



Interconnexion entre traduction, stockage et dégradation des ARN messagers chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*

Rémy Merret

► To cite this version:

Rémy Merret. Interconnexion entre traduction, stockage et dégradation des ARN messagers chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Botanique. Université de Perpignan Via Domitia (UPVD), 2019. tel-02186839

HAL Id: tel-02186839

<https://univ-perp.hal.science/tel-02186839>

Submitted on 17 Jul 2019

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

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

Dossier présenté en vue d'obtenir

L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Par

Rémy MERRET

**Interconnexion entre traduction, stockage et dégradation des ARN
messagers chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 21 Mai 2019

Composition du jury

Dr. Philippe Giégé
Pr. Anne-Marie Duchêne
Dr. Julia Morales
Dr. Jean-Phillipe Reichheld
Dr. Cécile Bousquet-Antonelli

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur interne
Examineur interne

Laboratoire Génome et Développement des Plantes

CNRS/UPVD
UMR 5096



UNIVERSITE DE PERPIGNAN

2019

Dossier présenté en vue d'obtenir

L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Par

Rémy MERRET

**Interconnexion entre traduction, stockage et dégradation des
ARN messagers chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 21 Mai 2019

Composition du jury

Dr. Philippe Giégé
Pr. Anne-Marie Duchêne
Dr. Julia Morales
Dr. Jean-Phillipe Reichheld
Dr. Cécile Bousquet-Antonelli

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur interne
Examineur interne

Laboratoire Génome et Développement des Plantes
CNRS/UPVD
UMR 5096

Résumé

Les végétaux en tant qu'organismes sont souvent confrontés à des conditions environnementales changeantes. Lorsqu'ils sont soumis à un stress, ces derniers passent d'un mode « croissance » à un mode « survie » grâce à une reprogrammation rapide de l'expression de leurs gènes. Ce processus repose sur des mécanismes moléculaires complexes qui se déroulent à différentes échelles (ADN, ARN, protéine). Au cours de ces 8 dernières années, je me suis plus particulièrement intéressé au rôle de la régulation post- transcriptionnelle des ARN messagers dans ce processus chez la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*. Cette régulation peut affecter dans le cytoplasme la stabilité des ARN messagers, leur traduction ou encore leur stockage.

Après une introduction sur le contrôle de la traduction et sur la stabilité des ARN messagers chez les eucaryotes, j'exposerai dans ce manuscrit mes travaux antérieurs depuis mon premier postdoctorat jusqu'à aujourd'hui. Ma première activité postdoctorale (LGDP, Perpignan) a permis de mettre en évidence l'importance de la dégradation active des ARN messagers en réponse au stress thermique chez *Arabidopsis* (Merret *et al.*, 2013). Cette dégradation est mise en place par l'exoribonucléase XRN4 sur environ 4500 transcrits codant les facteurs de l'activité cellulaire basale. Par ailleurs, nous avons montré qu'une partie de cette dégradation se met en place directement sur les polysomes. Cette dégradation dite co- traductionnelle est induite suite à un ralentissement des ribosomes sur des transcrits codant des peptides hydrophobes (Merret *et al.*, 2015). Elle permet ainsi une dégradation rapide des ARN messagers et évite l'agrégation de protéines hydrophobes au cours du stress. Ma seconde activité postdoctorale (ABRC, Taïwan) a révélé l'importance du stockage de certains ARN messagers au cours du stress thermique chez *Arabidopsis*. Lors du retour à la condition normale, ces ARNm stockés sont libérés par la chaperonne HSP101 et permettent une reprise efficace de la traduction (Merret *et al.*, 2017).

Depuis mon recrutement en tant que chargé de recherche (CRCN, CNRS) en 2015, je poursuis mon activité de recherche au sein de l'équipe du Dr. Cécile Bousquet-Antonelli au Laboratoire Génome et Développement des Plantes à Perpignan. Je terminerai donc ce manuscrit en présentant le projet de recherche que je développe actuellement et les orientations que je veux y apporter au cours de ces prochaines années. Ce projet de recherche s'oriente sur une analyse intégrée des mécanismes qui contrôlent à la fois la traduction et la dégradation des ARN messagers au cours du développement de la plante et en réponse à une contrainte environnementale.

Sommaire

I- Curriculum Vitae

II- Activités d'encadrement et d'animation de la recherche

III- Publications et Communications

IV- Travaux de recherche antérieurs

IV-1- Introduction générale : cycle de vie des ARN messagers

IV-2- Régulation post-transcriptionnelle des ARN messagers en réponse au stress thermique chez *Arabidopsis*

A- Mise en évidence d'un mécanisme actif de dégradation des ARN messagers en réponse au stress thermique chez *Arabidopsis*

B- Rôle de la dégradation co-translationnelle dans le métabolisme des ARNm au cours du stress thermique

C- Rôle du stockage des ARN messagers pour la reprise de la traduction après un événement de stress thermique

D- Conclusion et modèle de travail

IV-3- Caractérisation d'ECT2 comme lecteur de méthylation m⁶A chez *Arabidopsis thaliana*

V- Projets de recherche actuels

V-1- Analyse de l'interconnexion entre la traduction et la dégradation des ARN messagers au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*

A- Analyse de la dynamique de la dégradation co-translationnelle au cours du développement

B- Analyse des déterminants *cis* et *trans* gouvernant la dégradation co-translationnelle au cours du développement

C- Contribution de la dégradation co-translationnelle dans l'efficacité de la traduction

V-2- Rôle de la protéine LARP1 dans le contrôle de la traduction

VI- Autre activité liée à la recherche

VII- Bibliographie

I- Curriculum Vitae

Rémy MERRET, Chargé de recherche CNRS Classe Normale

Né le 10/08/1984

Adresse

Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096 CNRS/UPVD

58 Avenue Paul Alduy, 66000 Perpignan

Téléphone : +33(0)4.68.66.22.47, email : remy.merret@univ-perp.fr

Cursus universitaire

- **2007/2010** **Doctorat en Biologie végétale**, Université de Nancy, France
- **2005/2007** **Master en Sciences du végétal**, Université de Strasbourg, France
- **2002/2005** **Licence de Biologie des organismes**, Université de Brest, France

Expériences Professionnelles

- **Depuis Octobre 2015** : **Chargé de recherche CNRS (CRCN) au sein de l'équipe du Dr. C. Bousquet-Antonelli**, LGDP, UMR CNRS 5096, Université de Perpignan, Perpignan, France

Sujet : Régulation de la traduction et de la dégradation des ARN messagers au cours du développement et en réponse au stress chez Arabidopsis thaliana.

- **Novembre 2014 – Septembre 2015** : **Chercheur sous contrat au sein de l'équipe du Dr. YY. Charng**, Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taïwan

Sujet : Rôle de la protéine HSP101 dans la reprise de la traduction après un stress thermique chez Arabidopsis thaliana.

- **Décembre 2010 - Octobre 2014** : **Chercheur sous contrat au sein de l'équipe du Pr. JM. Deragon**, LGDP, UMR CNRS 5096, Université de Perpignan, France

Sujet : Analyse du métabolisme des ARN messagers en réponse au stress thermique chez Arabidopsis thaliana.

Stages de Recherche

- **Octobre 2007 - Novembre 2010 (3 ans)** : **Stage doctoral sous la direction des Drs. E. Dreyer, MB. Bogeat-Triboulot et I. Hummel**, Laboratoire d'Ecologie et d'Ecophysiologie Forestières, UMR INRA 1137, Université de Nancy, Champenoux, France

Sujet : Contrôle moléculaire de la croissance sous déficit hydrique : Analyse cinématique et régulation de l'expression des aquaporines TIP1s dans l'apex de la racine du peuplier.

- **Janvier 2007 - Juin 2007 (6 mois)** : **Stage de Master 2 sous la direction du Dr. A. Hemmerlin**, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR CNRS 2357, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Sujet : Analyse de la localisation subcellulaire du domaine transmembranaire de deux isoformes de la HMGR chez le tabac.

II – Activités d’encadrement et d’animation de la recherche

*** Activités d’encadrement et de formation par la recherche**

Encadrements de thèses

Jérémy SCUTENAIRE (2014-2017)

Co-encadrement : Cécile Bousquet-Antonelli, Jean-Marc Deragon et Rémy Merret

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

Soutenu le 14 décembre 2017. Position actuelle : Postdoctorant IGBMC, Illkirch, France

Encadrements de stagiaires

Seng Hour Vichet BE (Stagiaire Master 2) : Janvier à Juin 2019

Rôle de la protéine LARP1 dans le contrôle de la traduction chez *Arabidopsis thaliana* : lien avec les séquences 5'TOP

Seng Hour Vichet BE (Stagiaire Master 1) : Mars à Aout 2018

Rôle des protéines LARP1 et DCP5 dans le contrôle de la traduction chez *Arabidopsis thaliana*

Jérémy SCUTENAIRE (Stagiaire Master 2) : Janvier à Juin 2014

Identification of specific “readers” for the RNA modification N6-methyladenosine in *Arabidopsis*

Jérémy SCUTENAIRE (Stagiaire Master 1) : Février à Mai 2013

Etude *in vitro* des bases de l'interaction LARP1 et PAB2 d'*Arabidopsis thaliana*

Claire DEPARDIEU (Stagiaire Master 2) : Janvier à Juin 2009

Caractérisation de la réponse de la croissance de la racine de peuplier au stress osmotique

Encadrements de personnels techniques

Viviane JEAN (Assistant-ingénieur CNRS, 50% Equipe) : Depuis Octobre 2015

Michèle LAUDIE (Assistant-ingénieur CNRS, 50% Plateforme NGS) : Depuis Janvier 2018

Yann CHAPPE (CDD Ingénieur d’études) : Mai 2016 à Août 2017

Etienne DERAGON (CDD Assistant-ingénieur) : Janvier 2018 à Août 2018

*** Activités d’animation de la recherche**

Responsable scientifique et technique du plateau de Séquençage à Haut Débit (NGS) au sein de la plateforme BioEnvironnement, Université de Perpignan. Octobre 2017 – présent.

Membre du comité de pilotage de la plateforme BioEnvironnement, Université de Perpignan. Octobre 2015 – présent.

* Activités d'évaluation de la recherche

Reviewer pour les revues *Plant Cell*, *Plant Physiology*, *Frontiers in Plant Science*, *Functional Plant Biology*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Plant Science*, *Plant Molecular Biology Reporters*, *Planta*, *Journal of Experimental Botany*, *Plos One*.

* Financements

Projet Labex TULIP XRNDEV 2017 (15k€, Coordinateur) : Rôle de la dégradation co-traductionnelle au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*

* Collaborations

Dr. Laurence Drouard (IBMP, Strasbourg) : Rôle des tRF dans le contrôle de la traduction chez *Arabidopsis*

Dr. Jean-Philippe Combier (LRSV, Toulouse) : Rôle des miPEP dans le contrôle de la traduction chez *Arabidopsis*

Dr. Sébastien Gourbière (LGDP, Perpignan) : Etude de la contribution de la dégradation co-traductionnelle dans l'efficacité de traduction des transcrits chez *Arabidopsis* par une approche de modélisation

Pr. Maria Conte (King's College, London) : Analyse *in vitro* de l'interaction entre la protéine LARP1 et ses cibles ARN.

III – Publications et Communications

* Liste de publications

Soumis

Sulkowska A, Auber A, Sikorski PJ, Silhavy D, Jean V, **Merret R**, Bousquet-Antonelli C, Wawer I and Kufel J. (2019) RNA helicases from the DEA(D/H)-box family contribute to NMD efficiency in *Arabidopsis thaliana*. **Soumis à Plant Journal**.

En préparation

Merret R, Llauro C, Carpentier MC, Panaud O, Mirouze M. (2019) Landscape analysis of Arabidopsis transcriptome using Long Read Sequencing.

Lalande S, **Merret R**, Ubrig E, Salinas-Giége T, Duchêne AM, Maréchal-Drouard L. (2019). Inhibition of translation by tRNA-derived fragments in Arabidopsis.

Articles dans des journaux à comité de lecture

P10 - Scutenaire J, Deragon JM, Jean V, Benhamed M, Raynaud C, Favory JJ, **Merret R**#, Bousquet-Antonelli C.# (2018) The YTH Domain Protein ECT2 Is an m6A Reader Required for Normal Trichome Branching in Arabidopsis. **The Plant Cell**, 30, 986-1005. IF : 8.68

Corresponding authors

P9 - **Merret R**#, Carpentier MC, Favory JJ, Picart C, Descombin J, Bousquet-Antonelli C, Tillard P, Lejay L, Deragon JM, Charng YY.# (2017) Heat Shock Protein HSP101 Affects the Release of Ribosomal Protein mRNAs for Recovery after Heat Shock. **Plant Physiology**, 174, 1216-1225. IF : 6.45

Corresponding authors

P8 - **Merret R**, Nagarajan VK, Carpentier MC, Park S, Favory JJ, Descombin J, Picart C, Charng YY, Green PJ, Deragon JM, Bousquet-Antonelli C. (2015) Heat-induced ribosome pausing triggers mRNA co-translational decay in *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Research**, 43, 4121-4132. IF : 10,16

P7 - Durut N, Abou-Ellail M, Pontvianne F, Das S, Kojima H, Ukai S, de Bures A, Comella P, Nidelet S, Rialle S, **Merret R**, Echeverria M, Bouvet P, Nakamura K and Sáez-Vásquez J. (2014) A duplicated NUCLEOLIN gene with antagonistic activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in Arabidopsis. **The Plant Cell**, 26, 1330-1344. IF : 8.68

P6 - **Merret R**, Descombin J, Juan YT, Favory JJ, Carpentier MC, Chaparro C, Charng YY, Deragon JM, Bousquet-Antonelli C. (2013b) XRN4 and LARP1 are required in a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival to thermal stress. **Cell Reports**, 5, 1279-1293. IF : 8,28

P5 - Sement FM, Ferrer E, Zuber H, **Merret R**, Alioua M, Deragon JM, Bousquet-Antonelli C, Lange H, Gagliardi D. (2013) Uridylation prevents 3' trimming of oligoadenylated mRNAs. **Nucleic Acids Research**, 41, 7115-7127. IF : 10,16

P4 - Cohen D, Bogeat-Triboulot MB, Vialet-Chabrand S, **Merret R**, Courty PE, Moretti S, Bizet F, Guilliot A, Hummel I (2013) Developmental and Environmental Regulation of Aquaporin Gene Expression across Populus Species : Divergence or Redundancy ? **Plos One**, 8, e5506. IF : 2,76

P3 - Merret R, Martino L, Bousquet-Antonelli C, Fneich S, Descombin J, Billey E, Conte, MR, Deragon JM. (2013a) The association of a La-module with the PABP-interacting motif PAM2 is a recurrent evolutionary process that led to the neofunctionalization of La-related proteins. *RNA*, 19, 36-50. IF 2013 : 3,9

P2 - Merret R, Moulia B, Hummel I, Cohen D, Dreyer E, Bogeat-Triboulot MB (2010) Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanics formalism. *BMC Biology*, 8, 18. IF : 6,77

P1 - Merret R, Cirioni J, Bach TJ, Hemmerlin A. (2007) A serine involved in actin dependent subcellular localization of a stress-induced tobacco BY-2 hydroxymethylglutaryl-CoA reductase isoform. *FEBS Letters*, 581, 5295-5299. IF : 3,62

* Communications orales

C3- Merret R, Carpentier MC, Deragon JM, Bousquet-Antonelli. Monitoring co-translational mRNA decay targets across Arabidopsis development reveals dynamic features. *Post-transcriptional Gene Expression Regulation in Plants meeting*, March 2019, Nara, Japan

C2- Merret R, Nagarajan VK, Carpentier MC, Park S, Favory JJ, Descombin J, Picart C, Charng YY, Green PJ, Deragon JM, Bousquet-Antonelli C. Analysis of the stress triggered mRNA decay process in Arabidopsis thaliana. *Post-transcriptional Gene Expression Regulation in Plants meeting*, Juin 2014, Poznan, Poland.

C1- Merret R, Descombin J, Juan YT, Favory JJ, Carpentier MC, Chaparro C, Charng YY, Deragon JM, Bousquet-Antonelli C. XRN4 and LARP1 are required in a heat-mediated mRNA decay pathway essential for plant acclimation to heat stress and survival. *SifARN*, Novembre 2013, Bischoffsheim, France.

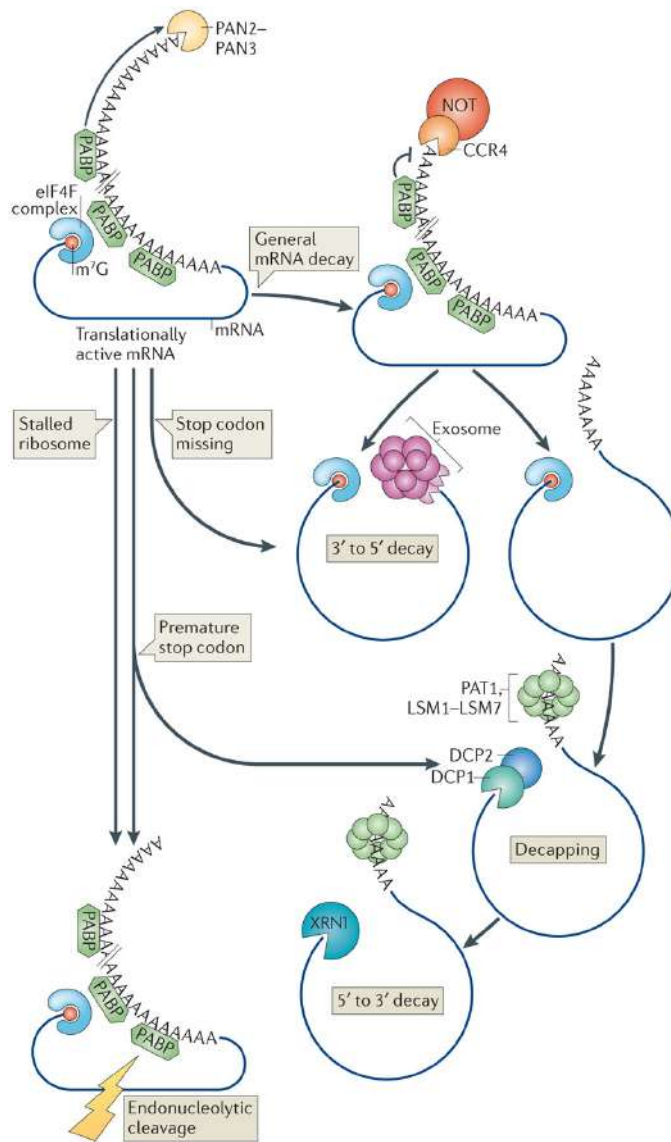


Figure 1 : Représentation schématique des mécanismes généraux de dégradation des transcrits chez la levure (Adapté de Norbury, 2013). Un ARN messager en cours de traduction est circulaire de part l'interaction entre les poly(A) binding protein (PABP) et le complexe de coiffe, eIF4F. L'entrée en dégradation démarre par une déadénylation lente provoquée par PAN2/PAN3 puis rapide par le complexe CCR4/NOT. Après déadénylation, l'ARN rentre dans un processus de dégradation 3'-5' facilité par l'exosome ou dans un processus de dégradation 5'-3' *via* XRN1 après recrutement du complexe LSM/Pat et decapping. L'ARN peut aussi être dégradé de manière déadénylation-indépendante par une coupure endonucléolytique par exemple.

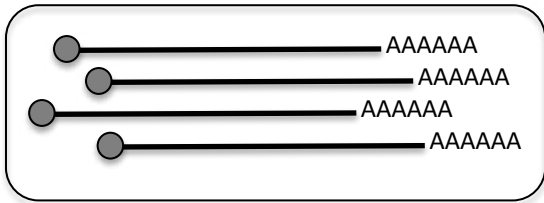
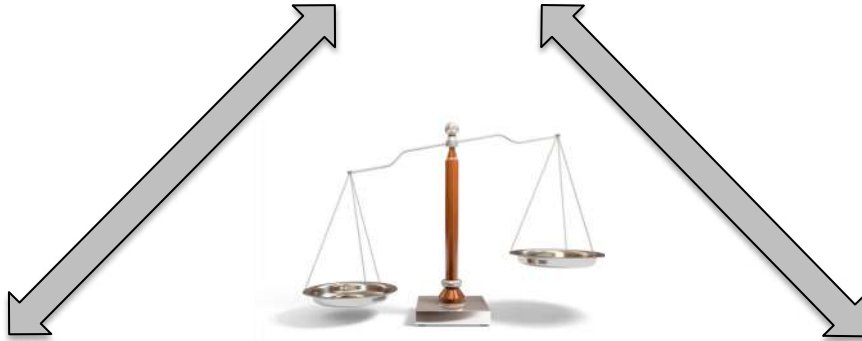
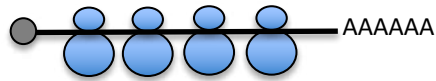
IV- Travaux de recherche antérieurs

Au cours de mon parcours, j'ai effectué une thèse à l'INRA de Nancy sur les bases moléculaires du contrôle de la croissance de la racine du peuplier sous déficit hydrique. Ce travail a notamment montré l'importance de prendre en compte la dynamique de la croissance cellulaire dans l'analyse de l'expression des gènes (Merret *et al.*, 2010). Je ne détaillerai pas dans ce manuscrit les travaux menés dans le cadre de ma thèse, malgré l'importance que je leur accorde dans mon parcours. Je vais décrire ci-dessous mes travaux de recherche à partir de mon premier post-doctorat réalisé sur le métabolisme des ARN messagers en réponse au stress thermique chez *Arabidopsis thaliana*. Ce projet a été le point de départ des travaux de recherche qui ont suivi, et que je mène actuellement.

IV-1- Introduction générale : cycle de vie des ARN messagers

Tout ARN messenger présente à chacune de ses extrémités des structures qui le protègent de la dégradation en même tant qu'elles stimulent sa traduction, respectivement en 5' la coiffe et en 3' la queue poly(A). Néanmoins, tout ARN messenger a une durée de vie fixée et peut subir un processus de dégradation cytoplasmique (Figure 1). Ce processus débute par la réduction de la queue poly(A) appelée déadénylation qui est une étape limitante se déroulant en deux phases. La première phase de mise en place par le complexe PAN2-PAN3 est un processus lent et distributif. Puis, la queue poly(A) est dégradée de manière rapide et processive par le complexe CCR4-CAF1-NOT jusqu'à une taille minimale (autour de 10 à 15 A) qui déclenche le processus de dégradation du messenger (Brook and Gray, 2012 ; Eulalio *et al.*, 2007a ; Parker, 2012). Suite à leur déadénylation, les ARN messagers peuvent être dégradés du côté 3' aussi bien que du côté 5'. La dégradation 3'-5' est catalysée par un complexe nommé l'exosome composé de 9 sous-unités qui forment une structure en anneau (Lange and Gagliardi, 2010 ; Lykke-Andersen *et al.*, 2011). La dégradation 5'-3' est catalysée par l'exoribonucléase XRN1 (ou XRN4, l'homologue chez *Arabidopsis thaliana*). Cette dégradation ne peut se faire qu'en l'absence de coiffe. Une étape de retrait de la coiffe (ou decapping) est donc nécessaire. Le déclenchement du decapping est amorcé par le recrutement du complexe LSM-PAT1 qui vient se fixer sur la queue poly(A) et inhibe l'activité 3' au profit de l'activité 5'. Les protéines DHH1, SCD6 (/DCP5/LSM14) et PAT1 agissent comme répresseurs de la traduction. Le decapping est majoritairement catalysé par le complexe DCP1/DCP2/HEDLS où DCP1 est le cofacteur et DCP2, la sous-unité catalytique (Franks and Lykke-Andersen, 2008 ; Parker, 2012). La protéine HEDLS est nécessaire à la mise en place et à la stabilité de l'interaction DCP1-DCP2. Cette voie de dégradation est appelée dégradation déadénylation-dépendante. Mais des voies alternatives de dégradations déadénylation-indépendante

Traduction



Stockage



Dégradation

Figure 2 : Equilibre dynamique des ARN messagers entre traduction, stockage et dégradation.

peuvent survenir comme à l'issue de coupures endonucléolytique par exemple.

Dans le cytoplasme les ARNm sont soit en traduction active, soit non traduits et stockés, soit en cours de dégradation (Eulalio *et al.*, 2007a ; Garneau *et al.*, 2007 ; Parker and Sheth, 2007, Hubstenberger *et al.*, 2017 ; Standart and Weil, 2018). Ces trois états forment un équilibre dynamique (Figure 2) dont l'altération constitue un moyen rapide et précis de régulation de l'expression génique en réponse à divers stimuli tels que les états développementaux, l'avancement du cycle cellulaire ou les conditions physiologiques exogènes (situations de stress notamment). En situation de stress, la cellule et l'organisme tout entier passent d'un mode croissance à un mode de survie. Ceci a pour conséquence une reprogrammation massive de l'expression génique notamment *via* des mécanismes d'inhibition de la transcription et l'activation de gènes spécifiques d'adaptation, mais également *via* une forte réduction de l'activité traductionnelle (Holcik and Sonenberg, 2005) et donc la libération d'une quantité importante d'ARNm sous forme inactifs de mRNP (messenger RiboNucleoProtein). Ces ARN messagers peuvent s'agréger dans le cytoplasme sous forme de foci dont la formation se manifeste dès les premières étapes du stress. Ces foci sont de deux types bien distincts, les p-bodies (PB) et les stress granules (SG). Alors que les p-bodies regroupent les éléments de la machinerie de dégradation, les granules de stress contiennent en particulier les complexes liés à la traduction. Le rôle précis de ces agrégats en situation de stress est encore mal connu. Il a été proposé que les granules de stress pourraient remplir une fonction de triage des ARN messagers en vue d'un retour vers la traduction et que les p-bodies joueraient un rôle dans leur dégradation. Alors que les granules de stress sont spécifiquement formés en réponse à stress, les p-bodies sont présents en condition normale. Il a été proposé que dans cette condition, les p-bodies serviraient de lieux de stockage (Hubstenberger *et al.*, 2017 ; Standart and Weil, 2018).

Chez *Arabidopsis thaliana*, certains acteurs de la dégradation des ARN messagers sont connus. On retrouve chez les plantes, comme chez les animaux plusieurs déadénylases de type CCR4, CAF et PAN. L'activité de decapping est assurée par l'holoenzyme DCP1/DCP2. Le decapping semble assurer un caractère essentiel et vital chez *Arabidopsis thaliana* car les mutants nuls respectifs pour DCP1 et DCP2 sont létaux. Des résultats suggèrent par ailleurs que la protéine DCP1 peut être modifiée post-traductionnellement en réponse aux conditions environnementales (Goeres *et al.*, 2007 ; Iwasaki *et al.*, 2007 ; Xu and Chua, 2012 ; Xu *et al.*, 2006). Seuls deux activateurs du decapping ont été identifiés chez *Arabidopsis*, le facteur VARICOSE (VCS) qui forme un complexe avec DCP1/DCP2 et stimule son activité *in vitro* (Goeres *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2006) et la protéine DCP5 qui est nécessaire au decapping *in vivo*. DCP5 est l'homologue de LSM14 chez l'Homme, Scd6 chez la levure et est impliquée dans l'inhibition de la traduction nécessaire à la mise en place du decapping. *In vitro*, DCP5 est antagoniste à la traduction. (Xu and

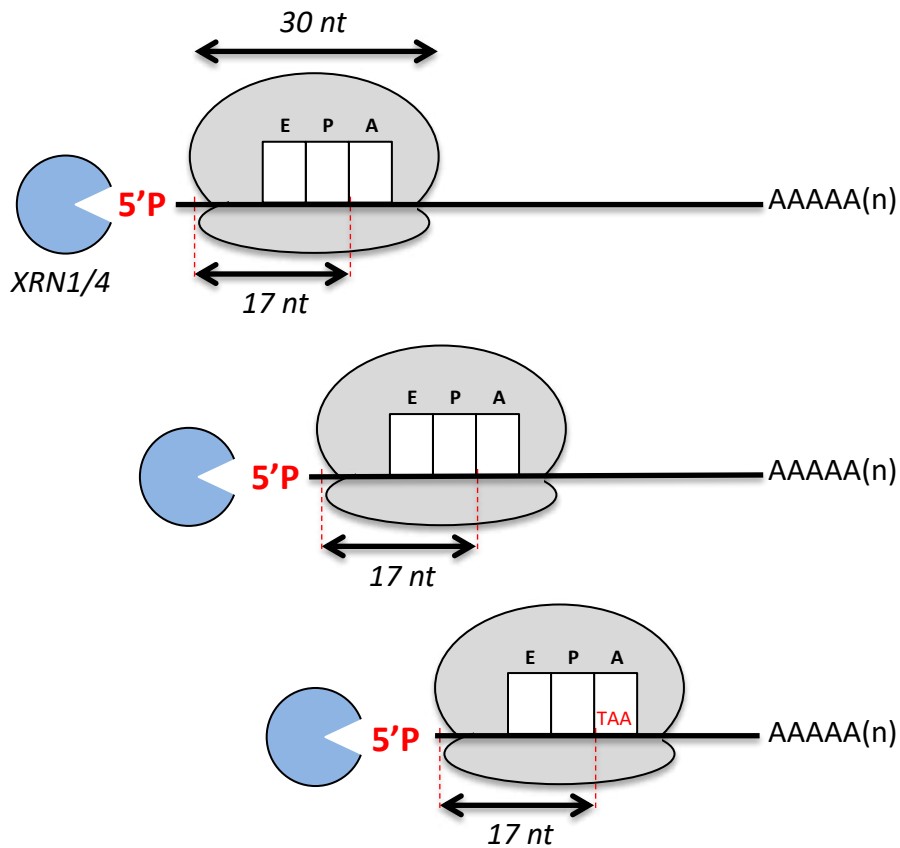


Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme de dégradation co-traductionnelle. Après retrait de la coiffe, l'exoribonucléase suit le déplacement du ribosome codon par codon jusqu'à atteindre le codon stop en site A qui initie la terminaison. Les approches de dégradome consistent donc à capturer ces intermédiaires de dégradation 5'P et de les séquencer depuis leur extrémité 5'. Un ribosome occupe une couverture de 30 nucléotides sur le transcrit. La distance entre l'extrémité 5' de l'intermédiaire et le site A du ribosome est de 17 nucléotides.

Chua, 2009). En terme d'exoribonucléase 5'-3', il existe trois homologues des protéines XRN chez *Arabidopsis*, respectivement XRN2, XRN3 et XRN4. La protéine XRN4 qui est cytoplasmique semble être l'homologue fonctionnel de la protéine XRN1 de levure, alors qu'XRN2 et XRN3 tiennent des rôles nucléaires (Gy *et al.*, 2007 ; Zakrzewska-Placzek *et al.*, 2010). La protéine XRN4 est impliquée dans le turnover des ARNm présentant une extrémité 5' monophosphate libérée (Souret *et al.*, 2004). Etrangement, XRN4 semble avoir peu de cibles en conditions normales, puisque son inactivation n'affecte la stabilité que de quelques transcrits, mais ces résultats n'ont pour l'instant été démontré que sur des fractions polyA⁺ d'ARN messagers, *i.e.* des ARNm purifiés sur une colonne oligo(dT25) (Rymarquis *et al.*, 2011 ; Souret *et al.*, 2004 ; Gutierrez *et al.*, 2002). La localisation subcellulaire de toutes ces protéines suite à un stress commence à être abordée. L'existence de p-bodies et de stress granules a été montrée sous diverses conditions de stress comme le stress thermique, le stress salin ou encore l'hypoxie (Weber *et al.*, 2008, Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015 ; Sorenson and Bailey-Serres, 2014). Ces données suggèrent l'existence des p-bodies et des granules de stress chez la plante mais les mécanismes qui gouvernent leurs formations ainsi que leurs compositions restent fragmentaires.

En plus des voies de dégradation classiques, des travaux récents proposent aussi l'existence d'une voie de dégradation 5'-3' dite co-translationnelle. L'existence de cette voie a tout d'abord été suggérée chez la levure par l'utilisation de gènes rapporteurs (Hu *et al.*, 2009). L'accumulation de transcrits décapés dans les polysomes laissait suggérer l'existence d'une telle voie. Ce n'est que très récemment que le rôle « genome-wide » de cette voie a pu être mis en évidence à la fois chez la levure et chez *Arabidopsis* par des approches de dégradome qui consistent à capturer les intermédiaires de dégradation (ARNm décappés présentant une extrémité 5' monophosphate) (Pelechano *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2016). Cette dégradation est catalysée par XRN1 chez la levure et XRN4 chez *Arabidopsis* (Figure 3). Il s'agit d'un processus répandu et conservé affectant la plupart des gènes, où la dégradation 5'-3' du transcrit suit le dernier ribosome en cours d'élongation, produisant une empreinte *in vivo* du ribosome. En séquençant depuis l'extrémité 5' des intermédiaires de dégradation, il est alors possible d'obtenir une mesure « genome-wide » de la dynamique des ribosomes (Figure 3). En effet, un ralentissement du ribosome à une position particulière produira une accumulation d'intermédiaires de dégradation. Ainsi, par ces approches, il a été possible chez la levure et *Arabidopsis* d'identifier des pauses générales à la terminaison de traduction (UAA, UAG, UGA) (Pelechano *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2016). Par ailleurs, chez la levure, une pause supplémentaire a été détectée sur les codons associés à la proline (CGA) et à l'arginine (CCG). La pause au codon CGA est liée à la rareté de ce codon et la pause au codon CCG est expliquée par un appariement de type « wobble » (Pelechano *et al.*, 2015). En condition de stress oxydatif, des pauses d'élongation du ribosome sont aussi observées sur tous les codons acide

aspartique (GAU, GAC) et sérine (UCU, UCC, AGU, AGC) (Pelechano *et al.*, 2015). Tous les transcrits subissent cette voie dégradation mais avec des amplitudes différentes en fonction des rôles biologiques. En effet chez la levure, les transcrits codant la machinerie de traduction sont peu affectés par ce mécanisme alors que les transcrits associés aux mécanismes de transcription sont fortement dégradés par cette voie (Pelechano *et al.*, 2015). Chez Arabidopsis, ces mêmes transcrits sont aussi cibles de cette dégradation (Yu *et al.*, 2016). Il semblerait qu'il existe une corrélation négative entre efficacité de traduction d'un transcrit et son taux de dégradation co-traductionnelle. A l'heure actuelle, peu d'acteurs impliqués dans cette voie de dégradation ont été identifiés. Chez la levure, RNY1, une RNase de type T2 impliquée dans le clivage des ARNt, a été montré comme requise dans les pauses spécifiques liées au stress oxydatif (Pelechano *et al.*, 2015). Les auteurs suggèrent alors que RNY1 et/ou les fragments d'ARNt issus de son action sont requis dans le contrôle de l'élongation des ribosomes en réponse au stress oxydatif. Chez Arabidopsis, CBP80, la plus grande sous-unité du complexe nucléaire de fixation à la coiffe, a été montrée comme étant impliquée dans la régulation de la dégradation co-traductionnelle (Yu *et al.*, 2016).

IV-2- Régulation post-transcriptionnelle des ARN messagers en réponse au stress thermique chez Arabidopsis

A- Mise en évidence d'un mécanisme actif de dégradation des ARN messagers en réponse au stress thermique chez Arabidopsis (Postdoctorat n°1 LGDP)

Contexte :

Il est maintenant accepté qu'en situation de stress thermique, un des éléments clés de l'acclimatation est une étape de reprogrammation de l'expression des gènes. Face à un stress thermique, l'expression de quelques centaines de gènes est stimulée. Ces gènes codent des protéines de type HSP (Heat Shock Proteins) ou bien des facteurs de transcription et jouent un rôle dans les mécanismes de tolérance au stress. Mais en parallèle, près de 25 % du transcriptome est réprimé face au stress (Larkindale and Vierling, 2008). Ce mécanisme de répression est mal compris à ce jour. Il peut être l'œuvre d'une répression massive de la transcription de transcrits non essentiels à la survie de la plante ou à une dégradation rapide des transcrits ou la combinaison des deux phénomènes. A mon arrivée en postdoctorat, des travaux préliminaires tendaient à montrer que la protéine LARP1, une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans le métabolisme des ARN messagers, suite à un choc thermique était relocalisée sous la forme d'agrégats subcytoplasmiques apparentés à des stress granules. J'ai poursuivi au cours de mon postdoctorat, ces travaux autour de la fonction de la protéine LARP1 dans la réponse au stress thermique.

Résultats :

Pour appréhender la fonction de cette protéine en situation de stress thermique, nous avons conduit par une analyse de transcriptomique globale (RNA sequencing), une analyse du taux de transcrits qui s'accumulent en plantules (plantes entières de 21 jours) sauvages (Col0) ou mutantes pour LARP1 cultivées *in vitro* en conditions normales (20°C) ou suite à un stress thermique de 30 minutes à 38°C. Nous avons comparé le rapport de la quantité de chaque transcrit à 38°C à sa quantité à 20°C. En condition sauvage, le stress thermique induit la sous-accumulation de près de 4500 transcrits. Dans le mutant *larpl1*, ces mêmes transcrits semblent être accumulés de la même manière. La protéine LARP1 ne semble pas avoir d'impact qualitatif sur la sous-accumulation de ces transcrits. En revanche, pour la grande majorité de ces transcrits, la sous-accumulation est moins importante dans le mutant *larpl1* que dans le fond sauvage. Ces résultats suggèrent un impact quantitatif de la mutation *larpl1* sur la sous-accumulation des transcrits en situation de stress thermique.

Par des approches de double hybride et d'immunoprécipitation, nous avons montré que la protéine LARP1 est capable de se fixer *in vitro* et *in planta* à XRN4 (homologue d'XRN1 de

levure), enzyme impliquée dans la dégradation 5'-3' des ARN messagers. L'interaction LARP1-XRN4 nous a conduit à tester l'implication de cette dernière dans la sous-accumulation des transcrits à 38°C. Nous avons donc testé la quantité à l'équilibre des ARNm dans un mutant d'inactivation de XRN4 (*xrn4.5*) en situation normale ou en réponse à un choc thermique. Les analyses de PCR quantitative montrent que dans la lignée *xrn4.5*, pour plus de 20 transcrits testés, le rapport entre la quantité de transcrits à 38°C par rapport à celle à 20°C est toujours plus importante qu'en condition sauvage. Ce rapport est soit équivalent à celui déterminé pour le mutant *larpl* soit supérieur à ce dernier. Ces résultats suggèrent que les protéines XRN4 et dans une moindre mesure LARP1, sont impliquées dans les mécanismes de régulation négatifs d'accumulation des ARNm à 38°C. De part la nature enzymatique d'XRN4, nous avons cherché à savoir si ce phénomène de sous-accumulation en stress thermique est lié à un mécanisme de dégradation massive des transcrits. Par des mesures de $\frac{1}{2}$ vie sur des ARN messagers spécifiques, nous montrons d'une part que le stress thermique induit une dégradation plus rapide des ARN messagers et d'autre part que la protéine XRN4 et dans une moindre mesure la protéine LARP1 jouent un rôle dans cette dégradation. Ces résultats suggèrent que les protéines LARP1 et XRN4 sont impliquées dans la dégradation rapide d'un large groupe de transcrits suite à un choc thermique, et que peut être au moins en partie cette dégradation repose sur l'interaction mise en place entre LARP1 et XRN4.

Ces premiers résultats ont ainsi permis de démontrer l'importance d'une dégradation active des transcrits pour la réponse au stress. Nous proposons l'existence d'une voie de dégradation déclenchée par le stress thermique que nous avons appelé HSMD pour Heat Stress Mediated Decay catalysée par XRN4 et dont la protéine LARP1 serait un cofacteur.

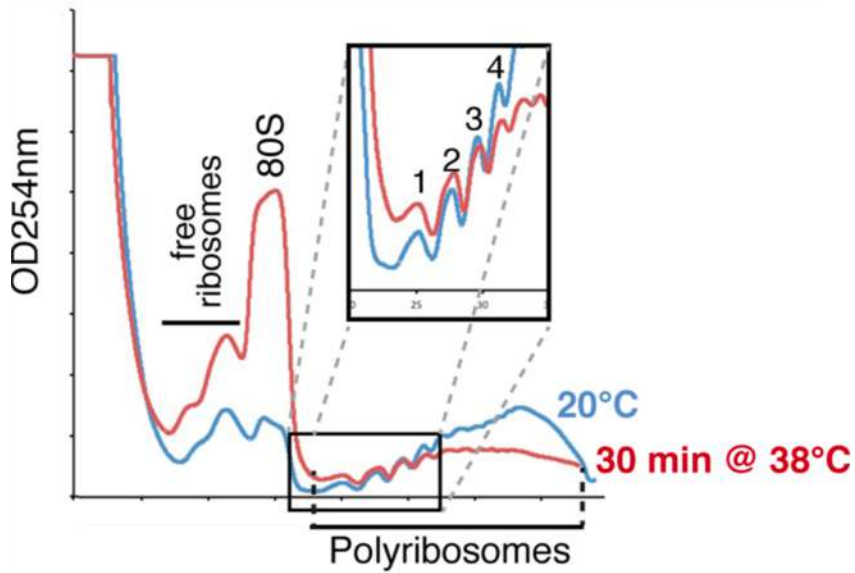


Figure 4. Exemple d'un profil polysomal de plantules d'*Arabidopsis* en condition normale de croissance (20°C) ou après 30 minutes à 38°C (issu de Merret *et al.*, 2015). Le phénomène de “ribosome pausing” induit par le stress thermique est représenté dans l’encart.

B- Rôle de la dégradation co-traductionnelle dans le métabolisme des ARNm au cours du stress thermique (Postdoctorat n°1 LGDP)

Contexte :

Nos précédents travaux ont permis de proposer l'existence d'une dégradation massive des ARN messagers au cours du stress thermique dont l'acteur principal semble être l'exoribonucléase 5'-3', XRN4. Nous avons de plus proposé qu'une voie de dégradation co-traductionnelle pourrait aussi se mettre en place au cours de ce stress. Afin d'approfondir ce mécanisme, nous avons initié une collaboration étroite avec le Professeur Pamela Green à l'Université de Delaware (USA). Je me suis attaché à décortiquer ce mécanisme de dégradation co-traductionnelle au cours du stress thermique.

Résultats :

Au cours du stress thermique, nous avons montré que 4500 ARN messagers subissaient une dégradation massive catalysée par l'activité 5'-3' d'XRN4. Néanmoins, notre analyse reposait uniquement sur une validation Q-PCR et des mesures de demi-vies sur quelques transcrits. Afin de renforcer notre modèle, nous avons initié de nouvelles analyses de séquençage massif sur le mutant nul *xrn4* afin de confirmer cette analyse à l'échelle du génome. De plus, afin d'étudier en détails les mécanismes de dégradation co-traductionnelle, nous avons en parallèle initié un séquençage massif sur des ARN polysomaux. Nous avons ainsi comparé l'accumulation des transcrits au cours du stress thermique à la fois sur un échantillon d'ARN totaux et sur un échantillon d'ARN polysomaux et étudié la contribution d'XRN4 sur ces deux populations. Ces analyses ont permis de montrer que certains transcrits étaient spécifiquement ciblés par XRN4 au niveau des polysomes. Par la suite, je me suis attaché à comprendre pourquoi et comment certains transcrits pouvaient être uniquement cibles d'XRN4 au niveau des polysomes et quel pouvait être le rôle de cette dégradation co-traductionnelle au cours du stress thermique.

Le stress thermique et d'autres stress abiotiques sont connus chez les plantes et chez d'autres eucaryotes pour inhiber la traduction de manière globale (Munoz and Castellano, 2012 ; Holcik *et al.*, 2005). Ainsi, certains stress sont connus pour induire une diminution des polysomes et une augmentation simultanée des monosomes (80S) et des sous-unités ribosomiques libres (Figure 4). Ce phénotype est proportionnel à la durée et l'intensité du stress : plus l'exposition au stress est longue, plus le profil polysomal est modifié. Les stress thermique et protéotoxique ont dans les cellules animales un impact plus élaboré sur la traduction car ils induisent un mécanisme de piégeage du ribosome où l'élongation est temporairement ralentie sur les premiers 200-240 nucléotides des séquences codantes (Liu *et al.*, 2013 ; Shalgi *et al.*, 2013). Ce phénomène, appelé « Ribosome Pausing », peut être directement visualisé sur un profil polysomal avec le niveau des

fractions polysomales légères (les quatre premiers pics de polyribosomes qui correspondent à des ARNm chargés de deux à cinq ribosomes) qui augmentent tandis que les niveaux de fractions polysomales lourdes ont tendance à diminuer (Figure 4). Nous avons montré que ce phénomène se mettait aussi en place chez *Arabidopsis* et qu'il était l'élément déclencheur de la dégradation co-traductionnelle.

En conclusion, ces travaux nous ont permis d'observer la mise en place d'un phénomène rapide et massif de dégradation de plusieurs milliers d'ARN messagers suite à un stress thermique. Ce mécanisme de déstabilisation rapide implique la fonction de la protéine XRN4 et se met en place à la fois au niveau du cytoplasme mais aussi directement au niveau des polysomes. Nos résultats montrent que la dégradation co-traductionnelle se met en place suite à un ralentissement des ribosomes et mettent en exergue un nouveau niveau de régulation face au stress chez les plantes, où le ribosome jouerait un rôle central dans le devenir d'un ARN messenger.

C- Rôle du stockage des ARN messagers pour la reprise de la traduction après un événement de stress thermique (Postdoctorat n°2 ABRC, Taïwan)

Contexte

Lors de mon second postdoctorat réalisé dans l'équipe du Dr. YY. Charng à Taïwan (ABRC, Academia Sinica), je me suis intéressé au rôle d'HSP101, une protéine chaperonne de réponse au stress, dans les mécanismes de récupération après un stress thermique. Son homologue, Hsp104p chez la levure, est impliqué dans la dissociation des granules de stress après un stress thermique pour permettre une reprise rapide de la traduction. Néanmoins, les ARN messagers stockés et replacés en traduction après le stress n'avaient pas été identifiés. Dans cette optique, nous avons cherché dans un 1^{er} temps à savoir si HSP101 était impliquée dans les mêmes fonctions qu'Hsp104p et dans un 2nd temps à identifier les transcrits stockés au cours du stress et leur rôle dans la reprise de la traduction.

Résultats

Afin de mettre en évidence le rôle d'HSP101 dans la reprise de traduction, une analyse de profil de polysomes a été menée en condition normale (22°C), après 1h de stress thermique à 37°C et après 2h de récupération à 22°C en utilisant la lignée sauvage Col0 ainsi que la lignée mutant nulle *hsp101*. Que ce soit à 22°C ou après 1h à 37°C, aucune différence significative n'est observée au niveau du profil des polysomes entre Col0 et *hsp101*. En revanche, après 2h de récupération, l'accumulation des polysomes est significativement plus faible dans le mutant *hsp101* comparé à Col0. Cette différence apparaît également au niveau des granules de stress. En utilisant une lignée rapportrice pour les granules de stress (GFP-PABP2) introgressée dans un fond Col0 ou *hsp101*, nous montrons que la dissociation des granules de stress est plus lente dans un mutant *hsp101*. Ces résultats coïncident avec les données publiées chez la levure pour le mutant *hsp104* (Cherkasov *et al.*, 2013). Pour comprendre le rôle des ARN messagers stockés au cours du stress dans la reprise de traduction, nous avons alors cherché à les identifier par des approches de séquençage. Une approche de RNAseq a donc été entreprise sur les deux génotypes en condition normale (22°C), après 1h de stress thermique à 37°C et après 2h de récupération à 22°C à la fois sur des ARN totaux et des ARN polysomiaux. Par analyse bioinformatique, nous avons ainsi pu identifier les ARN messagers retirés de la traduction et stockés au cours du stress puis identifier ceux repartant en traduction au cours de la récupération. Une analyse GO a permis de mettre en évidence que les transcrits codant les protéines ribosomales étaient préférentiellement stockés au cours du stress et rapidement remis en traduction lors de la récupération de manière HSP101-dépendante.

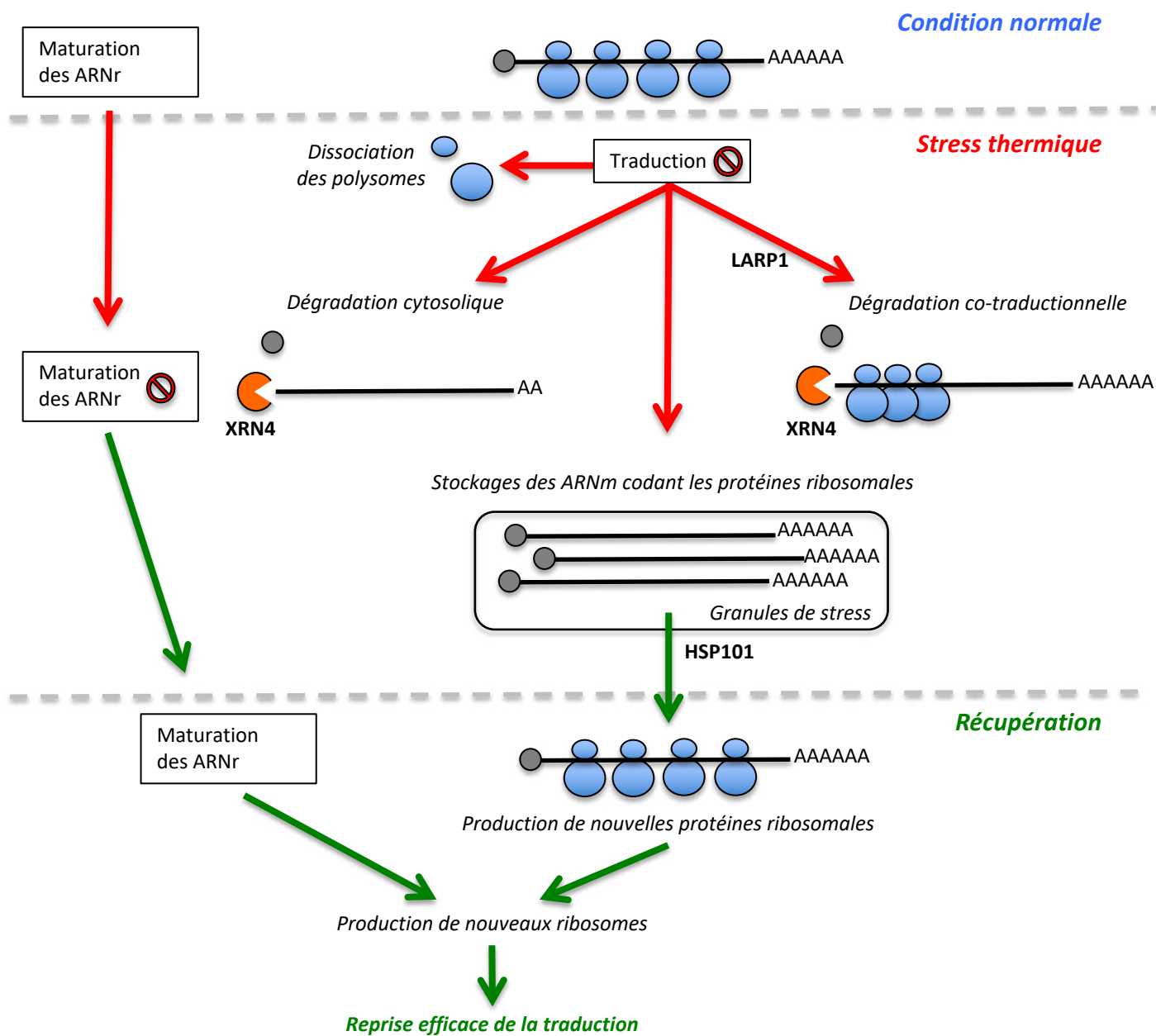


Figure 5 : Schéma récapitulatif des travaux présentés. Suite à une inhibition de traduction induite par le stress thermique et une dissociation des polysomes, des voies de dégradation cytosolique et co-traductionnelle se mettent en place catalysée par l'exoribonucléase XRN4. Ces voies affectent environ 4500 transcrits codant des gènes de ménage. En parallèle à cette dégradation active, un stockage de transcrits codant les protéines ribosomales se met en place dans les granules de stress. Le stress thermique est aussi connu pour bloquer la maturation des ARN ribosomiques (ARNr). Nous proposons alors qu'en récupération la traduction des protéines ribosomales ainsi que la maturation des ARNr sont un moyen efficace de synchroniser la biogénèse de nouveaux ribosomes et de permettre une reprise efficace de la traduction après l'événement de stress. Compilation des données issues de Merret *et al.*, 2013; 2015 et 2017.

D- Conclusion et modèle de travail

L'ensemble des trois travaux présentés a permis de démontrer l'importance de la régulation post-transcriptionnelle des ARN messagers en réponse au stress thermique chez *Arabidopsis* (Figure 5). Nous démontrons notamment qu'une voie active de dégradation des ARN messagers est mise en place sur des transcrits codants des fonctions de ménage. Cette dégradation catalysée par XRN4 est déclenchée soit dans le cytoplasme soit au niveau des polysomes après un ralentissement des ribosomes. En parallèle à de cette dégradation active, les ARN messagers codant les protéines ribosomales sont stockés dans des granules de stress. Au cours de la récupération, leur libération est facilitée par la chaperonne HSP101. Nous proposons que ce stockage soit un moyen rapide de relancer la production de ribosomes au moment de la récupération pour faciliter la reprise de la traduction.

Néanmoins, certaines questions subsistent et font partie de mes projets de recherche actuels. Les mécanismes régulant la dégradation co-traductionnelle sont encore mal connus. Il apparaît que la dégradation co-traductionnelle soit intimement liée à la traduction mais les mécanismes gouvernant ce lien sont à l'heure actuelle peu documentés. Dans mon 1^{er} projet, je propose d'analyser finement les déterminants en *cis* et en *trans* qui gouvernent cette voie. Dans mon 2^{ème} projet, je cherche à mieux comprendre comment les ARN messagers codant les protéines ribosomales sont co-régulés et adressés aux granules de stress notamment *via* l'étude de la fonction de la protéine LARP1 dans le contrôle de leur traduction.

IV-5- Caractérisation d'ECT2 comme lecteur de méthylation m⁶A chez *Arabidopsis thaliana* (CR CNRS 2015-présent)

Contexte

Ce travail fait partie intégrante de la thèse de Jérémie Scutenaire que j'ai co-encadré (Soutenu le 14 décembre 2017). Lors de l'étude la fonction de la protéine LARP1 initiée dans l'équipe, un crible double hybride avait été réalisé. Il a permis de mettre en évidence une interaction entre LARP1 et la protéine ECT2. Les protéines ECT partagent un domaine YTH, fixant la modification m⁶A des ARN messagers (Berlivet et al., 2019 pour revue). Cette modification joue un rôle crucial dans la reproduction, la croissance ou encore le développement en contrôlant l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (Berlivet et al., 2019 pour revue). Comme nous avons mis en évidence le rôle de la protéine LARP1 dans le mécanisme d'HSMD (Merret et al., 2013b), nous avons supposé que les marques de méthylation m⁶A pouvaient être un dénominateur commun permettant la reconnaissance des transcrits à dégrader. Néanmoins, il existait peu de travaux sur ces protéines chez Arabidopsis. La thèse de Jérémie a donc consisté à caractériser et analyser la fonction d'ECT2 chez Arabidopsis thaliana (Scutenaire, 2017).

Résultats

Comme il existait peu de données sur ces protéines, la première partie du travail a consisté à réaliser une analyse évolutive. Elle a ainsi permis de mettre en évidence que 13 protéines à domaine YTH existent chez Arabidopsis et qu'elles se répartissent en 4 classes distinctes. Par la suite, nous avons cherché à déterminer la fonction d'ECT2. Des analyses *in vivo* ont permis de démontrer qu'ECT2 est bien un lecteur de méthylation m⁶A et que son domaine YTH est requis pour sa fixation au motif. La localisation subcellulaire d'ECT2 a révélé que la protéine s'accumule dans des granules de stress suite à un choc thermique laissant suggérer un rôle dans le contrôle du devenir des ARN messagers. Enfin, une analyse phénotypique a permis de révéler l'implication d'ECT2 dans le développement des trichomes. En effet, le mutant *ect2* présente un défaut de branchement des trichomes laissant suggérer un lien avec le contrôle du cycle cellulaire. Néanmoins à ce jour, sa fonction claire dans ce processus n'est pas définie et reste en cours d'investigation.

Ce projet est actuellement financé par une ANR portée par Cécile et développé par d'autres membres du laboratoire.

V- Projets de recherche actuels

Le projet de recherche que je souhaite développer s'articule en 2 parties :

- (i) Analyse de l'interconnexion entre la traduction et la dégradation des ARN messagers au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*. Cette partie s'appuie largement sur nos résultats obtenus sur le rôle de la dégradation co-translationnelle en réponse au stress thermique (Merret *et al.*, 2015). C'est un projet en phase d'exploitation, pour lequel des données préliminaires sont déjà disponibles. Ces données préliminaires ont pu être obtenues grâce à un financement (15K€) du Labex TULIP et font l'objet d'une lettre d'intention ANR2019 JCJC (ANR Intertwined) en cours d'évaluation.

- (ii) Rôle de la protéine LARP1 dans le contrôle de la traduction. Cette partie s'appuie sur les compétences de l'équipe dans l'analyse des protéines LARP et sur les résultats obtenus sur le stockage des ARN messagers (Merret *et al.*, 2017). C'est un projet en cours de développement par Cécile Bousquet-Antonelli et moi-même avec l'aide d'un étudiant en Master 2, Vichet BE, actuellement en stage dans l'équipe. Ce projet fait aussi partie d'un plus vaste projet dont une lettre d'intention ANR2019 a été déposée (Projet ANR PRCE Atractor) coordonné par Christian Meyer (IJPB Versailles), partenaires : Cécile Bousquet-Antonelli (LGDP Perpignan) ; Lyubov Ryabova (IBMP Strasbourg) ; Christophe Robaglia (LGBP Marseille).

V-1- Analyse de l'interconnexion entre la traduction et la dégradation des ARN messagers au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana* (Projet n°1)

Contexte :

Tout au long de sa vie, un ARN messager est en perpétuelle balance entre traduction, stockage et dégradation. Néanmoins, nos connaissances actuelles sur les mécanismes gouvernant cet équilibre sont limitées chez les organismes multicellulaires, spécifiquement au cours du développement. L'objectif de ce projet est donc de mieux comprendre comment cet équilibre est régulé au cours du développement afin de maintenir une expression fine et précise des gènes. Pour répondre à cet objectif, le projet propose d'analyser le rôle de la dégradation co-traductionnelle dans cet équilibre. Cette voie de dégradation a été initialement décrite chez la levure à l'aide de gènes rapporteurs (Hu et al., 2009) puis son effet massif sur le transcriptome a ensuite été décrit chez la levure et chez Arabidopsis (Pelachano et al., 2015 ; Yu et al., 2016). Ce mécanisme est catalysé par le même exoribonucléase (XRN1/XRN4) chez les deux organismes (Pelachano et al., 2015 ; Yu et al., 2016). La conservation de cette voie suggère qu'elle joue un rôle biologique important mais dont les fonctions claires ne sont à l'heure actuelle pas documentées. L'hypothèse serait que cette voie de dégradation puisque couplée à la traduction pourrait servir de rhéostat pour contrôler finement la production de protéines soit au cours de phases développementales clés soit en réponse à des contraintes biotiques ou abiotiques. Le but de ce projet est donc de comprendre le rôle de la dégradation co-traductionnelle dans l'homéostasie de la traduction en utilisant le développement de l'arabette comme modèle d'étude.

En combinant des approches de séquençage massif et de modélisation, je propose d'analyser les mécanismes qui gouvernent la dégradation co-traductionnelle et de quelle manière ce mécanisme contribue à la régulation de la traduction au cours du développement et à sa reprogrammation en réponse à des signaux développementaux. Pour atteindre ces objectifs, plusieurs questions seront adressées :

- **Quelle est la dynamique de la dégradation co-traductionnelle au cours du développement ?***
- **Quels sont les composants clés qui gouvernent la dégradation co-traductionnelle au cours du développement ?***
- **Dans quelle mesure la modulation de la dégradation co-traductionnelle peut-elle impacter l'efficacité de traduction des transcrits ?***

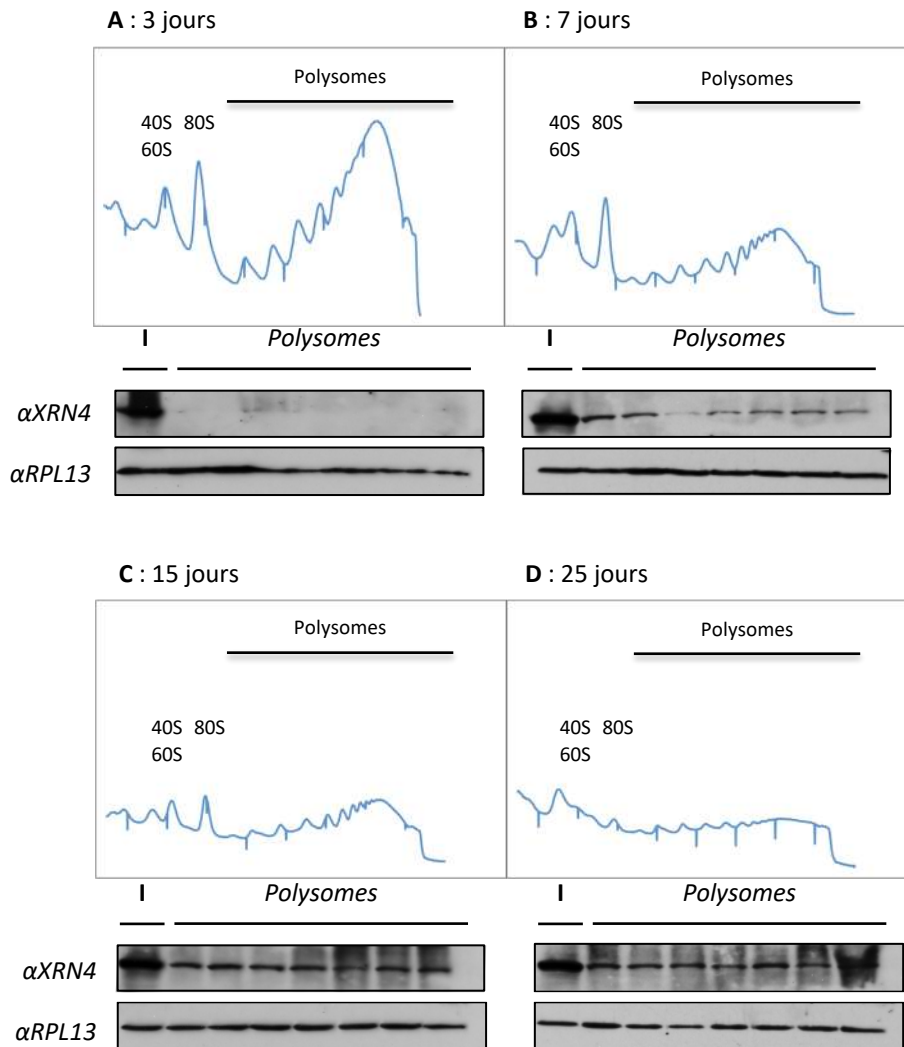


Figure 6 : Analyse de l'accumulation d'XRN4 au niveau des polysomes au cours de développement de la plantule. Analyse du profil des polysomes sur gradient de saccharose au stades 3 jours (A), 7 jours (B), 15 jours (C) et 25 jours (D). L'accumulation d'XRN4 a été analysée par western blot après fractionnement. L'anticorps anti-RPL13 est utilisé comme contrôle de charge des polysomes. Le même équivalent biomasse (200 mg) a été utilisé pour chaque condition. I : Input.

Afin d'analyser la dynamique de la dégradation co-translationnelle, il est nécessaire de pouvoir déterminer précisément le dégradome, c'est-à-dire de capturer de manière globale les intermédiaires de dégradation 5'monophosphate d'Arabidopsis. Plusieurs techniques permettent la capture de ces intermédiaires comme le 5'PSeq (Pelechano *et al.*, 2015), le PARE (Parallel Analysis of RNA Ends, Germann *et al.*, 2009) ou encore le GMUCT (Genome-Wide Mapping of Uncapped Transcripts, Willmann *et al.*, 2014). Ces différentes études ont révélé que bien que la distribution des intermédiaires de dégradation 5'P soit aléatoire sur les 5' et 3'UTR, cette distribution suit une périodicité de 3 nucléotides dans les régions codantes ainsi qu'une accumulation à 17 nucléotides avant le codon stop (Figure 3). Cette distribution s'explique par la protection des fragments par le ribosome, l'exoribonucléase XRN1/XRN4 suit le déplacement du ribosome codon par codon jusqu'à atteindre le codon stop (Figure 3). L'accumulation de fragments 17 nucléotides avant ce codon correspond exactement à la position du ribosome sur le codon placé sur le site A (Figure 3). L'étape de terminaison de traduction étant une étape plus lente que l'élongation, l'accumulation de ces reads est alors observable. Ainsi, ces approches de dégradome permettent de révéler la dynamique des ribosomes et notamment des pauses à des codons spécifiques.

A l'inverse des autres techniques, le GMUCT permet une capture rapide et peu coûteuse des intermédiaires de dégradation. Brièvement, après extraction d'ARN total, les ARNm polyadénylés décappés sont liés à un adaptateur ARN en extrémité 5'. Les ARNm sont alors reverse-transcrits à l'aide d'un hexanucléotide fusionné à un adaptateur 3'. Une amplification est alors réalisée à l'aide d'oligonucléotides ancrés sur les adaptateurs 5' et 3'. Les banques ainsi obtenues sont alors séquencées depuis l'extrémité 5'. En 2018, j'ai obtenu un financement du Labex TULIP afin de mettre au point la technique au laboratoire et de l'appliquer à l'étude de la dégradation co-translationnelle au cours du développement (XRNDEV, 15k€, PI).

A- Analyse de la dynamique de la dégradation co-translationnelle au cours du développement

Afin de déterminer les stades développementaux à analyser, l'accumulation d'XRN4 au niveau des polysomes a été déterminée par gradient de saccharose (Figure 6). Les analyses ont permis de montrer qu'aux stades plantules, l'accumulation d'XRN4 est fortement dynamique laissant suggérer que l'activité de dégradation co-translationnelle l'est tout autant. A 3 jours, XRN4 est majoritairement exclue des polysomes alors que le niveau des polysomes est très important. Et inversement, au stade 25 jours, XRN4 est majoritairement accumulée dans les polysomes alors que la quantité de polysomes est faible. Il semblerait donc qu'au cours du développement, il y ait une corrélation négative entre activité de dégradation co-translationnelle et activité translationnelle. Nous avons donc décidé de focaliser notre analyse sur ces stades (3 jours, 7 jours, 15 jours et 25 jours)

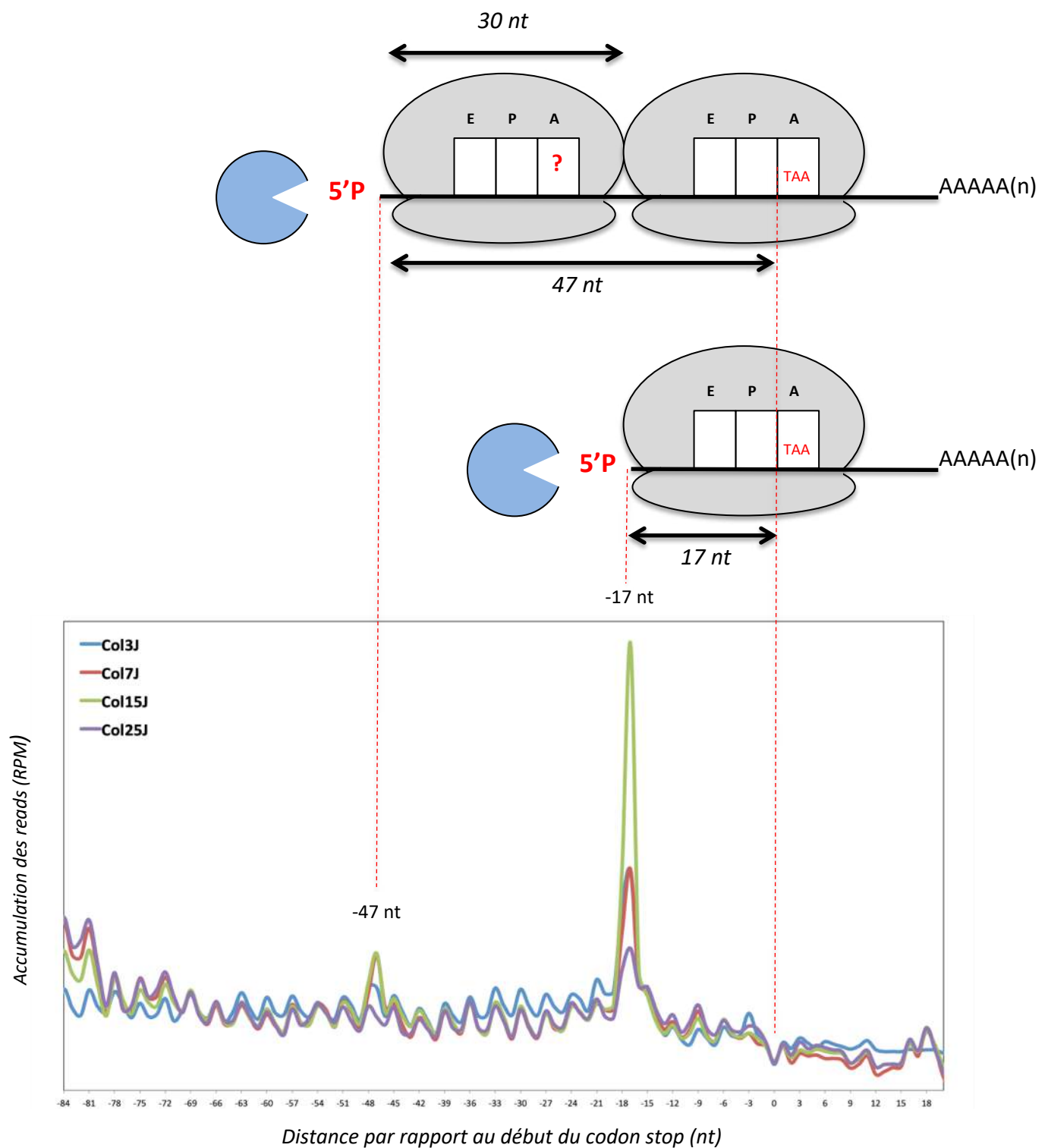


Figure 7 : Accumulation des intermédiaires de dégradation 5'P autour du codon stop selon le stade développemental. Un pic d'accumulation 17 nt en aval du codon stop est observé ainsi qu'un second pic à 47 nt. Chaque tracé est issu de deux répétitions biologiques. Une illustration des deux types d'accumulation possibles est représentée. Stade 3 jours : tracé bleu. Stade 7 jours : tracé rouge. Stade 15 jours : tracé vert. Stade 25 jours : tracé mauve.

afin d'étudier la dynamique de la dégradation co-translationnelle.

L'approche GMUCT a été initiée sur ces quatre stades. Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer l'accumulation des intermédiaires de dégradation 17 nucléotides avant le codon stop. Quelque soit le stade analysé, le pic d'accumulation est détecté (Figure 7). Néanmoins, son amplitude varie selon les stades développementaux. L'amplitude maximale est détectée au stade 15 jours. Cette première analyse nous conforte dans l'idée que la dégradation co-translationnelle est dynamique au cours du développement. Nous sommes actuellement en train d'identifier pour chaque stade développemental les transcrits ciblés par cette dégradation et de suivre la dynamique de leur dégradation.

B- Analyse des déterminants *cis* et *trans* gouvernant la dégradation co-translationnelle au cours du développement

Dans cette partie du projet, deux axes seront développés. Il s'agira d'une part de déterminer le rôle de l'optimalité des codons dans la régulation de la dégradation co-translationnelle et d'autre part d'étudier la régulation de la machinerie de dégradation co-translationnelle au cours du développement.

*a) Rôle de l'optimalité des codons dans la modulation de la dégradation co-translationnelle = déterminant *cis**

Les mécanismes couplant la traduction et la dégradation restent peu compris à ce jour. Des données récentes chez la levure suggèrent que l'optimalité des codons pourrait gouverner la demi-vie des ARN messagers (Presnyak *et al.*, 2015). Le terme « optimalité des codons » décrit l'efficacité de décodage des différents codons et dépend notamment de la disponibilité du ou des ARNt correspondants. Des codons optimaux vont favoriser l'élongation du ribosome et permettre une traduction active alors que des codons non-optimaux vont ralentir l'élongation du ribosome et induire la dégradation du transcrit. Ces résultats indiquent que l'optimalité des codons, en influant sur la vitesse de traduction, gouverne la durée de vie des ARN messagers. Ainsi l'optimalité des codons pourrait représenter un mécanisme général agissant simultanément sur la stabilité des ARN messagers et leur taux de traduction pour réguler finalement l'expression des gènes. L'optimalité des codons a maintenant été mise en évidence chez un grand nombre d'organismes tels que la drosophile, le poisson-zèbre ou encore la souris (Burrow *et al.*, 2018 ; Mishima and Tomari, 2016 ; Bazzini *et al.*, 2016). Néanmoins, son existence chez la plante reste encore à documenter. De plus, la régulation moléculaire de ce mécanisme et son évolution au cours du développement d'un organisme restent inconnues.

L'objectif ici est de déterminer dans quelle mesure l'optimalité des codons est régulée au cours du développement et quel impact cela peut avoir sur l'efficacité de traduction et la dégradation co-traductionnelle. Comme l'approche GMUCT permet de mettre en évidence des ralentissements des ribosomes, il s'agira de chercher dans quelle mesure des pauses à des codons spécifiques apparaissent au cours du développement. L'analyse de l'accumulation des intermédiaires de dégradation a pour le moment permis de mettre en évidence un deuxième pic d'accumulation 47 nucléotides avant le codon stop pour les stades 7 jours et 15 jours (Figure 7). La distance entre les deux pics est d'exactement de 30 nucléotides, ce qui correspond à l'encombrement d'un ribosome. Ce résultat laisse donc suggérer un ralentissement de l'élongation à une position encore non définie qui induit une accumulation d'intermédiaires de dégradation présentant deux ribosomes. Une recherche bioinformatique d'accumulation d'intermédiaires de dégradation 17 nucléotides avant chaque codon est en cours afin de savoir si ce second pic est associé à une pause sur un ou plusieurs codons spécifiques.

L'optimalité d'un codon dépend de la disponibilité des ARNt qui peuvent le reconnaître. Ainsi un moyen efficace de réguler l'optimalité des codons est de jouer sur l'abondance des ARNt. En pratique, le nombre de copies de gènes codant des ARNt est encore utilisé pour approximer leur abondance, cependant cet indicateur ne reflète pas la réelle disponibilité des ARNt engagés dans les polysomes. Afin de pallier cette approximation, il s'agira ici de déterminer la dynamique du pool de ARNt engagés dans les polysomes au cours du développement et de le corréler à l'efficacité de traduction des transcrits. La stratégie expérimentale repose sur l'utilisation du Ribo-tRNAseq, technique récemment développée chez la levure (Chen and Tanaka, 2018). Cette approche permet simultanément de déterminer la répartition des ribosomes le long des transcrits et la nature et la quantité des ARNt associés. Elle fournira ainsi un moyen efficace d'analyser l'évolution du pool de ARNt associé aux ribosomes au cours du développement et permettra de déterminer si des pauses de ribosomes à des codons spécifiques sont associées à certains déficits en ARNt. Cette analyse détaillée permettra ainsi de corréler efficacité de traduction, dégradation co-traductionnelle et disponibilité en ARNt.

b) Régulation de la machinerie de dégradation co-traductionnelle au cours du développement = déterminant trans

Un autre moyen de réguler la dégradation co-traductionnelle au cours du développement repose sur le contrôle de la disponibilité et l'activité des acteurs protéiques impliqués dans ce processus. Bien que la dégradation co-traductionnelle soit maintenant documentée chez plusieurs organismes, peu de facteurs impliqués dans ce processus ont été identifiés et rien n'est connu sur leur régulation au cours du développement. Nous savons d'ores-et-déjà que l'association d'XRN4

aux polysomes est fortement régulée au cours du développement de la plantule (Figure 6). Parmi les acteurs déjà identifiés, une DEAD-Box protéine, Dhh1p, a récemment été montrée comme un facteur clé reliant l'optimalité des codons à la dégradation des transcrits chez la levure (Radhakrishnan *et al.*, 2016). Il existe chez Arabidopsis, trois homologues à cette protéine (DHH1, DHH2 et DHH3). Il s'agira ici de déterminer si les profils d'accumulation de ces protéines dans les polysomes suivent celui d'XRN4 afin de déterminer si une ou plusieurs DHH pourraient être impliquées dans la modulation du mécanisme de dégradation co-traductionnelle. S'il s'avère que cela est le cas, une nouvelle approche de GMUCT sera réalisée sur la lignée mutante *dhh* correspondante. L'autre candidat à tester est DCP1. DCP1 est un cofacteur de decapping dont l'activité est régulée par phosphorylation (Xu and Chua, 2012). Nous disposons au laboratoire d'un anticorps capable de reconnaître les formes phosphorylées et non phosphorylées de DCP1. La régulation de DCP1 pourra alors être testée dans les polysomes au cours du développement. Par la suite, l'étude sera élargie à d'autres acteurs possibles de la dégradation des ARNm comme les protéines PAT1 ou encore LSM. D'autres candidats intéressants sont les RNase impliquées dans le clivage des ARNt. Chez la levure, il a été suggéré que RNY1, une RNase de type T2 était impliquée dans des pauses de ribosomes à des codons spécifiques (Pelechano *et al.*, 2015). La production de tRF (fragments dérivés d'ARNt) pourrait être un autre moyen de réguler la dégradation co-traductionnelle comme suggéré chez la levure. En effet, les tRF sont connus pour réguler la traduction (Lalande *et al.*, in prep ; Megel *et al.*, 2015 pour revue). Néanmoins, leur rôle précis à ce jour reste méconnu.

C- Contribution de la dégradation co-traductionnelle dans l'efficacité de la traduction

Il est maintenant admis que la dégradation co-traductionnelle fait partie intégrante des mécanismes qui peuvent contrôler l'efficacité de traduction d'un transcrit. Néanmoins, les calculs d'efficacité de traduction ne prennent pas en compte que dans les polysomes, un transcrit peut aussi subir de la dégradation. L'objectif de cette partie consiste à développer une approche mathématique de modélisation pour prendre en compte la part de la dégradation co-traductionnelle dans l'efficacité de traduction. Cette approche nécessite des compétences en modélisation et en biologie théorique, c'est pourquoi j'ai développé une collaboration avec l'équipe de Biologie Théorique dirigée par Sébastien Gourbière au laboratoire afin de développer ce projet. Il s'agira de développer un modèle mathématique basé sur des équations différentielles afin de tester l'impact de la dégradation co-traductionnelle dans l'efficacité traductionnelle. Il s'agira de simuler des variations de taux de dégradation et tester leurs impacts sur l'efficacité de traduction des transcrits. Le modèle pourra être par la suite complexifié pour tester l'implication du pool d'ARNt sur ces variations.

In fine, ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la régulation de la dégradation co-translationnelle ainsi que son implication dans la régulation de la traduction. Il apportera des éléments clés pour comprendre comment l'interconnexion entre traduction et dégradation des ARN messagers est régulée au cours du développement pour maintenir une expression fine des gènes. Au-delà, il permettra aussi d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement d'Arabidopsis et/ou de déterminer une couche supplémentaire dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement. Ces éléments pourront alors être appliqués à d'autres conditions où cette interconnexion est importante comme la réponse au stress.

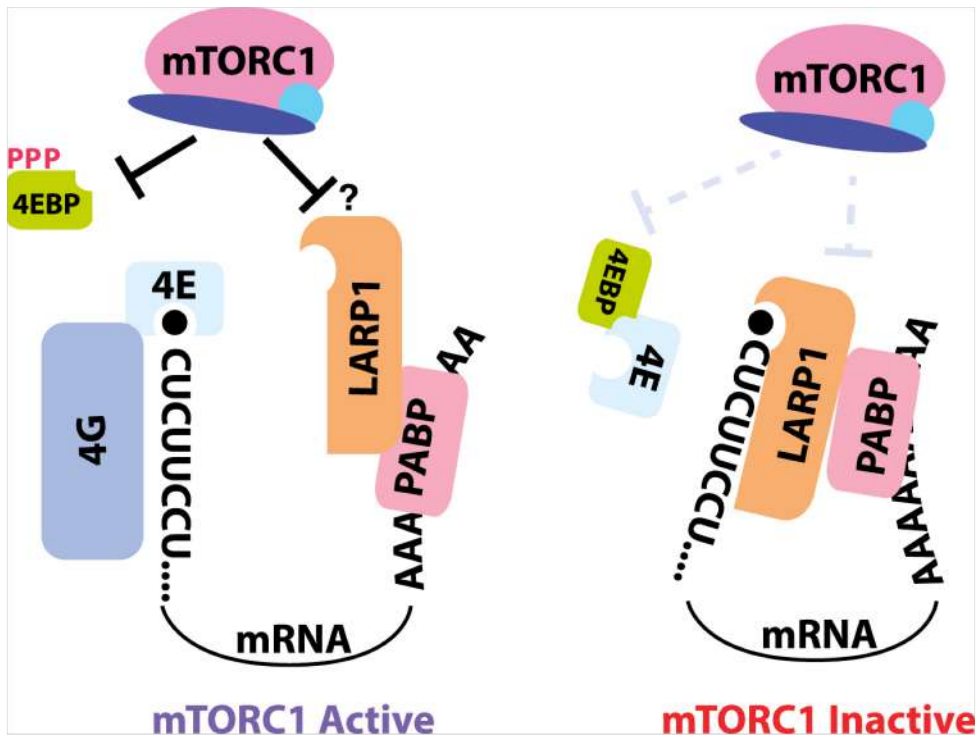


Figure 8 : Modèle proposé pour l'action de la protéine LARP1 sur le contrôle de la traduction des ARN messagers 5'TOP (issu de Philippe *et al.*, 2018). Lorsque le complexe mTORC1 est inactif, la forme non phosphorylée de LARP1 est capable de se fixer à la coiffe et aux séquences 5'TOP. LARP1 rentre alors en compétition avec le facteur d'initiation eiF4E pour réprimer la traduction de ces transcrits.

V-2- Rôle de la protéine LARP1 d'Arabidopsis dans le contrôle de la traduction (Projet n°2)

Contexte :

Les protéines à motif LA constituent une grande famille eucaryote de protéines de liaison à l'ARN qui selon la sous-famille dans laquelle elles se classent interviennent dans la biologie des ARN codants ou non codants. Les travaux que nous avons effectués depuis ces dernières années nous ont permis de mettre en évidence que certaines des protéines à motifs LA d'Arabidopsis interviennent dans le contrôle du métabolisme des ARNm (Merret et al., 2013a ; Merret et al., 2013b). La sous-famille LARP1 a été étudiée chez de nombreux organismes comme le ver, la drosophile, l'homme ou encore la souris. Les données publiées suggèrent qu'elles sont impliquées dans des mécanismes de contrôle de la stabilité et/ou de la traduction d'ARNm influençant selon les organismes la méiose mâle (Blagden et al., 2009 ; Ichihara et al., 2007), l'oogenèse et la détermination sexuelle (Nykamp et al., 2008 ; Zanetti et al., 2012 ; Zanin et al., 2010), la mitose (Burrows et al., 2010 ; Blagden et al. 2009), la survie et la migration cellulaire (Burrows et al., 2010). Néanmoins, sa fonction moléculaire dans le contrôle de la traduction reste encore très débattue. Le modèle actuel serait que la protéine LARP1 pourrait être à la fois un activateur ou un répresseur de traduction en fonction des conditions et de son statut de phosphorylation (Figure 7). Chez les mammifères, il apparaît que LARP1 peut être phosphorylée par le complexe kinase mTORC1 (Hong et al., 2017). En condition phosphorylée, LARP1 jouerait un rôle d'activateur de traduction. A l'inverse, en condition non phosphorylée, LARP1 jouerait un rôle d'inhibiteur de traduction. Il apparaît que cette protéine régule préférentiellement des transcrits présentant en leur extrémité 5' une séquence TOP (pour terminal oligopyrimidine sequence) présente sur les transcrits codant la machinerie de traduction (protéines ribosomales et facteurs d'initiation). En condition non phosphorylée, la protéine LARP1 se fixe via son domaine DM15 sur cette séquence TOP mais aussi au m7Gppp pour rentrer en compétition avec le facteur d'initiation eIF4E et ainsi inhiber la traduction de ces transcrits (Figure 7). Néanmoins, la présence de formes phosphorylées et non-phosphorylées rend difficile les analyses et les interprétations.

Chez Arabidopsis, peu d'informations existent sur la protéine LARP1. Ce projet vise à mieux comprendre le rôle de LARP1 dans le contrôle de la traduction et son lien avec le complexe mTORC1 chez Arabidopsis. Il s'agira ici de déterminer si LARP1 peut être phosphorylée chez Arabidopsis et quelles sont ses cibles directes. Ce sujet est actuellement en cours de développement par un étudiant en Master 2 que je co-encadre avec Cécile Bousquet-Antonelli.

Résultats et approches choisies

Chez les mammifères, il est suggéré que la protéine LARP1 régule la traduction des transcrits codant la machinerie de traduction *via* la reconnaissance du motif 5'TOP. Chez *Arabidopsis*, aucun motif 5'TOP n'a été caractérisé. Uniquement la présence de motifs « 5'TOP-like » a été suggérée (Dobrenel *et al.*, 2016). Nous pouvons donc se demander par quel mécanisme, LARP1 chez *Arabidopsis* régule ces transcrits. Nous avons dans un premier temps initié une collaboration avec Maria Conte (King College, London) spécialiste dans la structure des protéines LARP. Des analyses *in vitro* nous ont permis de montrer que le domaine DM15 de la protéine LARP1 d'*Arabidopsis* est capable de se fixer au m7Gppp mais aussi à une séquence 5'TOP de type mammifère. En revanche, aucune interaction n'a été identifiée avec une séquence 5'TOP-like. La caractéristique des séquences 5'TOP est de systématiquement débiter par une cytosine (C) immédiatement après la coiffe suivie d'une séquence riche en pyrimidine. La présence d'un C en +1 de transcription pourrait être alors le déterminant commun permettant la fixation de LARP1 à ces transcrits et non la séquence 5'TOP en tant que telle. Une caractérisation précise des sites d'initiation de transcription est donc nécessaire. Nous avons entrepris une approche « genome-wide » basée sur le séquençage de cDNA pleines longueurs afin d'identifier précisément les +1 de transcription des transcrits d'*Arabidopsis*. En parallèle, une approche de RIPseq (RNA ImmunoPrecipitation Sequencing) à l'aide d'une lignée GFP-LARP1 est aussi en cours afin de déterminer les cibles directes de la protéine LARP1. *In fine*, les données de ces deux approches seront croisées afin de déterminer s'il existe un dénominateur commun entre les cibles ARN de LARP1 et les sites d'initiation de transcription. Elles permettront de mieux comprendre comment LARP1 contrôle la traduction de ses cibles chez *Arabidopsis*.

En parallèle à ces approches « genome-wide », nous développons actuellement des tests de phosphorylation de LARP1 en modulant l'activité du complexe mTORC1 *in planta* *via* l'utilisation d'un inhibiteur chimique (Dobrenel *et al.*, 2016). Si le rôle du complexe mTORC1 dans la phosphorylation de LARP1 est confirmé, de nouvelles approches de RIP seront menées afin de déterminer le rôle de la phosphorylation dans sa fixation aux cibles ARN.

Enfin, ces données seront transposées au stress thermique. En effet, nous avons démontré que les ARN messagers codant les protéines ribosomes sont stockés pour la grande majorité d'entre eux dans les granules de stress (Merret *et al.*, 2017) laissant suggérer un mécanisme de co-régulation. Par ailleurs, la protéine LARP1 est relocalisée dans ces granules en condition de stress (Merret *et al.*, 2013). Nous explorerons alors l'hypothèse que la protéine LARP1 puisse participer à l'adressage de ces ARN messagers aux granules de stress.

VI- Autre activité liée à la recherche

Depuis Octobre 2017, l'université de Perpignan *via* sa plateforme Bio-Environnement a fait l'acquisition de deux séquenceurs à haut débit (un MiSeq et un NexSeq 550). Cette acquisition a permis l'ouverture en Janvier 2018 d'un plateau génomique offrant des prestations de séquençages à haut débit aux laboratoires du site mais aussi à des laboratoires extérieurs.

Depuis son ouverture, je suis co-responsable de cette plateforme avec ma collègue Eve Toulza (MCF, IHPE, Perpignan). Nous encadrons une équipe de deux techniciens en charge de la préparation des échantillons et du séquençage. En 2018, nous avons réalisé plus de 40 projets issus de demandes internes et externes. Le plateau propose aujourd'hui des prestations de type RNAseq, DNAseq, CHIPseq ou encore de Metabarcoding. Le plateau est aussi ouvert au développement de nouvelles approches en lien avec les problématiques scientifiques des laboratoires du site.

VII- Bibliographie

Arribere *et al.*, (2011). Reconsidering movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and P bodies. *Molecular Cell*, 44, 745-758.

Bazzini *et al.*, (2016). Codon identity regulated mRNA stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition. *EMBO Journal*, 35, 2087-2103.

Berlivet *et al.*, (2019). Readers of the m6A epitranscriptomic code. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, in press.

Blagden *et al.*, (2009). Drosophila Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. *Developmental Biology*, 334, 186-197.

Blewett *et al.* (2011). A quantitative assay for measuring mRNA decapping by splinted ligation reverse transcription polymerase chain reaction: qSL-RT-PCR. *RNA*, 17, 535-543.

Brook and Gray (2012). The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover. *Biochemical Society transactions*, 40, 856-864.

Burow *et al.*, (2018). Attenuated Codon Optimality Contributes to Neural-Specific mRNA decay in Drosophila. *Cell Reports*, 24, 1704-1712.

Burrows *et al.*, (2010). The RNA binding protein Larp1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic acids research* 38, 5542-5553.

Chen and Tanaka (2018). Genome-wide Translation Profiling by Ribosome-Bound tRNA Capture. *Cell Reports*, 23, 608-621.

Dobrenel *et al.*, (2016). The Arabidopsis TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1611.

Eulalio *et al.*, (2007a). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature Reviews Molecular Cell biology*, 8, 9-22.

Franks and Lykke-Andersen (2008). The control of mRNA decapping and P-body formation. *Molecular Cell*, 32, 605-615.

Garneau *et al.*, (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 113-126.

German *et al.*, (2011). Construction of Parallel Analysis of RNA Ends (PARE) libraries for the study of cleaved miRNA targets and the RNA degradome. *Nature Protocol*, 4, 356-362.

Goeres *et al.*, (2007). Components of the Arabidopsis mRNA decapping complex are required for early seedling development. *The Plant Cell*, 19, 1549-1564.

Gutierrez *et al.*, (2002). Identification of unstable transcripts in Arabidopsis by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 11513-11518.

Gutierrez-Beltran *et al.*, (2015). Tudor staphylococcal nuclease links formation of stress granules and processing bodies with mRNA catabolism in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27, 926-943.

- Gy et al., (2007).** Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *The Plant Cell*, 19, 3451-3461.
- Holcik and Sonenberg (2005).** Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell biology*, 6, 318-327.
- Hong et al., (2017).** LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *Elife*, 6: e25237
- Hu et al., (2009).** Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 461, 225-229.
- Hubstenberger et al., (2017).** P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Molecular Cell*, 68, 144-157.
- Ichihara et al., (2007).** A *Drosophila* orthologue of larp protein family is required for multiple processes in male meiosis. *Cell Structure and Function*, 32, 89-100.
- Iwasaki et al., (2007).** Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Letters*, 581, 2455- 2459.
- Lange and Gagliardi (2010).** The exosome and 3'-5' RNA degradation in plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 702, 50-62.
- Larkindale and Vierling (2008).** Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology*, 146 , 748-761.
- Liu et al., (2013).** Cotranslational response to proteotoxic stress by elongation pausing of ribosomes. *Molecular Cell*, 49, 453-463.
- Lykke-Andersen et al., (2011).** The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. *RNA biology*, 8, 61-66.
- Megel et al., (2015).** Surveillance and cleavage of eukaryotic tRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 1873-18793.
- Merret et al., (2010).** Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanics formalism. *BMC Biology*, 8, 18.
- Merret et al., (2013a).** The association of a La-module with the PABP-interacting motif PAM2 is a recurrent evolutionary process that led to the neofunctionalization of La-related proteins. *RNA*, 19, 36-50.
- Merret et al., (2013b).** XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell Reports*, 5, 1279-1293.
- Merret et al., (2015).** Heat-induced ribosome pausing triggers mRNA co-translational decay in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 43, 4121-4132.
- Mishima and Tomari (2016).** Codon usage and 3'UTR length determine maternal mRNA stability in zebrafish. *Molecular Cell*, 61, 874-885.
- Munoz and Castellano (2012).** Regulation of Translation Initiation under Abiotic Stress

Conditions in Plants: Is It a Conserved or Not so Conserved Process among Eukaryotes? *Comparative and functional genomics*, Article ID 406357.

Norbury (2013). Cytoplasmic RNA : a case of the tail wagging the dog. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 643-653.

Nykamp et al., (2008). C. elegans La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *RNA*, 14, 1378-1389

Parker (2012). RNA Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191, 671-702.

Parker and Sheth (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular Cell*, 25, 635-646.

Pelechano et al., (2015). Widespread co-translational RNA decay reveals ribosome dynamics. *Cell*, 161, 1400-1412.

Philippe et al., (2018). La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Research*, 46, 1457-1469.

Presnyak et al., (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, 160, 1111-1124.

Radhakrishnan et al., (2016). The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. *Cell*, 167, 122-132.

Rissland and Norbury (2009). Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16, 616-623.

Rymarquis et al., (2011). Evidence that XRN4, an Arabidopsis homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories. *RNA*. 17, 501-511.

Scutenaire (2017). Caractérisation fonctionnelle de la protéine ECT2 comme lecteur de la modification N6-méthyladénosine des ARN messagers chez la plante *Arabidopsis thaliana*. *Thèse de doctorat de l'université de Perpignan Via Domitia*.

Sement et al., (2013). Uridylation prevents 3' trimming of oligoadenylated mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 41, 7115-7127.

Shalgi et al., (2013). Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. *Molecular Cell*, 49, 439-435.

Sorenson and Baily-Serres (2014). Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 2373-2378.

Souret et al., (2004). AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular Cell*. 15, 173-183.

Standard and Weil (2018). P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. *Trends in Genetics*, 34, 612-626.

- Weber *et al.*, (2008).** Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *The Plant Journal*, 56, 517-530.
- Willmann *et al.*, (2014).** Improved genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts in eukaryotes—GMUCT2.0. *Methods*, 67, 64-73.
- Xu and Chua (2009).** Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *The Plant Cell*, 21, 3270-3279.
- Xu and Chua (2012).** Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *The EMBO Journal*, 31, 1975-1984.
- Xu *et al.* (2006).** Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *The Plant Cell*, 18, 3386-3398.
- Yu *et al.*, (2016).** Genome-Wide Mapping of Uncapped and Cleaved Transcripts Reveals a Role of the Nuclear mRNA Cap-binding Complex in Cotranslational RNA decay in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28, 2385-2397.
- Zakrzewska-Placzek *et al.*, (2010).** Arabidopsis thaliana XRN2 is required for primary cleavage in the pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 38, 4487-4502.
- Zanetti, *et al.*, (2012).** The sperm- oocyte switch in the *C. elegans* hermaphrodite is controlled through steady-state levels of the *fem-3* mRNA. *RNA*, 18, 1385-1394.
- Zanin *et al.*, (2010).** LARP-1 promotes oogenesis by repressing *fem-3* in the *C. elegans* germline. *Journal of cell science*, 123, 2717-2724.