

**Dynamique de la traduction de l'ARNm *ASH1*
chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Par Damiane DONATO

Département de Biochimie
Faculté de Médecine



Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Science en Biochimie

Avril, 2004



W

4

U58

2004

V. 103

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Dynamique de la traduction de l'ARNm *ASH1*
chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Présenté par :

Damiane DONATO

A été évalué par les personnes suivantes :

Dre Léa Brakier-Gingras
Présidente-rapporteure

Dr Pascal Chartrand
Directeur de recherche

Dr Luc DesGroseillers
Membre du jury

Résumé

La localisation de l'ARNm *ASH1* au bourgeon des levures lors de la fin de l'anaphase est essentielle pour la localisation de la protéine Ash1 au noyau de la cellule fille. Une fois dans le noyau, la protéine Ash1 va agir comme répresseur transcriptionnel de l'endonucléase Ho et ainsi réprimer le changement de type sexuel chez la cellule fille.

Ce processus dynamique requiert une bonne synchronisation entre la synthèse de l'ARNm, son transport à l'extrémité distale du bourgeon et sa traduction. Un défaut dans l'un de ces processus provoque une distribution symétrique de la protéine Ash1 dans la cellule mère et la cellule fille et conduit à une inhibition du changement de type sexuel chez les deux cellules.

L'ARNm *ASH1* contient quatre éléments de localisation : trois dans la séquence codante (E1, E2A et E2B) et un à cheval sur la fin de la séquence codante et le début de la région 3'UTR (E3). Il a été montré que ces éléments de localisation forment des structures secondaire complexes. Outre leur fonction dans la localisation de l'ARNm *ASH1*, ces éléments, de par leur position dans la séquence codante, pourraient influencer le taux de traduction de l'ARNm *ASH1* en ralentissant l'élongation des ribosomes. Si ces éléments de localisation sont mutés, la protéine Ash1 devrait être synthétisée plus rapidement.

Nous avons utilisé différents mutants du gène *ASH1*, ainsi qu'un gène sauvage *ASH1* contrôlés par un promoteur inductible pour suivre la cinétique d'apparition de la protéine Ash1, par buvardage de type *Western*. Les résultats obtenus nous montrent que la protéine Ash1 est produite plus rapidement lorsque tous les éléments de localisation sont mutés. Lorsqu'il y a seulement l'élément E1, nous observons un taux de traduction proche du type sauvage.

De récents résultats ont montré que la protéine Khd1 pourrait jouer un rôle en *trans* dans le contrôle de la traduction de l'ARNm *ASH1*. En utilisant un gène *ASH1* inductible au galactose dans une souche *KHD1Δ*, nous avons montré que la protéine Ash1 est produite plus rapidement et à un niveau plus élevé que dans une souche sauvage.

Ces résultats suggèrent que la position des éléments de localisation dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1* semble influencer le niveau de traduction de cet ARNm. De plus, des facteurs agissant en *trans* comme la protéine Khd1 pourraient également être impliqués dans le contrôle traductionnel de l'ARNm *ASH1*.

Mots clés : *ASH1*, localisation ARNm, traduction, cinétique, Ho, protéine Khd1.

Abstract

Dynamic of translation of the ASH1 mRNA in Saccharomyces cerevisiae.

The transport and localization of the *ASH1* mRNA at the bud tip of late-anaphase yeast cells are essential for the sorting of the Ash1 protein in the nucleus of the daughter cell. In the nucleus, the Ash1 protein represses the transcription of the *Ho* endonuclease, which is responsible for mating-type switching. This process requires a good synchronization between *ASH1* mRNA synthesis, its transport to the bud tip and its translation. A defect in one of these steps gives rise to a symmetrical distribution of Ash1p between the mother and the daughter cell.

The *ASH1* mRNA possesses four localization elements : three in the coding sequence (E1,E2A and E2B) and one between the end of the coding sequence and the beginning of the 3'UTR (E3). These localization elements have been shown to fold into complex secondary structures. Because of their location within the coding sequence, these localization elements may influence the rate of *ASH1* mRNA translation by slowing down the elongating ribosomes and may play a role in the translational control of this transcript. Indeed, previous results have shown that the transfert of the localization elements in the 3'UTR of the *ASH1* mRNA results in a decreased asymmetry of Ash1p. Therefore, we hypothesized that if these elements are mutated, Ash1p should be synthesized more rapidly.

We have generated an *ASH1* gene with mutated localization elements that maintain the coding frame of the protein. This mutant *ASH1* gene and the wild-type gene were inserted after the *GALI* promoter and we followed the kinetic of synthesis of Ash1p by Western Blotting after galactose induction. Our results show that Ash1p appears more rapidly when all the four localization elements are mutated. When there is only one localization element (E1), we observed a rate near the wild-type level.

Recent experiments have shown that a protein named Khd1p could play a role in trans to control *ASH1* mRNA translation. Using the galactose inducible *ASH1*

gene in a *KHDI*Δ strain, we found that Ash1p appeared more rapidly than in a wild-type strain.

The presence of the localization elements within the coding sequence of *ASH1* mRNA seems to be important to control the rate of translation of this transcript and contributes to the optimization of Ash1p asymmetric distribution. Moreover, trans-acting factors, like Khd1p, may also be involved in the translational control of the *ASH1* mRNA.

Key Words : *ASH1*, localization, mRNA, translation, kinetic, Ho, Khd1p.

Table des matières

RESUME.....	III
ABSTRACT	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XI
LISTE DES SYMBOLES.....	1
REMERCIEMENTS	2
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1. LA LOCALISATION D'ARNM :.....	2
1.1.1. <i>Rôles de la localisation d'ARNm</i> :	2
1.1.2. <i>Exemples d'ARNm localisés</i> :	3
1.2. MECANISMES DE CONTROLE TRADUCTIONNEL DES ARNm LOCALISES :	6
1.2.1. <i>Traduction</i> :	6
1.2.2. <i>Répression dépendante de la polyadénylation</i> :	7
1.2.3. <i>Répression avant initiation de la traduction</i> :	8
1.3. ARNm LOCALISES CHEZ LA LEVURE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> :	11
1.3.1. <i>Exemples d'ARNm localisés chez Saccharomyces cerevisiae</i> :	12
• <i>L'ARNm IST2</i> :	12
• <i>L'ARNm ASH1</i> :	12
• <i>AUTRES ARNm</i> :	13
1.4. LE CHANGEMENT DE TYPE SEXUEL CHEZ LA LEVURE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> : ROLE DE L'ARNM <i>ASH1</i> :	16
1.4.1. <i>Le changement de type sexuel</i> :	17
1.4.2. <i>Structure de l'ARNm ASH1</i> :	17
1.4.3. <i>Mécanisme de localisation de l'ARNm ASH1</i> :	20
1.5. REGULATION TRADUCTIONNELLE DE L'ARNM <i>ASH1</i> :	21
1.6. ROLE DE <i>KHD1P</i> :	27
1.7. CONTEXTE ET OBJECTIFS :	29
1.8. HYPOTHESES DE TRAVAIL :	29
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
2.1. SOUCHES DE LEVURES UTILISEES:	31
2.2. PLASMIDES UTILISES :	31
2.3. CLONAGE MOLECULAIRE :	33
2.4. TRANSFORMATION DE LEVURES :	33
2.5. CREATION D'UNE SOUCHE DELETÉE POUR LE GENE <i>KHD1</i> :	34
2.6. INDUCTION DES CONSTRUCTIONS :	36
2.7. GEL D'ELECTROPHORESE DE POLYACRYLAMIDE ET SDS ET IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN :	37

2.8.	EXTRACTION DES ARN TOTAUX :	38
2.9.	GEL ET HYBRIDATION DE TYPE NORTHERN :	39
2.9.1.	<i>Génération des sondes :</i>	39
2.9.2.	<i>Buvar dage de type Northern :</i>	39
2.10.	GRADIENT DE POLYSOMES :	40
3.	RÉSULTATS	42
3.1.	INFLUENCE DES ELEMENTS DE LOCALISATION SUR LA SYNTHÈSE DE LA PROTEINE ASH1 :	43
3.2.	INFLUENCE DE LA PROTEINE KHD1 SUR LA SYNTHÈSE DE LA PROTEINE ASH1 :	45
3.3.	NIVEAUX D'ARNm <i>ASH1</i> AVEC LES DIFFÉRENTS MUTANTS :	49
3.4.	GRADIENTS DE POLYSOMES :	50
4.	DISCUSSION	55
4.1.	ROLE DES ELEMENTS DE LOCALISATION DANS LA RÉGULATION DE LA TRADUCTION DE L'ARNm <i>ASH1</i> :	55
4.2.	ROLE DE LA PROTEINE KHD1 SUR LA TRADUCTION DE L'ARNm <i>ASH1</i> :	57
4.3.	MODELE DE RÉGULATION TRADUCTIONNELLE DE L'ARNm <i>ASH1</i> :	58
5.	PERSPECTIVES	62
6.	CONCLUSIONS	63
7.	LISTE DES RÉFÉRENCES	65

Liste des Figures

Figure 1 : Les différents rôles de la localisation des ARNm.	4
Figure 2 : Exemples d'ARNm localisés.	5
Figure 3 : Mécanismes de régulation traductionnelle des ARNm localisés.	10
Figure 4 : Localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>.	15
Figure 5 : Cycle cellulaire de la levure.	18
Figure 6 : L'ARNm <i>ASH1</i>.	19
Figure 7 : Modèle d'interaction du complexe de localisation.	23
Figure 8 : Modèle spatio-temporel de localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>.	24
Figure 9 : Influence des éléments de localisation dans le 3'UTR.	25
Figure 10 : Hypothèse pour la régulation de la traduction de la protéine Ash1.	28
Figure 11 : Détail des constructions utilisées au cours de l'étude.	32
Figure 12 : Cinétiques de synthèse de la protéine Ash1 obtenues avec les différents ARNm.	46
Figure 13 : Cinétiques de synthèse de la protéine Ash1 obtenues avec les différents ARNm.	48
Figure 14 : Vérification des niveaux d'ARNm <i>ASH1</i> obtenus avec les différentes constructions.	51
Figure 15 : Niveaux de protéine Ash1 obtenus.	52
Figure 16 : Distribution de l'ARNm <i>ASH1</i> dans la population de ribosomes dans une souche <i>KHD1</i> sauvage et <i>KHD1Δ</i>.	54

Liste des tableaux

Table I : ARNm localisés chez la levure d'après Shepard et al. (2003).	14
Table II : Vitesse de synthèse de la protéine Ash1 et maximum de protéine obtenu avec les différents ARNm.	44
Table III : Vitesse de synthèse de la protéine Ash1 et maximum de protéine obtenu avec les différents ARNm.	47

Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
C	Cytosine
C-terminale	Carboxy-terminale
dCTP	Désoxycytosine triphosphate
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
DTT	Dithiotréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
FISH	Fluorescence par Hybridation <i>in situ</i>
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
G	Guanine
HCl	Acide chlorhydrique
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
N-terminal	Amino-terminal
Kb	kilobase
KDa	kiloDalton
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
Pb	Paire de base
PBS	Solution de tampon phosphate
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
Poly-(A)	Polyadénylé
RNase	Ribonucléase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
T	Thymine
Taq	Thermostable aquaticus
U	Uracile
UCS	Domaine UNC-45/CRO1/SHE4
URS	Upstream Regulatory Sequences
3'UTR	Région 3' non codante
5'UTR	Région 5' non codante

Liste des symboles

°C	Degré Celsius
M	Molaire
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
nm	Nanomètre
ng	Nanogramme
pmole	Picomole
rpm	Rotation par minute
U	Unité
μCi	MicroCurie
μg	Microgramme
μL	Microlitre
%	Pourcentage

Remerciements

Je souhaite remercier le Dr Pascal Chartrand qui m'a offert la possibilité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire.

Pour le support technique mais surtout moral, j'aimerais remercier Catherine Olivier. Sans elle la vie au laboratoire aurait été bien compliquée.

Je souhaite remercier le laboratoire du Dre Léa Brakier-Gingras pour m'avoir permis d'utiliser le matériel pour faire les gradients de saccharose et pour m'avoir montré patiemment comment les utiliser.

INTRODUCTION

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. La localisation d'ARNm :

Il existe différentes façons de localiser une protéine à un site particulier de la cellule. Lorsqu'une protéine est requise au niveau d'un compartiment sub-cellulaire (Golgi, réticulum endoplasmique...), le mécanisme de localisation est généralement post-traductionnel : la protéine est ciblée à son compartiment cellulaire grâce à un peptide signal. Par contre, lorsque la protéine est requise dans une région particulière du cytoplasme par exemple, c'est l'ARNm codant pour cette protéine qui est localisé au site où la protéine est requise. La localisation des ARNm est un phénomène important pour les cellules polarisées car elle permet d'exprimer une protéine spécifique dans une région particulière du cytoplasme. C'est un mécanisme utilisé par un grand nombre de cellules lors du développement, de la division cellulaire asymétrique, de la formation des neurones, par exemple (Jansen, 2001).

1.1.1. Rôles de la localisation d'ARNm :

Plus spécifiquement, la localisation d'ARNm dans une cellule ou un organisme en développement peut jouer plusieurs rôles différents (Figure 1) (Kloc et al., 2002). Un de ces rôles est de permettre la production d'une grande quantité de protéine à un endroit spécifique de la cellule, par exemple la β -actine est produite en grande quantité au niveau de la membrane des fibroblastes en mouvement (Hill and Gunning, 1993). Cela peut permettre aussi la production d'un gradient de morphogène. Un des exemples est la formation d'un gradient de Bicoïd dans l'embryon de *Drosophila melanogaster* permettant la détermination du pôle antérieur de l'embryon (Salles et al., 1994; Cha et al., 2001). Une autre fonction de la localisation d'un ARNm peut être la détermination de lignées cellulaires par séquestration d'ARN dans un blastomère, comme on peut le voir chez *Xenopus* (Yisraeli et al., 1990; Kloc et al., 2001), ainsi que dans la spécification du

changement de type sexuel chez la levure (Bobola et al., 1996). Cela peut avoir pour rôle le ciblage de la protéine dans une organelle ou une région sub-cellulaire, par exemple l'ARNm de la cycline B localisée au niveau du réseau mitotique (Groisman et al., 2000). Enfin, cela peut permettre une traduction restreinte à un site spécifique d'une cellule ou d'un embryon (Gonzalez et al., 1999). Dans la figure 1, nous voyons l'exemple d'un neurone qui va localiser un ARNm au niveau des dendrites, pour permettre la traduction de cet ARNm seulement à cet endroit du neurone.

1.1.2.Exemples d'ARNm localisés :

Il existe un grand nombre d'ARNm localisés, dont environ 90 étaient connus en 2001 (Jansen, 2001). Récemment, chez la levure, il a été estimé que plus de 1% des gènes exprimés correspondaient à des ARNm localisés (Marc et al., 2002 ;Shepard et al., 2003 ; Lopez de Heredia and Jansen, 2004). Outre les exemples déjà cités plus haut, nous pouvons citer comme autres exemples, l'ARNm *Vg1* ainsi que l'ARNm *Xlirts* localisés au pôle végétal de l'oocyte de Xénope et permettant la détermination du pôle végétal de l'oocyte versus le pôle animal (Yisraeli et al., 1990). Chez la drosophile, un grand nombre d'exemples peuvent être cités. Les ARNm *Bicoid* et *Nanos*, localisés aux pôles antérieur et postérieur respectivement, sont indispensables pour la détermination des pôles antérieur et postérieur dans l'embryon de la drosophile (Hazelrigg, 1998;Kloc et al., 2002) (Figure 2).

Pour que tous les phénomènes liés à la localisation des ARNm puissent avoir lieu, il faut d'une part que l'ARNm soit correctement localisé mais, tout aussi important, pendant que l'ARNm est en train d'être localisé, il faut que la traduction de cet ARNm soit contrôlée. En effet, si l'ARNm est traduit avant sa localisation correcte, cela peut amener des défauts dans la détermination cellulaire par exemple, comme la formation de deux têtes et thorax chez la drosophile, ou un défaut dans le changement de type sexuel chez la levure.

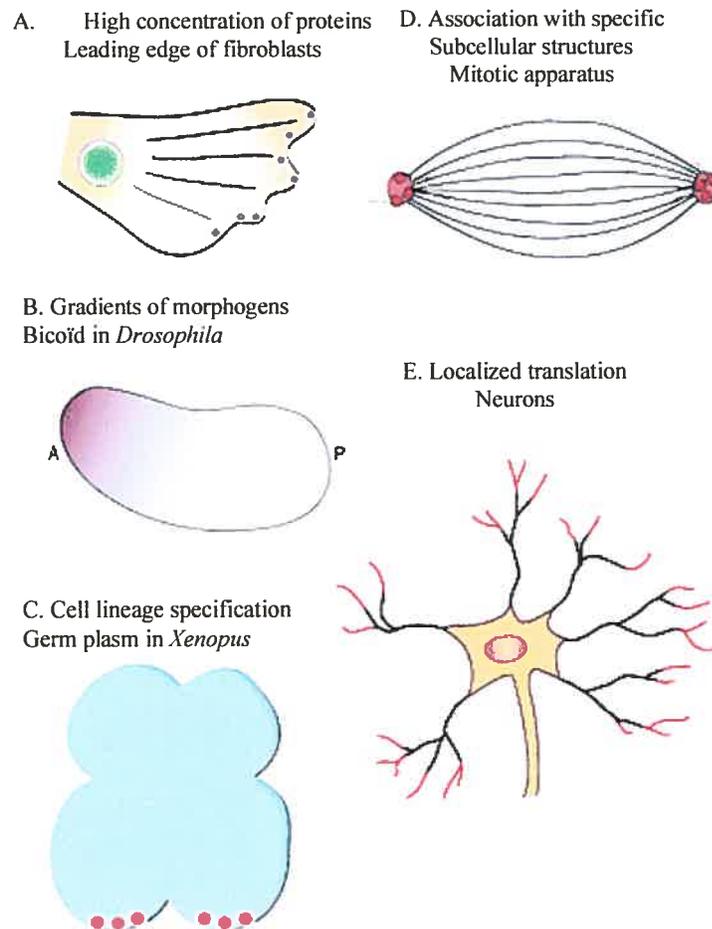


Figure 1 : Les différents rôles de la localisation des ARNm.
extraite de Kloc et al. (2002)

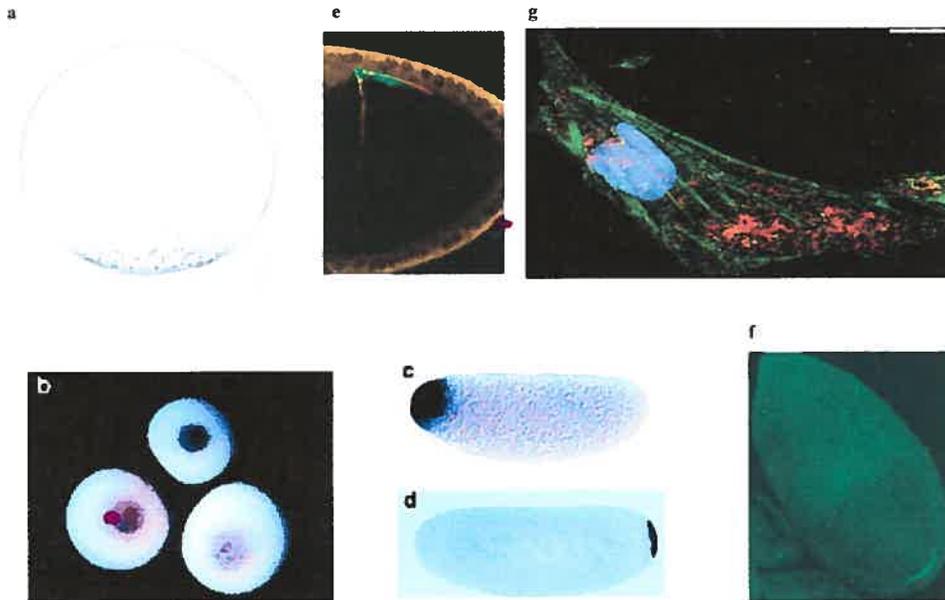


Figure 2 : Exemples d'ARNm localisés.

a, ARNm *Vg1* localisé au pôle végétal de l'oocyte de Xénope. **b**, ARNm *Xlirts* localisé au pôle végétal de l'oocyte de Xénope. **c**, ARNm *Bicoid* localisé au pôle antérieur de l'embryon de Drosophile. **d**, ARNm *Nanos* localisé au pôle postérieur de l'embryon de Drosophile. **e**, ARNm *Gurken* localisé au coin antéro-dorsal de l'oocyte de Drosophile. **f**, ARNm *Oskar* localisé à l'extrémité postérieure de l'oocyte de Drosophile. **g**, ARNm β -*Actine* localisé à la bordure d'un fibroblaste de poulet. **a**, **e** et **f** sont extraits de Jansen (2001) ; **b**, **c** et **g** sont extraits de Hazelrigg (1998) et **d** est extrait de Kloc et al. (2002).

1.2. Mécanismes de contrôle traductionnel des ARNm localisés :

Il existe plusieurs mécanismes de contrôle traductionnel des ARNm localisés. Le plus souvent, la répression a lieu à l'étape de l'initiation et implique la liaison de facteurs dans la région non codante de l'ARNm qui agissent en *trans* (Johnstone and Lasko, 2001).

La liaison peut avoir lieu dans la région 5' UTR de l'ARNm comme dans le cas de la ferritine par exemple (Rouault, 2002). La protéine IRE Binding Protein (IRE-BP) se lie au niveau de l'Iron Responsive Element (IRE) pour inhiber la traduction de la ferritine en empêchant le ribosome de se fixer sur l'ARNm de la ferritine. La liaison peut également avoir lieu au niveau de la région 3'UTR et impliquer l'interaction entre plusieurs facteurs liés en 3' ou en 5', comme décrit ci-dessous.

1.2.1. Traduction :

La traduction d'un ARNm se fait en plusieurs étapes et différents facteurs peuvent agir à différents niveaux pour influencer ce mécanisme. Pour un ARNm polyadénylé, la queue poly-(A) est liée par la Poly-(A) Binding Protein (PABP) qui interagit avec eIF4G. Ce dernier lie eIF4E et eIF4A pour former le complexe eIF4F. eIF4E se liant au niveau du cap de l'ARNm, il y a circularisation de l'ARNm grâce à l'interaction de ces différents facteurs *trans* liés en 5' et en 3'. Cette interaction stimule l'activation de la traduction (Gunkel et al., 1998). Ensuite, en présence d'ATP, eIF4B et eIF4H, qui sont des hélicases qui vont défaire les parties double brin, se lient à eIF4G. Un complexe formé de eIF2-GTP, eIF3, eIF1, eIF1A, la sous-unité 40S du ribosome, ainsi que d'un ARNt-méthionine va alors se lier à eIF4G. Il y a scanning de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation en présence d'ATP puis liaison de eIF5. Une fois la 40S arrivée au niveau du codon d'initiation, il y a relâche de eIF2-GDP qui est recyclé, ainsi que de eIF5, eIF1A, eIF1 et eIF3. Enfin, la sous-unité 60S

du ribosome se lie à la sous-unité 40S au niveau du codon d'initiation, en présence de eIF5B et de GTP. Le ribosome peut alors parcourir l'ARNm et synthétiser la protéine correspondante. La liaison entre eIF4G et des facteurs *trans* qui se lient à la région 3'UTR peut influencer la traduction à l'étape de l'initiation en affectant la capacité de l'ARNm à circulariser (Gunkel et al., 1998 ; Kozak, 1999 ; Kozak, 2002).

1.2.2. Répression dépendante de la polyadénylation :

La régulation de la taille de la queue poly-(A) est un mécanisme de régulation traductionnelle. En général, augmenter la taille de la queue poly-(A) provoque l'activation de la traduction, tandis que la réduction de sa taille provoque l'inhibition de la traduction de l'ARNm. Pour un ARNm contenant un Cytoplasmic Polyadenylation Element (CPE), le CPE est lié par la protéine CPEB phosphorylée. Celle-ci recrute des facteurs nécessaires pour la polyadénylation tel que le Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor (CPSF) (Kloc et al., 2002)

Des protéines agissant en *cis* sont nécessaires pour la dé-adénylation comme par exemple la Poly-(A) Specific RNase (PARN) chez le xénope (Korner et al., 1998). Chez la drosophile, l'ARNm *Hunchback* est dé-adénylé lorsque Nanos (Nos) et Pumilio (Pum) se lient au niveau des Nos Responsive Elements (NREs) dans la région 3'UTR de cet ARNm (Wreden et al., 1997). *Hunchback* est un ARNm maternel distribué uniformément dans l'embryon de la drosophile. Nanos qui est localisée au niveau postérieur de l'embryon inhibe la traduction de l'ARNm *Hunchback*, créant ainsi un gradient de *Hunchback* opposé au gradient de Nanos. Wreden et al. (1997) ont proposé un modèle pour la régulation de la traduction de l'ARNm *Hunchback* : la régulation serait le résultat d'un équilibre entre l'adénylation et la dé-adénylation de l'ARNm *Hunchback*. En effet, au niveau antérieur de l'embryon de la drosophile, les NREs situés dans la région 3'UTR de l'ARNm *Hunchback* sont liés par la protéine Pumilio. Nanos n'étant pas présente au niveau antérieur de l'embryon, il y aura plus d'adénylation que de dé-adénylation, provoquant l'activation de la traduction de l'ARNm *Hunchback*. Par contre, au niveau postérieur de l'embryon, Pumilio se lie aux NREs de *Hunchback* et recrute Nanos. La présence de Nanos augmente la dé-adénylation de l'ARNm *Hunchback* par rapport à l'adénylation, provoquant ainsi une inhibition de sa traduction.

Un autre mécanisme d'inhibition de la traduction est le masquage de l'ARNm. En effet, le masquage consiste à garder l'ARNm dans des particules de mRNP, ce qui l'empêche d'être traduit mais aussi d'être dégradé. Des protéines telles que la Y-box FRGY2 chez l'oocyte de xénope participent au masquage d'ARNm (Tafari and Wolffe, 1993). Lors du masquage de l'ARNm de la cycline B1 par exemple (de Moor and Richter, 1999), la protéine CPEB qui se lie au CPE n'est pas phosphorylée. La CPEB non phosphorylée se lie à la protéine Maskin qui lie eIF4E, en excluant eIF4G du complexe car la protéine Maskin possède le même site de liaison à eIF4E que la protéine eIF4G. La liaison de Maskin et eIF4E empêchera ainsi le recrutement du ribosome (Stebbins-Boaz et al., 1999; Kloc et al., 2002).

1.2.3. Répression avant initiation de la traduction :

Dans le cas d'une répression avant initiation de la traduction, une séquence en *cis*, généralement dans la région 3'UTR, est reconnue par un facteur agissant en *trans* requis pour la répression. Ce facteur *trans* prévient le recrutement du ribosome (Kloc et al., 2002).

L'ARNm *Nanos* (*Nos*), chez la drosophile, forme un gradient postérieur-antérieur et spécifie ainsi le développement postérieur. *Nos* possède dans sa région 3'UTR un Translational Control Element (TCE) où peut se lier Smaug (Smg) qui est un répresseur traductionnel agissant en *trans*. En effet, Smg inhibe la traduction des *Nos* non localisés en liant la protéine Cup qui agit comme une eIF4E-Binding Protein. Cup médie l'interaction entre Smg et eIF4E, bloquant ainsi l'interaction entre eIF4E et eIF4G (Nelson et al., 2004). Cependant, la répression traductionnelle de *Nos* requiert également un autre facteur qui n'a pas encore été identifié. En effet, le TCE est formé de 2 tiges-boucles. La première tige-boucle (tige-boucle II) est requise pour la liaison de la protéine Smg. La deuxième tige-boucle (tige-boucle III) contient un motif double brin qui est reconnu par une ou plusieurs protéines, différentes de la protéine Smg. La présence de la tige-boucle III n'est pas nécessaire à la liaison de Smg sur la tige-boucle II, mais elle est indispensable à la répression traductionnelle de *Nos* (Crucis et al., 2000). La répression de *Nos* peut également avoir lieu après l'initiation de sa traduction, en empêchant le ribosome de parcourir l'ARNm. Clark et al. (2000) ont voulu vérifier que l'ARNm *Nos* non localisé était

exclu des polysomes et donc, réprimé au niveau de l'initiation de la traduction. Ils ont effectué des gradients de saccharose et ont ainsi montré que l'ARNm *Nos* non localisé est associé aux polysomes. Ils en ont conclu que la répression traductionnelle des *Nos* non localisés devait se faire soit au niveau de l'élongation, soit au niveau de la terminaison de la traduction. Cette répression pourrait requérir la protéine β -NAC, une sous-unité du Nascent polypeptide Associated Complex (NAC) (Wiedmann et al., 1994). En effet, Markesich et al. (2000) ont montré qu'une mutation affectant l'expression de β -NAC provoquait une expression ectopique de la protéine *Nos* sans affecter la localisation de son régulateur en aval. Le complexe NAC est lié au ribosome et se lie au polypeptide naissant. Ce complexe permettrait de prévenir l'association non spécifique entre le ribosome et le réticulum endoplasmique (Lauring et al., 1995 ; Powers et Walters, 1996). Cependant, Markesich et al. proposent une autre fonction impliquant la sous-unité β -NAC . En effet, de par son association avec le polypeptide naissant, elle pourrait réguler la traduction des polypeptides pendant l'étape de l'élongation (Figure 3).

La protéine Cup a également été impliquée dans la régulation traductionnelle de l'ARNm *Oskar* (*Osk*) qui est localisé postérieurement et permet la formation des structures postérieures. L'ARNm *Osk* non localisé est réprimé traductionnellement tandis que, lorsqu'il est correctement localisé, il est traduit activement (Chang et al., 1999). Lors de la localisation de l'ARNm *Osk* vers le postérieur de l'embryon, la protéine Barentz (Btz) permet la liaison avec la kinésine I (van Eeden et al., 2001). En 2003, Wilhelm et al. ont montré que la protéine Cup se trouvait dans les mêmes complexes RNP contenant Btz et l'ARNm *Osk*. Ces complexes RNP contiennent également d'autres protéines telles que Exuperantia (Exu), impliquée dans la localisation antérieure de l'ARNm *Bcd* (St Johnston et al., 1989), et Ypsilon Schachtel (Yps), une protéine Y-box reliée à FRGY2 chez le xénope et impliquée dans la répression traductionnelle (Matsumoto et al., 1996). La protéine Cup agirait en recrutant la protéine Btz à l'ARNm *Osk* et est donc nécessaire à sa localisation correcte. De plus, Cup lie eIF4E et inhiberait ainsi la traduction d'*Osk* (Wilhelm et al., 2003).

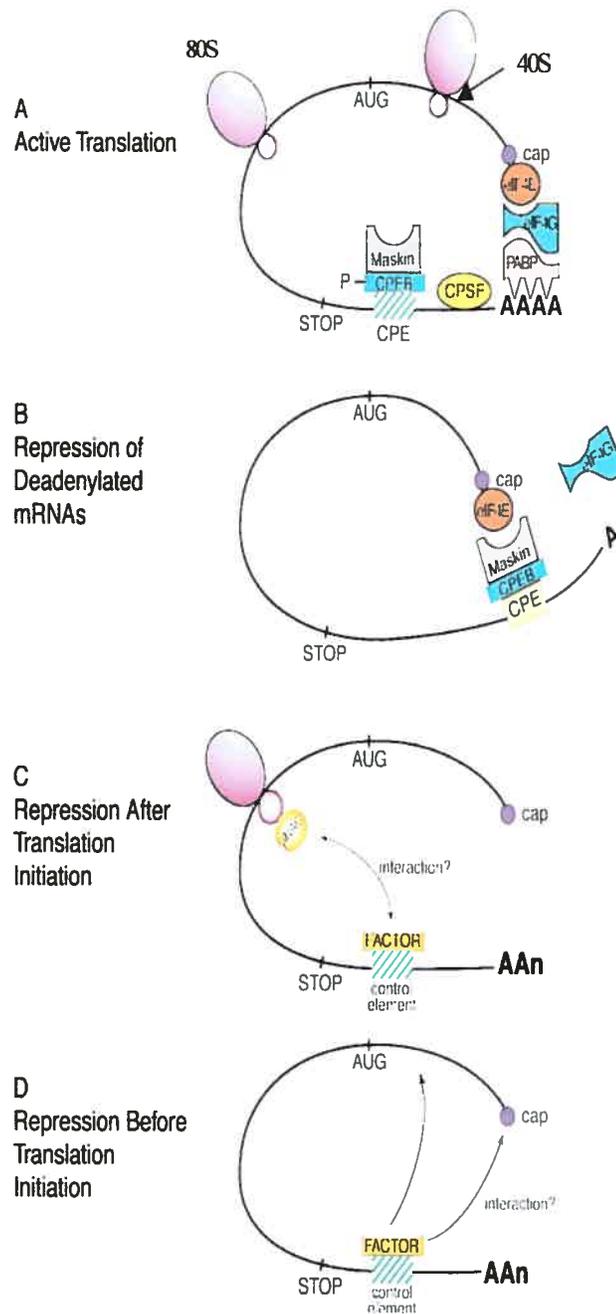


Figure 3 : Mécanismes de régulation traductionnelle des ARNm localisés.

A, Traduction ; **B**, Répression dépendante de la polyadénylation ; **C**, Répression après initiation de la traduction, **D**, Répression avant initiation de la traduction.
Figure extraite de Kloc et al. (2002).

Cependant, il existerait d'autres mécanismes permettant la répression traductionnelle d'*Osk*. En effet, la protéine Bruno (Bru) qui se lie à 3 régions dans la région 3'UTR d'*Oskar* (appelés Bru Response Elements ou BREs) et Apontic (Apt), qui interagit avec Bru, sont également impliquées dans la régulation traductionnelle d'*Osk* (Lie and Macdonald, 1999; Castagnetti et al., 2000). De plus, les protéines p50 et Bicaudal-C (Bic-C) seraient aussi impliquées. p50 se lie dans la région 3'UTR de l'ARNm *Osk*, et Bic-C est une protéine à domaines KH (Gunkel et al., 1998; Saffman et al., 1998). Des mutations affectant les domaines KH de Bic-C provoquent la traduction prématurée de *Osk*, suggérant que Bic-C pourrait jouer un rôle dans le contrôle traductionnel de *Osk* (Saffman et al., 1998). Une autre étude suggère que le contrôle de la taille de la queue poly(A) est essentielle pour la régulation traductionnelle d'*Osk* (Chang et al., 1999) et la protéine Yps agirait dans la régulation de la queue poly(A) (Mansfield et al., 2002).

Un autre exemple de répression traductionnelle avant initiation de la traduction est celui de la répression de la 15-lipoxygénase. En effet, dans les cellules érythroïdes de mammifères, la 15-lipoxygénase (LOX) est régulée traductionnellement à l'étape de l'association de la sous-unité 60S du ribosome. Soit, après le recrutement du complexe de pré-initiation 43S et son scanning jusqu'au codon d'initiation. Cette inhibition se fait par la liaison des hnRNP K et E1 au niveau de l'élément de contrôle de la différenciation (DICE) dans la région 3'UTR de l'ARNm *LOX*. Cet élément est constitué de 10 fois un motif répété de 19 nucléotides CU-riche (Ostareck et al., 1997).

1.3. ARNm localisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* :

Pendant longtemps, seulement 2 ARNm étaient connus comme étant des ARNm localisés au bourgeon de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, *IST2* et *ASH1* (Chartrand et al., 2001). Récemment, Shepard et al (2003) ont montré qu'il existait 22 ARNm localisés supplémentaires (Table I). Ces ARNm sont localisés au niveau du bourgeon de la cellule fille grâce aux protéines She (Kruse et al., 2002). Ces ARNm codent pour des protéines qui interviennent dans un grand nombre de processus biologiques.

1.3.1.Exemples d'ARNm localisés chez *Saccharomyces cerevisiae* :

- **L'ARNm *IST2* :**

IST2 et *TPO1* codent pour des transporteurs membranaires qui modulent les concentrations intracellulaires en ions (Tomitori et al., 1999). En effet la protéine Ist2 est une protéine canal qui augmente la tolérance au sodium de la levure. L'ARNm *IST2* est localisé au niveau des cellules filles en bourgeonnement et permet la localisation de la protéine Ist2 au niveau de la membrane plasmique (Takizawa et al., 2000). Cette localisation de l'ARNm n'a pas pour effet la distribution asymétrique de la protéine Ist2 au niveau de la cellule fille (Juschke et al., 2004). En effet, le transport de l'ARNm *IST2* dans la cellule fille en bourgeonnement est nécessaire pour l'expression de la protéine Ist2 dans celle-ci car les petits bourgeons possèdent du réticulum endoplasmique cortical mais pas de réticulum endoplasmique périnucléaire nécessaire à la voie de sécrétion classique des protéines membranaires (Juschke et al., 2004). Une fois l'ARNm *IST2* correctement localisé, celui-ci est traduit en protéine. Les protéines Ist2 nouvellement synthétisées sont alors séquestrées dans la cellule fille grâce à la formation de la barrière de septine, au niveau du cou de la levure en bourgeonnement (Takizawa et al., 2000; Juschke et al., 2004). Les éléments de localisation de l'ARNm *IST2* restent à déterminer.

- **L'ARNm *ASH1* :**

La protéine Ash1 est un régulateur transcriptionnel spécifique du type cellulaire (Sil et Herskowitz, 1996). En effet, la protéine Ash1 est exprimée seulement au niveau du noyau des cellules filles où elle réprime l'expression de l'endonucléase Ho. Ho est responsable du changement de type sexuel chez la levure (Maxon et Herskowitz, 2000). L'ARNm *ASH1* est localisé à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille en fin d'anaphase, permettant ainsi la localisation asymétrique de la protéine Ash1 au noyau de la cellule fille (Chartrand et al., 2001), (Figure 4).

- *Autres ARNm :*

Parmi les ARNm dont on a découvert qu'ils sont localisés dans l'étude de Shepard et al. (2003), il y a les ARNm codant pour la protéine Wsc2, qui est un senseur de choc thermique qui transduit son signal par la voie de la protéine Mpk1 (Shepard et al., 2003) ; la protéine Mtl1 est un senseur de la paroi cellulaire (Ketela et al., 1999; Rajavel et al., 1999). *BRO1* et *KSSI* codent pour des composantes de la voie de signalisation de la protéine Pkc1, une protéine kinase activée par des facteurs mitogéniques et qui régule les réponses cellulaires à différents stress environnementaux (Courchesne et al., 1989 ; Nickas and Yaffe, 1996 ; Shepard et al., 2003). D'autres ARNm comme *ERG2* et *LCB1* apparaissent localisés. Ces ARNm codent pour des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides (Ashman et al., 1991 ; Shepard et al., 2003) ; enfin *EGT2* code pour une cellulase impliquée dans la séparation cellulaire (Kovacech et al., 1996 ; Wu et al., 1996 ; Pan and Heitman, 2000 ; Shepard et al., 2003).

La localisation de ces protéines au niveau du bourgeon permettrait de concentrer leur activité au site le plus actif en croissance et restructuration de la cellule. Plusieurs ARNm découverts par Shepard et al. (2003) codent pour des protéines dont on ignore encore la fonction.

Table I : ARNm localisés chez la levure d'après Shepard et al. (2003).

Localisation de l'ARNm : oui, $\geq 90\%$; Partiel, 50-60% de localisation ;
Faible, 15-30% de localisation.

Gène	Localisation de l'ARNm	Régulation au cours du cycle cellulaire	Fonction prédite	Localisation de la protéine
<i>ASH1</i>	Oui	M	Transcription	Noyau du bourgeon
<i>BRO1</i>	Oui	Aucune	Transduction du stress	Vacuole
<i>CLB2</i>	Oui	M	Cycline B	Noyau, fuseau mitotique
<i>CPS1</i>	Oui	Aucune	Carboxypeptidase	Points cytoplasmiques
<i>DNM1</i>	Oui	S	Fission mitochondriale	Périphérie mitochondriale
<i>EGT2</i>	Oui	M	Cellulase	Membranes, gros bourgeons
<i>ERG2</i>	Oui	M	Stérol isomérase	Réticulum endoplasmique
<i>IST2</i>	Oui	Aucune	Transporteur	Membrane plasmique des bourgeons
<i>MID2</i>	Oui	Aucune	Récepteur membranaire	Membrane plasmique des bourgeons
<i>MMR1</i>	Oui	M	Inconnue	Sites de bourgeonnement, jonction mère-bourgeon
<i>SRL1</i>	Oui	G1	Inconnue	Périphérie des petits bourgeons
<i>TPO1</i>	Oui	M	Transport des polyamines	Membrane plasmique des bourgeons
<i>WSC2</i>	Oui	S	Récepteur membranaire	Membranes
<i>YGR046W</i>	Oui	Aucune	Inconnu	Mitochondrie
<i>YJL051C</i>	Oui	M	Inconnu	Membranes
<i>YLR434C</i>	Oui	Aucune	Inconnu	Mitochondries
<i>YML072C</i>	Oui	G2	Inconnu	Membranes
<i>YMR171C</i>	Oui	Aucune	Inconnu	Réticulum endoplasmique
<i>YNL087W</i>	Oui	Aucune	Inconnu	Membranes
<i>KSS1</i>	Partiel	Aucune	Protéine Kinase	inconnu
<i>LCB1</i>	Partiel	Aucune	Synthèse des lipides, Réticulum endoplasmique	Réticulum endoplasmique
<i>MET4</i>	Partiel	Aucune	Transcription	Noyau
<i>MTL1</i>	Faible	Aucune	MID-2 like	Inconnu
<i>YPL066C</i>	Faible	Aucune	Inconnue	Inconnu

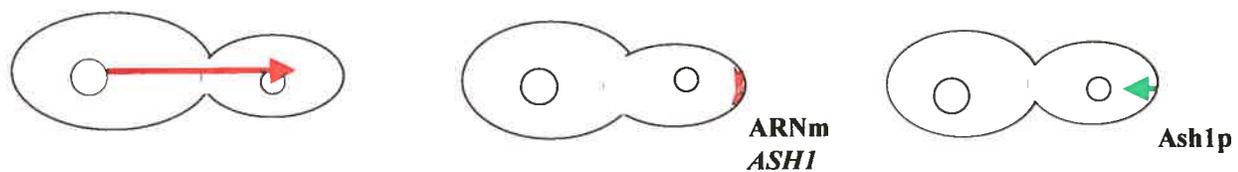
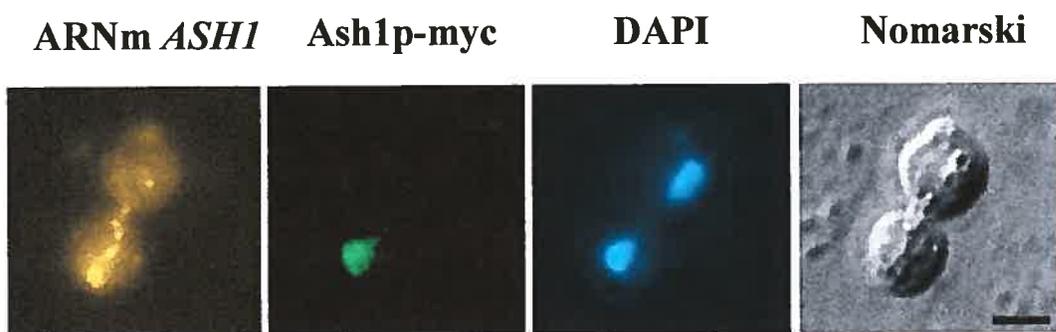


Figure 4 : Localisation de l'ARNm *ASH1*.

(Chartrand et al., 2001)

1.4. Le changement de type sexuel chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* : rôle de l'ARNm *ASH1* :

ASH1 signifie Asymmetric Synthesis of Ho. La protéine Ash1 a 588 acides aminés et contient un domaine de liaison au zinc relié à ceux de la famille des régulateurs transcriptionnels GATA (Sil and Herskowitz, 1996; Maxon and Herskowitz, 2001). La protéine Ash1 est bifonctionnelle : elle possède son activité de liaison à l'ADN en C-terminal et ses fonctions de répression en N-terminal. Par immunofluorescence, elle est observée exclusivement dans le noyau des cellules filles en fin d'anaphase où elle réprime l'expression de l'endonucléase Ho.

L'endonucléase Ho est régulée transcriptionnellement à différents niveaux : elle est exprimée seulement dans les cellules mères haploïdes, à la phase G1 du cycle cellulaire. Donc, un grand nombre de répresseurs, activateurs de la transcription et des facteurs de remodelage de la chromatine sont impliqués dans la régulation de l'expression de la protéine Ho (Nasmyth, 1993). La protéine Ash1 se lie spécifiquement à des séquences consensus YTGAT dans le promoteur du gène *HO* (Maxon and Herskowitz, 2001). Il y aurait 20 sites consensus pour la protéine Ash1 : 13 dans l'URS1 (Upstream Regulatory Sequence 1) et 7 dans l'URS2 (Upstream Regulatory Sequence 2). Il semblerait que la répression par la protéine Ash1 dans la cellule fille nécessite l'occupation d'un grand nombre de ces sites.

Il existe plusieurs modèles pour la répression du gène *HO* par la protéine Ash1. Le premier est que l'occupation du promoteur par la protéine Ash1 préviendrait la fonction de recrutement de la protéine Swi5 pour Swi/Snf sur le gène *HO*, Swi/Snf étant un complexe multiprotéique, requis pour l'expression d'un grand nombre de gènes (Peterson et al., 1994). La deuxième est que la protéine Ash1 fonctionnerait en inhibant directement le recrutement de Swi/Snf. Enfin, le troisième est que la protéine Ash1 réprime la transcription en interagissant avec des composantes de la chromatine, créant ainsi une structure défavorable à la liaison de Swi/Snf (Maxon and Herskowitz, 2001).

Dans la cellule fille, la répression du gène *HO* par la protéine Ash1 empêche celle-ci de changer de type sexuel. Au contraire, la cellule mère, qui ne possède pas

la protéine Ash1, va exprimer le gène *HO* et ainsi être capable de changer de type sexuel (Bobola et al., 1996).

1.4.1. Le changement de type sexuel :

Dans la nature, il existe 2 types sexuels possibles pour la levure : *Mat a* ou *Mat α* . Si nous prenons l'exemple d'une cellule *Mat a* (figure 5), lors du bourgeonnement, la cellule mère *Mat a* va donner naissance à une cellule fille *Mat a*. Lors d'une division subséquente, la cellule mère va exprimer la protéine Ho qui va permettre le changement de type sexuel de *Mat a* vers *Mat α* . En effet, l'endonucléase Ho est à l'origine d'une conversion de gène site spécifique durant laquelle le locus *MAT* est coupé (Wu et al., 1996). Ensuite, la cassure double brin est réparée en recombinant avec des séquences d'ADN homologues au niveau d'un locus donneur (Wu et al., 1996). Par contre, dans la cellule fille, la protéine Ash1 va réprimer l'expression de la protéine Ho et ainsi empêcher le changement de type sexuel. La proximité d'une cellule *Mat a* avec une cellule *Mat α* favorise la fusion et la formation d'une cellule diploïde *a/ α* (Amon, 1996 ; Darzacq et al., 2003).

1.4.2. Structure de l'ARNm *ASH1* :

La plupart des ARNm localisés possèdent des éléments de localisation dans leur région 3'UTR. La particularité de l'ARNm *ASH1* est que ses éléments de localisation se trouvent dans la séquence codante : notamment E1, E2A et E2B, tandis que E3 se trouve à cheval entre la fin de la séquence codante et le début de la région 3'UTR (Gonzalez et al., 1999). La figure 6A présente la schématisation de l'ARNm *ASH1* avec ses éléments de localisation, tandis que la figure 6B montre la structure secondaire prédite de ces éléments de localisation.

Nous connaissons les protéines impliquées dans la reconnaissance et la localisation de l'ARNm *ASH1* et un modèle d'interaction a été proposé par Chartrand et al. (2001).

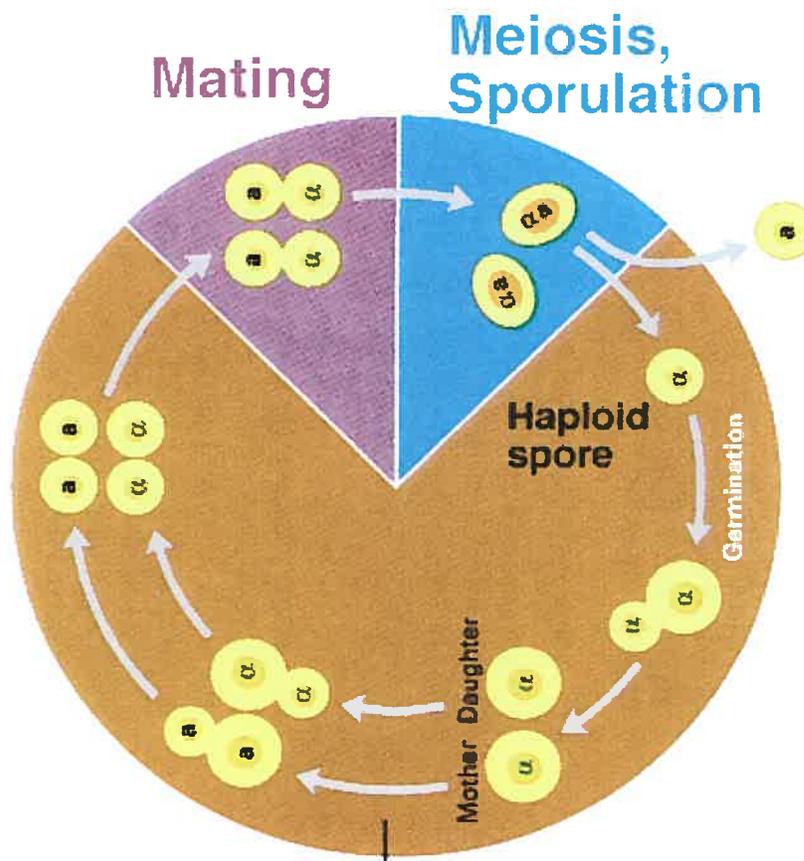


Figure 5 : Cycle cellulaire de la levure.

Une cellule mère bourgeonne et donne naissance à une cellule fille. Lors d'une division subséquente, la cellule mère va changer de type sexuel et permettre ainsi la proximité d'une cellule *Mat a* avec une cellule *Mat α*. Les 2 cellules vont alors pouvoir fusionner et donner une cellule diploïde. Par la suite, la cellule pourra sporuler et donner des spores haploïdes.

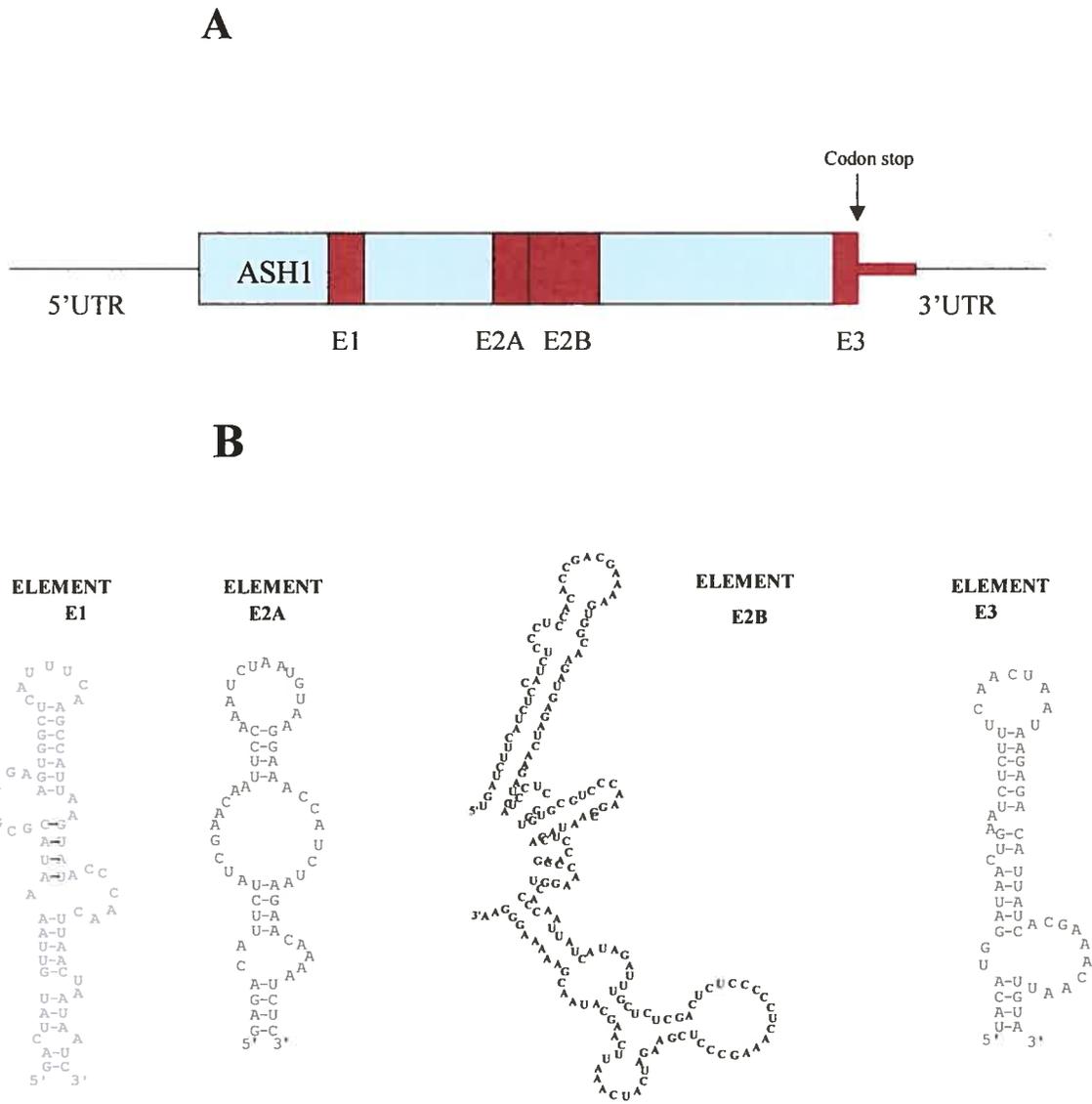


Figure 6 : L'ARNm *ASH1*.

A, Représentation schématique . B, Structure secondaire prédite des éléments de localisation. (Chartrand et al., 1999)

1.4.3. Mécanisme de localisation de l'ARNm *ASH1* :

La figure 7 montre le modèle d'interaction de la machinerie de localisation proposé par Chartrand et al. (2001). La machinerie de localisation est constituée des protéines She (Kwon and Schnapp, 2001). Tout d'abord, la protéine She2, liant l'ARN, reconnaît et se lie à chacun des éléments de localisation présents sur l'ARNm *ASH1* (Gonsalvez et al., 2003). Ensuite la protéine She2 recrute la protéine She3. La protéine She3 sert de pont entre la protéine She2 et la protéine She1/Myo4 (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000). La liaison entre la protéine She3 et la protéine Myo4 est indépendante de l'ARN et la protéine She2 est requise pour que les protéines She3/Myo4 se lient à l'ARNm *ASH1* (Munchow et al., 1999). La protéine She1/Myo4 est une myosine de type V qui se déplace le long des filaments d'actine (Takizawa and Vale, 2000). La protéine Myo4 est impliquée dans le transport des ARNm, tandis que la protéine Myo2, la seule autre myosine de type V présente chez la levure, est impliquée dans le transport des organelles (Karpova et al., 2000).

Deux autres protéines She sont essentielles pour la localisation de l'ARNm *ASH1*. La protéine She4 est une protéine possédant un domaine UCS (domaine UNC-45/CRO1/SHE4) ; elle est impliquée dans les phénomènes d'endocytose et de localisation d'ARNs. La protéine She4 s'associe aux myosines de classe I (Myo5) et de classe V (Myo4) et cette association est dépendante du domaine UCS. La protéine She4 agirait comme médiateur ou régulateur des fonctions des myosines chez la levure, probablement en aidant la liaison aux filaments d'actine (Takizawa and Vale, 2000; Wesche et al., 2003).

Enfin, la protéine She5/Bni1 est une protéine impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine puisqu'elle affecte sa polarité et son organisation (Wendland et al., 1996; Evangelista et al., 1997). Elle est impliquée dans différents aspects des fonctions du cytosquelette d'actine, comme la cytokinèse ; et interagit avec différentes protéines, comme la profiline et les protéines Rho, qui interviennent dans différentes fonctions liées à l'actine.

Chartrand et al. (2001) ont également proposé un modèle « spatio-temporel » pour la localisation de l'ARNm *ASH1*, montré à la figure 8. Dans le noyau, la protéine Loc1 se lie à l'ARNm *ASH1*. La protéine Loc1 est une protéine nucléaire

capable d'interagir avec de l'ARN double brin (Long et al., 2001). Le rôle de la protéine Loc1 n'est pas connu mais une souche *LOC1Δ* montre une délocalisation de l'ARNm *ASH1*. Ensuite, l'ARNm est transporté dans le cytoplasme avec la protéine She2. Il y a alors assemblage en locosome avec la protéine She3 puis association avec le moteur protéique She1/Myo4, et mouvement le long des filaments d'actine. Une fois l'ARNm localisé, il y a dissociation du locosome, ancrage à l'extrémité du bourgeon et enfin traduction. Selon Gonzalez et al. (1999), l'ancrage à l'extrémité du bourgeon nécessiterait la traduction de l'ARNm *ASH1*. En effet, ils montrent que la moitié C-terminale de la protéine Ash1 est impliquée dans l'ancrage de l'ARNm *ASH1* (Gonzalez et al., 1999).

Pendant la localisation de l'ARNm *ASH1*, il est important que sa traduction soit inhibée. En effet, le maintien de l'asymétrie de la protéine Ash1 résulte d'un équilibre cinétique entre la synthèse de la protéine Ash1 et la cytokinèse. La protéine Ash1 ne doit pas être synthétisée trop vite et en trop grande quantité pour éviter que la protéine puisse diffuser vers la cellule mère avant la cytokinèse, créant ainsi une perte d'asymétrie de la protéine Ash1.

Etant donné la position particulière des éléments de localisation dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1*, Chartrand et al. (2002) se sont demandé quel pouvait être l'impact des éléments de localisation sur la traduction de l'ARNm *ASH1*.

1.5. Régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1* :

Ils ont, pour répondre à cette question, utilisé 3 constructions : tout d'abord *ASH1* de type sauvage, avec ses 4 éléments de localisation, ensuite un *ASH1* mutant, dans lequel les éléments de localisation sont mutés de façon à détruire leur structure secondaire mais en gardant la séquence intacte (Chartrand et al., 2002). Et enfin, un *ASH1* dont les éléments de localisation dans la séquence codante sont mutés et auquel nous avons rajouté chacun des éléments dans le 3'UTR. La localisation de l'ARNm a été observée par FISH, pour chacune de ces constructions (Figure 9A). Avec la construction de type sauvage le pourcentage de cellules avec l'ARNm *ASH1* localisé est d'environ 80%. Lorsque les éléments de localisation sont mutés, nous observons une perte totale de la localisation de l'ARNm. Par contre, lorsque les éléments de localisation sont placés dans la région 3'UTR, nous observons un

pourcentage de localisation similaire au type sauvage. Donc, la présence des éléments de localisation dans la région 3'UTR n'affecte pas la localisation de l'ARNm *ASH1*.

Par la suite, la localisation de la protéine Ash1 a été observé par immunofluorescence (Figure 9B). Avec la construction *ASH1* de type sauvage la localisation asymétrique de la protéine Ash1 est d'environ 80%. Lorsque les éléments de localisation sont mutés, nous observons une perte totale de cette distribution asymétrique. Enfin, lorsque les éléments de localisation sont placés dans la région 3'UTR, il y a une diminution d'environ 40% de la distribution asymétrique de la protéine Ash1. Ces résultats suggèrent que la présence des éléments de localisation dans la séquence codante est importante pour obtenir une distribution asymétrique de la protéine Ash1. Une possibilité est que ces éléments affectent la traduction de l'ARNm et que, en les plaçant dans la région 3'UTR, le niveau de protéine Ash1 soit plus élevé, augmentant ainsi la possibilité qu'elle diffuse vers la cellule mère. Une autre possibilité est qu'un facteur puisse lier un des éléments et contrôler la traduction. Pour vérifier cette hypothèse, Chartrand et al. (2002) ont utilisé la construction avec les éléments de localisation dans la région 3'UTR à laquelle ils ont rajouté une tige-boucle dans la région 5'UTR (Figure 9C), dans le but de diminuer son taux de traduction. En effet, une étude effectuée par Kozak et al. (1986) a montré qu'une structure tige-boucle stable ($\Delta G = -50$ kcal/mol), inséré dans la région 5'UTR d'un ARNm provoque une inhibition de sa traduction d'un facteur 20. Des études chez la levure ont montré qu'une grande structure tige-boucle dans la région 5'UTR d'un ARNm inhibe la traduction de celui-ci, tandis qu'une structure tige-boucle plus petite aura un impact moins important (Vega Laso et al., 1993, Sagliocco et al., 1993). La tige-boucle utilisée ici, a été créée de façon à ce qu'elle diminue le taux de traduction de l'ARNm *ASH1*, sans toutefois inhiber totalement sa traduction (Chartrand et al., 2002). La présence de la tige-boucle en 5' n'affecte pas la localisation de l'ARNm. Par contre, lorsque la distribution asymétrique de la protéine Ash1 a été mesurée par immunofluorescence, nous avons observé la restauration de la distribution asymétrique de la protéine Ash1 au niveau du type sauvage (Figure 9D). Ces résultats suggèrent qu'il existe une relation temporelle entre la localisation et la traduction de l'ARNm *ASH1*.

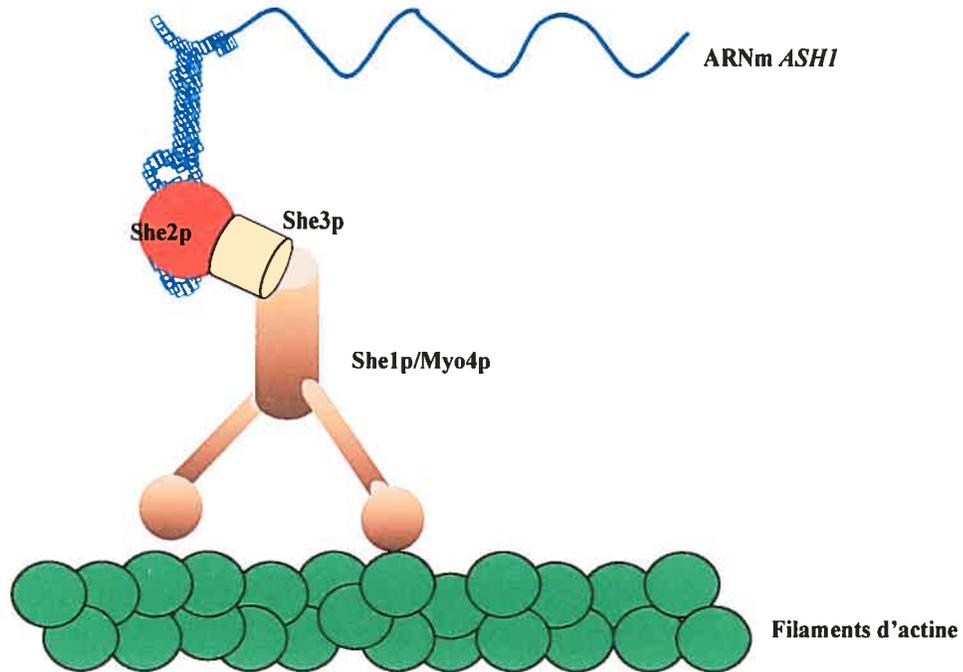


Figure 7 : Modèle d'interaction du complexe de localisation.

La protéine She2 reconnaît les 4 éléments de localisation sur l'ARNm *ASH1*. La protéine She3 sert de pont entre la protéine She2 et la protéine She1/Myo4. La protéine She1/Myo4 est un moteur myosine de type V qui permet le mouvement le long des filaments d'actine (Chartrand et al., 2001).

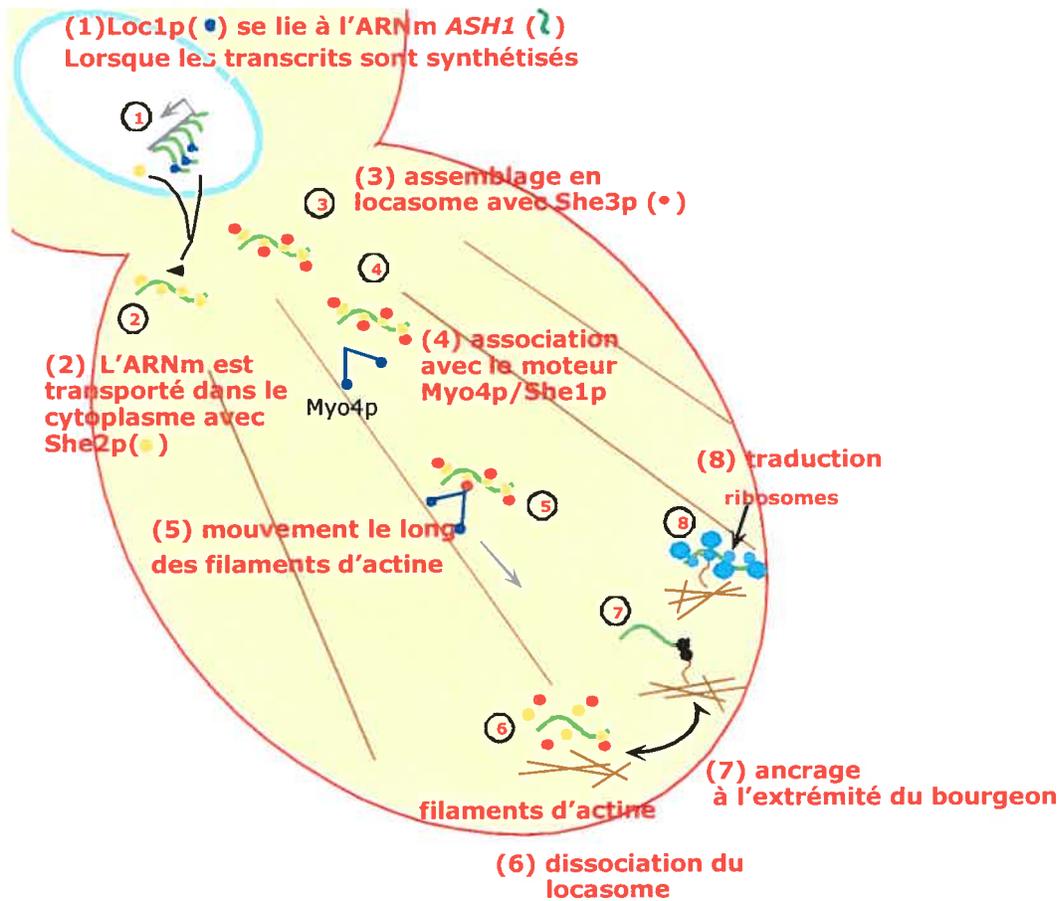
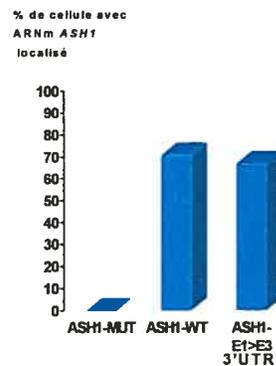


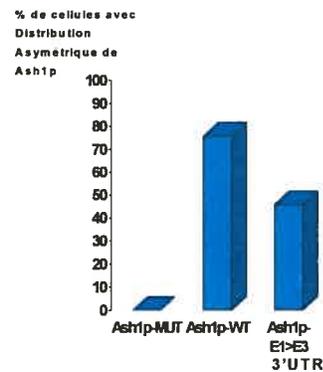
Figure 8 : Modèle spatio-temporel de localisation de l'ARNm *ASH1*.

(Chartrand et al., 2001). Voir le texte pour les détails.

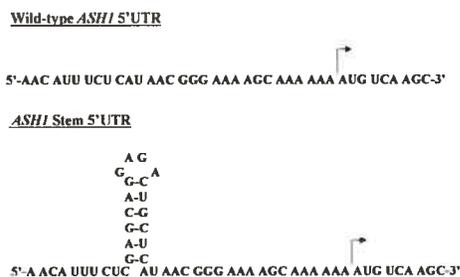
A



B



C



D

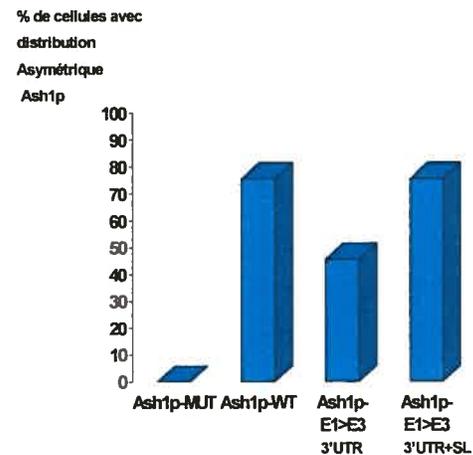


Figure 9 : Influence des éléments de localisation dans le 3'UTR.

A, La présence des éléments de localisation dans le 3'UTR n'affecte pas la localisation de l'ARNm *ASH1*. B, La présence des éléments de localisation dans le 3'UTR provoque une diminution de la distribution asymétrique de Ash1p. C, tige-boucle utilisée pour ralentir la traduction de l'ARNm *ASH1*. D, La présence d'une tige-boucle en 5'UTR de l'ARNm *ASH1* $E1 \Rightarrow E3$ 3'UTR restaure la distribution asymétrique de Ash1p au niveau du type sauvage (Chartrand et al., 2002).

Cette relation serait importante pour l'optimisation de la distribution asymétrique de la protéine Ash1 (Chartrand et al., 2002). Pour confirmer ces résultats, des essais de traduction *in vitro* dans des extraits de réticulocytes de lapin, ont été effectués avec les constructions *ASH1* de type sauvage et *ASH1* mutant (sans les éléments de localisation). Cette expérience montre que la construction *ASH1* mutant est traduite plus efficacement que la construction *ASH1* de type sauvage (résultats non montrés) (Chartrand et al., 2002). En effet, nous observons une augmentation de 3,5 fois du taux de synthèse de la protéine Ash1, lorsque la construction *ASH1* mutant est utilisée, par rapport à la construction *ASH1* de type sauvage. Ces résultats confirment les résultats précédents et montrent que la structure secondaire des éléments de localisation dans la séquence codante de l'ARNm est importante pour le contrôle du niveau de traduction de l'ARNm *ASH1*. Ces résultats montrent également que l'effet des éléments de localisation sur la traduction de l'ARNm *ASH1* ne nécessite pas la présence d'un facteur *trans* issu de la levure.

Nous avons alors formulé l'hypothèse suivante concernant la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Avec *ASH1* de type sauvage, les éléments de localisation sont reconnus par la machinerie de localisation. Une fois dans le cytoplasme, le ribosome vient se fixer sur l'ARNm et commence la traduction, mais il va être ralenti par les éléments de localisation et la machinerie de localisation jusqu'à ce que l'ARNm soit localisé à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille. Par contre, lorsque les éléments de localisation sont placés dans la région 3'UTR, le ribosome va venir se lier à l'ARNm mais ne sera pas ralenti par les éléments de localisation et la machinerie de localisation. Le ribosome va donc pouvoir traduire l'ARNm avant que celui-ci soit localisé. Les protéines ainsi produites vont pouvoir diffuser jusqu'à la cellule mère ce qui provoque la perte d'asymétrie de la protéine Ash1 (Figure 10).

Ces résultats suggèrent que la structure complexe des éléments de localisation dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1* permettrait de ralentir le ribosome jusqu'à ce que l'ARNm soit localisé à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille. Il semblerait cependant que les éléments de localisation ne soient pas les seuls acteurs de la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1*. En effet, la protéine Khd1 pourrait également jouer un rôle.

1.6. Rôle de Khd1p :

La protéine Khd1 (également appelée Hek2) (Denisenko and Bomsztyk, 2002) est un homologue chez la levure de la protéine hnRNP K humaine. En effet, la protéine Khd1 contient 3 domaines KH qui sont les régions les plus conservées entre les protéines humaine et de levure. Les domaines KH sont des domaines de liaison à l'ADN et à l'ARN (Siomi et al., 1993). Denisenko et Bomsztyk (2002), qui ont pour la première fois décrit la protéine Khd1, ont montré qu'elle était impliquée dans la régulation de la taille des télomères en agissant comme répresseur de l'effet de position télomérique (TPE), tout comme la hnRNP K humaine. Irie et al. (2002) ont suggéré, quant à eux, que la protéine Khd1 serait également impliquée dans la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1*. En effet, ils ont tout d'abord montré que la protéine Khd1 se liait à l'ARNm *ASH1* dans les 600 premiers nucléotides. Ensuite que l'ARNm *ASH1* co-immunoprécipite avec la protéine Khd1. Enfin, ils ont montré qu'une sur-expression de la protéine Khd1 inhibe la traduction de l'ARNm *ASH1* et empêche sa localisation convenable (Irie et al., 2002).

En utilisant une version TAP-tag, la protéine Khd1 a été co-purifiée par purification d'affinité avec, entre autre, les protéines eIF4G, eIF4E et eIF2 qui sont tous des facteurs d'initiation de la traduction (Gavin et al., 2002). Ces résultats, ainsi que les résultats de Ostareck et al. (1997), qui ont montré l'implication de hnRNP K dans la régulation traductionnelle de la 15-lipoxygénase, nous ont amené à étudier l'influence de la protéine Khd1 sur la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

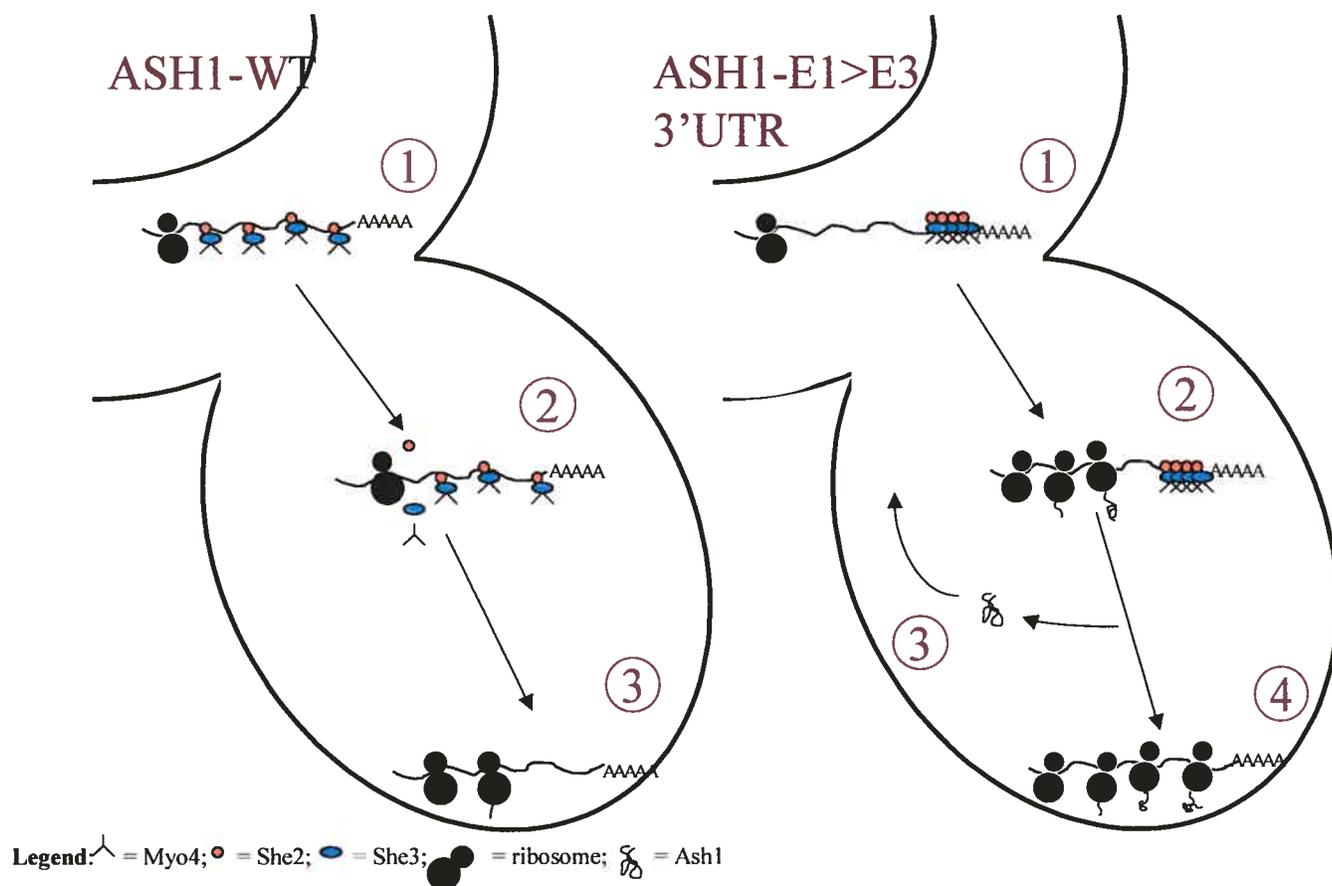


Figure 10 : Hypothèse pour la régulation de la traduction de la protéine Ash1.

Voir texte pour détails.

1.7. Contexte et objectifs :

L'ARNm *ASH1* est un des ARNm localisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, il est localisé à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille en fin d'anaphase pour permettre la distribution asymétrique de la protéine Ash1 au niveau du noyau de la cellule fille où elle va inhiber l'expression de l'endonucléase Ho. Le mécanisme de localisation de l'ARNm *ASH1* commence à être bien connu.

Cependant le mécanisme de régulation traductionnelle de cet ARNm est encore mal défini. La particularité de l'ARNm *ASH1* est que ses éléments de localisation se trouvent dans la séquence codante plutôt que dans la région 3'UTR tel qu'observé auparavant pour la majorité des ARNm localisés. Le but de cette étude est d'étudier l'effet des éléments de localisation sur la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1*, mais également d'étudier l'influence de la protéine Khd1 sur cette régulation afin de mieux comprendre ce mécanisme et de permettre l'établissement d'un modèle de régulation traductionnelle.

1.8. Hypothèses de travail :

La plupart des ARNm localisés possèdent des éléments de localisation dans leur région 3'UTR. L'ARNm *ASH1* possède 4 éléments de localisation : 3 d'entre eux se trouvent dans la séquence codante (E1, E2A, E2B), le quatrième se trouvant à cheval entre la fin de la séquence codante et le début de la région 3'UTR. Cette particularité ainsi que les résultats obtenus par Chartrand et al. (2002) nous ont amené à formuler l'hypothèse que la structure et la position des éléments de localisation pourraient avoir une influence sur la traduction de cet ARNm en ralentissant le ribosome jusqu'à ce que celui-ci soit localisé à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille. Nous avons donc effectué des cinétiques de traduction d'ARNm *ASH1* dont les éléments de localisation dans la séquence codante sont mutés.

D'autre part, l'homologie de la protéine Khd1 avec hnRNP K (Ostareck et al., 1997), ainsi que les différents résultats obtenus par Irie et al. (2002), suggérant une implication de la protéine Khd1 dans la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1*, nous ont amené à formuler l'hypothèse que si la protéine Khd1 inhibe la traduction de l'ARNm *ASH1* jusqu'à ce qu'il soit localisé, la protéine Ash1 devrait apparaître

plus vite dans une souche *KHD1Δ*. Nous avons donc effectué des cinétiques de traduction de l'ARNm *ASH1* dans une souche *KHD1Δ*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Souches de levures utilisées:

La première souche est la souche K699. Celle-ci est prototrophe pour l'uracile, la leucine, l'histidine et le tryptophane. Elle est *ura3*, *leu2*, *his3*, *trp1*.

La deuxième souche est la souche K699 *ASH1Δ-1*. Cette souche possède une ablation du gène *ASH1* par insertion d'une cassette kanamycine (Guldener et al., 1996).

2.2. Plasmides utilisés :

Les plasmides contenant les constructions utilisées au cours de cette étude ont été fournis par le laboratoire du Dr. Chartrand. Toutes les constructions ont été faites dans le plasmide YIPlac128 qui est un plasmide intégratif *LEU2* pour la sélection chez la levure et *AmpR* pour la sélection chez les bactéries (Gietz and Sugino, 1988). Lors de la transformation dans la souche K699 *ASH1Δ*, le plasmide s'intègre au niveau du gène *leu2* de la levure par recombinaison homologue. Toutes les constructions sont sous promoteur galactose permettant une induction à un temps t_0 , et contiennent une séquence *myc* pour permettre la détection de la protéine produite. Le détail des constructions est décrit dans la figure 11. Seule la construction *ASH1 MUT E1 ⇒ E3 3'UTR* ne se trouvait pas sous promoteur galactose.

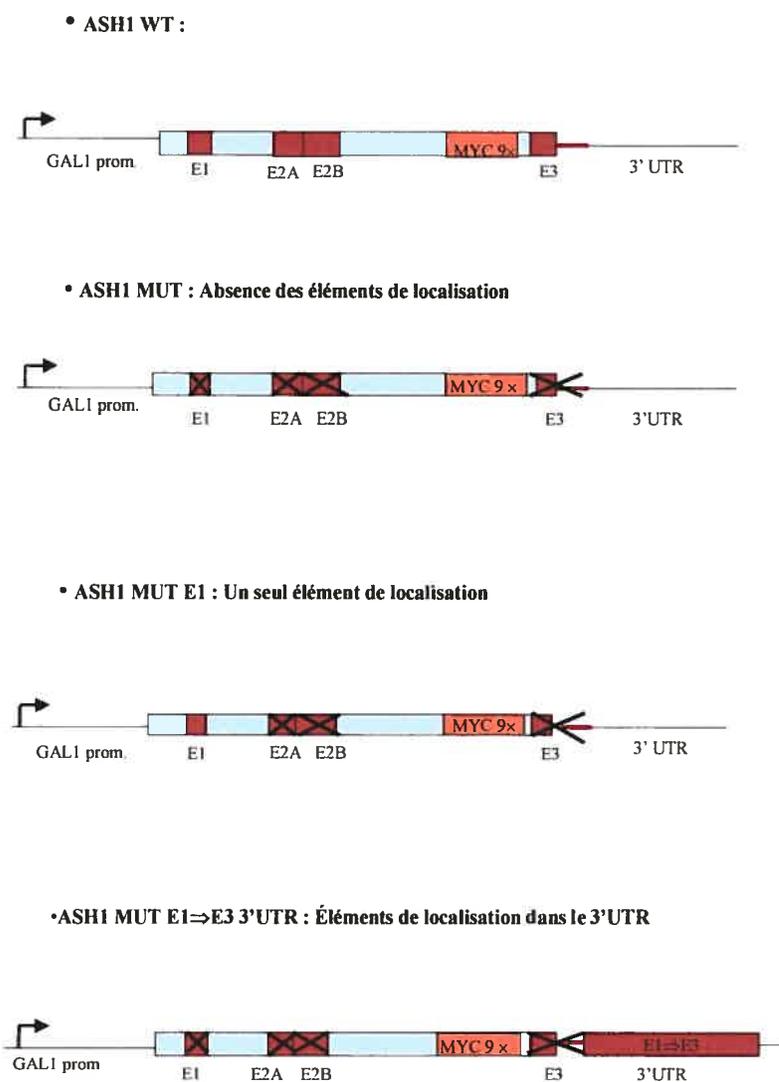


Figure 11 : Détail des constructions utilisées au cours de l'étude.

Les 2 premières constructions ont été décrites dans Chartrand et al. (2002). Les éléments de localisation ont été mutés de façon à détruire la structure tri-dimensionnelle de l'ARN en gardant la séquence codante intacte (conservation des acides aminés).

2.3. Clonage moléculaire :

La construction *ASH1-MUT-E1*⇒*E3 3'UTR* se trouvait dans le plasmide YIPlac128 sous le contrôle du promoteur endogène *ASH1*. Le promoteur *ASH1* a été enlevé et remplacé par le promoteur *GAL1* (*GAL1prom*). Pour cela, le plasmide YIPlac128-*GAL1prom-ASH1-MUT* ainsi que le plasmide YIPlac128-*ASH1-MUT-E1*⇒*E3 3'UTR* ont été soumis à une double digestion avec les enzymes de restriction *NcoI* et *PstI*. Ces digestions ont permis de retirer le promoteur *GAL1* du plasmide YIPlac128-*GAL1prom-ASH1-MUT*, et le promoteur *ASH1* du plasmide YIPlac128 - *ASH1-MUT-E1*⇒*E3 3'UTR*, puis de cloner le promoteur *GAL1* dans le plasmide YIPlac128-*ASH1-MUT-E1*⇒*E3 3'UTR*.

2.4. Transformation de levures :

Préalablement à la transformation des plasmides d'intégration dans les souches de levure, les plasmides ont été linéarisés par digestion avec *EcoRV* pour permettre leur intégration dans le gène *leu2* de la levure. Le protocole utilisé pour les transformations de levures a été décrit par Güldener et al. (1996).

Une culture de 5 mL de levure a été re-suspendue dans 50 mL de YPD à une D.O._{600nm} de 0,2. Lorsque la culture a atteint une D.O._{600nm} entre 0,7 et 1 les cellules ont été récupérées par centrifugation 5 minutes à 3 700 rpm. Celles-ci ont ensuite été re-suspendues dans 10 mL d'eau stérile puis centrifugées 5 minutes à 3 700 rpm. Les cellules ont été re-suspendues dans 1 mL d'eau stérile et transférées dans un tube de 1,5 mL puis à nouveau centrifugées pendant 1 minute et re-suspendues dans 1 mL de TE/LiOAc (0,1M LiOAc, 1X TE pH 7,5) stérile. Les cellules ont été centrifugées et re-suspendues dans 200 µL de TE/LiOAc. Parallèlement, l'ADN plasmidique digéré a été mélangé avec 50 µg d'ADN de sperme de saumon fraîchement dénaturé (20 minutes à 95°C). Cinquante µL de levures a été ajouté à l'ADN et mélangé doucement. Immédiatement, 300 µL de PEG 3350 à 40 % (1X TE pH 7,5, 0,1M LiOAc, 40% PEG 3350) stérile, fraîchement préparé, a été ajouté. Les cellules ont été incubées 30 minutes à 30 °C avec agitation puis à 42°C pendant 15 minutes, suivi par l'ajout de 800 µL d'eau stérile. Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 secondes, re-suspendues dans 1 mL de YPD et incubées 1

heure à température pièce en mélangeant par retournement de temps en temps. La totalité des cellules a été étalée sur pétri sans leucine et incubée à 30°C pendant 48 à 72 heures afin de sélectionner les levures ayant intégré le plasmide dans leur génome. De cette culture sur pétri, 1 colonie a ensuite été repiquée sur un nouveau pétri sans leucine afin de s'assurer que l'on travaille avec le même clone de départ. Ainsi, nous évitons des variations de résultats qui peuvent être dues à des différences dans l'intégration du plasmide.

Pour la transformation de plasmide autosomal dans la levure, le protocole de Knop et al. (1999) a été utilisé. D'une culture de 5 mL en milieu YPD, 0,5 mL de culture a été prélevé puis centrifugé pour récupérer les cellules. Au culot ont été ajoutés 10 µL d'ADN de sperme de saumon, 1 µL de plasmide et 0,5 mL de PEG 3350 40 %. Les culots ont été vortexés pour être re-suspendus puis laissés toute la nuit à température de la pièce. Après incubation, 100 µL de cellules a été étalé sur pétri sélectif et incubé 48 à 72 heures à 30°C.

2.5. Création d'une souche délétée pour le gène *KHD1* :

La délétion du gène *KHD1* a été faite par insertion d'une cassette kanamycine à la place du gène selon le protocole décrit dans l'article de Güldener et al (1996). Une cassette contenant le gène de résistance à la kanamycine (KAN) a été générée par PCR afin d'obtenir une grande quantité de cassette avec des extrémités complémentaires à 45 nucléotides du début et de la fin de la séquence codante du gène *KHD1*. Les amorces utilisées ont été : 5' *KHD1*-KAN : 5'-ATG TCA CAG TTC TTC GAA GCT GCT ACT CCC GTT GCA ATT CGC TGA AGC TTC GTA CGC TG-3' et 3' *KHD1*-KAN : 5'-GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT GTC ATG ATT CTC TTG AGG TTC TTC CTT GTC TTC CAA GAA-3' (les parties en gras soulignées sont les parties complémentaires au gène *KHD1*).

La réaction d'amplification a été effectuée en présence de 0,2 mM de dNTP, 25 pmole de chaque amorce, 1 unité de Vent polymérase (NEB), 1 µg d'ADN plasmidique pUG6 et du tampon de réaction 1X pour un volume final de 100 µL. Les réactions ont fait l'objet d'un « Hot Start » consistant à chauffer les échantillons 5 minutes à 98°C avant l'ajout de la polymérase. Par la suite, les échantillons ont été

amplifiés pendant 40 cycles consistants en une dénaturation à 98°C pendant 1 minute, un appariement à 50°C pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 2,5 minutes. Les 40 cycles ont été suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 4 minutes.

Après vérification sur gel d'agarose 1% de l'obtention d'un fragment à la bonne taille (1,6 Kb), 3 tubes de réactions PCR ont été réunis et l'ADN a été précipité à l'éthanol. L'ADN re-suspendu dans 12 µL d'eau a été transformé dans la souche K699 de la même façon que dans le chapitre 2.4. À la fin de la transformation, les cellules ont été placées à 30°C avec agitation pendant 3 heures puis étalées sur pétri YPD contenant du G-418 à 200 µg/mL pour sélectionner les cellules ayant intégré la cassette KAN- à la place du gène *KHDI*.

Après 48 heures de culture une réplique sur pétri YPD+G418 a été effectuée et placée à 30°C pendant 48 heures. Par la suite, 4 colonies différentes ont été repiquées sur YPD+G418. Après croissance sur pétri, ces 4 colonies ont été mises en milieu liquide YPD 5mL pour effectuer une extraction d'ADN génomique dans le but de vérifier la délétion du gène *KHDI*. Les cultures ont été centrifugées 5 minutes à 3 000 rpm pour récupérer les cellules. 0,5 mL de solution sorbitol (0,9 M sorbitol, 0,1M Tris pH 8 et 0,1M EDTA) a été ajouté aux cellules. Les culots ont été vortexés pour les re-suspendre, puis 50 µL d'une solution de zymolyase à 60 unités et 50 µL de β-mercapto-éthanol ont été ajoutés et mélangés doucement. Les échantillons ont alors été placés 1 heure à 37°C avec agitation. Par la suite, les échantillons ont été centrifugés 5 minutes à 3 000 rpm, re-suspendus avec 0,5 mL de Tris/EDTA (50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA) et transférés dans un tube de 1,5 mL. Cinquante µL de SDS 10% a été ajouté et incubé 20 minutes à 65°C. Au terme de cette incubation, 200 µL de potassium acétate 5 M a été ajouté et les tubes ont été placés sur glace pendant 30 minutes. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés 3 minutes et le surnageant a été récupéré dans un tube propre. Un mL d'éthanol 100% a été ajouté et le tout a été centrifugé 3 minutes à 13 000 rpm.

Le culot a été re-suspendu dans 300 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) et les tubes ont été placés à 65°C jusqu'à dissolution. Une fois le culot dissous, 50 µL de RNase A 1mg/mL a été ajouté et les échantillons ont été placés à 37°C pendant 1 heure, précipités avec 0,5 mL d'isopropanol 100%, puis centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm et à 4°C. Le culot a été transféré dans un

nouveau tube contenant 125 μL de tampon TE, auquel a été ajouté 200 μL de phénol/chloroforme. Les échantillons ont été vortexés, puis centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm à 4°C. La phase aqueuse a été récupérée et 2 volumes d'éthanol 100% ainsi qu'un volume correspondant à 1/10^e du volume de la phase aqueuse de NaOAc 3M ont été ajoutés. Après avoir vortexé, les échantillons ont été placés à -70°C pendant 15 minutes puis centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm et à 4°C. Les culots ont ensuite été lavés avec de l'éthanol 70%, centrifugés 5 minutes, puis les culots ont été re-suspendus dans 60 μL d'eau.

Les ADN génomiques des différents clones ont été utilisés pour faire une réaction de PCR afin de vérifier l'intégration de la cassette *KAN* au bon endroit. L'amorce sens utilisée se trouve au début du promoteur *KHDI* et a pour séquence : 5'-CCT ACC GGC CCT ATC GAA TT-3'. L'amorce antisens se trouve à la fin de la région 3' UTR du gène *KHDI* et a pour séquence : 5'-TTT GAA AGA TTA CGG GTG GCT-3'. De cette façon, si la cassette kanamycine s'est intégrée à la place du gène *KHDI* nous devons obtenir un produit PCR de 3,5 Kb, tandis que si l'intégration ne s'est pas faite nous obtiendrons un fragment de 3 Kb.

La réaction d'amplification a été effectuée en présence de 0,2 mM de dNTP, 25 pmole de chaque amorce, 1 unité de Taq polymérase (Amersham BioSciences), 1 μg d'ADN génomique et du tampon de réaction 1X pour un volume final de 100 μL . Les réactions ont fait l'objet d'un « Hot Start » 5 minutes à 95°C. Par la suite, les échantillons ont été amplifiés pendant 35 cycles consistants en une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, un appariement à 60°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 3,5 minutes. Les 35 cycles ont été suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 4 minutes. Les produits PCR obtenus ont été analysés sur gel d'agarose 1% .

2.6. Induction des constructions :

Toutes les constructions utilisées se trouvent sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose *GAL1prom* afin de permettre une induction à un temps t_0 . Pour permettre l'induction, les cultures ont été placées dans un milieu non inductible et non répressif permettant leur croissance. Dans un premier temps, une culture de 5 mL sur milieu sélectif -LEU, 2% glucose a été effectuée. Par la suite, la culture a été

diluée dans un milieu non inductible -LEU, 2% acide lactique pH 5,7, 3% glycérol, 0,05% glucose et placée à 30°C avec agitation toute la nuit. Enfin, le lendemain la culture a été diluée à une D.O._{600nm} de 0,2 dans un milieu -LEU, 2% acide lactique pH 5,7, 3% glycérol.

Lorsque la culture a atteint une densité optique de 0,5 les constructions ont été induites par ajout de 3% galactose. Un prélèvement de 25 mL de culture a été effectué à 0, 10, 20, 30, 40 et 60 minutes. Les prélèvements ont été placés dans un tube contenant 300 µL d'azoture de sodium 1 M pour arrêter la croissance des cellules. Les échantillons ont été centrifugés 5 minutes à 2 500 rpm, lavés avec 10 mL d'eau puis re-centrifugés 5 minutes à 2 500 rpm. Les culots ont été re-suspendus dans 1 mL d'eau, transférés dans un tube de 1,5 mL et centrifugés 5 secondes. Les culots ont alors été re-suspendus dans 0,5 mL de tampon d'extraction très froid (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % Glycérol, 2 % SDS, 5 % β-mercapto-éthanol, 0,0025 % bleu de bromophénol, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM benzamidine-HCl, 5 µg/mL pepstatine, 5 µg/mL leupeptine et 5 µg/mL aprotinine) et 0,5 mL de billes de verre a été ajouté. Les tubes ont alors été vortexés pendant 45 secondes et mis sur glace 45 secondes, 4 fois au total, puis centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant a été ensuite transféré dans un nouveau tube.

2.7. Gel d'électrophorèse de polyacrylamide et SDS et immunobuvardage de type Western :

À partir des extraits obtenus, 20 µL a été chargé sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide et SDS à 8 % d'acrylamide, les protéines séparées, puis transférées durant 2 heures sur une membrane de nitrocellulose (Hybond, Amersham BioScience) grâce à un Transblot SD Semi Dry Transfer Cell (Biorad) dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 195 mM glycine, 20 % méthanol). La membrane a ensuite été placée dans un tampon de blocage (PBS 1X, 5 % de lait faible en gras). La détection de la protéine Ash1-myc se fait grâce à un anticorps anti-myc 9E10 dilué au 1/5000^e et la protéine Pgk1 est détectée grâce à l'anticorps anti-Pgk1 dilué au 1/1000^e (Molecular Probes) dans du tampon PBS 1X, 1 % de lait faible en gras pendant 1 heure. Après 3 lavages avec du tampon 1X PBS/ 0,3 % Tween 20, la membrane a été incubée 30 minutes avec l'anticorps secondaire conjugué à la

peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) dilué au 1/5000^e dans du PBS 1X, 1 % de lait faible en gras. Après 5 lavages au PBS 1X / 0,3 % Tween 20 et 2 lavages au PBS 1X les protéines ont été détectées par kit ECLTM Western Blotting Analysis (Amersham). Les films obtenus ont été scannés et les bandes analysées grâce au logiciel Scion Image (Scion Corp.). L'intensité de chaque bande a été mesurée et reflète la quantité de protéines. La quantité de protéine Ash1 a alors été normalisée par rapport à la quantité de protéine Pgk1 provenant du même extrait.

2.8. Extraction des ARN totaux :

Pour mesurer la quantité d'ARNm produit par les différentes constructions, une cinétique de 60 minutes a été effectuée de la même façon que dans la section 2.6. Les cultures ont été arrêtées par ajout d'azoture de sodium et centrifugées 5 minutes à 3 700 rpm. Les culots ont été re-suspendus dans 400 μ L de tampon AE (50 mM acétate de sodium pH 5,3, 10 mM EDTA) puis transférés dans un tube de 1,5 mL. Quarante μ L de SDS 10 % a été ajouté et le tout a été vortexé. Un volume égal de phénol/chloroforme a été ajouté. Les tubes ont été vortexés puis placés à 65°C pendant 4 minutes. Les échantillons ont alors été rapidement refroidis dans un bain de glace sèche-éthanol puis centrifugés 2 minutes à 13 000 rpm. La phase aqueuse a été récupérée et un deuxième phénol/chloroforme a été effectué à température pièce 5 minutes. Quarante μ L d'acétate de sodium 3M pH 5,3 et 2,5 volumes d'éthanol 100 % ont été ajoutés à la phase aqueuse pour précipiter l'ARN. Les échantillons ont été centrifugés à 13 000 rpm et à 4°C pendant 15 minutes. Les culots ont été lavés avec de l'éthanol 80 %, séchés au lyophilisateur pendant 10 minutes puis re-suspendus dans 20 μ L d'eau. Les échantillons ont été dosés par mesure de la D.O._{260 nm} et ensuite stockés à -80°C.

2.9. Gel et hybridation de type Northern :

2.9.1. Génération des sondes :

Deux sondes ont été utilisées pour effectuer les buvardages de type Northern : une sonde pour détecter l'ARNm *ASH1* et une sonde pour l'ARNm *ACT1*. La sonde pour l'ARNm *ACT1* a servi de témoin d'hybridation et de chargement. La sonde pour l'ARNm *ASH1* a été produite par digestion enzymatique du plasmide C3319 contenant la séquence codante du gène *ASH1* avec les enzymes de restriction SphI et KpnI. Cela nous a permis d'obtenir un fragment de 1,7 Kb correspondant à la séquence codante du gène *ASH1*. Ce fragment a été élué grâce au QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen) puis dosé sur gel. La sonde *ACT1* a également été générée par digestion enzymatique (effectuée par Catherine Olivier).

Pour le marquage au P^{32} , 45 μL de la sonde *ASH1* (1 μg) et 1,5 μL de la sonde *ACT1* (1 μg) ont été dénaturés 3 minutes à 95°C puis mis sur glace pendant 2 minutes. Après une courte centrifugation chaque sonde a été placée dans un tube de bille du kit Ready-to-go DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham BioScience). Cinq μL de [α - ^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol) a été ajouté et le volume complété à 50 μL avec de l'eau. Les tubes ont ensuite été incubés 2 heures à 37°C. Les sondes marquées ont été purifiées sur colonnes de Sephadex G50 (Mini Quick Spin Columns ; Roche). Les sondes purifiées ont alors été comptées au compteur Rackbeta Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer). Le volume des sondes a ensuite été complété à 100 μL et 500 μL d'ADN de sperme de hareng a été ajouté. Les sondes ont été dénaturées 5 minutes à 100°C avant d'être ajoutées au tampon d'hybridation.

2.9.2. Buvardage de type Northern :

Vingt μg d'ARN totaux a d'abord été dénaturé dans un tampon contenant de la formamide à 65°C pendant 15 minutes, puis refroidis sur glace pendant 10 minutes. Les échantillons ont été chargés sur un gel d'agarose 1%, 6% formaldéhyde et migré à 80V pendant 4 heures. Les ARN ont ensuite été transférés sur membrane de nitrocellulose Hybond-XL (Amersham) avec du tampon 20X SSC pendant toute la nuit. La membrane a ensuite été lavée avec du tampon 6X SSC, séchée à l'air et

irradiée aux U.V. (Spectrolinker™ XL1000 UV Crosslinker, Spectronics Corporation) pendant 3 minutes. La membrane a été pré-hybridée pendant 30 minutes à 42°C avec du tampon de pré-hybridation (50 % Formamide, 6 SSC, 5X Denhardt's, 0,5 % SDS, 0,76 mg/mL ADN de sperme de hareng ; Denhardt's 100X : 2 % ficoll, 2 % polyvinyl Pyrolidone, 2 % BSA). Le tampon a ensuite été remplacé par du tampon d'hybridation (50 % Formamide, 1 M NaCl, 2,8X Denhardt's, 0,5 % SDS, 10 % Dextran) et les sondes de cDNA-P³² ont été ajoutées au tampon. L'hybridation a été effectuée toute la nuit à 42°C. Après hybridation, la membrane a été lavée 4 fois avec 2X SSC à température pièce puis 2 fois dans du 2X SSC, 0,1 % SDS à 65°C pendant 30 minutes. La membrane a ensuite été exposée à un film pour rayon X. Le film obtenu a été scanné et les bandes correspondant à l'ARNm *ASH1* et à l'ARNm *ACT1* ont été quantifiées grâce au logiciel Scion Image (Scion Corp.). Les mesures de quantité de l'ARNm *ASH1* ont ensuite été normalisées par la quantité d'ARNm *ACT1*.

2.10. Gradient de polysomes :

Une culture de 100 mL de levure a été effectuée en milieu sélectif jusqu'à une D.O._{600 nm} entre 1,0 et 1,5. De la cycloheximide a alors été ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de 100 µg/mL et la culture a été laissée sur glace 15 à 25 minutes. Ensuite, la culture a été centrifugée à 4 000 rpm pendant 10 minutes pour récupérer les cellules et lavée 2 fois avec de l'eau contenant de la cycloheximide à 100 µg/mL. Les cellules ont été lysées au vortex avec un volume égal de billes de verre dans du tampon de lyse 1X (25 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 5 mM β-mercapto-éthanol, 200 µg/mL cycloheximide, 2 µg/mL aprotinine, 1 mM PMSF, 0,5 µg/mL leupeptine, 2,9 µg/mL E64 qui est un inhibiteur de protéase, 1 µg/mL antipaïne qui est un inhibiteur de trypsine, papaïne et cathepsine A et B, 0,2 µg/mL chymostatine, 20 mM Vanadyl Ribonucléoside Complex qui est inhibiteur des ribonucléases). Le lysat a été transféré dans un tube propre et centrifugé à 6 500 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré et centrifugé à 14 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. La mesure de la D.O._{260 nm} du surnageant a été prise et 12 D.O._{260 nm} ont été chargées sur un gradient de saccharose 15-45 % (10 mM Tris pH 7,4, 70 mM NH₄Cl, 4 mM Mg(Oac)₂, les gradients ont été réalisés grâce au

Gradient Master 105, (BioComp). Le gradient a été centrifugé à 39 000 rpm à 4°C pendant 2,5 heures. Les fractions ont été récupérées en utilisant un Isco Gradient Fractionator et le profil ARN a été suivi par la mesure de la D.O._{254 nm}.

La moitié de chaque fraction a été immédiatement prélevée (~500 µL) et un volume égal de phénol/chloroforme a été ajouté. Les tubes ont été vortexés puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. La phase aqueuse a été prélevée et 40 µL de NaOAc 3M ainsi que 2,5 volumes d'éthanol 100 % ajoutés. Les fractions ont été centrifugées 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C. Les culots ont été lavés avec de l'éthanol 80 % puis séchés au lyophilisateur. La totalité de l'ARN obtenu a été utilisée pour effectuer un buvardage de type Northern comme décrit précédemment dans la section 2.9. Seule la sonde pour l'ARNm *ASH1* a été utilisée.

3. RÉSULTATS

Dans l'article de Chartrand et al (2002) nous avons constaté que, lorsque les éléments de localisation étaient mutés dans la séquence codante, la protéine Ash1 apparaissait plus vite. De la même façon, si les éléments de localisation étaient insérés au niveau de la région 3'UTR, nous restaurions la localisation de l'ARNm au bourgeon de la cellule fille ; mais la protéine Ash1 restait distribuée symétriquement de façon majoritaire et apparaissait également plus vite qu'avec un *ASH1* de type sauvage. Ces résultats suggèrent que les éléments de localisation ont une influence sur le taux de traduction de l'ARNm *ASH1*. Les expériences menées au cours de cette étude ont pour but de vérifier l'influence des éléments de localisation sur la traduction de l'ARNm *ASH1*. Tout d'abord, en regardant l'effet de l'absence de ces éléments dans la séquence codante, puis en regardant l'effet de la présence d'un seul élément de localisation (E1). Par la suite, nous souhaitons étudier l'effet de la protéine Khd1 sur la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Nous avons donc comparé les taux de traduction de l'ARNm *ASH1* lorsque la protéine Khd1 est présente et lorsqu'elle est absente. Enfin, nous avons regardé si la protéine Khd1 avait un effet sur l'association de l'ARNm *ASH1* avec les ribosomes en effectuant des gradients de polysomes.

Toutes les constructions ont été transformées dans la souche K699 *ASH1Δ* puis induites avec du galactose pour évaluer le niveau de protéine Ash1 produite. La construction YIPlac128 *Gal1prom-ASH1-MUT-E1⇒E3 3'UTR* ne donnant pas de résultats reproductibles, nous avons décidé de l'abandonner pour le reste des manipulations. Toutes les autres constructions donnent des résultats reproductibles.

3.1. Influence des éléments de localisation sur la synthèse de la protéine Ash1 :

L'évaluation de la quantité de protéine Ash1 produite a été faite en scannant les films des immunobuvardages de type Western obtenus. L'intensité de chaque bande a été mesurée grâce au logiciel Scion Image et normalisée par rapport à l'intensité de la bande de protéine Pgk1 correspondante. En effet, la protéine Pgk1 est une protéine abondante chez la levure et elle est exprimée de façon constitutive. Elle nous permet donc de normaliser toutes les mesures effectuées. Ces mesures nous permettent alors de tracer un graphique de densité relative (Ash1p/Pgk1p) en fonction du temps pour chaque construction. La densité relative reflète la quantité de protéine Ash1 par rapport à la quantité de protéine Pgk1. Les résultats obtenus proviennent d'au moins trois expériences indépendantes.

Comme nous pouvons le voir dans la figure 12.A., la protéine Ash1 apparaît entre 10 à 20 minutes après induction, quelle que soit la construction étudiée (un temps d'exposition plus long montre que la protéine apparaît avant 10 minutes d'induction). Par contre, la quantité de protéine produite semble varier selon l'ARNm considéré. En effet, pour l'ARNm de type sauvage, le maximum de protéine obtenue est de $0,23 \pm 0,04$ de densité relative tandis que, lorsque les éléments de localisation sont mutés (construction *ASH1-MUT*) nous observons environ 3 fois plus de protéine Ash1 avec un maximum de $0,72 \pm 0,08$ de densité relative. Enfin, lorsque seulement l'élément E1 est présent dans la séquence codante, nous observons un niveau équivalent à la construction de type sauvage avec un maximum de $0,24 \pm 0,072$ de densité relative (Figure 12.B et Table II).

De la même façon, si nous comparons les pentes des régions linéaires des différentes courbes, nous observons que pour l'ARNm de type sauvage, la vitesse d'apparition de la protéine Ash1 est de $0,011 \pm 0,002 \text{ min.}^{-1}$ alors que, pour l'ARNm avec les éléments de localisation mutés, la vitesse est de $0,031 \pm 0,009 \text{ min.}^{-1}$; soit environ 3 fois plus rapide. Enfin, l'ARNm possédant seulement l'élément E1 présente une vitesse de synthèse de $0,011 \pm 0,003 \text{ min.}^{-1}$, soit une vitesse équivalente à l'ARNm de type sauvage. (Table II).

Table II : Vitesse de synthèse de la protéine Ash1 et maximum de protéine obtenu avec les différents ARNm.

La vitesse de synthèse est représentée par la pente des différentes courbes obtenues et est exprimée en min^{-1} .

Constructions (ARNm)	Vitesse de synthèse de Ash1p (min^{-1})	Quantité maximale de protéine Ash1 obtenue (densité relative Ash1/Pgk1)
<i>ASH1 WT</i>	$0,011 \pm 0,002$	$0,23 \pm 0,04$
<i>ASH1 MUT</i>	$0,031 \pm 0,009$	$0,72 \pm 0,08$
<i>ASH1 MUT E1</i>	$0,011 \pm 0,003$	$0,24 \pm 0,07$

Ces résultats confirment le rôle joué par les éléments de localisation sur le niveau de synthèse de la protéine Ash1. Plus particulièrement, la position des éléments de localisation dans la séquence codante semble importante pour le contrôle de la vitesse de synthèse de la protéine Ash1 ainsi que pour réguler la quantité de protéine produite. Cependant, il semblerait que la présence de l'élément E1 soit suffisante pour rétablir une vitesse de synthèse et une quantité maximale équivalente au type sauvage. Pour expliquer ces résultats, il est possible que la structure secondaire formée par cet élément de localisation soit suffisamment stable pour affecter l'élongation des ribosomes et la traduction de cet ARNm. Une autre possibilité serait qu'une protéine interagisse avec l'élément E1 et que cette protéine régule la traduction de l'ARNm *ASH1*.

Cette possibilité nous a amené à étudier l'effet de la protéine Khd1 sur la cinétique de traduction de l'ARNm *ASH1*.

En effet, Irie et al. (2002) ont montré que la protéine Khd1 se lie à l'ARNm *ASH1* dans les 600 premiers nucléotides (ceci comprends l'élément E1). La sur-expression de la protéine Khd1 amène une réduction significative du niveau de la protéine Ash1, suggérant un rôle potentiel de la protéine Khd1 dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Nous avons donc décidé d'étudier les différentes constructions utilisées précédemment dans une souche délétée pour le gène *KHD1*

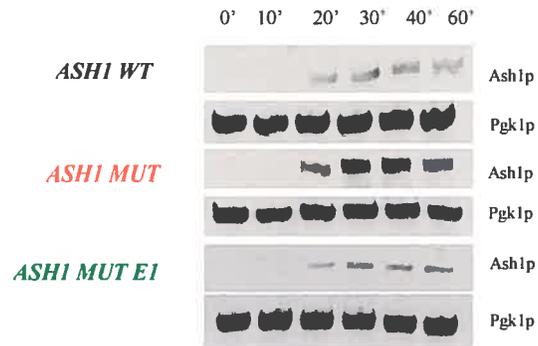
pour regarder l'effet de la protéine Khd1 sur le niveau de synthèse de la protéine Ash1.

3.2. Influence de la protéine Khd1 sur la synthèse de la protéine Ash1 :

Les constructions YIPlac128-*Gallprom-ASH1-WT* et YIPlac128-*Gallprom-ASH1-MUT* ont été transformées dans la souche K699 *KHD1Δ* comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Nous avons également effectué la transformation de la construction de type sauvage dans une souche K699 *SHE2Δ*. Cette nouvelle souche nous permet d'effectuer un contrôle supplémentaire et ainsi de s'assurer que les variations de niveaux de protéine obtenues ne sont pas dues au fait que la simple liaison d'une protéine à l'ARNm *ASH1*, comme le fait la protéine She2, n'affecte pas la traduction de cet ARNm.

Les constructions ont ensuite été induites pour effectuer les mêmes cinétiques que précédemment. Les films des immunobuvardages de type Western obtenus ont été scannés et chaque bande a été quantifiée grâce au logiciel Scion Image. De la même façon que dans 3.1, les mesures ont été normalisées par rapport à la protéine Pgk1 et le graphique de la densité relative de protéine par rapport au temps a été tracé (Figure 13). Sur le graphique 13.B nous observons que dans une souche *KHD1Δ*, pour l'ARNm de type sauvage, le maximum de protéine obtenu est de $0,5 \pm 0,1$ de densité relative tandis que, lorsque la souche est *KHD1* sauvage, la quantité maximale de protéine est de $0,23 \pm 0,04$ de densité relative. Donc, il y a environ 2 fois plus de protéine Ash1 produite lorsque le gène *KHD1* est délété, suggérant que la protéine Khd1 jouerait effectivement un rôle dans le contrôle du niveau de protéine Ash1. Cet effet de la protéine Khd1 sur le niveau de protéine Ash1 produite ne semble pas dû au fait que la protéine Khd1 lie l'ARNm *ASH1* dans sa séquence codante puisque la délétion de la protéine She2, qui lie aussi l'ARNm *ASH1* dans sa séquence codante, ne produit pas une telle augmentation de protéine Ash1 (Figure 13). Cet effet semble donc spécifique à la protéine Khd1.

A



B

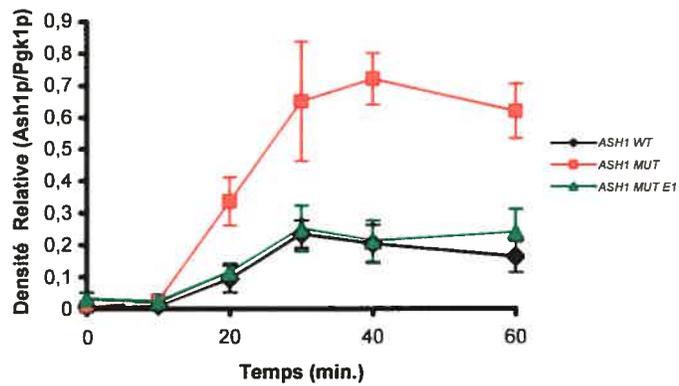


Figure 12 : Cinétiques de synthèse de la protéine Ash1 obtenues avec les différents ARNm.

A, Immunobuvardage de type Western. B, Normalisations des quantités de protéine obtenues.

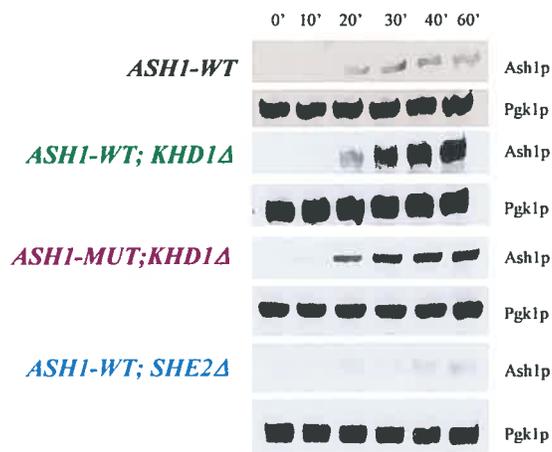
Si nous regardons la construction possédant les éléments de localisation mutés (construction *ASH1-MUT*), nous observons une quantité équivalente de protéine obtenue lorsque le gène *KHDI* est délété ou intact. En effet, nous avons un maximum de $0,64 \pm 0,06$ de densité relative lorsque le gène *KHDI* est délété et un maximum de $0,72 \pm 0,08$ de densité relative lorsque le gène *KHDI* est présent. De la même façon, si nous comparons les pentes des différentes courbes, nous observons que pour l'ARNm de type sauvage nous obtenons la même pente lorsque *KHDI* est délété et lorsqu'il est intact ($0,017 \pm 0,005 \text{ min.}^{-1}$ et $0,011 \pm 0,002 \text{ min.}^{-1}$ respectivement, cf. Table III). Il en est de même pour l'ARNm avec les éléments de localisation mutés avec une pente de $0,031 \pm 0,009 \text{ min.}^{-1}$ lorsque le gène *KHDI* est intact et $0,03 \pm 0,01 \text{ min.}^{-1}$ lorsque le gène *KHDI* est délété. Donc, il semblerait que la combinaison de la destruction des éléments de localisation et la délétion du gène *KHDI* n'ait pas d'effet synergique sur le niveau de synthèse de la protéine Ash1. De plus, la destruction des éléments de localisation, en plus d'augmenter le niveau de protéine Ash1 produite, a un effet plus prononcé sur la vitesse de synthèse de cette protéine comparativement à la délétion de *KHDI*.

Table III : Vitesse de synthèse de la protéine Ash1 et maximum de protéine obtenu avec les différents ARNm.

La vitesse de synthèse est représentée par la pente des différentes courbes obtenues et est exprimée en min.^{-1} .

Constructions (ARNm ; souche)	Vitesse de synthèse de Ash1p (min.^{-1})	Quantité maximale de protéine Ash1 obtenue (densité relative Ash1/Pgk1)
<i>ASH1-WT; WT</i>	$0,011 \pm 0,002$	$0,23 \pm 0,04$
<i>ASH1-WT; KHDIΔ</i>	$0,018 \pm 0,005$	$0,5 \pm 0,1$
<i>ASH1- MUT; WT</i>	$0,031 \pm 0,009$	$0,72 \pm 0,08$
<i>ASH1-MUT; KHDIΔ</i>	$0,03 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,06$
<i>ASH1-WT; SHE2Δ</i>	$0,003 \pm 0,001$	$0,09 \pm 0,03$

A



B

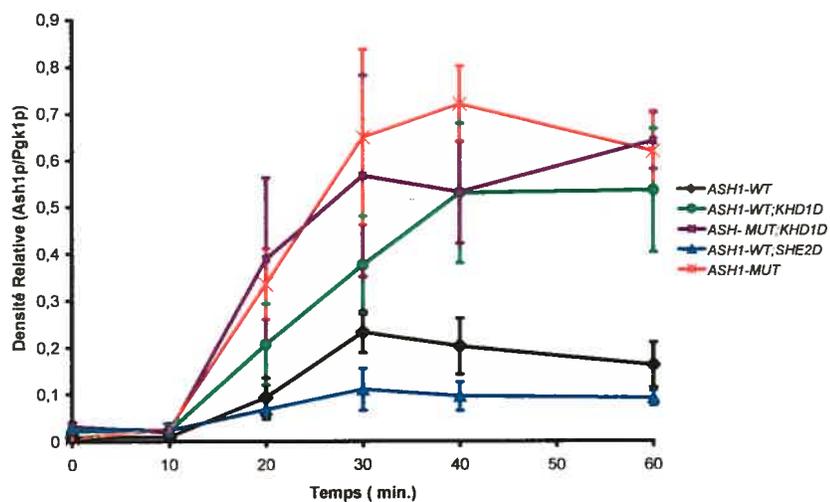


Figure 13 : Cinétiques de synthèse de la protéine Ash1 obtenues avec les différents ARNm.

A, Immunobuvardage de type Western. B, Normalisations des quantités de protéine obtenues.

3.3. Niveaux d'ARNm *ASH1* avec les différents mutants :

Après avoir obtenu ces résultats, nous avons vérifié que les variations de quantité de protéine Ash1 obtenues n'étaient pas dues à des variations dans la quantité d'ARNm transcrit. Les cinétiques ont donc été refaites en ne prélevant un échantillon qu'après 60 minutes d'induction. Les ARN totaux ont alors été extraits et des buvardages de type Northern ont été effectués comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les buvardages de type Northern ont été scannés et l'intensité des bandes a été mesurée grâce au logiciel Scion Image. Les mesures ont été normalisées par rapport à la quantité d'ARNm *ACT1* (actine). La figure 14.A montre un des buvardage de type Northern obtenu. La souche K699 *ASH1Δ* a été utilisée comme témoin négatif, on y obtient bien un signal pour l'ARNm *ACT1*, mais aucun signal pour l'ARNm *ASH1*.

Le graphique 14.B. montre les niveaux d'ARNm *ASH1* obtenus, normalisés par les niveaux d'ARNm *ACT1* correspondants. Tous les niveaux d'ARNm pour chaque construction sont inférieurs ou égaux au niveau d'ARNm pour la construction de type sauvage. Nous pouvons donc en conclure que les augmentations de niveaux de protéine Ash1 observées ne sont pas dues à une différence d'expression de l'ARNm *ASH1*, et qu'elles reflètent bien des variations dans le niveau traductionnel de ces ARNm.

Le graphique 15 montre les niveaux de protéine Ash1 à t=60 minutes normalisés avec les niveaux d'ARNm *ASH1* correspondant pour chaque construction. Ces niveaux sont comparés avec le niveau de protéine Ash1 obtenu pour la construction de type sauvage. Ainsi, nous pouvons voir que pour la construction *ASH1-MUT*, nous obtenons environ 8 fois plus de protéine par ARNm que pour l'ARNm *ASH1-WT*. Pour l'ARNm *ASH1-MUT-E1*, ainsi que pour le témoin *ASH1-WT* dans une souche *SHE2Δ*, nous obtenons la même quantité de protéine par ARNm que pour l'ARNm de type sauvage. Pour l'ARNm de type sauvage (*ASH1-WT*), dans une souche *KHD1Δ*, nous obtenons 2 fois plus de protéine par ARNm que dans une souche de type sauvage. Enfin, lorsque nous avons l'ARNm avec les éléments de localisation mutés (*ASH1-MUT*), dans la souche *KHD1Δ*, nous

obtenons presque 5 fois plus de protéine par ARNm que dans une souche de type sauvage. Ces résultats supportent l'hypothèse que les éléments de localisation ainsi que la protéine Khd1 joueraient un rôle dans le contrôle traductionnel de l'ARNm *ASH1*.

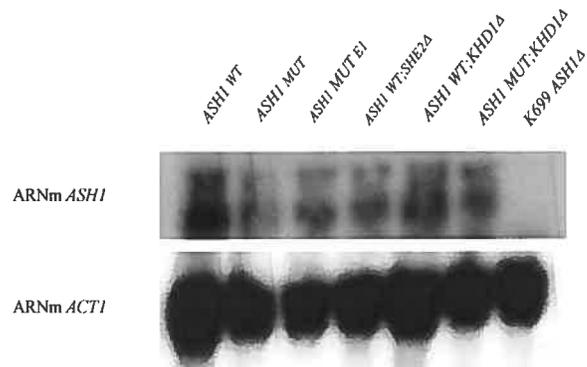
Pour l'ARNm *ASH1-WT* dans une souche *SHE2Δ*, même si le niveau de protéine Ash1 est plus bas que pour l'ARNm *ASH1-WT* dans une souche *SHE2-WT*, en normalisant avec le niveau d'ARNm, on obtient le même niveau Ash1p/ARNm *ASH1* qu'une souche de type sauvage.

3.4. Gradients de polysomes :

Nous avons par la suite étudié la distribution de l'ARNm *ASH1* dans la population de ribosomes. Une étude précédente a montré que l'ARNm *ASH1* était traduit par environ 3 ribosomes en moyenne, ce qui représente un faible niveau de traduction (Arava et al., 2003). Si la protéine Khd1 agit effectivement sur la traduction de l'ARNm *ASH1*, celui-ci devrait être détecté préférentiellement au niveau des monosomes. Par contre, dans une souche où la protéine Khd1 est absente, nous devrions observer un déplacement de l'ARNm *ASH1* vers les polysomes, soit vers les ribosomes en traduction, reflétant ainsi une absence de contrôle de l'initiation de la traduction.

Nous avons effectué des gradients de polysomes avec les souches K699 et K699 *KHD1Δ*. Pour s'assurer de détecter l'ARNm *ASH1*, qui est produit en faible quantité comparativement à d'autres ARNm, nous avons choisi de le sur-exprimer en transformant chaque souche avec un plasmide multicopie (C3319) contenant le gène *ASH1* sous son promoteur endogène. La méthode utilisée pour les gradients de polysomes a été décrite par Lang et Fridovich-Keil (2000) et Li et al. (2003). Des buvardages de type Northern ont été effectués sur chaque fraction obtenue comme décrit dans la section Matériel et Méthodes.

A



B

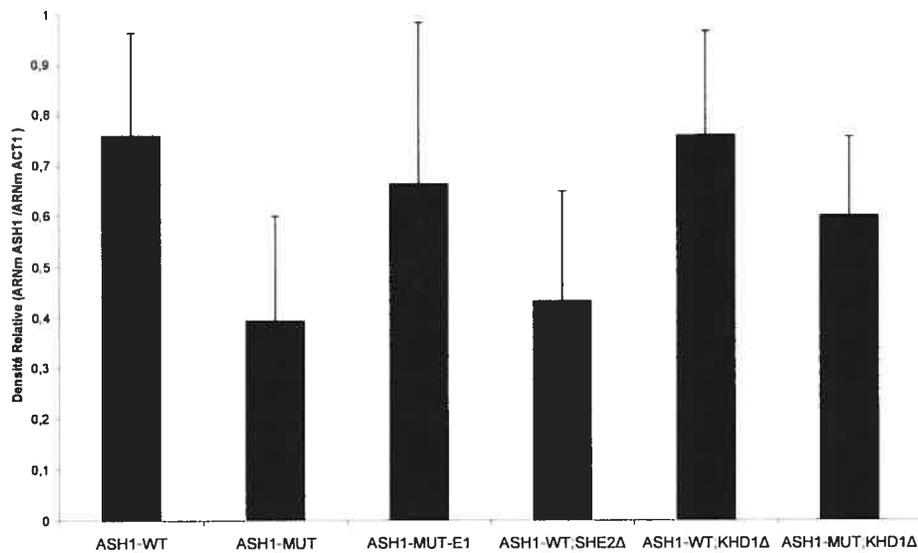


Figure 14 : Vérification des niveaux d'ARNm *ASH1* obtenus avec les différentes constructions.

A, Buvardage de type Northern. B, Normalisations des niveaux d'ARNm *ASH1* en fonction des niveaux d'ARNm *ACT1*.

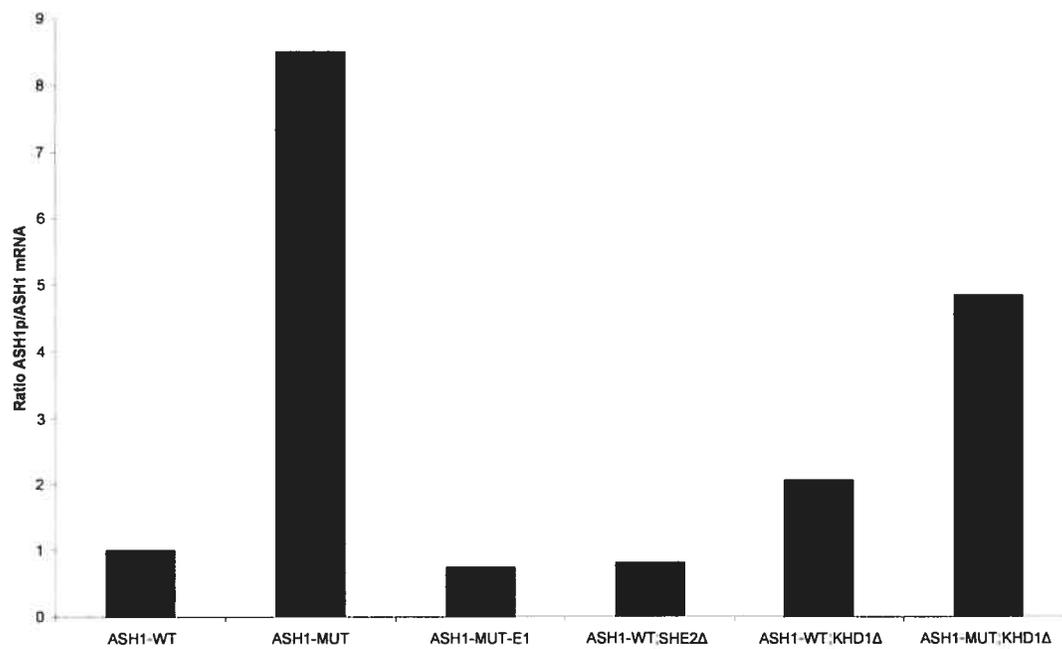


Figure 15 : Niveaux de protéine Ash1 obtenus.

Les niveaux sont normalisés avec la quantité d'ARNm *ASH1* transcrit pour chaque construction, par rapport à la construction de type sauvage.

La figure 16A montre le résultat obtenu pour la souche de type sauvage. De haut en bas, nous avons le profil de $D.O_{254\text{ nm}}$ obtenu lors de la récolte des fractions du gradient ; le profil des ARN ribosomaux sur gel d'agarose et le buvardage de type Northern obtenu pour l'ARNm *ASH1*. Comme nous pouvons le voir, le signal n'est pas très fort et a nécessité une exposition du film durant 2 semaines. Nous voyons cependant que la majorité de la population d'ARNm *ASH1* se retrouve au niveau de la fraction correspondant aux ribosomes 80S. Ceci signifie que peu de ribosomes sont assemblés sur cet ARNm, ce qui va dans le sens des résultats obtenus par Arava et al. (2003). La figure 16B montre les résultats obtenus pour la souche *KHD1Δ*. Le signal obtenu pour le buvardage de type Northern était beaucoup plus fort et n'a nécessité qu'une exposition d'une heure avec un K-Screen (Biorad). Nous constatons que la séparation des différentes fractions ne s'est pas faite correctement puisque nous ne voyons pas la fraction correspondant aux sous-unités 60S. Cependant, les résultats ont tout de même été analysés grâce à un Molecular Imager® FX (BioRad). Dans cette souche, nous observons que la population d'ARNm *ASH1* est maintenant distribuée au niveau des ribosomes 80S mais également au niveau des poly-ribosomes. Donc, dans une souche *KHD1Δ*, nous observons une redistribution de l'ARNm *ASH1* vers les ribosomes en traduction. Ces résultats supportent notre hypothèse selon laquelle la protéine Khd1 jouerait un rôle dans le contrôle de la traduction de l'ARNm *ASH1*, possiblement au niveau de l'initiation des ribosomes sur cet ARNm.

Les résultats obtenus pour la souche de type sauvage ont été répétés et confirmés. Par contre, les résultats obtenus pour la souche *KHD1Δ* doivent être confirmés.

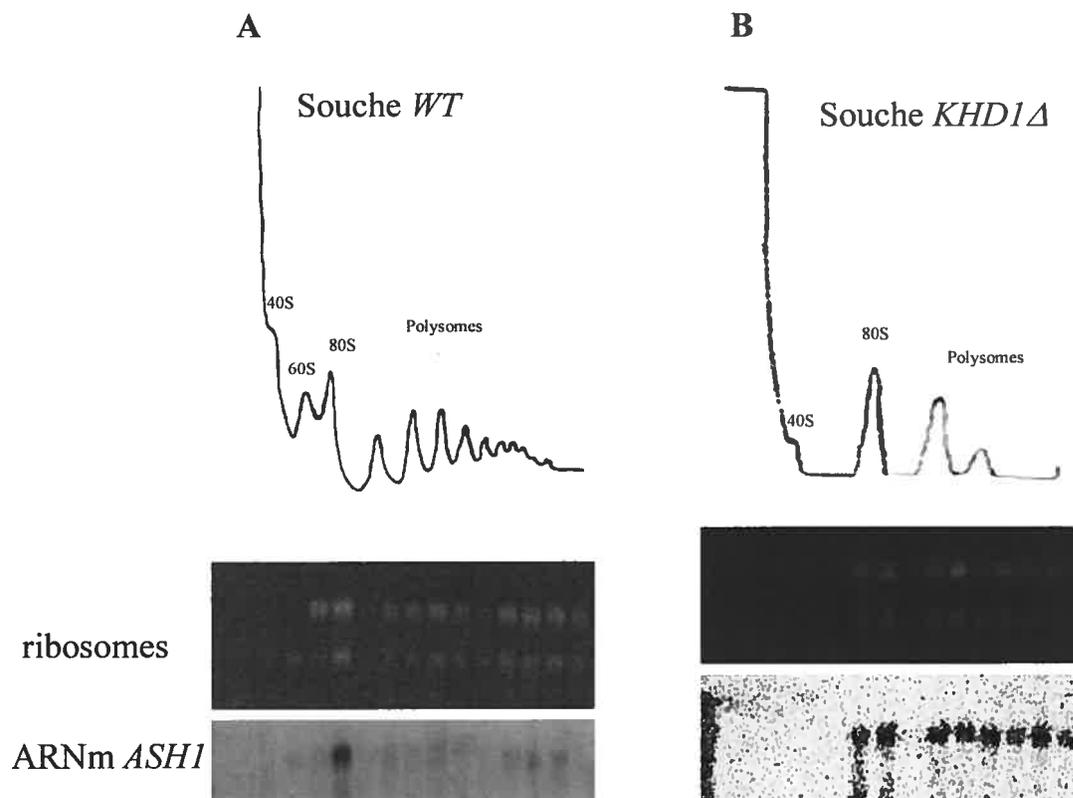


Figure 16 : Distribution de l'ARNm *ASH1* dans la population de ribosomes dans une souche *KHD1* sauvage et *KHD1Δ*.

De haut en bas : profil de D.O._{254 nm} ; Profil des ARN ribosomiaux sur gel d'agarose ; buvardage de type Northern pour l'ARNm *ASH1*. **A**, Souche de type sauvage. **B**, Souche *KHD1Δ*.

4. DISCUSSION

4.1. Rôle des éléments de localisation dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*:

Les ARNm localisés possèdent, en règle générale, des éléments de localisation dans leur région 3'UTR. Ces éléments de localisation sont reconnus par la machinerie de localisation et permettent ainsi le transport de l'ARNm à son site spécifique. La particularité de l'ARNm *ASH1* est que ces éléments de localisation se trouvent à l'intérieur de la séquence codante. Donc, outre le fait qu'ils soient essentiels pour permettre une localisation correcte de l'ARNm *ASH1* à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille, ces éléments de localisation pourraient avoir un rôle à jouer dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

Le but de cette étude est de regarder l'effet des éléments de localisation sur la vitesse de traduction de l'ARNm *ASH1*.

Nous avons donc commencé par comparer les cinétiques d'apparition de la protéine Ash1 des constructions avec et sans les éléments de localisation dans la séquence codante. La construction sans les éléments de localisation a été effectuée en mutant spécifiquement des codons, permettant ainsi de détruire la structure tridimensionnelle des éléments mais en maintenant la séquence codante intacte : utilisation de codons équivalents qui codent pour le même acide aminé ou un acide aminé de même type. Il a également été tenu compte de la rareté de certains codons. En effet, certains codons sont présents retrouvés moins fréquemment dans les ARNm et influencent ainsi, dans une certaine mesure, la vitesse de traduction de l'ARNm.

Si l'on compare les cinétiques d'apparition de la protéine Ash1 en présence et en absence des éléments de localisation dans la séquence codante (Figure 12, Table II, ainsi que Figure 15.), nous pouvons voir que lorsque les éléments de localisation sont absents, la protéine Ash1 n'apparaît pas plus tôt dans la cinétique. Cette observation peut signifier que les éléments de localisation dans la séquence codante

ne contrôlent pas l'initiation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Cependant, les expériences effectuées rendent compte de l'apparition de la protéine complète. Ici, nous ne pouvons pas différencier l'initiation de l'élongation. Par contre, la protéine est synthétisée en plus grande quantité puisque l'on obtient environ 3 fois plus de protéine qu'avec la construction de type sauvage. De plus, si nous regardons la vitesse à laquelle la protéine est produite, nous constatons que dans le cas de la construction *ASH1-MUT* la protéine est produite 3 fois plus vite. Il semblerait donc que les éléments de localisation jouent un rôle dans le niveau de traduction de l'ARNm *ASH1*. Ces résultats nous amènent à envisager 2 hypothèses différentes. La première est que la structure tridimensionnelle complexe des éléments de localisation va permettre le ralentissement du ribosome en élongation. En effet, devant une structure complexe de type tige-boucle, le ribosome va devoir effectuer une pause afin de défaire chaque structure avant de pouvoir continuer la synthèse de la protéine. La deuxième hypothèse est que ces éléments vont permettre la liaison d'un ou plusieurs facteurs ayant pour fonction de réguler le taux de traduction de l'ARNm *ASH1*. Ces résultats confirment les résultats obtenus par Chartrand et al. (2002) qui montraient que, lors d'une traduction *in vitro* dans des extraits de réticulocytes de lapin, la construction *ASH1* mutant, ne possédant aucun élément de localisation, était traduite plus efficacement que la construction *ASH1* de type sauvage.

Nous avons par la suite regardé l'effet d'un seul élément de localisation sur la cinétique de traduction de l'ARNm *ASH1*, en l'occurrence l'élément E1 car c'est le premier élément de localisation et que sa structure secondaire est la plus stable. De façon surprenante, lorsque l'élément E1 est présent dans la séquence codante nous retrouvons les caractéristiques de cinétique de la construction de type sauvage puisque la vitesse de synthèse, ainsi que la quantité maximale de protéine obtenue sont équivalentes. Cela peut s'expliquer de deux façons : soit l'élément E1 est suffisant pour réguler la traduction de l'ARNm *ASH1* (les autres éléments étant indispensables seulement pour une localisation optimale de l'ARNm) ; soit une protéine interagit avec l'élément E1 et régule la traduction de l'ARNm *ASH1*. Cette dernière hypothèse nous a amenés à étudier l'effet de la protéine Khd1 sur la cinétique de traduction de la protéine Ash1.

4.2. Rôle de la protéine Khd1 sur la traduction de l'ARNm *ASH1* :

La protéine Khd1 a été impliquée dans le processus de localisation-traduction de l'ARNm *ASH1* dans l'article de Irie et al. (2002). Dans cet article, les auteurs montrent que la protéine Khd1 se lie dans les 600 premiers nucléotides de l'ARNm *ASH1*. De plus, ils montrent également que la sur-expression de la protéine Khd1 affecte le niveau de protéine Ash1. Ces éléments nous ont fait considérer la protéine Khd1 comme candidat potentiel dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Nous avons donc comparé les cinétiques de traduction de l'ARNm *ASH1* en présence et en absence de la protéine Khd1 (figure 13, Table III, ainsi que figure 15). Les résultats obtenus suggèrent que la protéine Khd1 jouerait un rôle dans le contrôle du niveau de protéine Ash1 : une délétion du gène *KHDI* résulte en une augmentation du niveau de protéine Ash1 et cette même délétion provoque une redistribution de l'ARNm *ASH1* vers les poly-ribosomes.

L'ensemble de nos résultats nous amène à constater que les différents éléments de régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1* ne semblent pas avoir d'effet synergique. La protéine Khd1 et les éléments de localisation semblent avoir un effet indépendant sur la traduction de l'ARNm *ASH1*. En effet, lorsque les éléments de localisation sont mutés, nous observons une augmentation de la vitesse de synthèse, ainsi que de la quantité de protéine Ash1 produite, tandis que lorsque le gène *KHDI* est délété nous observons une augmentation de la quantité de protéine Ash1 produite mais pas de la vitesse de traduction de la protéine Ash1. Par contre, lorsque nous combinons la mutation des éléments de localisation avec la délétion du gène *KHDI*, nous n'observons pas d'effet plus important sur la vitesse de synthèse et la quantité de protéine Ash1 produite que lorsque les mutations sont étudiées séparément.

Avec les différents résultats obtenus, serait-il possible d'établir un modèle pour la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* ?

4.3. Modèle de régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1* :

Lors de la localisation de l'ARNm *ASH1* au bourgeon de la cellule fille, il se déroule une course entre la traduction de l'ARNm *ASH1* et la cytokinèse de la cellule. En effet, la traduction de l'ARNm *ASH1* doit être suffisamment ralentie pour éviter que la protéine Ash1 ne soit produite trop vite et en trop grande quantité, avant que la cytokinèse ait lieu, ce qui provoquerait une perte de l'asymétrie de la protéine Ash1, puisqu'elle serait alors capable de diffuser vers la cellule mère. Boven et Gullov (1979) ont montré que la vitesse d'élongation d'un ribosome était de 10 acides aminés par seconde dans la levure ; la protéine Ash1 a 588 acides aminés et devrait donc apparaître en environ 1 minute. Or, des résultats obtenus au laboratoire montrent qu'il y a un délai de 2 minutes entre le début de l'apparition d'ARNm *ASH1* localisé et l'apparition de protéines Ash1. L'élongation de l'ARNm *ASH1* prenant 1 minute, l'étape d'initiation, qui est une étape limitante du processus de traduction prendrait également 1 minute (Yannick Sylvestre, communication personnelle). Nous proposons que la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1* se ferait à 2 niveaux. Le premier niveau serait l'étape de l'initiation, contrôlée par la protéine Khd1 ; le deuxième niveau serait l'étape d'élongation contrôlée par les éléments de localisation dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1*.

La régulation traductionnelle par la protéine Khd1 nous fait poser plus de questions. En effet, il a été montré par Irie et al. (2002) que la protéine Khd1 se lierait dans les 600 premiers nucléotides de l'ARNm *ASH1*. Bien que ces 600 premiers nucléotides comprennent l'élément E1, il reste encore à prouver que la protéine Khd1 se lie à cet élément. Cependant, le fait que la présence seule de l'élément E1 dans la séquence codante suffise à ramener les niveaux de protéine ainsi que la vitesse d'apparition de celle-ci à des niveaux proches de ceux du type sauvage, nous amène à envisager la possibilité d'une interaction entre la protéine Khd1 et l'élément E1. De plus, les domaines KH de la protéine Khd1 possèdent des homologies avec les domaines KH des protéines Nova-2 et Nova-1. Ces protéines lient les ARNm au niveau d'une séquence répétée de UCAU dans la boucle d'une tige-boucle (Jensen et al., 2000). Or, la boucle supérieure de l'élément E1 est composée des nucléotides UCAUUCAA. Il se pourrait donc que la protéine Khd1 se lie à l'élément E1 au niveau de cette répétition.

Comme l'ont montré Denisenko et Bomszyk (2002), la protéine Khd1 est homologue de la protéine hnRNP K humaine. Cette dernière ayant été impliquée dans la régulation traductionnelle de la 15-lipoxygénase (Ostareck et al., 1997), cela supporte l'hypothèse de la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1* par la protéine Khd1. La protéine hnRNP K se lie à l'ARNm au niveau de la région 3'UTR et inhibe la traduction en empêchant la sous-unité 60S de se lier au complexe de pré-initiation 43S (Ostareck et al., 1997). Il semblerait que la protéine Khd1 n'agisse pas de la même façon. En effet, la protéine Khd1 se lie dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1* (Irie et al., 2002). De plus, les résultats obtenus avec les gradients de polysomes ainsi que les résultats obtenus par Arava et al. (2003) montrent que l'ARNm *ASH1* est lié à un monosome 80S. Donc, la protéine Khd1 permettrait le scanning par la sous-unité 40S jusqu'au codon d'initiation, ainsi que l'association de la sous-unité 60S, pour former le monosome 80S. La protéine Khd1 pourrait agir en bloquant ou en ralentissant le monosome 80S au niveau du codon d'initiation de l'ARNm. Il a été montré par purification d'affinité, que la protéine Khd1 se lierait aux facteurs d'initiation eIF4G, eIF4E ainsi que eIF2 (Gavin et al., 2002). Il n'a pas été montré si ces interactions se font directement, ni si elles se font en même temps ou successivement. La liaison au facteur eIF4E peut faire penser aux protéines 4E-BP qui se lient à eIF4E pour bloquer l'initiation de la traduction comme pour l'ARNm *Osk* par exemple (Matsumoto et al., 1996; Lasko, 2003; Wilhelm et al., 2003). Est-ce que la protéine Khd1 pourrait agir comme une 4E-BP ?

Les 4E-BP sont des protéines qui lient eIF4E et l'empêchent de recruter eIF4G pour initier la traduction (Mader et al., 1995). Un exemple de 4E-BP est la protéine Cup chez la drosophile. Celle-ci participe à l'inhibition de la traduction de plusieurs ARNm comme *Nos* et *Osk*. Dans le cas de l'ARNm *Nos*, qui forme un gradient postérieur-antérieur et spécifie ainsi le développement postérieur de l'embryon de la drosophile, Cup médie l'interaction entre Smg et eIF4E, bloquant ainsi l'interaction entre eIF4E et eIF4G (Nelson et al., 2004) et l'initiation de la traduction. La régulation des 4E-BP se fait par leur niveau de phosphorylation. En effet, lorsque les 4E-BP sont peu phosphorylées elles se lient à eIF4E et inhibent la traduction. Pour dé-réprimer la traduction, TOR va phosphoryler 4E-BP qui va alors libérer eIF4E pour sa liaison à eIF4G (Gingras et al., 2001; Crespo and Hall, 2002; Miron et al., 2003). La protéine Khd1 ne semble pas posséder de site consensus de phosphorylation. De plus, les 4E-BP ne lient pas eIF4G mais seulement eIF4E. Il

semblerait donc que si la protéine Khd1 possède des similitudes dans la régulation traductionnelle avec les 4E-BP, il y a des différences à noter. La protéine Khd1 pourrait, à l'inverse, agir en liant eIF4G de façon à inhiber la liaison de eIF4E. Il existe, chez la levure, une protéine qui se lie à eIF4G dans le noyau pour permettre l'export de l'ARNm vers le cytoplasme : la protéine CBP80, qui fait partie du Nuclear Cap Binding Complex (CBC). La protéine CBP80 lie eIF4G sur un site qui chevauche partiellement les sites de liaison de eIF4G à eIF4E et eIF4A. Lorsque l'ARNm se retrouve dans le cytoplasme, la protéine CBP80 est déplacée par eIF4E par interaction compétitive (Fortes et al., 2000). Dans le cas de la protéine Khd1, celle-ci pourrait lier eIF4G dans le noyau et participer à l'export de l'ARNm *ASH1* vers le cytoplasme. Par contre, son déplacement par eIF4E ne se ferait que lorsque l'ARNm *ASH1* serait localisé au bourgeon de la cellule fille. En effet, une fois l'ARNm localisé, celui-ci est ancré à l'extrémité du bourgeon. Cet ancrage permettrait un changement de conformation qui autoriserait le déplacement de la protéine Khd1 par eIF4E.

Une autre possibilité est que la protéine Khd1 agisse en liant eIF4G de façon à empêcher la liaison avec PABP, comme dans le cas des rotavirus. L'ARN des rotavirus code pour une protéine non structurale, appelée NSP3. La protéine NSP3 peut interagir avec la partie N-terminale de eIF4G. La formation du complexe NSP3-eIF4G expulse la protéine PABP du complexe eIF4F et inhibe ainsi la traduction cellulaire de l'hôte (Piron et al., 1998).

Enfin, Il est possible que la protéine Khd1 se lie simultanément avec eIF4E et eIF4G. Cette liaison pourrait empêcher l'interaction directe entre ces 2 protéines, gênant ainsi leur fonctions ultérieures. Cette inhibition pourrait mener à la formation d'une structure défavorable aux étapes suivantes de l'initiation. Effectivement, la liaison de eIF4E et eIF4G, qui lie PABP, permet la formation d'une structure circulaire importante pour l'efficacité de l'initiation de la traduction (Gunkel et al., 1998). La liaison de la protéine Khd1 avec eIF4E et eIF4G pourrait diminuer l'efficacité de l'initiation et ainsi ralentir le processus traductionnel. Il n'y aurait donc pas une inhibition totale mais seulement un ralentissement de l'initiation. Ce qui expliquerait pourquoi nous trouvons l'ARNm *ASH1* dans la fraction des monosomes lorsque nous faisons des gradients de polysomes. Cependant, le signal obtenu pour le buvardage de type Northern, effectué après le gradient de polysomes pour la souche *KHDI* de type sauvage, était très faible. Nous ne pouvons pas

conclure que l'ARNm *ASH1* se trouve exclusivement dans la fraction des monosomes. Il est probable qu'en ayant un signal plus fort, nous observerions une partie de l'ARNm *ASH1* au niveau des polysomes. Par contre, nous nous attendrions à ce que la quantité d'ARNm *ASH1* associé aux polysomes soit plus importante dans une souche *KHD1Δ* que dans une souche *KHD1* de type sauvage. Ces expériences doivent être refaites pour permettre une confirmation des résultats.

Par la suite, lorsque l'initiation est terminée, le deuxième niveau de régulation entre en jeu. En effet, de la même façon que l'initiation a été ralentie, les éléments de localisation vont ralentir le ribosome en élongation. La structure tridimensionnelle des éléments de localisation permet une reconnaissance par la machinerie de localisation. Mais, de par leur position à l'intérieur de la séquence codante de l'ARNm *ASH1*, ces éléments de localisation ont un rôle à jouer dans la régulation traductionnelle de cet ARNm. Il est connu que ce genre de structure, à l'intérieur d'une séquence codante, est suffisante pour freiner le ribosome et ralentir la traduction de l'ARNm. En effet, il a été montré que des structures secondaires complexes comme des pseudo-nœuds provoquent une pause du ribosome lors de la traduction d'un ARNm. Une structure tige-boucle aura moins d'effet, mais permettra tout de même un ralentissement significatif du ribosome en élongation (Somogyi et al., 1993; Lopinski et al., 2000). Le ralentissement de ces 2 étapes de la traduction va faire que l'ARNm *ASH1* aura le temps d'être localisé à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille avant que la protéine Ash1 ne soit complètement synthétisée. Ce mécanisme serait en accord avec les résultats de Gonzalez et al. (1999), qui montraient que la partie C-terminale de la protéine Ash1 serait nécessaire à l'ancrage de l'ARNm à son site spécifique, étant donné que la traduction n'est pas complètement inhibée mais seulement ralentie par les différents acteurs de la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1*.

5. Perspectives :

Il reste encore beaucoup de choses à élucider et à confirmer sur la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Il faudrait tout d'abord confirmer les résultats obtenus avec les gradients de polysomes. Par la suite, il serait intéressant de regarder si la protéine Khd1 se lie avec les ribosomes par co-immunoprécipitation.

Il serait également intéressant d'effectuer des gradients de polysomes avec la construction *ASH1-MUT* pour voir si, lorsque les éléments de localisation sont absents de la séquence codante, l'ARNm se retrouve en traduction active, donc dans les poly-ribosomes. Ensuite, l'influence de la protéine Khd1 sur la traduction pourrait être confirmée par traduction *in vitro*. Il serait également important dans un futur proche de déterminer, d'une part exactement le site de liaison de la protéine Khd1 sur l'ARNm *ASH1*, et d'autre part, quelle partie de la protéine Khd1 est utilisée pour lier l'ARNm. De la même façon il serait intéressant d'étudier en détail la liaison de la protéine Khd1 avec les différents facteurs d'initiation de la traduction : eIF4E, eIF4G et eIF2. Il faudrait déterminer si ces interactions sont directes et si oui déterminer les sites d'interaction. De cette façon, nous pourrions savoir si la liaison des différents facteurs se fait simultanément ou de façon séquentielle.

6. CONCLUSIONS

Au cours de cette étude, nous avons analysé les différentes composantes de la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1*. Le système de régulation qui semble agir ici ne ressemble à aucun autre mécanisme de régulation traductionnelle connu à ce jour. En effet, la plupart des mécanismes de régulation traductionnelle consistent en un ou plusieurs inhibiteurs qui stoppent complètement la traduction, généralement à l'étape de l'initiation, puis de un ou plusieurs activateurs pour démarrer la traduction lorsque l'ARNm est correctement localisé à son site spécifique dans la cellule ou l'organisme en développement. Dans le mécanisme de régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1*, plusieurs paramètres entrent en jeu : d'une part, la protéine Khd1 et, d'autre part, les éléments de localisation présents dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1*. Cependant, il semblerait que l'ensemble de ces acteurs n'agissent pas en stoppant totalement la traduction mais seulement en ralentissant suffisamment le ribosome pour que l'ARNm ait le temps d'être correctement localisé avant l'apparition des premières protéines. Une fois localisé, l'ARNm doit être ancré à son site spécifique et la protéine Ash1 participe à ce processus (Gonzalez et al., 1999).

Lorsque l'ARNm *ASH1* est transcrit, il est pris en charge par le locosome constitué des protéines She qui vont permettre le mouvement le long des filaments d'actine vers l'extrémité du bourgeon de la cellule fille (Chartrand et al., 2001). En même temps la protéine Khd1, qui est une homologue à hnRNP K, va se lier à l'ARNm *ASH1* (Ostareck et al., 1997; Irie et al., 2002). De par sa capacité de liaison avec les facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E, eIF4G et eIF2), la protéine Khd1 va ralentir le processus d'initiation de la traduction. Soit en créant une structure défavorable, non optimale, pour la fixation des différents facteurs d'initiation, soit éventuellement en liant ces facteurs directement, de façon transitoire, pour les empêcher de se fixer aux autres facteurs d'initiation ou à l'ARNm. Une fois que l'initiation est terminée, ce sont les éléments de localisation ainsi que la machinerie de localisation qui vont ralentir le ribosome en élongation. En effet, la structure tridimensionnelle des éléments de localisation, et les protéines du

locosome qui sont fixées dessus forment un obstacle à la progression du ribosome. Cet encombrement va obliger le ribosome à faire des pauses pour défaire les structures avant de pouvoir continuer l'élongation. Une fois l'ARNm localisé, les premières protéines apparaissent et participent à l'ancrage de celui-ci à l'extrémité du bourgeon. Ainsi, l'ARNm va pouvoir être activement traduit à son site spécifique. La protéine va alors se localiser au noyau et inhiber la transcription de l'endonucléase Ho.

Ce mécanisme de régulation de la traduction est un mécanisme spatio-temporel qui nécessite une fine synchronisation des événements qui se produisent dans la cellule. L'avantage d'un tel mécanisme est que si une des composantes destinées à ralentir le ribosome est absente, les autres acteurs vont tout de même pouvoir agir, évitant ainsi des événements catastrophiques pour la cellule.

7. Liste des références

- Amon, A. (1996). Mother and daughter are doing fine: asymmetric cell division in yeast. *Cell* *84*, 651-4.
- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J.D., Liu, C.L., Brown, P.O., and Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3889-94.
- Ashman, W.H., Barbuch, R.J., Ulbright, C.E., Jarrett, H.W., and Bard, M. (1991). Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. *Lipids* *26*, 628-32.
- Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H., and Nasmyth, K. (1996). Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* *84*, 699-709.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., and Jansen, R.P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J* *19*, 5514-24.
- Bonven, B. and Gullov, K. (1979). Peptide chain elongation rate and ribosomal activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the growth rate. *Mol Gen Genet* *170*, 225-30.
- Bovee, M.L., Lamphear, B.J., Rhoads, R.E., Lloyd, R.E. (1998). Direct cleavage of eIF4G by poliovirus 2A protease is inefficient in vitro. *Virology* *245*, 241-249.
- Castagnetti, S., Hentze, M.W., Ephrussi, A., and Gebauer, F. (2000). Control of oskar mRNA translation by Bruno in a novel cell-free system from *Drosophila* ovaries. *Development* *127*, 1063-8.
- Cha, B.J., Koppetsch, B.S., and Theurkauf, W.E. (2001). In vivo analysis of *Drosophila* bicoid mRNA localization reveals a novel microtubule-dependent axis specification pathway. *Cell* *106*, 35-46.
- Chang, J.S., Tan, L., and Schedl, P. (1999). The *Drosophila* CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes. *Dev Biol* *215*, 91-106.
- Chartrand, P., Meng, X.H., Huttelmaier, S., Donato, D., and Singer, R.H. (2002). Asymmetric sorting of ash1p in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol Cell* *10*, 1319-30.

- Chartrand, P., Meng, X.H., Singer, R.H., and Long, R.M. (1999). Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol* 9, 333-6.
- Chartrand, P., Singer, R.H., and Long, R.M. (2001). RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 297-310.
- Clark, I.E., Wyckoff, D., and Gavis, E.R. (2000). Synthesis of the posterior determinant Nanos is spatially restricted by a novel cotranslational regulatory mechanism. *Curr Biol* 10, 1311-4.
- Courchesne, W.E., Kunisawa, R., and Thorner, J. (1989). A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* 58, 1107-19.
- Crespo, J.L. and Hall, M.N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 579-91, table of contents.
- Crucs, S., Chatterjee, S., and Gavis, E.R. (2000). Overlapping but distinct RNA elements control repression and activation of nanos translation. *Mol Cell* 5, 457-67.
- Cuesta, R., Xi, Q., Schneider, R.J. (2000). Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *EMBO J* 19, 3465-3474.
- Darzacq, X., Powrie, E., Gu, W., Singer, R.H., and Zenklusen, D. (2003). RNA asymmetric distribution and daughter/mother differentiation in yeast. *Curr Opin Microbiol* 6, 614-20.
- de Moor, C.H. and Richter, J.D. (1999). Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. *EMBO J* 18, 2294-303.
- Denisenko, O. and Bomsztyk, K. (2002). Yeast hnRNP K-like genes are involved in regulation of the telomeric position effect and telomere length. *Mol Cell Biol* 22, 286-97.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M., and Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276, 118-22.
- Fortes, P., Inada, T., Preiss, T., Hentze, M.W., Mattaj, I.W., Sachs, A.B. (2000). The yeast nuclear binding complex can interact with translation factor eIF4G and mediate translation initiation. *Mol Cell* 6, 191-196.

- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edlmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* *415*, 141-7.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* *74*, 527-34.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* *15*, 807-26.
- Gonsalvez, G.B., Lehmann, K.A., Ho, D.K., Stanitsa, E.S., Williamson, J.R., and Long, R.M. (2003). RNA-protein interactions promote asymmetric sorting of the *ASH1* mRNA ribonucleoprotein complex. *RNA* *9*, 1383-99.
- Gonzalez, I., Buonomo, S.B., Nasmyth, K., and von Ahsen, U. (1999). *ASH1* mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and *Ash1* protein translation. *Curr Biol* *9*, 337-40.
- Groisman, I., Huang, Y.S., Mendez, R., Cao, Q., Theurkauf, W., and Richter, J.D. (2000). CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* *103*, 435-47.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* *24*, 2519-24.
- Gunkel, N., Yano, T., Markussen, F.H., Olsen, L.C., and Ephrussi, A. (1998). Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev* *12*, 1652-64.
- Hazelrigg, T. (1998). The destinies and destinations of RNAs. *Cell* *95*, 451-60.
- Hill, M.A. and Gunning, P. (1993). Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J Cell Biol* *122*, 825-32.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K., and Herskowitz, I. (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of *ASH1* mRNA in yeast. *EMBO J* *21*, 1158-67.
- Jansen, R.P. (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 247-56.

- Jensen, K.B., Musunuru, K., Lewis, H.A., Burley, S.K., and Darnell, R.B. (2000). The tetranucleotide UCA_n directs the specific recognition of RNA by the Nova K-homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5740-5.
- Johnstone, O. and Lasko, P. (2001). Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu Rev Genet* *35*, 365-406.
- Juschke, C., Ferring, D., Jansen, R.P., and Seedorf, M. (2004). A novel transport pathway for a yeast plasma membrane protein encoded by a localized mRNA. *Curr Biol* *14*, 406-11.
- Karpova, T.S., Reck-Peterson, S.L., Elkind, N.B., Mooseker, M.S., Novick, P.J., and Cooper, J.A. (2000). Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* *11*, 1727-37.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* *181*, 3330-40.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A.P., Allen, L.H., Zearfoss, N.R., and Etkin, L.D. (2001). RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol* *203*, 63-91.
- Kloc, M., Zearfoss, N.R., and Etkin, L.D. (2002). Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* *108*, 533-44.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* *15*, 963-72.
- Korner, C.G., Wormington, M., Muckenthaler, M., Schneider, S., Dehlin, E., and Wahle, E. (1998). The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* *17*, 5427-37.
- Kovacech, B., Nasmyth, K., and Schuster, T. (1996). EGT2 gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol Cell Biol* *16*, 3264-74.
- Kozak, M. (1986). Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 2850-2854.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eucaryotes. *Gene* *234*, 187-208.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* *299*, 1-34.
- Kruse, C., Jaedicke, A., Beaudouin, J., Bohl, F., Ferring, D., Guttler, T., Ellenberg, J., and Jansen, R.P. (2002). Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J Cell Biol* *159*, 971-82.

- Kwon, S. and Schnapp, B.J. (2001). RNA localization: SHedding light on the RNA-motor linkage. *Curr Biol* *11*, R166-8.
- Lang, B.D. and Fridovich-Keil, J.L. (2000). Scp160p, a multiple KH-domain protein, is a component of mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* *28*, 1576-84.
- Lasko, P. (2003). Cup-ling oskar RNA localization and translational control. *J Cell Biol* *163*, 1189-91.
- Lauring, B., Sakai, H., Kreibich, G, Wiedmann, M. (1995). Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5411-5415.
- Leibowitz, R., Penman, S. (1971). Regulation of protein synthesis in HeLa cells. 3. Inhibition during poliovirus infection. *J. Virol.* *8*, 661-668.
- Li, A.M., Watson, A., and Fridovich-Keil, J.L. (2003). Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res* *31*, 1830-7.
- Lie, Y.S. and Macdonald, P.M. (1999). Apontic binds the translational repressor Bruno and is implicated in regulation of oskar mRNA translation. *Development* *126*, 1129-38.
- Lloyd, R.E., Toyoda, H., Etchison, D., Wimmer, E., Ehrenfeld, E. (1986). Cleavage of the cap binding protein complex polypeptide p220 is not effected by the second poliovirus protease 2A. *Virology* *150*, 299-303.
- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J* *19*, 6592-601.
- Long, R.M., Gu, W., Meng, X., Gonsalvez, G., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2001). An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J Cell Biol* *153*, 307-18.
- Lopez de Heredia, M. and Jansen, R.P. (2004). mRNA localization and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 80-5.
- Lopinski, J.D., Dinman, J.D., and Bruenn, J.A. (2000). Kinetics of ribosomal pausing during programmed -1 translational frameshifting. *Mol Cell Biol* *20*, 1095-103.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* *15*, 4990-7.
- Mansfield, J.H., Wilhelm, J.E., and Hazelrigg, T. (2002). Ypsilon Schachtel, a *Drosophila* Y-box protein, acts antagonistically to Orb in the oskar mRNA localization and translation pathway. *Development* *129*, 197-209.

- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., and Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* 3, 159-64.
- Markesich, D.C., Gajewski, K.M., Nazimiec, M.E., and Beckingham, K. (2000). bicaudal encodes the Drosophila beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery*. *Development* 127, 559-72.
- Matsumoto, K., Meric, F., and Wolffe, A.P. (1996). Translational repression dependent on the interaction of the Xenopus Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *J Biol Chem* 271, 22706-12.
- Maxon, M.E. and Herskowitz, I. (2001). Ash1p is a site-specific DNA-binding protein that actively represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1495-500.
- Miron, M., Lasko, P., and Sonenberg, N. (2003). Signaling from Akt to FRAP/TOR targets both 4E-BP and S6K in Drosophila melanogaster. *Mol Cell Biol* 23, 9117-26.
- Munchow, S., Sauter, C., and Jansen, R.P. (1999). Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins. *J Cell Sci* 112 (Pt 10), 1511-8.
- Nasmyth, K. (1993). Regulating the HO endonuclease in yeast. *Curr Opin Genet Dev* 3, 286-94.
- Nelson, M.R., Leidal, A.M., and Smibert, C.A. (2004). Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO J* 23, 150-9.
- Nickas, M.E. and Yaffe, M.P. (1996). BRO1, a novel gene that interacts with components of the Pkc1p-mitogen-activated protein kinase pathway in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* 16, 2585-93.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M., and Hentze, M.W. (1997). mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell* 89, 597-606.
- Pan, X. and Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol* 20, 8364-72.
- Peterson, C.L., Dingwall, A., and Scott, M.P. (1994). Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2905-8.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17, 5811-5821.

- Powers, T., Walter, P. (1996). The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. *Curr Biol* 6, 331-338.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B., and Levin, D.E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 3969-76.
- Rouault, T.A. (2002). Post-transcriptional regulation of human iron metabolism by iron regulatory proteins. *Blood Cells Mol Dis* 29, 309-14.
- Saffman, E.E., Styhler, S., Rother, K., Li, W., Richard, S., and Lasko, P. (1998). Premature translation of oskar in oocytes lacking the RNA-binding protein bicaudal-C. *Mol Cell Biol* 18, 4855-62.
- Salles, F.J., Lieberfarb, M.E., Wreden, C., Gergen, J.P., and Strickland, S. (1994). Coordinate initiation of *Drosophila* development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs. *Science* 266, 1996-9.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L., and Vale, R.D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11429-34.
- Sil, A. and Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* 84, 711-22.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., and Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res* 21, 1193-8.
- Somogyi, P., Jenner, A.J., Brierley, I., and Inglis, S.C. (1993). Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot. *Mol Cell Biol* 13, 6931-40.
- St Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S., and Nusslein-Volhard, C. (1989). Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* 107 *Suppl*, 13-9.
- Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C.H., Mendez, R., and Richter, J.D. (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell* 4, 1017-27.
- Tafari, S.R. and Wolffe, A.P. (1993). Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J Biol Chem* 268, 24255-61.
- Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E., and Vale, R.D. (2000). Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* 290, 341-4.

- Takizawa, P.A. and Vale, R.D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5273-8.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y., and Igarashi, K. (1999). Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J Biol Chem* 274, 3265-7.
- van Eeden, F.J., Palacios, I.M., Petronczki, M., Weston, M.J., and St Johnston, D. (2001). Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *J Cell Biol* 154, 511-23.
- Wendland, B., McCaffery, J.M., Xiao, Q., and Emr, S.D. (1996). A novel fluorescence-activated cell sorter-based screen for yeast endocytosis mutants identifies a yeast homologue of mammalian eps15. *J Cell Biol* 135, 1485-500.
- Wesche, S., Arnold, M., and Jansen, R.P. (2003). The UCS Domain Protein She4p Binds to Myosin Motor Domains and Is Essential for Class I and Class V Myosin Function. *Curr Biol* 13, 715-24.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A., Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370, 434-440.
- Wilhelm, J.E., Hilton, M., Amos, Q., and Henzel, W.J. (2003). Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of oskar and the recruitment of Barentsz. *J Cell Biol* 163, 1197-204.
- Wreden, C., Verrotti, A.C., Schisa, J.A., Lieberfarb, M.E., and Strickland, S. (1997). Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development* 124, 3015-23.
- Wu, X., Moore, J.K., and Haber, J.E. (1996). Mechanism of MAT alpha donor preference during mating-type switching of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 657-68.
- Yisraeli, J.K., Sokol, S., and Melton, D.A. (1990). A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 108, 289-98.



001-100-1000