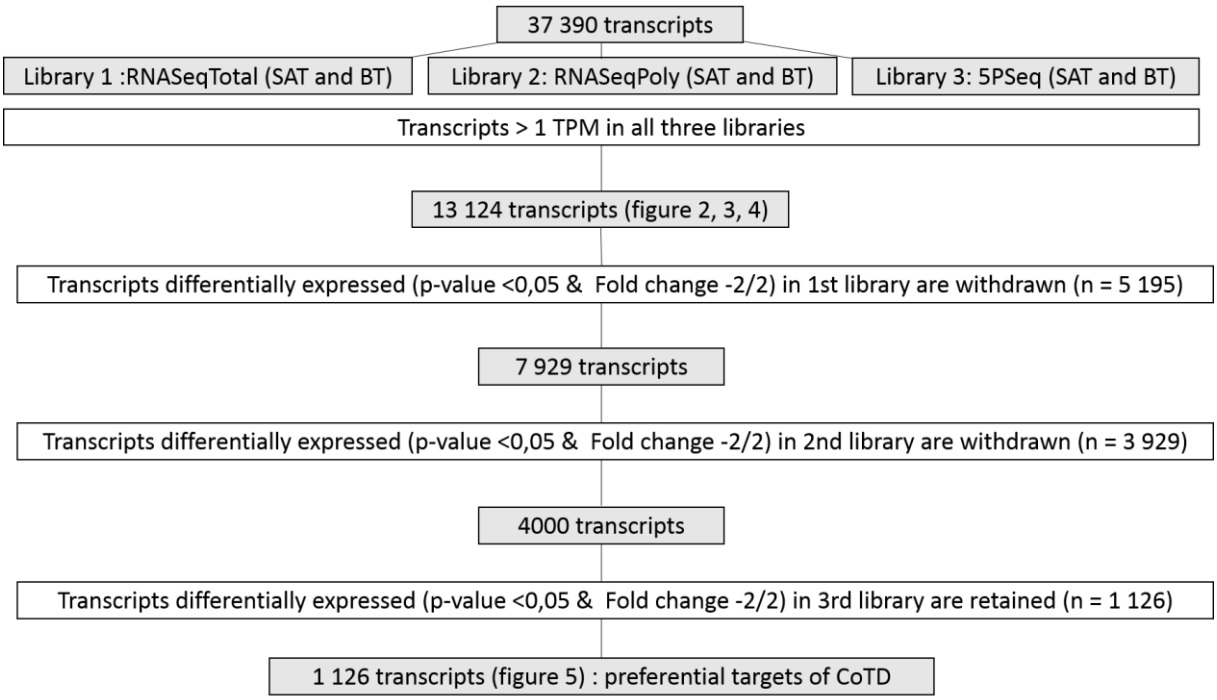


Figure Supplémentaire 5. Pipeline used to assess subgroups of mRNA preferentially targeted by CoTD. Three libraries were made using different NGS techniques. A first filter was used to keep only transcripts with > 1TPM in all three libraries generating a new dataset of 13 124 transcripts. Then all transcripts differentially expressed (p-value <0.05 & FC -2/2) in library 1 and 2 were taken out, generating a dataset of 4000 genes. Then only transcripts differentially expressed in the 3rd library were kept and considered as preferential targets of CoTD.

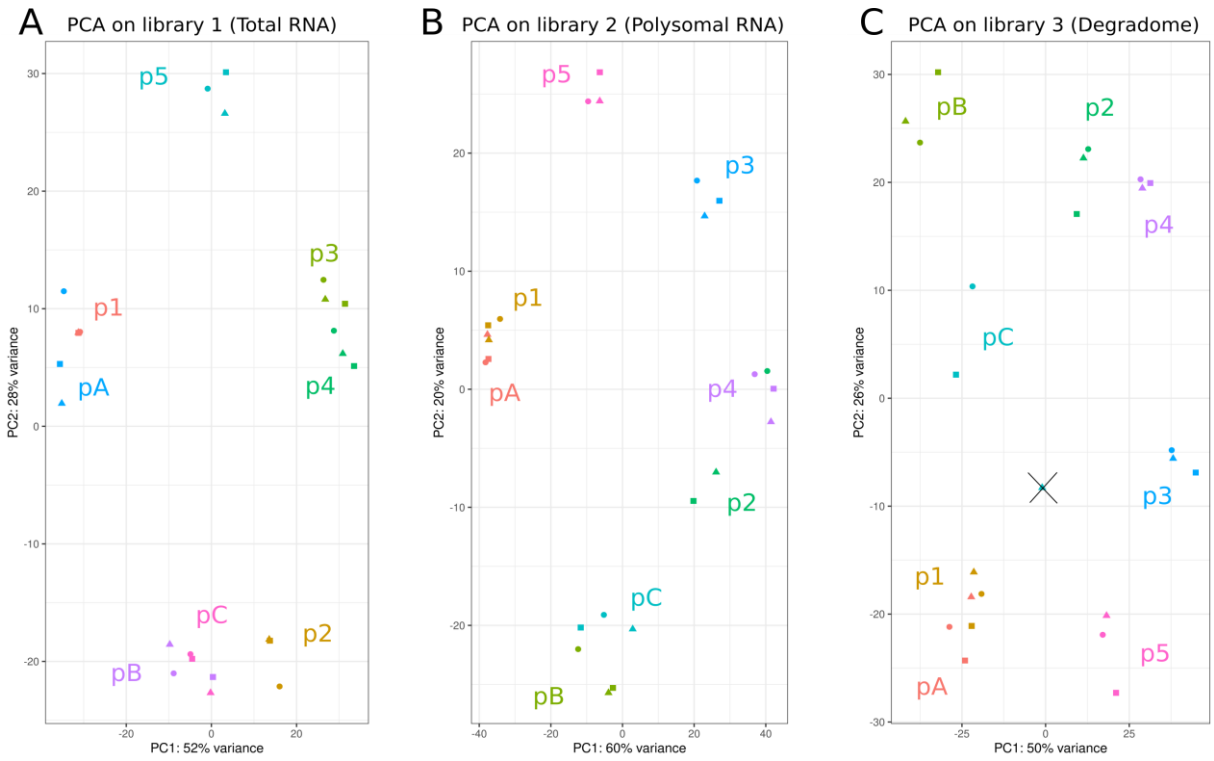


Figure Supplémentaire 6. Libraries quality control. Three two-dimensions PCA were conducted for each library produced (A : library 1, B : library 2 and C : library 3). The two axes can explain 80%, 80 and 76% of the variance for each library respectively. Each replicate is represented by round (R1), triangle (R2), square (R3). In "C", the second replica of pC diverged from the other two and was withdrawn from the study (represented by a cross on the figure).

Tableaux Supplémentaires

Reliquias (Portugal) (Rei-0)	Températures mensuelles (moyenne, °C)	Humidité (%)	Précipitation (mm)	Ensoleillement (h)
Janvier	10,2	80	54	171
Février	10,8	75	51	192
Mars	13	72	55	219
Avril	14,8	70	57	249
Mai	17,8	63	38	294
Juin	21,2	58	11	330
Juillet	22,8	56	2	339
Aout	23,4	56	5	327
Septembre	21,3	63	26	276
Octobre	18,2	73	68	228
Novembre	13,3	76	67	192
Décembre	11,1	80	68	177
Moyenne Annuelle	16,49	68,5	41,83	249,5

Brazuelo (Spain) (Bra-0)	Températures mensuelles (moyenne, °C)	Humidité (%)	Précipitation (mm)	Ensoleillement (h)
Janvier	2,8	83	74	117
Février	3,3	77	53	150
Mars	5,8	71	61	186
Avril	8	70	68	219
Mai	11,6	66	65	273
Juin	16,4	58	39	327
Juillet	18,7	53	25	339
Aout	18,8	52	28	324
Septembre	15,9	57	38	270
Octobre	11,1	72	80	180
Novembre	5,6	82	74	123
Décembre	3,5	82	75	114
Moyenne Annuelle	10,12	68,58	56,66	218,5

Landsberg (Germany) (Col-0)	Températures mensuelles (moyenne, °C)	Humidité (%)	Précipitation (mm)	Ensoleillement (h)
Janvier	-0,5	69	71	204
Février	-0,1	71	71	216
Mars	4,1	69	86	243
Avril	8,6	70	80	279
Mai	12,9	71	102	303
Juin	16,5	70	100	318
Juillet	18,1	68	102	321
Aout	17,9	69	90	285
Septembre	13,7	70	83	246
Octobre	9,5	69	66	225
Novembre	4,1	67	76	216
Décembre	0,6	72	86	186
Moyenne Annuelle	8,78	69,58	84,41	253,5
Malmö (Suède) (T1110)	Températures mensuelles (moyenne, °C)	Humidité (%)	Précipitation (mm)	Ensoleillement (h)
Janvier	1	84	54	75
Février	1	83	44	108
Mars	2,9	80	45	159
Avril	7,2	74	40	261
Mai	11,9	71	44	309
Juin	15,5	70	63	321
Juillet	18	72	62	327
Aout	17,5	75	71	297
Septembre	14,3	78	58	216
Octobre	9,9	82	59	144
Novembre	6	86	54	93
Décembre	2,8	86	57	72
Moyenne Annuelle	9	78,41	54,25	198,5

Lagodekhi (Géorgie) (Lag1.5)	Températures mensuelles (moyenne, °C)	Humidité (%)	Précipitation (mm)	Ensoleillement (h)
Janvier	-0,5	61	39	201
Février	1	63	48	210
Mars	5,3	67	74	234
Avril	10,3	69	85	264
Mai	15,5	65	59	330
Juin	20,6	54	37	375
Juillet	23,7	51	39	372
Aout	23,7	47	29	348
Septembre	18,5	56	38	291
Octobre	12,3	66	56	228
Novembre	5,4	67	59	198
Décembre	1	60	38	201
Moyenne Annuelle	11,4	60,5	50,08	271

Tableau Supplémentaire 1. *Données météorologiques des habitats des 5 écotypes naturels d'Arabidopsis Bra-0 (Brazuelo, Espagne), Rei-0 (Reliquias, Portgual), Col-0 (Landsberg, Allemagne), T1110 (Malmö, Suède) et Lag1.5 (Lagodekhi, Géorgie). Source : WMO (World Meteorological Organization). Les données moyennes sont fondées sur les données collectées au cours de 30 années (de 1991 à 2020). Ces données ont été utilisées pour la Figure 41.*

mesure	group1	group2	p.format	p.signif
Psi	Bra-0	Rei-0	0.00029	***
Psi	Rei-0	T1110	0.03147	*
Psi	Rei-0	Lag1.5	0.00564	**
m7G	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
m3C	Col-0	Bra-0	0.02443	*
m3C	Col-0	Rei-0	0.02443	*
m3C	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
m3C	Rei-0	Lag1.5	4.1e-05	****
m3C	T1110	Lag1.5	0.01419	*
m1G	Col-0	Rei-0	0.01419	*
m1G	Bra-0	Rei-0	0.00029	***
m1G	Rei-0	Lag1.5	0.03998	*
mcm5s2U	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
mcm5s2U	Rei-0	Lag1.5	0.00564	**
ncm5U	Col-0	Bra-0	0.01876	*
ncm5U	Bra-0	Rei-0	0.00016	***
ncm5U	Rei-0	T1110	0.02443	*
m1A	Col-0	Rei-0	0.00399	**
m1A	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
m5C	Col-0	Rei-0	0.00399	**
m5C	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
m5C	Rei-0	Lag1.5	0.00049	***
Cm	Col-0	Rei-0	0.00016	***
Cm	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
Cm	Bra-0	Lag1.5	0.01876	*
Cm	Rei-0	T1110	0.02443	*
Cm	Rei-0	Lag1.5	0.00123	**
Gm	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
Gm	Bra-0	T1110	0.01419	*
Gm	Bra-0	Lag1.5	0.00564	**
Am	Rei-0	T1110	0.02443	*
Am	T1110	Lag1.5	0.00777	**
m22G	Col-0	Rei-0	0.00399	**
m22G	Bra-0	Rei-0	0.00078	***
m2G	Col-0	Rei-0	0.00276	**
m2G	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
m2G	Rei-0	Lag1.5	0.01876	*
i6A	Col-0	Rei-0	8.2e-05	****
i6A	Col-0	T1110	0.00123	**
i6A	Col-0	Lag1.5	0.01419	*
i6A	Bra-0	Rei-0	4.1e-05	****
i6A	Bra-0	T1110	0.00016	***
i6A	Bra-0	Lag1.5	0.01061	*
i6A	Rei-0	Lag1.5	0.00399	**
i6A	T1110	Lag1.5	0.03147	*
D	Col-0	Rei-0	0.02443	*
D	Bra-0	Rei-0	0.00049	***
io6A	Col-0	Rei-0	0.00016	***
io6A	Bra-0	Rei-0	0.00078	***
io6A	Rei-0	Lag1.5	0.00123	**

***Tableau Supplémentaire 2**. Résultats des test statistiques permettant de comparer les taux d'enrichissement des modifications (normalisés par U+G+C) des ARNt entre les cinq écotypes d'Arabidopsis. Pour chaque modification tous les écotypes sont comparés deux à deux et un test de Wilcoxon à deux échantillons non appariés est réalisé pour tester la significativité des variations observées. * : p-value < 0.05, ** : p-value < 0.01, *** : p-value < 0.001, **** : p-value < 0.0001.*

modification	group1	group2	p.format	p.signif
m7G	Col-0	Bra-0	0.00777	**
m7G	Col-0	Rei-0	0.00399	**
m7G	Col-0	Lag1.5	0.03998	*
m1A	Col-0	Lag1.5	0.01876	*
m1A	Bra-0	T1110	0.01199	*
m1A	T1110	Lag1.5	0.01199	*
m5C	Col-0	Lag1.5	0.01876	*
m5C	Rei-0	Lag1.5	0.01419	*
m5C	T1110	Lag1.5	0.03596	*
m66A	Col-0	Rei-0	0.01876	*
m66A	Col-0	Lag1.5	0.00123	**
m22G	Col-0	Rei-0	0.02443	*
m22G	Rei-0	T1110	0.03596	*
m2G	Col-0	Bra-0	0.03998	*
m2G	Bra-0	T1110	0.00280	**
m2G	Bra-0	Lag1.5	0.00029	***
m2G	Rei-0	T1110	0.01199	*
m2G	Rei-0	Lag1.5	0.00777	**
m5U	Col-0	T1110	0.00040	***
m5U	Col-0	Lag1.5	0.03147	*
m5U	Bra-0	T1110	0.00160	**

***Tableau Supplémentaire 3**. Résultats des test statistiques permettant de comparer les taux d'enrichissement des modifications (normalisés par U+G+C) des ARNr entre les cinq écotypes d'Arabidopsis. Pour chaque modification tous les écotypes sont comparés deux à deux et un test de Wilcoxon à deux échantillons non appariés est réalisé pour tester la significativité des variations observées. * : p-value < 0.05, ** : p-value < 0.01, *** : p-value < 0.001, **** : p-value < 0.0001.*

Heat stress response, subcomponent Cytosolic Protein Response (CPR)

Gene	Function	log2(fold change) (P)	log2(fold change)(NP)
AT1G74310	ATHSP101	7,74	6,41
AT3G12580	HSP70-4 (HSP70)	6,72	4,98
AT5G02490	HSP70-2 (HCS70-2)	1,61	2,13
AT2G32120	HSP70-8 (HSP70T-2)	5,64	5,27
AT5G62020	HSFB2A	1,78	2,44
AT4G36990	ATHSF4	2,57	2,24
AT5G52640	ATHSP90-1	7,54	5,91
AT1G54050	HSP17.4B,	7,85	6,74
AT2G29500	HSP17.6B	10	6,68
AT2G19310	HSP18.5,	4,52	3,97
AT5G37670	HSP15.7	6,5	6,18
AT5G51440	HSP23.5	6,56	5,39
AT2G25140	HSP98.7	2,05	2,11
AT5G48570	ATFKBP65, FKBP65, ROF2, potential to interact with Hsp90/Hsp70 as co-chaperones.	7,92	4,96
AT2G20560	DNAJ, DNAJ PROTEIN, DNAJ heat shock family protein;	5,67	5,39
AT1G01720	ANAC002, ANAC2, ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2, ATAF1	1,21	1,48
AT1G07350	SERINE/ARGININE RICH-LIKE PROTEIN 45A, SR45A SERINE/ARGININE RICH-LIKE PROTEIN 45A, SR45A	2,79	4,07
AT1G09070	ATSRC2	2,05	1,23
AT1G14200	SNIPER1, USR1, E3 ligase involved in the regulation of the homeostasis of sensor NLR immune receptors.	1,85	4,17
AT1G17870	TEGY3, EGY3, ETHYLENE-DEPENDENT GRAVITROPISM-DEFICIENT AND YELLOW-GREEN-LIKE 3	7,17	3,31
AT1G26800	MISFOLDED PROTEIN SENSING RING E3 LIGASE 1, MPSR1, SNIPER2	2,8	3,91
AT1G30070	SGS domain-containing protein	5,53	4,56
AT1G55530	BCA2 ZINC FINGER ATL 6, BTL06	1,64	2,05
AT1G66080	HIKESHI-LIKE, HIKESHI-LIKE PROTEIN1, HKL, HLP1	2,47	3,99
AT1G67360	LD-ASSOCIATED PROTEIN 1, LDAP1, SMALL RUBBER PARTICLE PROTEIN, SRP1	3,58	3,23
AT2G36460	FBA6, FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 6	3,32	1,98
AT2G46240	ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 6, ATBAG6, BAG6, BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 6	6,78	6,28
AT3G04710	TETRATRICOPEPTIDE REPEAT 10, TPR10, potential to interact with Hsp90/Hsp70 as co-chaperones.	1,8	1,12
AT3G07090	DESI1	3,28	2,33
AT3G09350	FES1A, Encodes one of the Arabidopsis orthologs of the human Hsp70-binding protein 1 (HspBP-1) and yeast Fes1p	5,76	3,97
AT3G10020	HUP26, HYPOXIA RESPONSE UNKNOWN PROTEIN 26	6,16	3,65
AT3G12050	Aha1 domain-containing protein	3,13	1,64
AT3G13470	CHAPERONIN-60BETA2, CPN60BETA2, CPNB2	2,52	1,51
AT3G17611	ATRBL10, ATRBL14, RBL10, RBL14, RHOMBOID-LIKE PROTEIN 10, RHOMBOID-LIKE PROTEIN 14	3	2,66
AT3G24500	ATMBF1C, MBF1C, MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1C	5,62	5,91
AT3G53230	ATCDC48B, CELL DIVISION CYCLE 48B	2,32	1,1
AT4G12400	HOP3, potential to interact with Hsp90/Hsp70 as co-chaperones	6,39	6,11
AT4G15420	Ubiquitin fusion degradation UFD1 family protein	2,45	1,64
AT4G23570	SGT1A	1,89	2,94
AT5G05410	DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2, DRE-BINDING PROTEIN 2A, DREB2, DREB2A,	3,75	4,36
AT5G12110	elongation factor 1-beta 1	4,43	2,49
AT5G35320	DBH-like monooxygenase	3,8	4,55
AT5G47830	hypothetical protein	3,75	2,67

General heat stress response

Genes	function	log2(fold change) (p4)	log2(fold change)(pB)
AT4G21320	HSA32	5,54	3,3
AT3G09440	HSP70-3 (HCS70-3)	3,92	2,7
AT1G16030	HSP70-5 (HSP70B)	9,18	6,32
AT1G79920	HSP70-15	2,95	1,22
AT5G09590	HSP70-10 (MTHSC70-2)	4,43	2,82
AT5G56030	ATHSP90.2	3,23	2,3
AT5G56010	ATHSP90-3	1,94	1,69
AT5G59720	HSP18.2	11,45	6,11
AT3G22840	ELIP1	1,92	1,9
AT3G08970	ATERDJ3A, THERMOSENSITIVE MALE STERILE 1, TMS1	3,05	4,08
AT3G44110	ATJ, ATJ3, DNAJ HOMOLOGUE 3, J3	1,95	1,11
AT5G58070	ATTIL, TEMPERATURE-INDUCED LIPOCALIN, TIL	3,18	1,18
AT5G59820	ATZAT12, RESPONSIVE TO HIGH LIGHT 41, RHL41, ZAT12	1,11	3,76
AT5G15450	ALBINO AND PALE GREEN 6, APG6, ATCLPB3, CASEIN LYTIC PROTEINASE B-P, CASEIN LYTIC PROTEINASE B3, CLPB-P, CLPB3	4,13	1,39
AT2G47180	ATGOLS1, GALACTINOL SYNTHASE 1, GOLS1	8,14	3,05
AT4G17250	transmembrane protein	3,18	2

Tableau Supplémentaire 4. Compilation des g*ènes de la voie CPR (jaune) et de la réponse générale au stress thermique (bleu), surexprimés à 44°C dans les conditions amorcée (p4) et non-amorcée (pB). Les données de fold-change des conditions p4 et pB sont indiquées en log2 (Plant response to intermittent stress involves modulation of mRNA translation efficiency).*

Regulation

Gene	Function	log2(fold change)
AT1G42990	ATBZIP60.	1,18
AT5G47120	ARABIDOPSIS BAX INHIBITOR 1, ATBI-1, regulator of bZIP28	2,65
AT5G22290	ANAC089, response to endoplasmic reticulum stress	2,84

Protein folding

Gene	Function	log2(fold change)
AT5G28540	BIP1 (HSP70-11)	2,63
AT5G42020	BIP2 (HSP70-12)	2,1
AT2G25110	ATSDF2, Forms a complex SDF2-ERdj3B-BiP	1,46
AT3G62600	ERDJ3B, Forms a complex SDF2-ERdj3B-BiP	1,11
AT5G61790	CALNEXIN 1, a conserved endoplasmic reticulum (ER) chaperone protein	1,8
AT5G07340	CALNEXIN 2, a conserved endoplasmic reticulum (ER) chaperone protein	1,54
AT4G24190	SHEPHER (ATHSP90-7), an ER-resident HSP90-like protein	1,27
AT4G16660	HSP70-17, an ER-resident HSP70-like protein	1,82
AT1G27350	Ribosome associated membrane protein RAMP4	2,21
AT1G27330	Ribosome associated membrane protein RAMP4	1,78
AT1G04980	ATPDI10, response to endoplasmic reticulum stress	1,63
AT2G32920	ATPDI9, response to endoplasmic reticulum stress	1,96
AT1G77510	ATPDI6, response to endoplasmic reticulum stress	1,42
AT2G02810	UTR1, UDP-GALACTOSE TRANSPORTER 1, Involved in the unfolded protein response	2,38
AT1G14360	UTR3, UDP-GALACTOSE TRANSPORTER 3, reticulum unfolded protein response,	1,79

ERAD

Gene	Function	log2(fold change)
AT1G65040	HRD1B, Involved in ERAD (Endoplasmic reticulum-associated degradation).	1,76
AT4G29330	DER1, DERLIN-1 ERAD complex	1,39
AT4G17420	ATAIM24-B1, PAWH1, ERAD pathway	1,26
AT5G47420	ATAIM24- B2, PAWH2, ERAD pathway	1,22
AT4G03510	ATRMA1, ERAD pathway	1,41
AT1G72175	RNF170-like protein (DUF 1232), E3 ubiquitin-protein ligase	2,82
AT3G09840	CDC48, ubiquitin-dependent ERAD pathway	1,34
AT5G03340	CDC48C, ubiquitin-dependent ERAD pathway	1,06
AT2G17190	DSK2A, complete the action of Cdc48 during ERAD	1,03
AT1G51710	UBP6, UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 6	1,53
AT3G08690	UBC11, UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 11 (UBE2K-like)	2,95
AT4G11740	SAY1, vesicle-mediated transport, ubiquitin binding, similarity to coil-coiled domain of yeast VSP27 protein	1,58
AT4G23040	Ubiquitin-like superfamily protein	1,52

Tableau supplémentaire 5. *Gènes de la voie UPR surexprimés à 44°C uniquement dans la condition amorcée (p4). Les gènes sont séparés en trois tableaux en fonction de leur rôle dans la voie UPR : régulateur (vert), activité chaperonne (bleu), système ERAD (orange). Les données de fold-change de la condition p4 sont indiquées en log2 (Plant response to intermittent stress involves modulation of mRNA translation efficiency).*

Gene	Function	log2(fold change)
AT1G05680	UGT74E2, Uridine diphosphate glycosyltransferase 74E2	2,97
AT1G10370	ATGSTU17, Glutathione S-Transferase U17	1,53
AT1G19020	HUP35, HYPOXIA RESPONSE UNKNOWN PROTEIN 35	2,72
AT1G21910	DREB26, DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN 26	2,06
AT1G22190	ERF58, Putative transcription factor belongings to the abiotic stress-associated DREB A-6 clade	2,01
AT1G25560	ATTEM1, AP2/B3 transcription factor family protein, member of the RAV transcription factor family	1,29
AT1G32560	ATLEA4-1, LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 4-1	1,66
AT1G49780	PUB26, plant U-box 26	1,28
AT1G68620	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	1,91
AT1G72930	ATTN10, toll/interleukin-1 receptor-like protein	1,24
AT1G73010	ATAPS2, Pyrophosphate-specific phosphatase	1,75
AT1G73500	ATMKK9, MAP kinase kinase 9	1,31
AT1G78080	ATWIND1, Member of the DREB subfamily A-6	1,59
AT2G15480	UGT73B5, UDP-glucosyl transferase 73B5	1,52
AT2G16060	AHB1, Hemoglobin 1	1,44
AT2G38870	PR (pathogenesis-related) peptide that belongs to the PR-6 proteinase inhibitor family	1,29
AT2G40000	HSPRO2, Ortholog of sugar beet HS1 PRO-1 2	2,26
AT3G13310	DJC66, DNA J PROTEIN C66	1,45
AT3G45140	ATLOX2, Lipoxygenase 2	1,31
AT3G55980	ATC3H47, Salt-inducible zinc finger 1	2,72
AT3G61890	ATHB-12, Homeobox 12	1,08
AT3G62260	PP2C49, TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASE 49	1,46
AT4G03960	ATPFA-DSP4, Phosphotyrosine protein phosphatases superfamily protein	1,09
AT4G11280	ACS6, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc) synthase 6	3,49
AT4G11660	AT-HSFB2B, HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR B2B	1,81
AT4G14690	ELIP2, Chlorophyll A-B binding family protein	1,09
AT4G17090	ATBAM3, BETA-AMYLASE 3,	1,07
AT4G22880	LDOX, Leucoanthocyanidin dioxygenase	1,3
AT4G27280	CMI1, CA2+-DEPENDENT MODULATOR OF ICR1	3,26
AT4G28270	ATRMA2, RING membrane-anchor 2	1,03
AT4G32480	Phosphorus (P) stress-inducible DUF506 gene family member	1,58
AT4G34150	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	1,54
AT5G02020	SIS, SALT INDUCED SERINE RICH	1,73
AT5G08790	ANAC081, ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 81	2,59
AT5G21940	hybrid signal transduction histidine kinase M-like protein	1,61
AT5G37680	ARLA1A, ADP-ribosylation factor-like A1A	1,14
AT5G37770	ATCML24, CALMODULIN-LIKE 24	1,12
AT5G41080	ATGDPD2, GLYCEROPHOSPHODIESTER PHOSPHODIESTERASE 2	1,56
AT5G61600	ERF104, Ethylene response factor 104	2,89
AT5G63160	BT1, BTB and TAZ domain protein 1	1,62
AT5G66400	ATDI8, Dehydrin family protein	2,29

Tableau supplémentaire 6*. Gènes de réponse au stress, surexprimés à 44°C uniquement dans la condition non amorcée (pB). Les données de fold-change de la condition pB sont indiquées en log2 (Plant response to intermittent stress involves modulation of mRNA translation efficiency).*

Gene	Fonction	Compartiment	Nom
AT5G27850	Grande sous-unité	Cytoplasmique	EL18X
AT1G57660	Grande sous-unité	Cytoplasmique	EL21X
AT1G57860	Grande sous-unité	Cytoplasmique	EL21W
AT3G22230	Grande sous-unité	Cytoplasmique	EL27Y
AT4G26230	Grande sous-unité	Cytoplasmique	EL31Y
AT2G19740	Grande sous-unité	Cytoplasmique	EL31Z
AT5G46430	Grande sous-unité	Cytoplasmique	EL32Y
AT2G36170	Grande sous-unité	Cytoplasmique	EL40Z
AT2G27530	Grande sous-unité	Cytoplasmique	UL1Y
AT1G04480	Grande sous-unité	Cytoplasmique	UL14X
AT2G33370	Grande sous-unité	Cytoplasmique	UL14Z
AT5G39740	Grande sous-unité	Cytoplasmique	UL18Y
AT2G39390	Grande sous-unité	Cytoplasmique	UL29Y
AT1G34030	Petite sous-unité	Cytoplasmique	US13Y
AT3G43980	Petite sous-unité	Cytoplasmique	US14Z
AT5G04800	Petite sous-unité	Cytoplasmique	ES17W
AT2G16930	Grande sous-unité	Mitochondrie	BL278M
AT5G56940	Petite sous-unité	Mitochondrie	BS16M
AT3G26360	Petite sous-unité	Mitochondrie	BS21M
AT3G59650	Grande sous-unité	Mitochondrie	ML43
AT3G01790	Petite sous-unité	Mitochondrie	UL13M
AT1G07830	Petite sous-unité	Mitochondrie	UL29M
AT5G02450	Grande sous-unité	Cytoplasmique	ELX36
AT5G07090	Petite sous-unité	Cytoplasmique	ES4Y
AT3G63490	Grande sous-unité	Chloroplaste	UL1C
AT4G01310	Grande sous-unité	Chloroplaste	UL5C
AT3G11250	Grande sous-unité	Cytoplasmique	UL10X
AT1G78630	Grande sous-unité	Chloroplaste	UL13C
AT3G25920	Grande sous-unité	Chloroplaste	UL15C
AT1G48350	Grande sous-unité	Chloroplaste	UL18C
AT2G33800	Petite sous-unité	Chloroplaste	US5C
AT5G18380	Petite sous-unité	Cytoplasmique	US9X
AT5G14320	Petite sous-unité	Chloroplaste	US13C
AT1G75350	Grande sous-unité	Chloroplaste	BL31C
AT3G54210	Grande sous-unité	Chloroplaste	RPL17
AT5G30510	Petite sous-unité	Chloroplaste	RPS1
AT5G17870	Précurseur protéine ribosomale	Chloroplaste	CL38
AT3G52150	Précurseur protéine ribosomale	Chloroplaste	PSRP2

Tableau supplémentaire 7*. Liste des protéines ribosomales différentiellement régulées via des mécanismes traductionnels au cours de la récupération. En violet, les protéines retrouvées dans le cluster 1-PE (régulées via leur engagement polysomal), en vert les protéines retrouvées dans le cluster 1-CTRD (régulées via leur dégradation co-traductionnelle).*

Point	Réplicat	Population ARN
p2	1	Total
p4	3	Total
pA	3	Total
pC	3	Total
p3	3	Poly
pA	3	Poly
pB	2	Poly

Tableau supplémentaire 8. Sept échantillons ont été retirés de l'étude. *Sur la base des analyses des Figures 56A et 56B, sept échantillons sur les 48 collectés au total ont été retirés de l'étude. Quatre sont retrouvés dans la population d'ARNt^{TOTAUX} et trois dans la population d'ARtN^{POLYSOMAUX}.*

Tableau abréviations :

Ψ = Pseudouridine

3-nt = 3 nucléotides

3D = tridimensionnelle

4EBP = eIF4E-binding protein

5'P = 5'-monophosphate

5'PSeq = 5'monophosphate sequencing

5'UTR = 5' Untranslated Region

A = Adénine

aaARNt = ARN de transfert aminoacylé

aaRSs = aminoacyl-tRNA synthétases

ABA = acide abscissique

ABCE1 = ATP-BINDING CASSETTE E1

ac^4c = N4-acetylcytidine

ACD = alpha-crystallin domain

ADAT = Adénosine déasaminase

ADN = acide désoxyribonucléique

AHA = Acid Hydrophobic Aromatic

AHA1 = Arabidopsis H+-ATPase 1

Am = 2'O-methyladénosine

APE2/ERF = APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR

APR6 = ACTIN-RELATED PROTEIN 6

ARF = AUXIN RESPONSE FACTOR

ARN = acide ribonucléique

ARNm = ARN messager

ARNt = ARN de transfert

$ARNt^{Ala}$ = ARNt alanine

$ARNt^{Arg}$ = ARNt arginine

$ARNt^{Leu}$ = ARNt leucine

$ARNt^{Lys}$ = ARNt lysine

$ARNt^{Met}$ = ARNt méthionine

$ARNt^{Phe}$ = ARNt phénylalanine

$ARNt^{Pro}$ = ARNt proline

$ARNt^{Ser}$ = ARNt sérine

$ARNt^{Thr}$ = ARNt thréonine

$ARNt_i^{met}$ = ARN de transfert initiateur (méthionine)

ARNtot = ARN totaux

ARNr = ARN ribosomique

ATP = adénosine triphosphate

BAC = Boucle de l'anticodon

BiP = binding proteins

bZIP60 = BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 60

C = Cytosine

Ca^{2+} = ions calcium

CAF1 = CCR4-associated factor 1

CaMs = Calmodulines

CCS = COPPER CHAPERONE FOR SOD1

CD = C-terminal domain

CHIP-Seq = Chromatin Immunoprecipitation Sequencing

CHX = cycloheximide

Clp = Caseinolytic Protease

Cm = 2'-O-methylcytidine

Cm^5U = 5-carbonylméthyluridine

CNGC = CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL

CPR = cytosolic protein response

CSD1 = COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1

CSD2 = COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1

ct^{6}A = cyclic N6-threonylcarbamoyladenosine

CTRD = cotranslational decay

CTU1 = Cytosolic Thiouridylase Subunit 1

CTU2 = Cytosolic Thiouridylase Subunit 2

D = Dihydrouridine

daARNt = ARN de transfert déacétylé

DBD = DNA binding domain

DCP1 = DECAPPING 1

DCP2 = DECAPPING 2

DREB2 = DEHYDRATATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2

dsARN = double-strand ARN

DXPS = 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase

EA = épissage alternatif

eIFs = eucaryotic initiation factors

EIN4 = ETHYLENE INSENSITIVE 4

eEF = eukaryotic elongation factor

ES = saut d'éxon

eERF = eucaryotic release factor

ERS1 = ETHYLENE RESISTANT 1

ERS2 = ETHYLENE RESISTANT 2

ETR1 = ETHYLENE RESPONSE 1

ETR2 = ETHYLENE RESPONSE 2

f^{5}Cm = 5-formyl-2'-O-methylcytidine

G = Guanine

GIEC = Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'évolution du Climat

Gm = 2'-O-methylguanosine

GMUCT = Genome-Wide Mapping of Uncapped Transcripts

GTP = Guanosine triphosphate

H3K4me3 = Histone 3 Lysine 4 tri méthylation.

H3KA8ac = Lysine 18 histone H3

hm^{5}C = 5-hydroxymethylcytidine

hm^{5}Cm = 2'-O-methyl-5-hydroxymethylcytidine

HOP = HSP70/HSP90-organizing protein

HSA32 = HEAT-STRESS-ASSOCIATED 32

HSE = Heat Stress Element

HSF = HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTORS

HSFA1 = HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A1

HTT = HEAT-INDUCED TAS1 TARGET

HPS = HEAT SHOCK PROTEINS

I = Inosine

i^{6}A = N6-isopentenyladenosine

io^{6}A =N6(cishydroxyisopentenyl)adenosine

IP3 = inositol triphosphate

IRE = Iron Responsive Elements

IRE1 = INOSITOL REQUIRING 1

IRES = Internal ribosome entry site

JA = acide jasmonique

LARP1 = LA RELATED PROTEIN 1A

LC-MS/MS = Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LSU = Large subunit

m^1A = 1-méthyladénosine

m^1G = 1-méthylguanosine

m^1I = 1-methylinosine

m^2G = N2-methylguanosine

$m^{2,2}G$ = N2,N2-dimethylguanosine

m^3C = 3-methylcytidine

m^5C = 5-methylcytidine

m^5U = 5-méthyluridine

m^5Um = 5,2'-O-dimethyluridine

m^6A = N^6-méthyladénosine

m^7G = 7-methylguanosine

mcm^5U = 5-methoxycarbonylmethyl

mcm^5S^2U = 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine

MD = middle domain

METTL1 = methyltransferase 1

miARN = micro ARN

mnm^5s^2U = 5-methylaminomethyl-2-thiouridine

ms^2t^6A = 2-methylthio-N6-threonylcarbamoyladenosine

NBD = Nucleotide binding domain

ncm^5U = 5-carbamoylmethyluridine

ND = N-terminal domain

NES = nuclear export signal

NEF = nucleotide exchange factor

NGD = no-go decay

NLS = nuclear localization signal

NMD = nonsense-mediated decay

NMR = spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

NPR1 = NONEXPRESSOR OF PR GENES 1

NSD = non-stop decay

OD = oligomerization domain

P-bodies = processing bodies

PAB = poly(A) binding proteins

PARE = parallel analysis of RNA ends

PIP2 = phosphatidylinositol 4,5 biphosphate

PLC = Phosphoinositide-Specific Phospholipases C

PMSR = PEPTIDE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE

Pol III = ARN polymérase pol III

PR = protéines ribosomales

Pre-ARNt = precursors-tRNA

Pri-ARNt = primary transcript of tRNA

PROPR = protein-only RNase P

PTC = Peptidyl transferase center

PTF = Productivité Totale des Facteurs

PTM = modifications post-traductionnelles

RbohD = NADPB/respiratory burst oxidase proteins

RCP = Representative Concentration Pathway

RdDM = RNA directed DNA-methylation

RE = Réticulum endoplasmique

REF6 = RELATIVE OF EARLY FLOWERING

REX1 = RNA exonuclease 1

RI = retention d'intron

ROS = Espèces réactives de l'oxygène

RTD = Rapid tRNA decay

RSCU = Relative synonymous codon usage

S6K = ribosomal-protein S6 kinase

SEN = RNA SPLICING ENDONUCLEASE

SGs = granules de stress

sHSP = small heat shock protein

siRNA = small interfering ARNs

SNP = single nucleotide polymorphisme

SOV = SUPPRESSOR OF VARICOSE

SP1 = site1 proteases

SP2 = site2 proteases

SPL = SQUAMOSA-PROMOTER BINDING LIKE

ST = stress thermique

ssARN = single-strand ARN

SSU = small subunit

T = thymine

T_{54}= 5-méthyluridine en position 54

t^6A = N6-threonylcarbamoyladenosine

tasiRNA = trans-actif small interference RNA

TFIIIB = facteur de transcription IIIB

TFIIIC = facteur de transcription IIIC

TOR = Target of Rapamycin

TORC = TOR COMPLEX

TRM6 = tRNA methyltransferase 6

TRM61 = tRNA methyltransferase 61

TRM9 = tRNA methyltransferase 9

TRZ1 = tRNase Z

TSEN = tRNA splicing endonuclease

uORF = Upstream Open Reading Frame

Um = 2'-O-methyluridine

UPR = Unfolded protein response

VSC = VARICOSE

XRN1/4 = EXORIBONUCLEASE 1/4

yW = Wybutosine

BIBLIOGRAPHIE

1. IPCC. *Climate Change 2023: Synthesis Report. A Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Diriba Korecha Dadi* (2023) doi:10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.

2. Duffy, K. A. *et al.* How close are we to the temperature tipping point of the terrestrial biosphere? *Sci Adv* **7**, (2021).

3. Moore, F. C. The Emergent Influence of Anthropogenic Warming on Global Crop Yields. https://eartharxiv.org/repository/view/1762/ (2020).

4. Ortiz-Bobea, A., Ault, T. R., Carrillo, C. M., Chambers, R. G. & Lobell, D. B. Anthropogenic climate change has slowed global agricultural productivity growth. *Nat Clim Chang* **11**, 306–312 (2021).

5. Thiault, L. *et al.* Escaping the perfect storm of simultaneous climate change impacts on agriculture and marine fisheries. *Sci Adv* **5**, (2019).

6. Hoffmann, M. H. Biogeography of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (Brassicaceae). *J Biogeogr* **29**, 125–134 (2002).

7. Duruflé, H. *et al.* An integrative study showing the adaptation to sub-optimal growth conditions of natural populations of Arabidopsis Thaliana: A focus on cell wall changes. *Cells* **9**, 1–23 (2020).

8. Herms, D. A. & Mattson, W. J. The dilemma of plants: To grow or defend. *Quarterly Review of Biology* **67**, 283–335 (1992).

9. Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L. & He, S. Y. Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* vol. 7 1267–1287 Preprint at https://doi.org/10.1093/mp/ssu049 (2014).

10. Mittler, R., Finka, A. & Goloubinoff, P. How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* vol. 37 118–125 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007 (2012).

11. Guihur, A., Rebeaud, M. E. & Goloubinoff, P. How do plants feel the heat and survive? *Trends in Biochemical Sciences* vol. 47 824–838 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.05.004 (2022).

12. Kerbler, S. M. & Philip A. Wigge. Temperature Sensing in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **74**, (2023).

13. Vigh, L. *et al.* Plasma membranes as heat stress sensors: From lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1838 1594–1618 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.015 (2014).

14. Cui, Y. *et al.* CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELs 14 and 16 promote tolerance to heat and chilling in rice1[OPEN]. *Plant Physiol* **183**, 1794–1808 (2020).

15. Praat, M., De Smet, I. & van Zanten, M. Protein kinase and phosphatase control of plant temperature responses. *J Exp Bot* **72**, 7459–7473 (2021).

16. Ren, H., Gao, K., Liu, Y., Sun, D. & Zheng, S. The role of AtPLC3 and AtPLC9 in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **12**, e1162368 (2017).

17. Hong, T. L. *et al.* Primary evidence for involvement of IP3 in heat-shock signal transduction in Arabidopsis. *Cell Res* **16**, 394–400 (2006).

18. Yao, Y. *et al.* ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in Arabidopsis. *New Phytologist* **213**, 1667–1681 (2017).

19. Han, Y. *et al.* Functional analysis of arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H2O2 to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxid Redox Signal* **18**, 2106–2121 (2013).

20. Wang, L. *et al.* Hydrogen peroxide acts upstream of nitric oxide in the heat shock pathway in arabidopsis seedlings. *Plant Physiol* **164**, 2184–2196 (2014).

21. Xie, Z., Nolan, T. M., Jiang, H. & Yin, Y. AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* vol. 10 437723 Preprint at https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00228 (2019).

22. Huang, J., Zhao, X., Bürger, M., Wang, Y. & Chory, J. Two interacting ethylene response factors regulate heat stress response. *Plant Cell* **33**, 338–357 (2021).

23. Huang, Y. C., Niu, C. Y., Yang, C. R. & Jinn, T. L. The heat stress factor HSFA6b connects ABA signaling and ABA-mediated heat responses. *Plant Physiol* **172**, 1182–1199 (2016).

24. Chao, L. M. *et al.* Arabidopsis Transcription Factors SPL1 and SPL12 Confer Plant Thermotolerance at Reproductive Stage. *Mol Plant* **10**, 735–748 (2017).

25. Xue, G. P., Sadat, S., Drenth, J. & McIntyre, C. L. The heat shock factor family from Triticum aestivum in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes. *J Exp Bot* **65**, 539–557 (2014).

26. PIRKKALA, L., NYKÄNEN, P. & SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal* **15**, 1118–1131 (2001).

27. Bonner, J. J. *et al.* Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor. *Mol Biol Cell* **11**, 1739–1751 (2000).

28. Akhtar, M. *et al.* DREB1/CBF transcription factors: Their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *Journal of Genetics* vol. 91 385–395 Preprint at https://doi.org/10.1007/s12041-012-0201-3 (2012).

29. Guo, M. *et al.* The plant heat stress transcription factors (HSFS): Structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Front Plant Sci* **7**, 180954 (2016).

30. Drees, B. L., Grotkopp, E. K. & Nelson, H. C. M. The GCN4 leucine zipper can functionally substitute for the heat shock transcription factor's trimerization domain. *J Mol Biol* **273**, 61–74 (1997).

31. Kotak, S., Port, M., Ganguli, A., Bicker, F. & Von Koskull-Döring, P. Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class a Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *Plant Journal* **39**, 98–112 (2004).

32. Lyck, R. *et al.* Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* **202**, 117–125 (1997).

33. Döring, P. *et al.* The Role of AHA Motifs in the Activator Function of Tomato Heat Stress Transcription Factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell* **12**, 265–278 (2000).

34. Fragkostefanakis, S., Röth, S., Schleiff, E. & Scharf, K. D. Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. *Plant Cell and Environment* vol. 38 1881–1895 Preprint at https://doi.org/10.1111/pce.12396 (2015).

35. Scharf, K. D., Berberich, T., Ebersberger, I. & Nover, L. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 104–119 (2012).

36. Qian, J. *et al.* Overexpression of Arabidopsis HsfA1a enhances diverse stress tolerance by promoting stress-induced Hsp expression. *Genetics and Molecular Research* **13**, 1233–1243 (2014).

37. Liu, H. C., Liao, H. T. & Charng, Y. Y. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **34**, 738–751 (2011).

38. Shah, Z. *et al.* Introduction of Arabidopsis's heat shock factor HsfA1d mitigates adverse effects of heat stress on potato (Solanum tuberosum L.) plant. *Cell Stress Chaperones* **25**, 57–63 (2020).

39. Charng, Y. Y. *et al.* A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**, 251–262 (2007).

40. Schramm, F. *et al.* The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **60**, 759–772 (2006).

41. Lin, K. F., Tsai, M. Y., Lu, C. A., Wu, S. J. & Yeh, C. H. The roles of Arabidopsis HSFA2, HSFA4a, and HSFA7a in the heat shock response and cytosolic protein response. *Bot Stud* **59**, 15 (2018).

42. Yoshida, T. *et al.* Functional analysis of an Arabidopsis heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 515–521 (2008).

43. Ikeda, M., Mitsuda, N. & Ohme-Takagi, M. Arabidopsis HsfB1 and HsfB2b act as repressors of the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance. *Plant Physiol* **157**, 1243–1254 (2011).

44. Andrási, N., Pettkó-Szandtner, A. & Szabados, L. Diversity of plant heat shock factors: regulation, interactions, and functions. *J Exp Bot* **72**, 1558–1575 (2021).

45. Yoshida, T. *et al.* Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics* **286**, 321–332 (2011).

46. Hahn, A., Bublak, D., Schleiff, E. & Scharf, K.-D. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 Chaperones and Heat Stress Transcription Factors in Tomato. *Plant Cell* **23**, 741–755 (2011).

47. Hübel, A. & Schöffl, F. Arabidopsis heat shock factor: isolation and characterization of the gene and the recombinant protein. *Plant Molecular Biology* vol. 26 353–362 Preprint at https://doi.org/10.1007/BF00039545 (1994).

48. Bharti, K. *et al.* Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1. *Plant Cell* **16**, 1521–1535 (2004).

49. Röth, S., Mirus, O., Bublak, D., Scharf, K. D. & Schleiff, E. DNA-binding and repressor function are prerequisites for the turnover of the tomato heat stress transcription factor HsfB1. *Plant Journal* **89**, 31–44 (2017).

50. Li, H. C. *et al.* Expression of maize heat shock transcription factor gene ZmHsf06 enhances the thermotolerance and drought-stress tolerance of transgenic Arabidopsis. *Functional Plant Biology* **42**, 1080–1091 (2015).

51. Zhuang, L. *et al.* Characterization and functional analysis of FaHsfC1b from Festuca arundinacea conferring heat tolerance in arabidopsis. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).

52. Chandler, J. W. Class VIIIb APETALA2 Ethylene Response Factors in Plant Development. *Trends in Plant Science* vol. 23 151–162 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.016 (2018).

53. Zhou, L. & Yarra, R. Genome-wide identification and characterization of ap2/erf transcription factor family genes in oil palm under abiotic stress conditions. *Int J Mol Sci* **22**, 1–16 (2021).

54. Riechmann, J. L. *et al.* Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science (1979)* **290**, 2105–2110 (2000).

55. Licausi, F., Ohme-Takagi, M. & Perata, P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *The New phytologist* vol. 199 639–649 Preprint at https://doi.org/10.1111/nph.12291 (2013).

56. Liu, Q. *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1391–1406 (1998).

57. Tiwari, S. B. *et al.* The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. *The Plant Journal* **70**, 855–865 (2012).

58. Lämke, J., Brzezinka, K., Altmann, S. & Bäurle, I. A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *EMBO J* **35**, 162–175 (2016).

59. Cortijo, S. *et al.* Transcriptional Regulation of the Ambient Temperature Response by H2A.Z Nucleosomes and HSF1 Transcription Factors in Arabidopsis. *Mol Plant* **10**, 1258–1273 (2017).

60. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* **18**, 571–573 (1962).

61. Swindell, W. R., Huebner, M. & Weber, A. P. Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**, 125 (2007).

62. Samakovli, D. *et al.* HSP90 affects root growth in Arabidopsis by regulating the polar distribution of PIN1. *New Phytologist* **231**, 1814–1831 (2021).

63. Wang, R. *et al.* HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in Arabidopsis by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. *Nat Commun* **7**, 1–11 (2016).

64. Lee, U. *et al.* The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: Chaperones for stress and chloroplast development. *Plant Journal* **49**, 115–127 (2007).

65. Ul Haq, S. *et al.* Heat shock proteins: Dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 Preprint at https://doi.org/10.3390/ijms20215321 (2019).

66. Schlesinger, M. J. Heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry* vol. 265 12111–12114 Preprint at https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38314-0 (1990).

67. Helm, K. W., LaFayette, P. R., Nagao, R. T., Key, J. L. & Vierling, E. Localization of small heat shock proteins to the higher plant endomembrane system. *Mol Cell Biol* **13**, 238–247 (1993).

68. Jee, H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J Exerc Rehabil* **12**, 255–259 (2016).

69. Tiwari, L. D. *et al.* Stress and development phenotyping of Hsp101 and diverse other Hsp mutants of Arabidopsis thaliana. *J Plant Biochem Biotechnol* **30**, 889–905 (2021).

70. Scharf, K. D., Siddique, M. & Vierling, E. The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing α-crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chaperones* **6**, 225–237 (2001).

71. Lin, B. L. *et al.* Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in Arabidopsis thaliana. *Cell Stress Chaperones* **6**, 201–208 (2001).

72. Krishna, P. & Gloor, G. The Hsp90 family of proteins in arabidopsis thaliana. *Cell Stress Chaperones* **6**, 238–246 (2001).

73. Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Sahi, C., Gallie, D. R. & Grover, A. Arabidopsis thaliana Hsp100 proteins: Kith and kin. *Cell Stress Chaperones* **6**, 219–224 (2001).

74. Larkindale, J., Hall, J. D., Knight, M. R. & Vierling, E. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* vol. 138 882–897 Preprint at https://doi.org/10.1104/pp.105.062257 (2005).

75. Braun, N. *et al.* Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone αB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20491–20496 (2011).

76. Haslbeck, M. & Vierling, E. A first line of stress defense: Small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol* **427**, 1537–1548 (2015).

77. Basha, E., O'Neill, H. & Vierling, E. Small heat shock proteins and α-crystallins: Dynamic proteins with flexible functions. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 37 106–117 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.005 (2012).

78. Van Montfort, R. L. M., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C. & Vierling, E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol* **8**, 1025–1030 (2001).

79. Kim, K. K., Kim, R. & Kim, S. H. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**, 595–599 (1998).

80. Hanazono, Y. *et al.* Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from Schizosaccharomyces pombe. *Structure* **21**, 220–228 (2013).

81. Yu, C. *et al.* Structural basis of substrate recognition and thermal protection by a small heat shock protein. *Nat Commun* **12**, 1–11 (2021).

82. Waters, E. R. & Vierling, E. Plant small heat shock proteins – evolutionary and functional diversity. *New Phytologist* **227**, 24–37 (2020).

83. Berka, M., Kopecká, R., Berková, V., Brzobohatý, B. & Černý, M. Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity. *Journal of Experimental Botany* vol. 73 1894–1909 Preprint at https://doi.org/10.1093/jxb/erab549 (2022).

84. Sarkar, N. K., Kundnani, P. & Grover, A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (Oryza sativa). *Cell Stress Chaperones* **18**, 427–437 (2013).

85. Zuiderweg, E. R. P., Hightower, L. E. & Gestwicki, J. E. The remarkable multivalency of the Hsp70 chaperones. *Cell Stress and Chaperones* vol. 22 173–189 Preprint at https://doi.org/10.1007/s12192-017-0776-y (2017).

86. Clerico, E. M., Tilitsky, J. M., Meng, W. & Gierasch, L. M. How Hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *Journal of Molecular Biology* vol. 427 1575–1588 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.004 (2015).

87. Takakuwa, J. E., Nitika, Knighton, L. E. & Truman, A. W. Oligomerization of Hsp70: Current Perspectives on Regulation and Function. *Front Mol Biosci* **6**, 486551 (2019).

88. Schleiff, E. & Becker, T. Common ground for protein translocation: Access control for mitochondria and chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 12 48–59 Preprint at https://doi.org/10.1038/nrm3027 (2011).

89. Sun, J. L., Li, J. Y., Wang, M. J., Song, Z. T. & Liu, J. X. Protein Quality Control in Plant Organelles: Current Progress and Future Perspectives. *Molecular Plant* vol. 14 95–114 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.10.011 (2021).

90. Zhang, Y., Xia, G. & Zhu, Q. Conserved and Unique Roles of Chaperone-Dependent E3 Ubiquitin Ligase CHIP in Plants. *Frontiers in Plant Science* vol. 12 699756 Preprint at https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699756 (2021).

91. Xu, Z. S. *et al.* Heat shock protein 90 in plants: Molecular mechanisms and roles in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 13 15706–15723 Preprint at https://doi.org/10.3390/ijms131215706 (2012).

92. Terasawa, K., Minami, M. & Minami, Y. Constantly updated knowledge of Hsp90. *Journal of Biochemistry* vol. 137 443–447 Preprint at https://doi.org/10.1093/jb/mvi056 (2005).

93. Wayne, N. & Bolon, D. N. Dimerization of Hsp90 is required for in vivo function: Design and analysis of monomers and dimers. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 35386–35395 (2007).

94. Flynn, J. M., Mishra, P. & Bolon, D. N. A. Mechanistic Asymmetry in Hsp90 Dimers. *Journal of Molecular Biology* vol. 427 2904–2911 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.03.017 (2015).

95. Kadota, Y. & Shirasu, K. The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1823 689–697 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.016 (2012).

96. Li, J., Richter, K. & Buchner, J. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 61–67 (2011).

97. Lotz, G. P., Lin, H., Harst, A. & Obermann, W. M. J. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 17228–17235 (2003).

98. Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S. & Grover, A. Plant Hsp100 proteins: Structure, function and regulation. *Plant Science* vol. 163 397–405 Preprint at https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00209-1 (2002).

99. Mishra, R. C. & Grover, A. ClpB/Hsp100 proteins and heat stress tolerance in plants. *Critical Reviews in Biotechnology* vol. 36 862–874 Preprint at https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1051942 (2016).

100. Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. & Lindquist, S. HSP100/Clp proteins: A common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 21 289–296 Preprint at https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)10038-4 (1996).

101. Watanabe, Y. hei, Motohashi, K. & Yoshida, M. Roles of the two ATP binding sites of ClpB from Thermus thermophilus. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 5804–5809 (2002).

102. Zhang, T. *et al.* Flexible connection of the N-terminal domain in ClpB modulates substrate binding and the aggregate reactivation efficiency. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **80**, 2758–2768 (2012).

103. McLoughlin, F., Kim, M., Marshall, R. S., Vierstra, R. D. & Vierling, E. HSP101 interacts with the proteasome and promotes the clearance of ubiquitylated protein aggregates. *Plant Physiol* **180**, 1829–1847 (2019).

104. Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F. & Maule, A. J. The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 642–654 (2009).

105. Strasser, R. Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum of Plants. *Annual Review of Plant Biology* vol. 69 147–172 Preprint at https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040331 (2018).

106. Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M. & Walter, P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18773–18784 (2005).

107. Kim, J.-S., Mochida, K. & Shinozaki, K. ER Stress and the Unfolded Protein Response: Homeostatic Regulation Coordinate Plant Survival and Growth. *Plants* **11**, 3197 (2022).

108. Bao, Y. & Howell, S. H. The Unfolded Protein Response Supports Plant Development and Defense as well as Responses to Abiotic Stress. *Front Plant Sci* **8**, 247565 (2017).

109. Pastor-Cantizano, N., Ko, D. K., Angelos, E., Pu, Y. & Brandizzi, F. Functional Diversification of ER Stress Responses in Arabidopsis. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 45 123–136 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.10.008 (2020).

110. Sunkar, R. & Zhu, J. K. Novel and stress regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis w inside box sign. *Plant Cell* **16**, 2001–2019 (2004).

111. Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y. & Zhu, J. Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Journal* **74**, 840–851 (2013).

112. Lin, J. S. *et al.* MicroRNA160 modulates plant development and heat shock protein gene expression to mediate heat tolerance in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **9**, 68 (2018).

113. Tsai, W. A. *et al.* Involvement of microRNA164 in responses to heat stress in Arabidopsis. *Plant Science* **329**, 111598 (2023).

114. Li, S. *et al.* HEAT-INDUCED TAS1 TARGET1 mediates thermotolerance via heat stress transcription factor A1a-directed pathways in arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 1764–1780 (2014).

115. Walter, J. *et al.* Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environ Exp Bot* **71**, 34–40 (2011).

116. Wingard, S. A. (1928). Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants.

117. Ouellet, F. & Charron, J. Cold Acclimation and Freezing Tolerance in Plants. in *eLS* (Wiley, 2013). doi:10.1002/9780470015902.a0020093.pub2.

118. Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. & Mittler, R. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* **203**, 32–43 (2014).

119. Walter, J., Jentsch, A., Beierkuhnlein, C. & Kreyling, J. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. *Environ Exp Bot* **94**, 3–8 (2013).

120. Frost, C. J., Mescher, M. C., Carlson, J. E. & De Moraes, C. M. Plant Defense Priming against Herbivores: Getting Ready for a Different Battle. *Plant Physiol* **146**, 818–824 (2008).

121. Kim, Y., Gilmour, S. J., Chao, L., Park, S. & Thomashow, M. F. Arabidopsis CAMTA Transcription Factors Regulate Pipecolic Acid Biosynthesis and Priming of Immunity Genes. *Mol Plant* **13**, 157–168 (2020).

122. Liu, N. & Avramova, Z. Molecular mechanism of the priming by jasmonic acid of specific dehydration stress response genes in Arabidopsis. *Epigenetics Chromatin* **9**, 8 (2016).

123. Shahnejat-Bushehri, S., Mueller-Roeber, B. & Balazadeh, S. Arabidopsis NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 affects thermomemoryassociated genes and enhances heat stress tolerance in primed and unprimed conditions. *Plant Signal Behav* **7**, 1518–1521 (2012).

124. Charng, Y., Mitra, S. & Yu, S.-J. Maintenance of abiotic stress memory in plants: Lessons learned from heat acclimation. *Plant Cell* (2022) doi:10.1093/plcell/koac313.

125. Bäurle, I. Can't remember to forget you: Chromatin-based priming of somatic stress responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 83 133–139 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.032 (2018).

126. Lämke, J. & Bäurle, I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology* vol. 18 1–11 Preprint at https://doi.org/10.1186/s13059-017-1263-6 (2017).

127. Oberkofler, V., Pratx, L. & Bäurle, I. Epigenetic regulation of abiotic stress memory: maintaining the good things while they last. *Curr Opin Plant Biol* **61**, (2021).

128. Nishizawa-Yokoi, A. *et al.* HsfA1d and HsfA1e Involved in the Transcriptional Regulation of HsfA2 Function as Key Regulators for the Hsf Signaling Network in Response to Environmental Stress. *Plant Cell Physiol* **52**, 933–945 (2011).

129. Friedrich, T. *et al.* Heteromeric HSFA2/HSFA3 complexes drive transcriptional memory after heat stress in Arabidopsis. *Nat Commun* **12**, 1–15 (2021).

130. Kappel, C. *et al.* Genomic and epigenomic determinants of heat stress-induced transcriptional memory in Arabidopsis. *Genome Biol* **24**, 129 (2023).

131. Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C. & Hohn, B. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* **442**, 1046–1049 (2006).

132. Liu, J. *et al.* An H3K27me3 demethylase-HSFA2 regulatory loop orchestrates transgenerational thermomemory in Arabidopsis. *Cell Res* **29**, 379–390 (2019).

133. Li, J. *et al.* Epigenetic memory marks determine epiallele stability at loci targeted by de novo DNA methylation. *Nat Plants* **6**, 661–674 (2020).

134. Stief, A. *et al.* Arabidopsis miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *Plant Cell* **26**, 1792–1807 (2014).

135. Marasco, L. E. & Kornblihtt, A. R. The physiology of alternative splicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 24 242–254 Preprint at https://doi.org/10.1038/s41580-022-00545-z (2023).

136. Martín, G., Márquez, Y., Mantica, F., Duque, P. & Irimia, M. Alternative splicing landscapes in Arabidopsis thaliana across tissues and stress conditions highlight major functional differences with animals. *Genome Biol* **22**, 35 (2021).

137. Filichkin, S. A. *et al.* Genome-wide mapping of alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Genome Res* **20**, 45–58 (2010).

138. Shalgi, R., Hurt, J. A., Lindquist, S. & Burge, C. B. Widespread inhibition of posttranscriptional splicing shapes the cellular transcriptome following heat shock. *Cell Rep* **7**, 1362–1370 (2014).

139. Reddy, A. S. N., Marquez, Y., Kalyna, M. & Barta, A. Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell* vol. 25 3657–3683 Preprint at https://doi.org/10.1105/tpc.113.117523 (2013).

140. Lal, S. V. *et al.* Splice variants and seasonal expression of buffalo HSF genes. *Cell Stress Chaperones* **20**, 545–554 (2015).

141. Liu, J. *et al.* An autoregulatory loop controlling Arabidopsis HsfA2 expression: Role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant Physiol* **162**, 512–521 (2013).

142. Ling, Y. *et al.* Thermopriming triggers splicing memory in Arabidopsis. *J Exp Bot* **69**, 2659–2675 (2018).

143. Roces, V. *et al.* Integrative analysis in *Pinus* revealed long-term heat stress splicing memory. *The Plant Journal* **112**, 998–1013 (2022).

144. Merret, R. *et al.* Heat shock protein HSP101 affects the release of ribosomal protein mRNAs for recovery after heat shock. *Plant Physiol* **174**, 1216–1225 (2017).

145. Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O. & Pogson, B. J. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances* vol. 2 Preprint at https://doi.org/10.1126/sciadv.1501340 (2016).

146. Nguyen, A. H. *et al.* Loss of Arabidopsis 5'-3' Exoribonuclease AtXRN4 Function Enhances Heat Stress Tolerance of Plants Subjected to Severe Heat Stress. *Plant Cell Physiol* **56**, 1762–1772 (2014).

147. Li, B. *et al.* Differential regulation of mRNA stability modulates transcriptional memory and facilitates environmental adaptation. *Nat Commun* **14**, 1–17 (2023).

148. Bensaude, O., Bellier, S., Dubois, M. F., Giannoni, F. & Nguyen, V. T. Heat-shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities. *EXS* vol. 77 199–219 Preprint at https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9088-5_13 (1996).

149. Huang, B. & Xu, C. Identification and Characterization of Proteins Associated with Plant Tolerance to Heat Stress. *J Integr Plant Biol* **50**, 1230–1237 (2008).

150. Gustavsson, N. *et al.* A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in Arabidopsis thaliana can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. *Plant Journal* **29**, 545–553 (2002).

151. Merret, R. *et al.* XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell Rep* **5**, 1279–1293 (2013).

152. Bonnot, T. & Nagel, D. H. Time of the day prioritizes the pool of translating mRNAs in response to heat stress. *Plant Cell* **33**, 2164–2182 (2021).

153. Mickelbart, M. V., Hasegawa, P. M. & Bailey-Serres, J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics* vol. 16 237–251 Preprint at https://doi.org/10.1038/nrg3901 (2015).

154. Bilichak, A. & Kovalchuk, I. Transgenerational response to stress in plants and its application for breeding. *Journal of Experimental Botany* vol. 67 2081–2092 Preprint at https://doi.org/10.1093/jxb/erw066 (2016).

155. Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. On the origin of the translation system and the genetic code in the RNA world by means of natural selection, exaptation, and subfunctionalization. *Biology Direct* vol. 2 1–25 Preprint at https://doi.org/10.1186/1745-6150-2-14 (2007).

156. Bieri, P., Leibundgut, M., Saurer, M., Boehringer, D. & Ban, N. The complete structure of the chloroplast 70S ribosome in complex with translation factor pY. *EMBO J* **36**, 475–486 (2017).

157. Tomal, A., Kwasniak-Owczarek, M. & Janska, H. An update on mitochondrial ribosome biology: The plant mitoribosome in the spotlight. *Cells* vol. 8 Preprint at https://doi.org/10.3390/cells8121562 (2019).

158. Waltz, F., Soufari, H., Bochler, A., Giegé, P. & Hashem, Y. Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome. *Nat Plants* **6**, 377–383 (2020).

159. Wilson, D. N. & Cate, J. H. D. The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, 5 (2012).

160. Holm, M. *et al.* mRNA decoding in human is kinetically and structurally distinct from bacteria. *Nature* **617**, 200–207 (2023).

161. Weisser, M. & Ban, N. Extensions, extra factors, and extreme complexity: Ribosomal structures provide insights into eukaryotic translation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11**, a032367 (2019).

162. Sáez-Vásquez, J. & Delseny, M. Ribosome biogenesis in plants: From functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *Plant Cell* vol. 31 1945–1967 Preprint at https://doi.org/10.1105/TPC.18.00874 (2019).

163. Palm, D. *et al.* Plant-specific ribosome biogenesis factors in Arabidopsis thaliana with essential function in rRNA processing. *Nucleic Acids Res* **47**, 1880–1895 (2019).

164. Lomakin, I. B., Kolupaeva, V. G., Marintchev, A., Wagner, G. & Pestova, T. V. Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing. *Genes Dev* **17**, 2786–2797 (2003).

165. Aylett, C. H. S., Boehringer, D., Erzberger, J. P., Schaefer, T. & Ban, N. Structure of a Yeast 40S-eIF1-eIF1A-eIF3-eIF3j initiation complex. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 269–271 (2015).

166. Llácer, J. L. *et al.* Conformational Differences between Open and Closed States of the Eukaryotic Translation Initiation Complex. *Mol Cell* **59**, 399–412 (2015).

167. Schmitt, E., Naveau, M. & Mechulam, Y. Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: A heterotrimeric tRNA carrier. *FEBS Letters* vol. 584 405–412 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.002 (2010).

168. Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* vol. 461 1234–1242 Preprint at https://doi.org/10.1038/nature08403 (2009).

169. Jivotovskaya, A. V., Valášek, L., Hinnebusch, A. G. & Nielsen, K. H. Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 (eIF3) and eIF2 Can Promote mRNA Binding to 40S Subunits Independently of eIF4G in Yeast. *Mol Cell Biol* **26**, 1355–1372 (2006).

170. Llácer, J. L. *et al.* Conformational Differences between Open and Closed States of the Eukaryotic Translation Initiation Complex. *Mol Cell* **59**, 399–412 (2015).

171. Fringer, J. M., Acker, M. G., Fekete, C. A., Lorsch, J. R. & Dever, T. E. Coupled Release of Eukaryotic Translation Initiation Factors 5B and 1A from 80S Ribosomes following Subunit Joining. *Mol Cell Biol* **27**, 2384–2397 (2007).

172. Crick, F. H. C. Codon—anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J Mol Biol* **19**, 548–555 (1966).

173. Fei, J., Kosuri, P., MacDougall, D. D. & Gonzalez, R. L. Coupling of Ribosomal L1 Stalk and tRNA Dynamics during Translation Elongation. *Mol Cell* **30**, 348–359 (2008).

174. Spahn, C. M. T. *et al.* Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO Journal* **23**, 1008–1019 (2004).

175. Ratje, A. H. *et al.* Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature* **468**, 713–716 (2010).

176. Poulis, P., Peske, F. & Rodnina, M. V. The many faces of ribosome translocation along the mRNA: reading frame maintenance, ribosome frameshifting and translational bypassing. *Biological Chemistry* Preprint at https://doi.org/10.1515/hsz-2023-0142 (2023).

177. Xu, B., Liu, L. & Song, G. Functions and Regulation of Translation Elongation Factors. *Frontiers in Molecular Biosciences* vol. 8 816398 Preprint at https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.816398 (2022).

178. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R. S. & Ramakrishnan, V. Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes. *Nature* **524**, 493–496 (2015).

179. Shao, S. *et al.* Decoding Mammalian Ribosome-mRNA States by Translational GTPase Complexes. *Cell* **167**, 1229-1240.e15 (2016).

180. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. Termination and post-termination events in eukaryotic translation. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* vol. 86 45–93 (Academic Press Inc., 2012).

181. Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. Reinitiation and other unconventional posttermination events during eukaryotic translation. *Mol Cell* **51**, 249–264 (2013).

182. Son, S. & Park, S. R. Plant translational reprogramming for stress resilience. *Frontiers in Plant Science* vol. 14 1151587 Preprint at https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1151587 (2023).

183. Collart, M. A. The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* vol. 7 438–454 Preprint at https://doi.org/10.1002/wrna.1332 (2016).

184. Liang, W. *et al.* The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res* **19**, 307–316 (2009).

185. Chou, W. L. *et al.* Divergence of the expression and subcellular localization of CCR4-associated factor 1 (CAF1) deadenylase proteins in Oryza sativa. *Plant Mol Biol* **85**, 443–458 (2014).

186. Jia, J. *et al.* An atlas of plant full-length RNA reveals tissue-specific and monocots–dicots conserved regulation of poly(A) tail length. *Nat Plants* **8**, (2022).

187. Audébért, L. *et al.* Title: Deadenylation rate is not a major determinant of RNA degradation in yeast. doi:10.1101/2023.01.16.524186.

188. Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural and Molecular Biology* vol. 11 121–127 Preprint at https://doi.org/10.1038/nsmb724 (2004).

189. Deyholos, M. K. *et al.* Varicose, a WD-domain protein, is required for leaf blade. *Development* **130**, 6577–6588 (2003).

190. Sheth, U. & Parker, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science (1979)* **300**, 805–808 (2003).

191. Hubstenberger, A. *et al.* P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Mol Cell* **68**, 144-157.e5 (2017).

192. Potuschak, T. *et al.* The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 3047–3057 (2006).

193. Zhang, E. *et al.* A specialised SKI complex assists the cytoplasmic RNA exosome in the absence of direct association with ribosomes . *EMBO J* **38**, (2019).

194. Januszyk, K. & Lima, C. D. The eukaryotic RNA exosome. *Current Opinion in Structural Biology* vol. 24 132–140 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.01.011 (2014).

195. Sieburth, L. E. & Vincent, J. N. Beyond transcription factors: Roles of mrna decay in regulating gene expression in plants [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research* vol. 7 Preprint at https://doi.org/10.12688/f1000research.16203.1 (2018).

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

197. Willmann, M. R., Berkowitz, N. D. & Gregory, B. D. Improved genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts in eukaryotes-GMUCT 2.0. *Methods* vol. 67 64–73 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.003 (2014).

198. Hellen, C. U. T. Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).

199. Schneider-Poetsch, T. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* **6**, 209–217 (2010).

200. Pelechano, V., Wei, W. & Steinmetz, L. M. Widespread co-translational RNA decay reveals ribosome dynamics. *Cell* **161**, 1400–1412 (2015).

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

202. Yu, X., Willmann, M. R., Anderson, S. J. & Gregory, B. D. Genome-Wide Mapping of Uncapped and Cleaved Transcripts Reveals a Role for the Nuclear mRNA Cap-Binding Complex in Cotranslational RNA Decay in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**, 2385–2397 (2016).

203. Hou, C. Y. *et al.* Global analysis of truncated RNA ends reveals new insights into Ribosome Stalling in plants. *Plant Cell* **28**, 2398–2416 (2016).

204. Ibrahim, F., Maragkakis, M., Alexiou, P. & Mourelatos, Z. Ribothrypsis, a novel process of canonical mRNA decay, mediates ribosome-phased mRNA endonucleolysis. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 302–310 (2018).

205. Guo, R., Yu, X. & Gregory, B. D. The identification of conserved sequence features of co-translationally decayed mRNAs and upstream open reading frames in angiosperm transcriptomes. *Plant Direct* **7**, e479 (2023).

206. Carpentier, M.-C. *et al.* Monitoring of XRN4 targets reveals the importance of co-translational decay during Arabidopsis development. (2020) doi:10.1104/pp.20.00942ï.

207. Vogel, C. *et al.* Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol Syst Biol* **6**, (2010).

208. Buttgereit, F. & Brand, M. D. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochemical Journal* **312**, 163–167 (1995).

209. Shalgi, R. *et al.* Widespread Regulation of Translation by Elongation Pausing in Heat Shock. *Mol Cell* **49**, 439–452 (2013).

210. Liu, B., Han, Y. & Qian, S. B. Cotranslational Response to Proteotoxic Stress by Elongation Pausing of Ribosomes. *Mol Cell* **49**, 453–463 (2013).

211. Merret, R. *et al.* Heat-induced ribosome pausing triggers mRNA co-translational decay in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* **43**, 4121–4132 (2015).

212. Yángüez, E., Castro-Sanz, A. B., Fernández-Bautista, N., Oliveros, J. C. & Castellano, M. M. Analysis of Genome-Wide Changes in the Translatome of Arabidopsis Seedlings Subjected to Heat Stress. *PLoS One* **8**, e71425 (2013).

213. Matsuura, H., Ishibashi, Y., Shinmyo, A., Kanaya, S. & Kato, K. Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **51**, 448–462 (2010).

214. Tatebe, H. & Shiozaki, K. Evolutionary conservation of the components in the tor signaling pathways. *Biomolecules* vol. 7 Preprint at https://doi.org/10.3390/biom7040077 (2017).

215. Valvezan, A. J. & Manning, B. D. Molecular logic of mTORC1 signalling as a metabolic rheostat. *Nature Metabolism* vol. 1 321–333 Preprint at https://doi.org/10.1038/s42255-019-0038-7 (2019).

216. Moreau, M. *et al.* Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell* **24**, 463–481 (2012).

217. Anderson, G. H., Veit, B. & Hanson, M. R. The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol* **3**, 12 (2005).

218. Deprost, D., Truong, H. N., Robaglia, C. & Meyer, C. An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem Biophys Res Commun* **326**, 844–850 (2005).

219. Montané, M. H. & Menand, B. ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J Exp Bot* **64**, 4361–4374 (2013).

220. Xiong, Y. *et al.* Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* **496**, 181–186 (2013).

221. Caldana, C. *et al.* Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **73**, 897–909 (2013).

222. Wang, P. *et al.* Reciprocal Regulation of the TOR Kinase and ABA Receptor Balances Plant Growth and Stress Response. *Mol Cell* **69**, 100-112.e6 (2018).

223. Dong, Y. *et al.* Functional analogs of mammalian 4E-BPs reveal a role for TOR in global plant translation. *Cell Rep* **42**, (2023).

224. Wek, R. C. Role of eIF2α kinases in translational control and adaptation to cellular stress. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).

225. Berrocal-Lobo, M., Toribio, R. & Castellano, M. M. Eif2α phosphorylation by gcn2 is induced in the presence of chitin and plays an important role in plant defense against b. Cinerea infection. *Int J Mol Sci* **21**, 1–11 (2020).

226. Spriggs, K. A., Bushell, M. & Willis, A. E. Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Molecular Cell* vol. 40 228–237 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.028 (2010).

227. Pichon, X. *et al.* RNA Binding Protein/RNA Element Interactions and the Control of Translation. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 294–304 (2012).

228. Spriggs, K. A., Stoneley, M., Bushell, M. & Willis, A. E. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* **100**, 27–38 (2008).

229. D, R. eIF2α phosphorylation in cellular stress responses and disease. *Transl Control Biol Med* **13**, 349–372 (2007).

230. Leipuviene, R. & Theil, E. C. The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 64 2945–2955 Preprint at https://doi.org/10.1007/s00018-007-7198-4 (2007).

231. Lukoszek, R., Feist, P. & Ignatova, Z. Insights into the adaptive response of Arabidopsis thaliana to prolonged thermal stress by ribosomal profiling and RNA-Seq. *BMC Plant Biol* **16**, 221 (2016).

232. Chen, Y., Liu, M. & Dong, Z. Preferential ribosome loading on the stress-upregulated mrna pool shapes the selective translation under stress conditions. *Plants* **10**, 1–15 (2021).

233. Otta, H. *et al.* The chaperones MPP11 and Hsp70L1 form the mammalian ribosome-associated complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10064–10069 (2005).

234. Zhang, L. *et al.* Mutations in eIF5b confer thermosensitive and pleiotropic phenotypes via translation defects in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **29**, 1952–1969 (2017).

235. Crisp, P. A. *et al.* Rapid recovery gene downregulation during excess-light stress and recovery in arabidopsis. *Plant Cell* **29**, 1836–1863 (2017).

236. Hanson, G. & Coller, J. Translation and Protein Quality Control: Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 19 20–30 Preprint at https://doi.org/10.1038/nrm.2017.91 (2018).

237. Presnyak, V. *et al.* Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* **160**, 1111–1124 (2015).

238. Su, Z., Wilson, B., Kumar, P. & Dutta, A. Noncanonical Roles of tRNAs: TRNA Fragments and beyond. *Annual Review of Genetics* vol. 54 47–69 Preprint at https://doi.org/10.1146/annurev-genet-022620-101840 (2020).

239. Crick, F. H. C. *ON PROTEIN SYNTHESIS*. (1958).

240. HOAGLAND, M. B., STEPHENSON, M. L., SCOTT, J. F., HECHT, L. I. & ZAMECNIK, P. C. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem* **231**, 241–257 (1958).

241. Cognat, V. *et al.* PlantRNA, a database for tRNAs of photosynthetic eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **41**, (2013).

242. Male, G. *et al.* Architecture of TFIIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nat Commun* **6**, 1–11 (2015).

243. Geiduschek, E. P. & Kassavetis, G. A. The RNA polymerase III transcription apparatus. *Journal of Molecular Biology* vol. 310 1–26 Preprint at https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4732 (2001).

244. Berg, M. D. & Brandl, C. J. Transfer RNAs: diversity in form and function. *RNA Biol* **18**, 316 (2021).

245. Gutmann, B., Gobert, A. & Giegé, P. PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in Arabidopsis. *Genes Dev* **26**, 1022–1027 (2012).

246. Skowronek, E., Grzechnik, P., Späth, B., Marchfelder, A. & Kufel, J. TRNA 3′ processing in yeast involves tRNase Z, Rex1, and Rrp6. *RNA* **20**, 115–130 (2014).

247. Bousquet-Antonelli, C. & Deragon, J. M. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA* **15**, 750–764 (2009).

248. Golisz, A., Sikorski, P. J., Kruszka, K. & Kufel, J. Arabidopsis thaliana LSM proteins function in mRNA splicing and degradation. *Nucleic Acids Res* **41**, 6232–6249 (2013).

249. Kufel, J., Allmang, C., Verdone, L., Beggs, J. D. & Tollervey, D. Lsm Proteins Are Required for Normal Processing of Pre-tRNAs and Their Efficient Association with La-Homologous Protein Lhp1p. *Mol Cell Biol* **22**, 5248–5256 (2002).

250. Betat, H. & Mörl, M. The CCA-adding enzyme: A central scrutinizer in tRNA quality control. *BioEssays* **37**, 975–982 (2015).

251. Schmidt, C. A. & Matera, A. G. tRNA introns: Presence, processing, and purpose. *WIREs RNA* **11**, e1583 (2020).

252. Chan, P. P. & Lowe, T. M. GtRNAdb 2.0: An expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes. *Nucleic Acids Res* **44**, D184–D189 (2016).

253. Ho, C. K. & Abelson, J. Testing for intron function in the essential Saccharomyces cerevisiae tRNASerUCG gene. *J Mol Biol* **202**, 667–672 (1988).

254. Payea, M. J., Hauke, A. C., De Zoysa, T. & Phizicky, E. M. Mutations in the anticodon stem of tRNA cause accumulation and Met22-dependent decay of pre-tRNA in yeast. *RNA* **26**, 29–43 (2020).

255. Akama, K., Junker, V. & Beier, H. Identification of two catalytic subunits of tRNA splicing endonuclease from Arabidopsis thaliana. *Gene* **257**, 177–185 (2000).

256. Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N. & Endo, T. Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: The yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria. *Mol Biol Cell* **14**, 3266–3279 (2003).

257. Englert, M. *et al.* Plant pre-tRNA splicing enzymes are targeted to multiple cellular compartments. *Biochimie* **89**, 1351–1365 (2007).

258. Pang, Y. L. J., Poruri, K. & Martinis, S. A. tRNA synthetase: TRNA aminoacylation and beyond. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**, 461–480 (2014).

259. O'Donoghue, P. & Luthey-Schulten, Z. On the Evolution of Structure in Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 550–573 (2003).

260. Ohira, T. & Suzuki, T. Precursors of tRNAs are stabilized by methylguanosine cap structures. *Nat Chem Biol* **12**, 648–655 (2016).

261. Huang, H. Y. & Hopper, A. K. Multiple layers of stress-induced regulation in tRNA biology. *Life* vol. 6 Preprint at https://doi.org/10.3390/life6020016 (2016).

262. Kadaba, S. *et al.* Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA Met in S. cerevisiae. *Genes Dev* **18**, 1227–1240 (2004).

263. Shaheen, H. H. *et al.* Retrograde nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in rat hepatoma cells in response to amino acid deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8845–8850 (2007).

264. Kramer, E. B. & Hopper, A. K. Retrograde transfer RNA nuclear import provides a new level of tRNA quality control in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 21042–21047 (2013).

265. Ohira, T. & Suzuki, T. Retrograde nuclear import of tRNA precursors is required for modified base biogenesis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10502–10507 (2011).

266. Schwenzer, H. *et al.* Oxidative Stress Triggers Selective tRNA Retrograde Transport in Human Cells during the Integrated Stress Response. *Cell Rep* **26**, 3416-3428.e5 (2019).

267. Boccaletto, P. *et al.* MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2021 update. *Nucleic Acids Res* **50**, D231–D235 (2022).

268. Dannfald, A., Favory, J. J. & Deragon, J. M. Variations in transfer and ribosomal RNA epitranscriptomic status can adapt eukaryote translation to changing physiological and environmental conditions. *RNA Biol* **18**, 4–18 (2021).

269. DAVIS, F. F. & ALLEN, F. W. Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *J Biol Chem* **227**, 907–915 (1957).

270. Meyer, K. D. & Jaffrey, S. R. The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 15 313–326 Preprint at https://doi.org/10.1038/nrm3785 (2014).

271. Grosjean, H. RNA modification: The golden period 1995-2015. *RNA* vol. 21 625–626 Preprint at https://doi.org/10.1261/rna.049866.115 (2015).

272. Lucas, M. C. *et al.* Quantitative analysis of tRNA abundance and modifications by nanopore RNA sequencing. *Nat Biotechnol* 1–15 (2023) doi:10.1038/s41587-023-01743-6.

273. Dewez, M. *et al.* The conserved Wobble uridine tRNA thiolase Ctu1-Ctu2 is required to maintain genome integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5459–5464 (2008).

274. Aslam, M. *et al.* TRM61 is essential for Arabidopsis embryo and endosperm development. *Plant Reprod* **35**, 31–46 (2022).

275. Kuratani, M. *et al.* Crystal structure of tRNA m(1)A58 methyltransferase TrmI from Aquifex aeolicus in complex with S-adenosyl-L-methionine. *J Struct Funct Genomics* **15**, 173–180 (2014).

276. Basavappa, R. & Sigler, P. B. The 3 Å crystal structure of yeast initiator tRNA: Functional implications in initiator/elongator discrimination. *EMBO Journal* **10**, 3105–3112 (1991).

277. Tasak, M. & Phizicky, E. M. Initiator tRNA lacking 1-methyladenosine is targeted by the rapid tRNA decay path way in evolutionarily distant yeast species. *PLoS Genet* **18**, e1010215 (2022).

278. Barraud, P. *et al.* Time-resolved NMR monitoring of tRNA maturation. *Nat Commun* **10**, 1–14 (2019).

279. Han, L. & Phizicky, E. M. A rationale for tRNA modification circuits in the anticodon loop. *RNA* vol. 24 1277–1284 Preprint at https://doi.org/10.1261/rna.067736.118 (2018).

280. Guy, M. P. *et al.* Defects in tRNA Anticodon Loop 2'-O-Methylation Are Implicated in Nonsyndromic X-Linked Intellectual Disability due to Mutations in FTSJ1. *Hum Mutat* **36**, 1176–1187 (2015).

281. Guy, M. P. & Phizicky, E. M. Conservation of an intricate circuit for crucial modifications of the tRNAPhe anticodon loop in eukaryotes. *RNA* **21**, 61–74 (2015).

282. Barraud, P. *et al.* Time-resolved NMR monitoring of tRNA maturation. *Nat Commun* **10**, 1–14 (2019).

283. Voigts-Hoffmann, F. *et al.* A Methyl Group Controls Conformational Equilibrium in Human Mitochondrial tRNA Lys. *J. AM. CHEM. SOC* **129**, 13382–13383 (2007).

284. Dewe, J. M., Whipple, J. M., Chernyakov, I., Jaramillo, L. N. & Phizicky, E. M. The yeast rapid tRNA decay pathway competes with elongation factor 1A for substrate tRNAs and acts on tRNAs lacking one or more of several modifications. *RNA* **18**, 1886–1896 (2012).

285. de Zoysa, T. & Phizicky, E. M. Hypomodified tRNA in evolutionarily distant yeasts can trigger rapid tRNA decay to activate the general amino acid control response, but with different consequences. *PLoS Genet* **16**, (2020).

286. Kotelawala, L., Grayhack, E. J. & Phizicky, E. M. Identification of yeast tRNA Um44 2'-O-methyltransferase (Trm44) and demonstration of a Trm44 role in sustaining levels of specific tRNASer species. *RNA* **14**, 158–169 (2008).

287. Suzuki, T. The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 22 375–392 Preprint at https://doi.org/10.1038/s41580-021-00342-0 (2021).

288. Lei, L. & Burton, Z. F. "Superwobbling" and tRNA-34 Wobble and tRNA-37 Anticodon Loop Modifications in Evolution and Devolution of the Genetic Code. *Life* vol. 12 Preprint at https://doi.org/10.3390/life12020252 (2022).

289. Thompson, D. M., Lu, C., Green, P. J. & Parker, R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* **14**, 2095–2103 (2008).

290. Watanabe, K. *et al.* Degradation of initiator tRNAMet by Xrn1/2 via its accumulation in the nucleus of heat-treated HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **41**, 4671–4685 (2013).

291. Yamagami, R., Sieg, J. P., Assmann, S. M. & Bevilacqua, P. C. Genome-wide analysis of the in vivo tRNA structurome reveals RNA structural and modification dynamics under heat stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, (2022).

292. Watkins, C. P., Zhang, W., Wylder, A. C., Katanski, C. D. & Pan, T. A multiplex platform for small RNA sequencing elucidates multifaceted tRNA stress response and translational regulation. *Nat Commun* **13**, 1–14 (2022).

293. Su, Z. *et al.* Genome-wide RNA structurome reprogramming by acute heat shock globally regulates mRNA abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 12170–12175 (2018).

294. Darwin, C. *On the Origin of Species, 1859*. *On the Origin of Species, 1859* (Routledge, 1859). doi:10.4324/9780203509104.

295. Richter, F. *et al.* RNA marker modifications reveal the necessity for rigorous preparation protocols to avoid artifacts in epitranscriptomic analysis. *Nucleic Acids Res* **50**, 4201–4215 (2022).

296. Huber, S. M., Leonardi, A., Dedon, P. C. & Begley, T. J. The versatile roles of the tRNA epitranscriptome during cellular responses to toxic exposures and environmental stress. *Toxics* vol. 7 Preprint at https://doi.org/10.3390/toxics7010017 (2019).

297. Wang, Y. *et al.* Identification of tRNA nucleoside modification genes critical for stress response and development in rice and Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **17**, 261 (2017).

298. Martinez-Seidel, F., Beine-Golovchuk, O., Hsieh, Y.-C. & Kopka, J. Systematic Review of Plant Ribosome Heterogeneity and Specialization. *Front Plant Sci* **11**, 948 (2020).

299. Dias-Fields, L. & Adamala, K. P. Engineering Ribosomes to Alleviate Abiotic Stress in Plants: A Perspective. *Plants* **11**, 2097 (2022).

300. Navarro, I. C. *et al.* Translational adaptation to heat stress is mediated by RNA 5-methylcytosine in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* (2020) doi:10.15252/embj.2020105496.

301. Jin, G., Xu, M., Zou, M. & Duan, S. The Processing, Gene Regulation, Biological Functions, and Clinical Relevance of N4-Acetylcytidine on RNA: A Systematic Review. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* vol. 20 13–24 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.01.037 (2020).

302. Yared, M.-J. *et al.* Different modification pathways for m1A58 incorporation in yeast elongator and initiator tRNAs. *Nucleic Acids Res* (2023) doi:10.1093/nar/gkad722.

303. Pereira, M. *et al.* M5 U54 tRNA hypomodification by lack of TRMT2A drives the generation of tRNA-derived small RNAs. *Int J Mol Sci* **22**, 1–19 (2021).

304. Rafels-Ybern, À., Attolini, C. S. O. & de Pouplana, L. R. Distribution of ADAT-dependent codons in the human transcriptome. *Int J Mol Sci* **16**, 17303–17314 (2015).

305. Zhou, W., Karcher, D. & Bock, R. Identification of enzymes for adenosine-to-inosine editing and discovery of cytidine-to-uridine editing in nucleus-encoded transfer RNAs of arabidopsis. *Plant Physiol* **166**, 1985–1997 (2014).

306. Rafels-Ybern, À., Torres, A. G., Grau-Bove, X., Ruiz-Trillo, I. & Ribas de Pouplana, L. Codon adaptation to tRNAs with Inosine modification at position 34 is widespread among Eukaryotes and present in two Bacterial phyla. *RNA Biol* **15**, 500–507 (2018).

307. Sharp, P. M. & Li, W. H. Codon usage in regulatory genes in Escherichia coli does not reflect selection for 'rare' codons. *Nucleic Acids Res* **14**, 7737–7749 (1986).

308. Patil, A. *et al.* Translational infidelity-induced protein stress results from a deficiency in Trm9-catalyzed tRNA modifications. *RNA Biol* **9**, 990–1001 (2012).

309. Pichot, F. *et al.* Quantification of substoichiometric modification reveals global tsRNA hypomodification, preferences for angiogenin-mediated tRNA cleavage, and idiosyncratic

epitranscriptomes of human neuronal cell-lines. *Comput Struct Biotechnol J* **21**, 401–417 (2023).

310. Kennedy, D., Samali, A. & Jäger, R. Methods for studying ER stress and UPR markers in human cells. *Methods in Molecular Biology* **1292**, 3–18 (2015).

311. Oslowski, C. M. & Urano, F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. in *Methods in Enzymology* vol. 490 71–92 (Academic Press Inc., 2011).

312. Martinez-Seidel, F., Beine-Golovchuk, O., Hsieh, Y. C. & Kopka, J. Systematic review of plant ribosome heterogeneity and specialization. *Frontiers in Plant Science* vol. 11 1 Preprint at https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00948 (2020).

313. Ho, J. M., Bakkalbasi, E., Söll, D. & Miller, C. A. Drugging tRNA aminoacylation. *RNA Biology* vol. 15 667–677 Preprint at https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1429879 (2018).

314. Vignon, M. *et al.* Multiplexed LC-MS/MS quantification of salivary RNA modifications in periodontitis. *J Periodontal Res* **58**, 959–967 (2023).

315. Relier, S. *et al.* Multivariate Analysis of RNA Chemistry Marks Uncovers Epitranscriptomics-Based Biomarker Signature for Adult Diffuse Glioma Diagnostics. *Anal Chem* **94**, 11967–11972 (2022).

Abstract

The sessile nature of plants has led them to develop strong acclimatization and adaptation capabilities, especially in the face of extreme heat. Plants also have the ability to remember a previous stress event in order to be better prepared for the onset of new stresses: a phenomenon known as the memory effect.

Under conditions of thermal stress, it is essential for the survival of plants that they fine-tune the expression of their genes in order to coordinate the balance between growth and defense. To date, numerous studies have focused on the role of transcriptional regulation in heat stress acclimation and the memory effect, but the involvement of translation, a key process in gene expression, has been poorly characterized. Translation is regulated by several elements, including transfer RNAs (tRNAs). These molecules act as a link between the world of nucleic acids and that of amino acids, decoding mRNAs and transporting amino acids to ribosomes. tRNAs possess a variety of chemical modifications, that constitute the so-called tRNA epitranscriptome. They affect the biology of tRNAs at multiple levels, including their interactions with mRNAs and ribosomes and ultimately translation. Recently, these epitranscriptomic modifications have been observed to be dynamic and responsive to intra- and extracellular signals. It is proposed that they represent a new level of gene expression regulation that modulates translation. However, only a few studies have described the tRNA epitranscriptomes and their variations in Arabidopsis.

The aim of my thesis was to understand how translational control regulates gene expression, to enable plant acclimation to heat stress and the establishment of the memory effect. And also, how the epitranscriptome of tRNAs varies in response to different conditions. My work has focused on three main areas: the study of natural variability in tRNA chemical modifications, the impact of heat stress and the memory effect on translational regulation, and the impact on the tRNA epitranscriptome.

In the first axis, I demonstrated for the first time the existence of natural epitranscriptomic variability within different Arabidopsis populations from different regions of Europe, with very contrasting climatic conditions. The results obtained suggest that this epitranscriptomic variability is mainly dictated by genetic parameters.

In the second part, I highlighted the importance of polysomal mechanisms (polysomal engagement and co-translational degradation) in the response to heat stress and the establishment of the memory effect in Arabidopsis. I showed how priming can enhance the translational capacities of Arabidopsis, to enable acclimation.

Finally, I demonstrated the effect of heat stress and priming on the composition of tRNA epitranscriptomes (bound or not to polysomes). Finally, an integrative analysis of the results suggested a role for a chemical modification of tRNAs (inosine at position 34) in an epitranscriptomic regulation of translation.

Finally, this thesis has provided new information on the importance of translational regulations in the response to heat stress and the memory effect. In addition, we have provided new insights into the variability of tRNA chemical modifications. These innovative results support the hypothesis of their involvement in the fine regulation of gene expression and the integration of these molecules in the response to heat stress and the memory effect in plant organisms.

Résumé

La nature sessile des plantes les a poussé à développer de fortes capacités d'acclimatation et d'adaptation. Les plantes ont aussi la capacité de se souvenir d'un événement de stress antérieur afin d'être mieux préparées lors de l'apparition de nouveaux stress : un phénomène que l'on qualifie d'effet mémoire.

En condition de stress thermique il est nécessaire pour la survie des plantes qu'elles ajustent finement l'expression de leurs gènes, afin de coordonner la balance entre croissance et défense. Aujourd'hui, de nombreuses études se sont intéressées aux rôles des régulations transcriptionnelles dans l'acclimatation au stress thermique et l'effet mémoire, mais l'implication de la traduction, un processus clé de l'expression des gènes, n'a été que très peu caractérisé. La traduction est régulée par divers éléments, dont les ARN de transfert (ARNt). Ces molécules servent de lien entre le monde des acides nucléiques et celui des acides aminés, en décodant les ARNm et en transportant les acides aminés aux ribosomes. Les ARNt possèdent des modifications chimiques variées, constituant ce que l'on nomme l'épitranscriptome des ARNt. Elles impactent la biologie des ARNt à plusieurs niveaux, y compris leurs interactions avec les ARNm et les ribosomes, influençant *in fine* la traduction. Récemment, il a été observé que ces modifications épitranscriptomiques sont dynamiques et répondent à des signaux intra- et extracellulaires. Il est proposé qu'elles constituent un nouveau niveau de régulation de l'expression des gènes, modulant la traduction. Néanmoins chez Arabidopsis assez peu d'études décrivent les épitranscriptomes des ARNt et leurs variations.

Le but de ma thèse a été de comprendre comment le contrôle de la traduction régule l'expression des gènes, permettant l'acclimatation des plantes au stress thermique et l'établissement de l'effet mémoire. Et aussi, comment varie l'épitranscriptome des ARNt en réponse à différentes conditions. Trois grands axes ont été suivis au cours de mes travaux : l'étude de la variabilité naturelle des modifications chimiques des ARNt, l'impact du stress thermique et de l'effet mémoire sur les régulations traductionnelles et l'impact sur l'épitranscriptome des ARNt.

Dans le premier axe j'ai montré pour la première fois l'existence d'une variabilité épitranscriptomique naturelle au sein de différentes populations d'Arabidopsis provenant de différentes régions d'Europe, aux conditions climatiques très contrastées. Les résultats obtenus suggèrent que cette variabilité épitranscriptomique est principalement dictée par des paramètres génétiques.

Dans la deuxième partie j'ai mis en lumière l'importance des mécanismes polysomaux (traduction et dégradation co-traductionnelle) dans la réponse au stress thermique et l'établissement de l'effet mémoire chez Arabidopsis. J'ai montré comment l'amorçage permet d'améliorer ses capacités traductionnelles afin de permettre son acclimatation.

Dans le dernier axe, j'ai montré l'impact du stress thermique ainsi que de l'amorçage sur la composition des épitranscriptomes des ARNt (engagés ou non dans les polysomes). Enfin, une analyse intégrative des résultats a permis de proposer l'implication d'une modification chimique des ARNt (inosine en position 34) dans une potentielle régulation épitranscriptomique de la traduction.

Enfin, cette thèse a permis d'apporter de nouvelles informations sur l'importance des régulations traductionnelles dans la réponse au stress thermique et l'effet mémoire. De plus nous avons apporté de nouvelles connaissances sur la variabilité des modifications chimiques des ARNt chez Arabidopsis. Ces résultats innovants permettent de soutenir l'hypothèse de leur implication dans la régulation fine de l'expression des gènes et d'intégrer ces molécules dans la réponse au stress thermique et dans l'effet mémoire chez les organismes végétaux.