

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par  
**UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA**

Préparée au sein de l'école doctorale :  
« Energie Environnement » ED 305

Et de l'unité de recherche :  
Laboratoire Génome et Développement des Plantes  
UMR 5096

Spécialité : Biologie

Présentée par  
**Elodie BILLEY**

**Caractérisation fonctionnelle de la sous-famille  
LARP6 chez *Arabidopsis thaliana* :  
mise en évidence du rôle de LARP6c dans le pollen.**

Soutenue le 2 octobre 2015 devant le jury composé de :

Dr. Mark BAYFIELD, MCF, Université de York, Canada

Dr. Thierry GAUDE, DR CNRS, UMR 5667/ENS Lyon, France

Dr. Juliette LEYMARIE, MCF, UPMC, Paris, France

Dr. Jean-Philippe REICHHELD, DR CNRS, UMR 5096, Perpignan, France

Dr. Cécile BOUSQUET-ANTONELLI, DR CNRS, UMR 5096, Perpignan, France

Pr. Jean-Marc DERAGON, PR UPVD, UMR 5096, Perpignan, France

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

## *Remerciements*

Curieusement, cette partie n'est pas la plus simple à écrire, le défi étant d'employer les bons mots et, surtout, de n'oublier personne... mais allons-y !

Je tiens tout d'abord à remercier Mark Bayfield, Thierry Gaude, Juliette Leymarie et Jean-Philippe Reichheld d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens ensuite à remercier Thierry Lagrange et Dominique Gagliardi pour leur disponibilité annuelle et leur assiduité lors des comités de thèse.

Sans surprise, je voudrais remercier Cécile Bousquet-Antonelli et Jean-Marc Deragon de m'avoir accueillie au sein de leur équipe, d'avoir répondu à toutes mes questions, même les plus bêtes parce que, paraît-il, « il n'y a pas de question bête... ». Merci plus particulièrement à Cécile d'avoir fait, refait et re-refait avec moi de superbes tableaux de croisements.

Je tiens également à remercier les collaborateurs de ce travail qui ont permis de faire avancer le projet. Merci à Sasi Conte pour ses ITC, de m'avoir accueillie pendant un mois dans son équipe, de m'avoir accordé de son temps, et de m'avoir laissé jouer avec la « superloop ». Merci à l'équipe de David Honys, et plus particulièrement, à Saïd Hafhid pour son sérieux, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie tous les membres du LGDP qui, à un moment ou un autre, ont su m'aider, me conseiller, m'apprendre, ou encore m'écouter; merci pour votre disponibilité. Un grand merci, également, aux maîtres de conférences qui m'ont guidée lors de mes premiers pas en tant qu'enseignante. Et merci à toutes les LGDPiennes qui ont été présentes, qui m'ont écoutée et conseillée dans n'importe quelle situation.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe « Reprogrammation de la traduction en situation de stress chez les plantes » devenue « Reprogrammation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes en réponse au stress », enfin pour faire court, mon équipe...

Un énorme merci à Viviane Jean qui a été, pendant ces dernières années, mon 2<sup>ème</sup> cerveau, mes 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> mains, qui a pris soin de mes plantes et s'est même attaquée aux clonages. Merci pour les *Medicago* que tu as réussi à faire entrer dans le LGDP, accompagnées de leurs bactéries et leurs nodosités. Et surtout MERCI d'avoir accepté d'être une abeille en chef pendant, entre autres, une looonnnngue semaine ! Je ne t'en veux pas pour les filtres aspirés par 6c3FPO6000 ;-)

Un grand merci à Julie Descombin pour ses protocoles, ses conseils techniques, pour avoir répondu 100 fois à mes questions à propos des antibiotiques, et pour avoir su me donner les numéros des plasmides de tête, bref, pour avoir été à la paillasser derrière moi. Merci aussi pour avoir sauvé ma main d'une brûlure et pour ses onomatopées qui m'ont fait tellement rire.

Un grand merci, aussi, à Rémy Merret, qui s'en va et qui revient, pour son aide lors des expériences de polysomes et de qPCR mais aussi pour les pauses de 16h ! Je ne sais pas, par contre, si je dois te remercier pour les chansons entêtantes que tu fredonnais en manipant et que je ne vais pas citer ici. Mais merci pour le russe blanc, la Carança et ton soutien à Nohèdes.

Je voudrais remercier également Jean-Jacques Favory pour ses conseils, sa disponibilité, sa minutie et ses anecdotes. Merci aussi de m'avoir permis de placer un pays de plus sur la carte.

Au « petit » dernier de l'équipe, Jérémy Scutenaire, félicitations d'avoir accepté de devenir thésard malgré mon état déjà avancé et empirant lorsque tu es arrivé. Et merci aussi d'avoir entretenu ma culture générale durant les derniers mois de ma thèse afin que je reste connectée avec le monde, une info par jour, ce n'est déjà pas si mal, surtout celles-là.

Je voudrais remercier Claire Picart de m'avoir appris à utiliser le microscope confocal, me permettant ainsi d'observer le « pollen à lunette » (et de passer des journées dans le noir à 19°C). Merci, également, d'avoir foncé dans l'apprentissage de l'immunoloc'...

Merci, également, à la plateforme bio-informatique d'avoir analysé mes données de séquençage et d'avoir généré ces beaux tableaux de comptages.

Passons aux heureuses chanceuses qui ont pu partager mon bureau. Enfin, ... je veux dire.... Merci à Marion Clavel d'avoir, gentiment, accepté de partager son bureau avec moi, après une demande dans les règles de l'art et devant témoins. Merci pour tes conseils de manip', tes réponses à mes questions. J'hésite encore à te remercier pour les chansons horribles que tu m'as fait écouter, ou encore tous ces chats ridicules que tu m'as fait voir. Notre cohabitation a tout de même permis l'invention du révolutionnaire « projectile avec paracétamol embarqué »; ce n'est pas rien.

En parlant d'invention, merci à Emilie Debladis, qui a pris la suite de Marion à mes côtés et qui est la co-inventrice de la « procrastin-roulette » (invention qui a eu, pendant une très courte période certes, son heure de gloire). Merci de m'avoir supportée durant la rédaction, donc merci pour ta patience et ta compréhension.

Je tiens aussi à remercier Emilie Alart pour ses conseils de rédaction et son soutien, mais aussi pour quelques embuscades. Merci, également, de m'avoir trouvé une activité sportive extra-thèse et pour ton « shortbread millionaire ».

Merci à Sara Fneich pour ses encouragements, son soutien, nos longues discussions et ces quelques restos que tu m'as fait découvrir.

Je tiens à remercier, également, Edouard Jobet, qui m'a encouragée et qui a cru en moi dès le début. Merci de m'avoir fabriqué non pas un, mais plusieurs « tubes à pollen ». Merci pour ta disponibilité et ton écoute, et d'avoir partagé ta bonne humeur. Un grand merci de m'avoir nourrie de M&Ms dans les coups durs, de m'avoir fait garder à l'esprit qu'on pouvait réaliser ses rêves de petite fille. La liste n'est pas exhaustive mais merci pour tout ça et tout le reste.

Je remercie, également, Marie-Christine Carpentier, et voilà.... .

Merci à Sophie Lanciano pour nos longues discussions à propos de la recherche, de la science,...mais aussi tous les thèmes à débat : des vastes sujets et des  $\mu$ -sujets. Donc merci pour ces failles temporelles, Calamity Jane. Et merci aussi d'avoir fait le vigile devant ma porte.

Revenons à Marie-Christine, merci d'avoir répondu à mes questions mais aussi de m'avoir appris le awk, le grep, le sort -u, ... Merci, aussi d'avoir partagé avec moi l'apprentissage de la géographie. Je suis aussi ravie d'avoir été ta conscience.

Je dois également plusieurs énormes mercis à Christophe Belin, pour des tonnes de discussions à propos de mon projet, pour des tonnes de discussions tout court. Merci de m'avoir soutenue, d'avoir été là pour moi quand ça n'allait pas. Merci de m'avoir formée pour mes toutes premières heures d'enseignement, de m'avoir donné mal à la tête avec des suffixes en -cystes ou -phytes ou -anges... Merci aussi d'avoir affronté, avec Julie et Moi, la galère des nodules nodosités. Merci aussi pour toutes ces rigolades, ces bières,... Je ne te remercierai pas, par contre, pour la porte que j'ai vu arriver de près, ni pour le carton rouge injustifié (non, je n'ai pas oublié), ni pour toutes les frayeurs que tu m'as faites, toutes les fois où j'ai dit « je sais que t'es là Cracker's alors que tu n'étais pas là... », et tous les derniers morceaux de gâteau que tu m'as volés. Malgré ça, la liste des remerciements est encore bien longue, donc en résumé, merci d'avoir été là.

Pour ceux qui me supportent en dehors du labo :

Merci à Vincent d'avoir essayé de me comprendre, de m'avoir encouragée, et de m'avoir changé les idées quand c'était nécessaire; merci aussi pour les hamburgers maison à 1h du matin et la livraison d'américains.

Finalement, je voudrais remercier ma famille qui m'a énormément soutenue et encouragée, et sans qui je ne serais pas arrivée jusque-là. Ils m'ont appris, parmi des milliers d'autres choses, le sens du travail, la persévérance et l'anecdote "des chercheurs et de la puce"....

*« L'homme animé par l'esprit scientifique désire sans doute savoir, mais c'est aussitôt pour mieux interroger. »*

*Gaston Bachelard, philosophe des sciences et de la poésie (1884-1962).*

*« Tout travail scientifique est une réalisation communautaire et non pas l'œuvre d'un cavalier seul... »*

*Stephen Jay Gould, Paléontologue (1941-2002).*

## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
I. Les ARNm au sein des mRNP .....	14
I.1. Composition des mRNP : les RNA Binding Protein ou RBP .....	14
I.2. Etude des mRNP : granules et régulons .....	15
II. Les protéines à motif LA.....	16
II.1. Découverte de la protéine LA authentique chez l'Homme .....	16
II.2. Caractéristiques du motif LA.....	16
II.3. Du motif LA au module LA .....	17
II.3.1 Caractéristiques du motif RRM.....	17
II.3.2 Le module LA.....	17
II.4. Identification de 5 sous-familles de protéines à motif LA.....	18
II.4.1 Identification des LARP .....	18
II.4.2 Phylogénie des LARP.....	19
II.4.3 Les autres motifs des LARP .....	19
II.4.3.a Le motif RRM2 ou xRRM .....	19
II.4.3.b Le motif DM15 ou domaine LARP1.....	20
II.4.3.c Le motif LSA.....	21
II.4.3.d Le motif PAM2 .....	21
III. Caractéristiques fonctionnelles des 5 sous-familles de LARP .....	23
III.1. Les protéines LA authentique.....	23
III.1.1 Phylogénie, structure .....	23
III.1.2 Impact de la phosphorylation de la protéine LA authentique .....	24
III.1.3 Les cibles de la protéine LA authentique .....	24
III.1.4 Les fonctions de la protéine LA authentique.....	25
III.1.4.a Maturation des ARNt .....	25
III.1.4.b Rôle dans la transcription et la traduction.....	26
III.1.4.c Activité chaperonne de la protéine LA authentique.....	28
III.1.4.d Autres fonctions moléculaires ou physiologiques de la protéine LA authentique.....	29
III.1.5 La protéine LA chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
III.2. Les protéines LARP7 .....	31
III.2.1 Phylogénie et structure .....	31
III.2.2 Fonctions des protéines LARP7.....	32

III.2.2.a Assemblage de la télomérase chez les ciliés .....	32
III.2.2.b Fonction de la protéine LARP7 chez l'homme : rôle dans la particule 7SK .....	34
III.3. Les protéines à motif LA capables de fixer les ARNm .....	36
III.3.1 La sous-famille LARP1 .....	36
III.3.1.a Phylogénie, structure et localisation .....	36
III.3.1.b Fonctions des protéines LARP1 .....	37
III.3.2 Les protéines LARP4 .....	40
III.3.2.a Phylogénie et structure .....	40
III.3.2.b Interactions mises en place avec les protéines LARP4 .....	41
III.3.2.c Fonction des protéines LARP4 .....	42
III.3.3 Les protéines LARP6 .....	42
III.3.3.a Evolution de la sous-famille LARP6 .....	42
III.3.3.b Les motifs protéiques chez les protéines LARP6 .....	43
III.3.3.c Fonction des protéines LARP6 .....	46
IV. Le pollen chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	55
IV.1. Développement du pollen .....	55
IV.1.1 Généralités sur le pollen .....	55
IV.1.2 Formation du grain de pollen .....	55
IV.1.3 Le pollen tricellulaire et mature .....	56
IV.2. Les connexions cellulaires au sein du pollen .....	57
IV.2.1 Connexion impliquant les cellules spermatiques .....	57
IV.2.2 Connexion entre cellules spermatiques et cellule végétative .....	58
IV.2.3 Connexion entre une des cellules spermatiques et le noyau végétatif .....	58
IV.2.3.a Caractéristiques et formation .....	58
IV.2.3.b Fonctions .....	59
IV.3. De la germination du tube pollinique à la fécondation .....	60
IV.3.1 Le périple du tube pollinique .....	61
IV.3.2 La communication mâle/femelle .....	61
IV.3.2.a Les étapes d'adhésion et d'hydratation .....	61
IV.3.2.b La croissance du tube pollinique jusqu'à l'ovule .....	62
IV.3.3 Organisation au sein du tube pollinique .....	63
<b>RESULTATS PRELIMINAIRES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>69</b>
I. Analyse comparative des protéines LARP6a, LARP6b et LARP6c .....	70
I.1. Analyse des profils d'expression des gènes et protéines de la sous-famille LARP6 .....	70
I.1.1 Profils d'expression des gènes LARP6 chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	70
I.1.2 Analyse des régions promotrices des gènes <i>LARP6b</i> et <i>LARP6c</i> .....	71

I.1.3 Profils d'expression des protéines LARP6b et LARP6c .....	72
I.2. Les protéines de la sous-famille LARP6 sont-elles redondantes ? .....	73
I.2.1 Caractérisation des lignées d'insertion ADN-T.....	73
I.2.2 Etude de la redondance entre LARP6a et les protéines LARP6b/LARP6c.....	74
I.2.2.a Etude phénotypique des plantules mutantes <i>larp6</i> .....	74
I.2.2.b Etude de l'interdépendance des profils d'expression de LARP6b et LARP6c.....	75
II. Etude de la protéine LARP6c.....	77
II.1. Localisation subcellulaire dans le pollen .....	77
II.1.1 Obtention des outils.....	77
II.1.2 Localisation subcellulaire de LARP6c au cours des stades précoces de développement du pollen. ....	77
II.1.3 Localisation de LARP6c dans le pollen mature .....	78
II.2. Interactions entre LARP6c et les PAB.....	79
II.2.1 Localisation de PAB3 et PAB5 dans le pollen.....	80
II.2.2 Analyse comparative des localisations de LARP6c avec PAB3 et PAB5.....	81
II.2.3 LARP6c est présente au niveau des polysomes.....	81
II.2.4 Analyse de l'interaction entre LARP6c et PAB .....	82
II.3. Analyse transcriptomique du mutant <i>larp6c</i> .....	83
II.3.1 Analyses préliminaires de l'expérience de transcriptomique .....	84
II.3.2 Accumulation des ARNm du pollen mature dans <i>larp6c-3</i> .....	84
II.3.3 Expression différentielle des gènes impliqués dans le transport et la modification post-traductionnelle.....	85
II.3.4 Les ARNm différemment accumulés sont principalement liés au transport vésiculaire et/ou transmembranaire.....	86
II.3.5 Identification de complexes et familles protéiques affectées par la mutation <i>larp6c-3</i> en lien avec le transport et la dégradation. ....	88
II.4. Identification des cibles directes de la protéine LARP6c .....	90
II.4.1 Recherche de motif / structure conservé dans les ARNm identifiés en transcriptomique.....	90
II.4.2 Interaction <i>in vitro</i> de LARP6c avec les structures précédemment identifiées .....	91
II.4.3 Recherche de cibles directes de LARP6c .....	92
II.4.4 Recherche de motifs communs aux cibles potentielles de LARP6c.....	94
II.5. Rôle de LARP6c lors de la reproduction .....	96
II.5.1 LARP6c et la maturation du pollen .....	96
II.5.2 LARP6c et la fertilité mâle chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	97
II.5.3 LARP6c et la croissance du tube pollinique.....	98
II.5.4 LARP6c et la reconnaissance de l'ovule par le tube pollinique .....	99

II.5.5 Le rôle de LARP6a dans la fertilité mâle .....	100
II.5.6 Localisation de LARP6c dans le tube pollinique ?.....	101
II.6. Rôle de LARP6c en conditions de stress .....	102
II.6.1 Le phénotype de <i>larp6c</i> n'est pas visible en autofécondation.....	102
II.6.2 Le phénotype de <i>larp6c</i> est augmenté en conditions de stress.....	103
II.6.3 Etude de LARP6c dans les polysomes en conditions de stress .....	105
III. Résultats complémentaires sur la protéine LARP6b.....	107
III.1. LARP6b pourrait être impliquée dans une voie métabolique faisant intervenir une PAB.....	107
III.1.1 Localisation subcellulaire de LARP6b.....	107
III.1.2 Influence du stress sur l'interaction LARP6b/PAB2 .....	108
III.2. Rôle de LARP6b dans la racine.....	109
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>110</b>
I. Deux protéines LARP6 à motif PAM2 chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	111
II. Conclusions et discussions autour de la protéine LARP6c .....	112
II.1. LARP6c en tant que protéine de mRNP .....	112
II.1.1 L'interaction de LARP6c avec les ARNm.....	112
II.1.2 L'interaction de LARP6c avec les PAB.....	113
II.1.3 Le rôle de LARP6c sur les ARNm.....	113
II.1.4 Deux étapes potentielles dans la fonction moléculaire de LARP6c .....	114
II.2. La fonction physiologique de LARP6c.....	116
II.2.1 Rôle de LARP6c dans les étapes de formation du pollen.....	116
II.2.2 Rôle de LARP6c dans la fécondation.....	116
II.3. Lien entre les fonctions moléculaires et physiologiques .....	117
III. Conclusions et discussion autour de la protéine LARP6b .....	119
IV. Perspectives .....	120
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>123</b>
I. Cultures végétales.....	124
I.1. Conditions de culture .....	124
I.1.1 Culture <i>in vitro</i> .....	124
I.1.2 Culture en chambre.....	124
I.1.3 Culture en serre.....	124
I.1.4 Culture en enceinte Percival ® .....	125
I.2. Lignées d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	125
I.3. Transformation de plantes.....	125
I.3.1 Obtention de lignées stables d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	125

I.3.1.a Transformation de plantes par <i>Agrobacterium tumefasciens</i> : technique de « floral dip » .....	125
I.3.1.b Etablissement d'une lignée transgénique.....	126
I.3.2 Expression transitoire en feuille de tabac ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ) .....	126
II. Techniques relatives au pollen .....	127
II.1. Récolte de pollen .....	127
II.2. Croissance de tubes polliniques <i>in vitro</i> .....	128
II.3. Observations phénotypiques .....	128
II.3.1 Test de croissance du tube pollinique.....	128
II.3.1.a Analyses <i>In vitro</i> .....	129
II.3.1.b Analyses semi <i>in vivo</i> .....	129
II.3.2 Test de transmission .....	129
II.3.3 Test de la capacité du tube pollinique à cibler l'ovule. ....	130
II.3.3.a Analyses semi <i>in vivo</i> .....	130
II.3.3.b Analyse <i>in vivo</i> : marquage au bleu d'aniline .....	131
III. Techniques de base en biologie moléculaire.....	131
III.1. Techniques liées à l'ADN .....	131
III.1.1 Extraction d'ADN .....	131
III.1.1.a Extraction d'ADN génomique végétal.....	131
III.1.1.b Préparation d'ADN plasmidique.....	132
III.1.2 Amplification par PCR et électrophorèse sur gel d'agarose .....	132
III.1.2.a Amplification d'ADN pour le clonage.....	132
III.1.2.b Amplification d'ADN pour d'autres applications.....	133
III.1.2.c Electrophorèse et purification d'ADN sur gel d'agarose .....	133
III.1.3 Digestion par enzyme de restriction.....	134
III.1.4 Séquençage SANGER.....	134
III.1.5 Clonages.....	134
III.1.5.a Clonage en vecteur pGEM®-T easy .....	135
III.1.5.b Clonage par restriction / ligation.....	135
III.2. Techniques liées à l'utilisation de bactéries .....	135
III.2.1 Conditions de cultures.....	135
III.2.1.a <i>Escherichia Coli</i> (DB3.1™/ DH5-α™).....	135
III.2.1.b <i>Agrobacterium tumefasciens</i> (GV3101) .....	136
III.2.2 Transformation de cellules compétentes par choc thermique .....	136
III.2.2.a Préparation de cellules compétentes d' <i>E. coli</i> .....	136
III.2.2.b Transformation des souches d' <i>E.coli</i> .....	137
III.2.2.c Préparation de cellules compétentes d' <i>A. tumefasciens</i> .....	137
III.2.2.d Transformation de bactéries d' <i>A. tumefasciens</i> .....	138

III.3. Techniques liées à l'analyse des ARN .....	139
III.3.1 Extraction d'ARN total et séparation par électrophorèse.....	139
III.3.2 Traitement DNase .....	139
III.3.3 Transcription inverse (RT).....	140
III.4. Techniques liées aux protéines .....	140
III.4.1 Western blot .....	140
III.4.1.a Anticorps .....	140
III.4.1.b Préparation d'extraits totaux .....	140
III.4.1.c Migration d'extraits protéiques et analyse par western blot.....	141
IV. Techniques de biochimie .....	142
IV.1. Immunoprécipitation (IP).....	142
IV.1.1 Préparation des extraits totaux .....	142
IV.1.2 Immunoprécipitation.....	143
IV.2. Séparation des polysomes sur gradient de sucrose et analyse des fractions.....	143
IV.2.1 Préparation des gradients, séparation des polysomes et collecte des fractions. ....	143
IV.2.2 Analyse des fractions. ....	144
IV.3. Isothermal Titration Calorimétrie (ITC).....	145
V. Analyses haut-débit.....	145
V.1. Analyses moléculaires .....	145
V.1.1 Transcriptomique .....	145
V.1.2 RNA Immunoprécipitation (RIP).....	146
V.1.3 Validation par PCR quantitative (qPCR) .....	148
V.1.3.a Choix des amorces et des dilutions d'ADNc.....	148
V.1.3.b Conditions de PCR quantitative.....	148
V.1.3.c Analyse des données .....	149
V.2. Analyse bio-informatique .....	149
V.2.1 Génération des tableaux de comptage .....	149
V.2.2 Analyse différentielle des données de transcriptomique .....	150
V.2.3 Analyse différentielle des données de RIP.....	151
VI. Techniques d'imagerie.....	152
VI.1. Observation au microscope confocal .....	152
VI.2. Observations à la loupe binoculaire .....	153
VI.3. Analyse de l'expression d'un rapport GUS (coloration GUS).....	153
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>154</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>174</b>

## Table des illustrations

- Figure 1: Etapes classiques de la vie d'un ARNm et intervenants principaux
- Figure 2: Structure 3D du motif LA de *Trypanosoma brucei*
- Figure 3: Structure du motif RRM de la protéine U1A humaine en liaison avec son ARN
- Figure 4: Conservation des motifs RNP1 et RNP2 au sein des motifs RRM
- Figure 5: Structure du module LA en complexe
- Figure 6: Acides aminés conservés du module LA
- Figure 7: Relations phylogénétiques entre les domaines LAM-RRM(-L)
- Figure 8: Relations phylogénétiques entre les sous-familles de protéines à motif LA et organisation des domaines protéiques
- Figure 9: Structure 3D du motif RRM2
- Figure 10: Alignement et structure 3D du motif DM15
- Figure 11: Conservation du motif LSA des protéines LARP6 et comparaison des motifs LSA et SBS
- Figure 12: Alignement du motif PAM2 consensus issu des différents règnes
- Figure 13: Structure 3D de l'interaction MLE/PAM2
- Figure 14: Organisation de la structure des protéines LA authentiques dans différentes espèces
- Figure 15: Rôle de la protéine LA authentique de *S. cerevisiae* dans la maturation des ARN de transfert
- Figure 16: Principe de l'expérience de « tRNA mediated suppression »
- Figure 17: Organisation des protéines et structure du module LA des protéines LARP7
- Figure 18: Formation de la télomérase
- Figure 19: Structure 3D de l'interaction entre la protéine p65 et l'ARN télomérase
- Figure 20: Complexe 7SK snRNP sous ses deux formes
- Figure 21: Modèle 2D de l'interaction de la protéine LARP7 humaine avec l'ARN 7SK
- Figure 22: Organisation des domaines des deux types de protéines LARP1
- Figure 23: Position des nouveaux domaines potentiels identifiés sur la protéine LARP1 humaine
- Figure 24: Structure des protéines LARP4
- Figure 25: Arbre phylogénétique détaillé de la sous-famille LARP6 chez les eucaryotes
- Figure 26: Arbre phylogénétique détaillé de la sous-famille LARP6 chez les végétaux
- Figure 27: Organisation des motifs protéiques chez les protéines LARP6 animales et végétales
- Figure 28: Conservation du module LA dans les sous-familles
- Figure 29: Comparaison de l'organisation des motifs LA et RRM1 des protéines LA et LARP6 humaines

Figure 30: Partie 5' des séquences du collagène de type I et III

Figure 31: Domaines de la protéine LARP6 humaine impliqués dans des interactions ARN et protéiques lors de sa fonction de régulation du collagène de type I

Figure 32: Rôle de la protéine LARP6 humaine dans le métabolisme des ARNm du collagène de type I via ses interactions protéiques

Figure 33: Morphologie et localisation du pollen chez les spermatophytes

Figure 34: Schéma des étapes de microsporogénèse et microgamétogénèse chez *Arabidopsis thaliana*

Figure 35: Connexions entre les cellules du pollen mature

Figure 36: Schéma des étapes de la double fécondation

Figure 37: Etapes du transport des cellules spermatiques à l'ovule

Figure 38: Croissance du tube pollinique dans les tissus femelle et communication

Figure 39: Schéma de l'organisation du tube pollinique durant sa croissance

Figure 40: Représentation schématique des voies de régulations majeures au sein du tube pollinique en croissance

Figure 41: Profil d'expression des gènes *LARP6a*, *LARP6b* et *LARP6c* dans différents tissus

Figure 42: Expression des gènes *LARP6* dans différents tissus dont différents stades du pollen

Figure 43: Profil d'expression des gènes *LARP6* chez *Arabidopsis thaliana*

Figure 44: Profil d'expression de la bêta-glucuronidase sous contrôle des régions promotrices de *LARP6b* et *LARP6c*

Figure 45: Structure des protéines LARP6 chez *Arabidopsis thaliana*

Figure 46: Profil d'expression des protéines LARP6b et LARP6c chez *Arabidopsis thaliana*

Figure 47: Observation par western blot de la présence de protéines LARP6c étiquetées en tissus sporophytiques

Figure 48: Structure des gènes *LARP6* chez *Arabidopsis thaliana* et position des insertions ADN-T

Figure 49: Caractérisation des lignées mutantes par western blot

Figure 50: Observation phénotypique des lignées mutantes *larp6*

Figure 51: Etude de l'interdépendance de l'expression de LARP6b et LARP6c

Figure 52: Analyse du niveau d'expression des protéines LARP6c-RFP

Figure 53: Localisation subcellulaire de LARP6c à différents stades de maturation du pollen

Figure 54: Localisation subcellulaire de LARP6c dans le pollen mature

Figure 55: Expression des gènes de classe I, II et III de la famille des *PAB* par rapport au profil d'expression de *LARP6c*

Figure 56: Localisation subcellulaire de *PAB3* dans le pollen bicellulaire et mature

Figure 57: Localisation subcellulaire de *PAB5* dans le pollen bicellulaire et mature

Figure 58: Co-localisation des protéines LARP6c et PAB5 au niveau des cellules spermatiques

Figure 59: Investigation de la présence de LARP6c dans les polysomes

Figure 60: Test d'interaction PAB / LARP6c par co-immunoprécipitation (IP)

Figure 61: Réplicabilité des données de transcriptomique

Figure 62: Représentation globale des gènes différentiellement accumulés

Figure 63: Annotation GO des transcrits différentiellement accumulés entre *Col-0* et *larp6c-3*

Figure 64: Les grandes familles de gènes affectés par la mutation *larp6c-3*

Figure 65: Analyse par qRT-PCR des variations d'accumulation des transcrits du complexe exocyste dans le mutant *larp6c-3*

Figure 66: Recherche de motifs et structures conservés au niveau ARN parmi les membres du complexe exocyste affectés par la mutation *larp6c-3*

Figure 67: Test de l'interaction entre le module LA de LARP6c et les structures ARN des gènes codant *SEC1b*, *SEC8*, *SEC15a* par ITC

Figure 68: Réplicabilité des données de RIP

Figure 69: Annotation des transcrits enrichis en RIP

Figure 70: Motifs conservés au sein des séquences 5' UTR et 3' UTR des gènes enrichis en RIP

Figure 71: Position des motifs identifiés en 5' des ARNm des gènes enrichis en RIP

Figure 72: Observation d'un défaut de maturation des grains de pollen

Figure 73: Principe des tests de transmission

Tableau 1: Test de transmission en lignées mutantes et étiquetées

Figure 74: Effet des mutations *larp6c* sur la croissance du tube pollinique

Figure 75: Principe des expériences testant la croissance dirigée des tubes polliniques vers les ovules

Figure 76: Test de la capacité du tube pollinique à cibler l'ovule par analyses semi *in vivo* et *in vivo*

Figure 77: Localisation subcellulaire des protéines LARP6a et LARP6c dans le pollen mature

Tableau 2: Test de transmission en lignées mutante *larp6a-1* et double mutante (*larp6c-3/larp6a-1*)

Figure 78: Localisation subcellulaire des protéines LARP6c et LARP6a dans le tube pollinique

Tableau 3: Analyse de la ségrégation des lignées mutantes *larp6c*

Tableau 4: Analyse par ségrégation des lignées mutantes *larp6c* en condition de stress thermique

Figure 79: Principe des stress thermiques réalisés sur des croisements

Tableau 5: Test de transmission mâle en lignées mutantes en conditions de stress thermique

Figure 80: Investigation de la présence de LARP6c dans les polysomes

Figure 81: Localisation subcellulaire de LARP6b en racines et feuilles

Figure 82 : Test de l'interaction LARP6b / PAB2 par immunoprécipitation (IP)

Figure 83: Comparaison des racines des plantules *Col-0* et *larp6b-3*

Figure 84: Schéma des fonctions moléculaires potentielles de LARP6c

Figure 85: Système de filtres permettant la récolte de pollen

Figure 86: Micrographie de tubes polliniques en germination *in vitro*

Figure 87: Schématisation du principe des tests de transmission

Figure 88: Principe des stress thermiques réalisés sur des croisements

Figure 89: Micrographie de tubes polliniques en germination semi *in vivo*

Figure 90: Micrographie de tubes polliniques marqués au bleu d'aniline en germination *in vivo*

Tableau 6: Conditions de réalisation des IP

Figure 91: Schéma de la méthodologie de l'analyse bio-informatique

Figure 92: Représentation schématique de filtres appliquée lors de l'analyse fonctionnelle du RIP

## Liste des abréviations

5'SL: **5'** Stem Loop

5'TOP: **5'** Terminal **O**ligopyrimidine tract

ADN: **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique

ADN-T: **A**DN de **T**ransfert

ARN: **A**cide **R**ibo**N**ucléique

CID: **C**TC **I**nteracting **D**omain

CRP: **C**ystein **R**ich **P**eptides

CTC: **C**arboxyl-**T**erminal **C**onserved domain, alias: MLLE, PABC

ECM: **E**xtra**C**ellular **M**atrix

EDD: **E**3 isolated by **D**ifferentia **D**isplay, alias: HYD

HEK293: **H**uman **E**mbryonic **K**idney **293**

HMC: **H**igh **M**olecular weight **C**omplex

HSC: **H**epatic **S**tellate **C**ells

HYD: **H**Yperplastic **D**iscs, alias: EDD

IRES: **I**nternal **R**ibosome **E**nter **S**ite

ITC: **I**sothermal **T**itration **C**alorimetry

KO: **K**nock **O**ut

LARP: **L**A **R**elated **P**rotein

LSA: **L**A and **S**1 **A**ssociated

MAGUK: **M**embrane-**A**ssociated **G**Uanylate **K**inase protein

MEF: **M**ouse **E**mbryonic **F**ibroblast

MEME: **M**ultiple **E**m for **M**otif **E**licitation

MGU: **M**ale **G**erm **U**nit

MLLE: **M**ademoise**L**L**E**

mRNP: **m**essenger **R**ibo**N**ucleoprotein **P**articles

NCRP: **N**on **C**ystein **R**ich **P**eptides

NLS: **N**uclear **L**ocalisation **S**equence

NoLS: **N**ucleolar **L**ocalization **S**ignal

NRE: **N**uclear **R**etention **E**lement

PAB: **P**oly**A** **B**inding protein

PABC: **P**oly-**A**denylate **B**inding protein **C**-terminal domain, alias: CTC, MLLE

PAM2: **P**AB interacting **M**otif **2**

P-bodies: **P**rocessing bodies

PCE: **P**ost transcriptional **C**ontrol **E**lement

PCR: **P**olymerase **C**hain **R**eaction

PIP7S: **P**-TEFb-Interaction **P**rotein for **7**SK **S**tability

PMI: **P**ollen **M**itosis **I**

pol III: polymérase III

RACK1: **R**eceptor for **A**ctivated **K**inase **1**

Ras-MAPK: Ras-**M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase

RBD: **R**NA **B**inding **D**omain, alias: RNP, RRM

RBP: **R**NA **B**inding **P**rotein

RE: **R**éticulum **E**ndoplasmique

RHA: **R**NA **H**elicase **A**

RIP: **R**NA **I**mmuno**P**recipitation

rpkms : reads **p**er **k**ilobase per **m**illion

RNP: **R**ibo**N**ucleo**P**rotein domain, alias: RBD, RRM

rRNA: ARN ribosomique 5S

RRM: **R**NA **R**ecognition **M**otif, alias: RBD, RNP

SBM: **S**hort **B**asic **M**otif

SBS: **S**TRAP **B**inding **S**equence

SC: **S**perm **C**ell

SINE: **S**hort **I**nterspersed **N**uclear **E**lement

snoRNA: **s**mall **n**ucleolar **R**NA

SRP: **S**ignal **R**ecognition **P**articule

STRAP: **S**érine-**T**hréonine kinase **R**eceptor **A**ssociated **P**rotein

TERT: **T**ELomerase **R**everse **T**ranscriptase

TOR: **T**arget **O**f **R**apamycin

TOS-like: **T**OR **S**ignaling motif

tRNA: ARN de transfert

uORF: **u**pstream **O**pen **R**eading **F**rame

UsnRNA: **s**mall **n**uclear**R**NA

VEGF: **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor

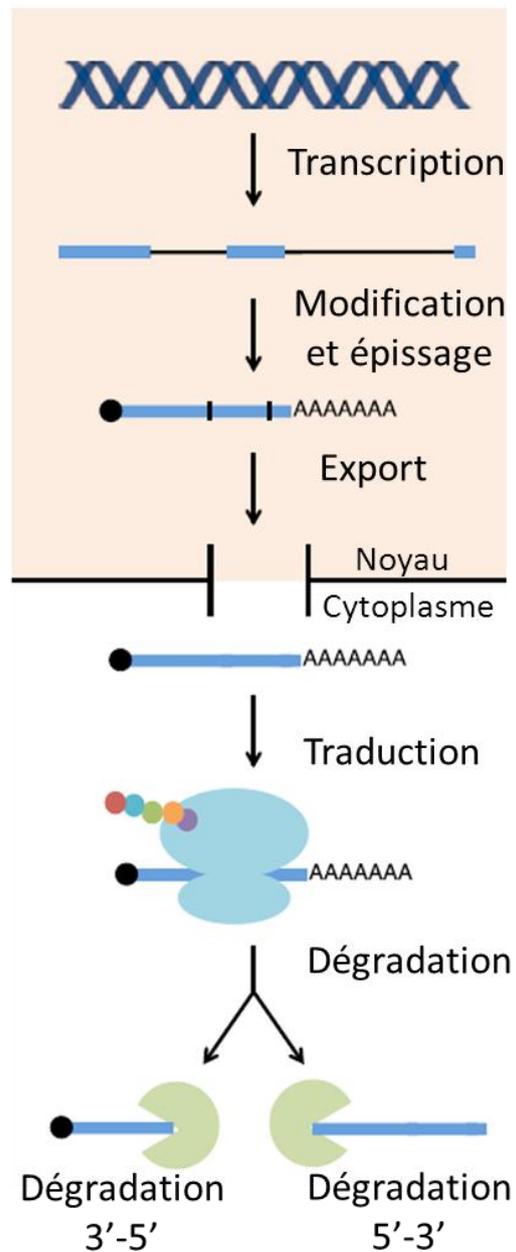
XIAP: **X**-linked **I**nhibitor of **A**ptosis **P**rotein

---

# **INTRODUCTION**

---

## Etapes de la vie d'un ARNm



## Intervenants principaux

ARN polymérase II

Enzyme de coiffe, facteurs d'épissage, de clivage et de polyadénylation

Facteurs d'export, composants des pores nucléaires

Facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction, ribosomes, ARNt

Enzymes de retrait de la coiffe et de déadénylation, 5'-3' nucléases ou exosome

**Figure 1: Etapes classiques de la vie d'un ARNm et intervenants principaux**

La partie gauche de la figure schématise les différentes étapes de la vie d'un ARNm de sa synthèse à sa dégradation. La partie droite de la figure présente les principaux acteurs de chacune des étapes. ARNt : ARN de transfert (Mitchell & Parker, 2014).

## INTRODUCTION

### **I. Les ARNm au sein des mRNP**

Les protéines dont il est question dans ce manuscrit font partie des protéines de liaison à l'ARN. Ce type de protéines est capable, via ses différents domaines, d'établir une interaction stable avec un ARN et d'intervenir sur son devenir (maturation, transport, stabilité, traduction,...). Il existe une multitude de protéines de liaison à l'ARN présentant des fonctions différentes et représentées chez tous les êtres vivants. L'association de ces protéines avec un ARN messager (ARNm) entraîne la formation de mRNP (**m**essenger **R**ibo**N**ucleoprotein **P**articles) comprenant l'ARNm, des protéines de liaison à l'ARN appelées RBP (**R**NA **B**inding **P**rotein) et dans certains cas des ARN non codants tels que les microARN (Mitchell & Parker, 2014). Il existe ainsi une multitude de mRNP de composition, de localisation et de fonction différentes qui dépendent de la nature de l'ARNm mais aussi, pour un même ARNm, de l'étape à laquelle on le considère. Ce dynamisme finement régulé des mRNP permet à l'ARNm de réaliser les différentes étapes de sa maturation (Figure 1).

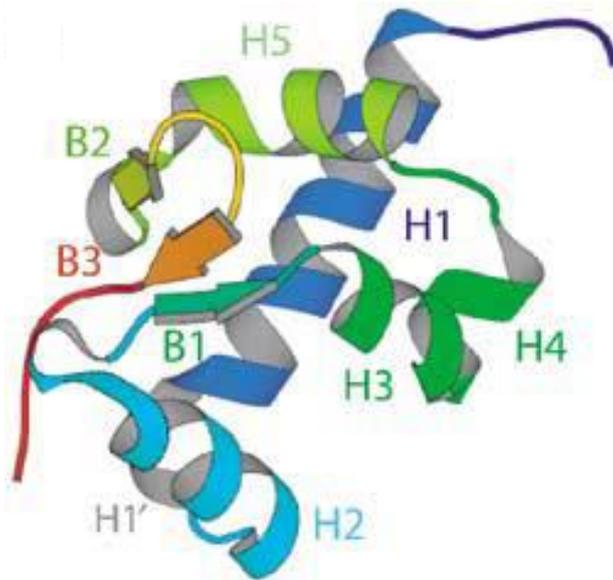
#### **I.1. Composition des mRNP : les RNA Binding Protein ou RBP**

Classiquement la vie d'un ARNm comprend de nombreuses étapes qui sont résumées dans la figure 1 (Mitchell & Parker, 2014). A chacune de ces étapes, différentes « machineries » comprenant essentiellement des protéines de liaison à l'ARN que l'on nomme RBP interviennent sur le transcrit. Généralement, les RBP possèdent plusieurs motifs de fixation à l'ARN (Mitchell & Parker, 2014) qui leur permettent d'augmenter la longueur de leur site de fixation et par conséquent leur affinité et spécificité ou encore de moduler ces deux paramètres grâce à la présence de motifs différents (pour revue Mitchell & Parker, 2014). Aux facteurs généraux du métabolisme des ARNm, capables de lier une grande diversité d'ARNm, s'ajoutent des interactants plus spécifiques ciblant des sous-groupes d'ARNm. Ainsi un ARNm peut interagir avec de nombreux interactants de manière très dynamique. La mise en place d'un mRNP est dépendante de plusieurs paramètres dont la

structure tridimensionnelle de l'ARN, l'ensemble des protéines déjà présentes sur l'ARNm (accès aux sites de fixation, présence de protéines de recrutement d'autres protéines) ainsi que la disponibilité en protéines dans la cellule.

### **I.2. Etude des mRNP : granules et régulons**

L'étude des mRNP est importante afin de comprendre les régulations qui se mettent en place au niveau des ARNm et donc d'appréhender les processus post-transcriptionnels contrôlant l'expression des gènes. Ceci a permis de révéler qu'il existe des RBP spécifiques de certains groupes d'ARNm. Ainsi il existe des protéines capables de reconnaître et d'intervenir sur le devenir de l'ensemble des ARNm codant des protéines impliquées dans une même fonction ou un même processus métabolique, créant la notion de régulons (Keene, 2007; Mitchell & Parker, 2014). D'autre part, l'étude des mRNP a montré que la formation d'un grand nombre de particules d'un même type dans la cellule mène à l'accumulation en différents points de protéines et d'ARNm interagissant ensemble. Ceci a pour conséquence de former des agrégats de mRNP appelés granules (Mitchell & Parker, 2014). Ces granules sont visibles au microscope optique (après marquage fluorescent), très dynamiques et de différents types selon les mRNP qu'ils renferment. On peut citer par exemple, dans le cytoplasme, les granules de stress ou les P-bodies (**P**rocessing bodies) intervenant respectivement dans le stockage d'ARNm à destination, respectivement, de la traduction et de la dégradation.



**Figure 2: Structure 3D du motif LA de *Trypanosoma brucei***

La structure « winged helix turn helix » comprend six hélices  $\alpha$  (H1 à H5) ainsi que trois feuillets antiparallèles (B1 à B3) (Dong et al., 2004).

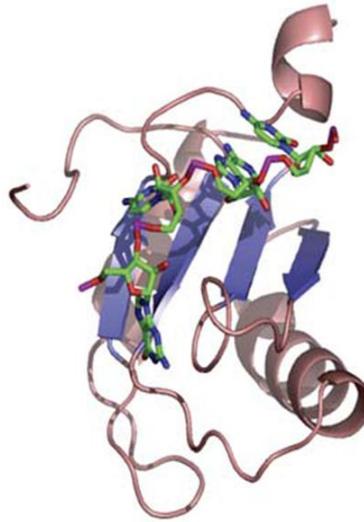
## II. Les protéines à motif LA.

### II.1. Découverte de la protéine LA authentique chez l'Homme

Il y a maintenant 40 ans que la protéine LA aussi nommée SS-B a été découverte chez des patients souffrant de Lupus Erythémateux (Mattioli & Reichlin, 1974) ou du syndrome de Sjogren's (SS-B) (Alspaugh & Tan, 1975). Ces maladies auto-immunes entraînent, respectivement, une détérioration des tissus conjonctifs et un dessèchement des muqueuses. Le sérum de patients souffrant de l'une ou l'autre de ces maladies réagit contre une protéine de liaison aux ARN, appelée autoantigène LA. Celle-ci est capable de fixer de nombreux transcrits primaires synthétisés par la polymérase III (Francoeur & Mathews, 1982; Lerner et al., 1981; Rinke & Steitz, 1982; Stefano, 1984). Ce n'est qu'en 1988, que l'ADN complémentaire codant l'autoantigène LA est cloné et séquencé, permettant l'identification de la protéine LA (Chambers et al., 1988). Depuis, des orthologues de la protéine à motif LA ont été découvertes dans de nombreuses espèces (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009; Wolin & Cedervall, 2002).

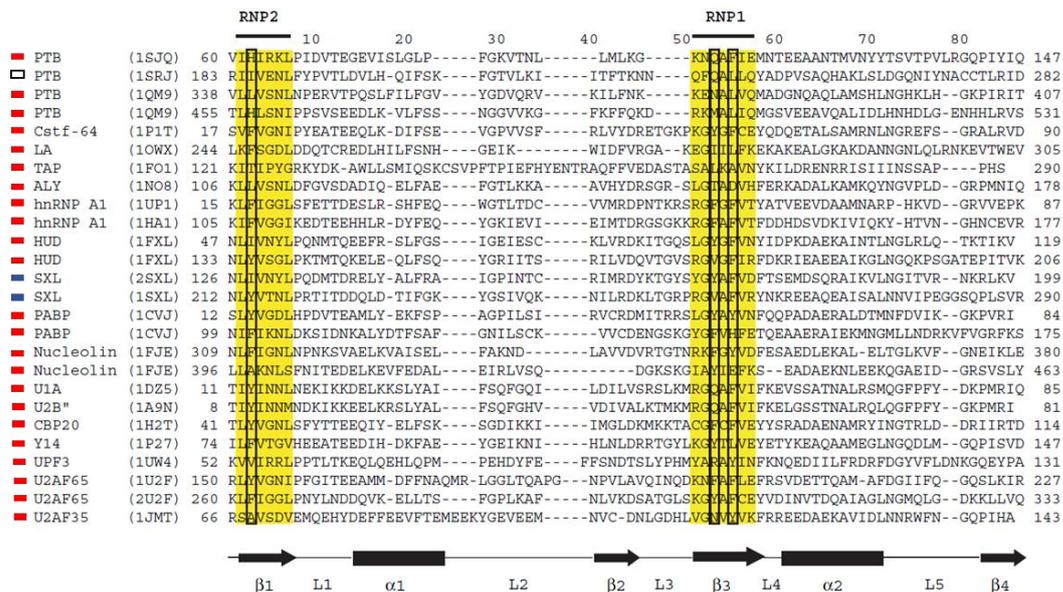
### II.2. Caractéristiques du motif LA

La protéine LA authentique humaine est une phosphoprotéine modulaire de 47 kDa capable de fixer l'ARN (Wolin & Cedervall, 2002). Elle est composée de plusieurs motifs protéiques dont le motif LA. Ce motif très conservé comprend environ 90 acides aminés et forme une structure de type « winged helix turn helix » représentée dans la figure 2 (Dong et al., 2004). Il est présent chez de nombreuses espèces et est spécifique des eucaryotes (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Il possède en surface un enchaînement d'acides aminés aromatiques très conservés, ainsi qu'une région basique adjacente (Dong et al., 2004). Cette structure lui confère les caractéristiques nécessaires mais pas suffisantes pour lier l'ARN. En effet, des expériences menées *in vivo* et *in vitro* soutiennent le fait que le motif LA seul n'est pas capable de lier l'ARN (Hussain et al., 2013; Naeeni et al., 2012). Il coopère avec un motif de liaison à l'ARN qui lui est immédiatement adjacent appelé RRM1 (RNA Recognition Motif 1), afin de former une poche de liaison aux ARN.



**Figure 3: Structure du motif RRM de la protéine U1A humaine en liaison avec son ARN**

La protéine U1A est une protéine du spliceosome possédant un RRM (rose et bleu). Les 4 feuillets  $\beta$  sont représentés en bleu, les 2 hélices  $\alpha$  sont quant à elles représentées en rose. L'ARN lié par le motif RRM est représenté en vert (Marais & Bayfield, 2006; Oubridge et al., 1994).



**Figure 4: Conservation des motifs RNP1 et RNP2 au sein des motifs RRM**

La partie supérieure présente l'alignement des séquences de motifs RRM dont la structure est connue et issus de différentes protéines. Ces dernières sont issus d'espèces animales : vertébrés (rectangle rouge) et insecte (rectangle bleu) et d'une espèce d'eubactérie (rectangle blanc). Les motifs RNP1 et RNP2 (surlignés en jaune) sont aussi conservés dans les motifs RRM d'espèces végétales. Les acides aminés encadrés sont les acides aminés aromatiques importants pour l'interaction avec l'ARN. La partie inférieure représente la position des séquences dans la structure protéique (Maris et al., 2005).

### II.3. Du motif LA au module LA

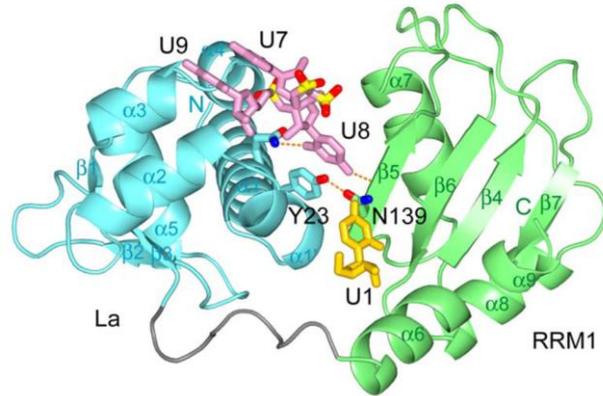
Comme indiqué précédemment le motif LA seul n'est pas capable de lier l'ARN ; cette action nécessite, en plus de la présence du motif LA, un motif RRM1. Cette association est nommée : module LA.

#### II.3.1 Caractéristiques du motif RRM

Les motifs RRM aussi appelés RNP (**R**ibo**N**ucleo**P**rotein domain) ou RBD (**R**NA **B**inding **D**omain) font parties d'une superfamille. Ces motifs d'environ 90 acides aminés comptent parmi les motifs de liaison à l'ARN les plus répandus (Maris et al., 2005). Les motifs RRM « canoniques », tel que le motif RRM1, adoptent une structure en « sandwich  $\alpha\beta$  » représentée dans la figure 3 (Oubridge et al., 1994). Cette structure comprend 4 feuillets  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$  qui s'enchaînent en :  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ . Ce motif contient par ailleurs deux motifs de moins de 10 acides aminés appelés RNP1 et RNP2, de séquences conservées et situés respectivement dans les feuillets  $\beta_3$  et  $\beta_1$  (Figure 4). Ces séquences comprennent des acides aminés aromatiques exposés à la surface des feuillets qui interviennent dans le contact à l'ARN (Maris et al., 2005). Alors que la structure et la fonction du motif RRM canonique (tel que le RRM1) sont bien connues, il s'avère qu'il existe des motifs non canoniques dont les séquences et/ou structures divergent comme les RRM1-L et RRM2 (cf. II.4.3.a Le motif RRM2 ou xRRM). Certains sont même capables d'interagir avec l'ADN voire des protéines (Cléry et al., 2008). Il faut retenir des motifs RRM qu'ils sont des motifs eucaryotes incontournables impliqués dans de très nombreux processus biologiques.

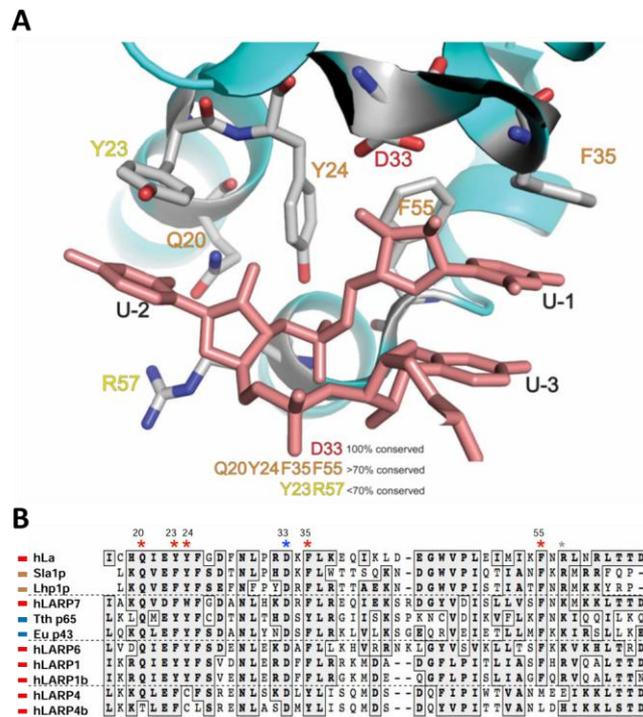
#### II.3.2 Le module LA

Le module LA comprend le motif LA et le motif RRM1 (ou RRM1-L) séparés par une séquence nommée « linker ». Alors que les motifs LA et RRM1 sont directement requis pour l'interaction à l'ARN (pour revue Bayfield et al., 2010), le linker, lui, ne participe que de manière indirecte (Figure 5). Il organise les deux motifs l'un par rapport à l'autre permettant au module LA d'adopter la structure adéquate (Martino et al., 2014; Sanfelice et al., 2008; Teplova et al., 2006). En effet, la coopération entre les deux motifs qui forment ainsi une unité est nécessaire à une interaction spécifique et forte avec la ou les cibles ARN (pour revue Bayfield et al., 2010) [les interactions module LA/ARN seront



**Figure 5: Structure du module LA en complexe**

L'ARN (représentation en bâtonnets) comprend une extrémité 5' (U1, jaune) et une extrémité 3'-UUU-OH (rose). Le module LA représenté ici est issu de la protéine LA humaine. Le motif LA (en turquoise) réalise plus d'interactions avec l'ARN que le motif RRM1 (vert). La région linker, quant à elle, n'intervient pas directement dans l'interaction avec l'ARN (Teplova et al., 2006).



**Figure 6: Acides aminés conservés du module LA**

A: position des acides aminés conservés sur la structure 3D du module LA (protéine LA humaine) interagissant avec l'ARN (en rose) ; le pourcentage de conservation des acides aminés est également indiqué.

B : alignement du motif LA issu de protéines d'espèces différentes\*, les acides aminés conservés sont marqué par un astérisque. Le numéro de position des acides aminés correspond à la position sur la séquence de la protéine LA authentique humaine. \*Les séquences présentées ici sont issues de protéines d'animaux (rectangle rouge), de protistes (rectangle bleu) et de champignons (rectangle marron). Le module LA est également conservé chez la majorité des protéines à motif LA végétales. Figures tirées de Bayfield et al. 2010

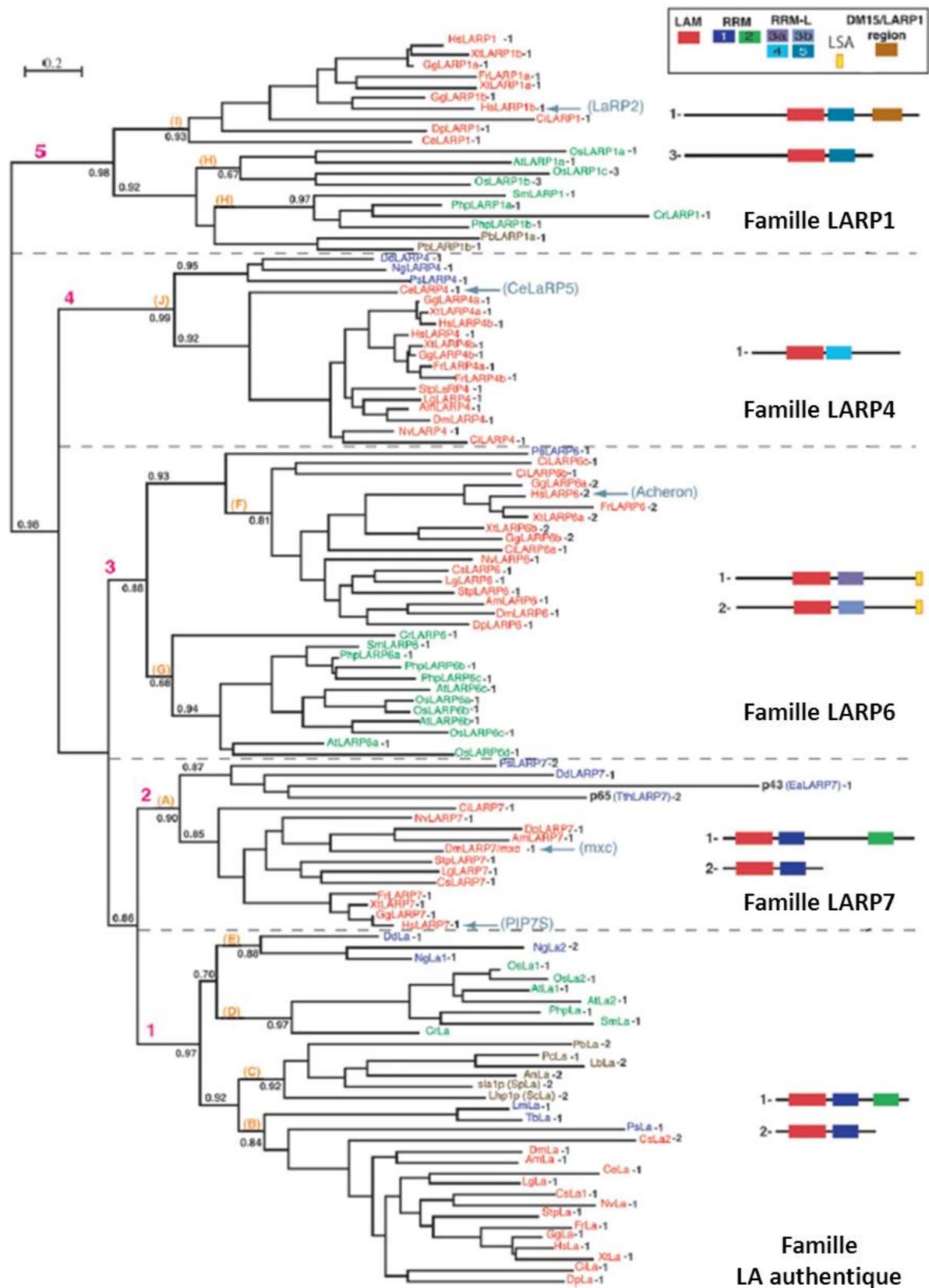
détaillées plus loin dans ce manuscrit]. L'analyse structurale du module LA associé à une cible ARN a permis de mettre en évidence le rôle clé de 7 acides aminés dans l'interaction (Figure 6A). Il s'avère que tous ces acides aminés (Q20, Y23, Y24, D33, D35, F55, R57 - nomenclature issue de la séquence de la protéine LA authentique humaine) sont situés au sein du motif LA et sont très conservés (Figure 6B) (Bayfield et al., 2010; Merret et al., 2013b).

### **II.4. Identification de 5 sous-familles de protéines à motif LA**

#### **II.4.1 Identification des LARP**

Vingt ans après la découverte de la protéine LA authentique chez l'Homme, de nombreuses protéines à motif LA ont été identifiées chez d'autres espèces de vertébrés tel que *Xenopus laevis* (Terns et al., 1992), chez des invertébrés comme *Drosophila melanogaster* (Bai et al., 2011) mais aussi chez des champignons (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) (Van Horn et al., 1997; Yoo & Wolin, 1994), des plantes (*Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*) (Fleurdépine et al., 2007; Smykal et al., 2000) ainsi que des protistes comme *Trypanosoma brucei* (Westermann & Weber, 2000). Ces recherches ont aussi permis d'identifier des protéines non homologues de la protéine LA authentique mais possédant toutefois un module LA. Ces protéines ont été nommées LARP pour « **LA Related Protein** ».

Afin d'identifier les protéines à motif LA de façon plus exhaustive et ainsi d'obtenir une vision plus complète, une recherche systématique des protéines à motif LA dans 129 génomes (46 d'archées et 83 d'eucaryotes) ainsi que dans les génomes d'eubactéries représentatives a été réalisée en 2009 (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Cette étude a montré que les protéines à motif LA sont spécifiques des eucaryotes et donc qu'elles sont apparues chez l'ancêtre commun des eucaryotes après la radiation archées / eucaryotes. D'autre part, on s'aperçoit que les protéines à motif LA forment une superfamille étant donné qu'il existe plusieurs protéines à motif LA au sein d'un même génome : 308 protéines ont été identifiées sur les 83 génomes eucaryotes analysés (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). En revanche, il n'y a toujours qu'un seul motif LA par protéine et celui-ci est dans la grande majorité des cas associé à un motif RRM. Alors que les motifs LA sont



**Figure 7: Relations phylogénétiques entre les domaines LAM-RRM(-L) (légende page suivante).**

conservés entre les différentes protéines, les motifs RRM1 associés sont quant à eux plus divergents et ont été nommés RRM-L (**RRM-Like**).

### **II.4.2 Phylogénie des LARP**

L'analyse du module LA-RRM(-L) réalisée sur 113 protéines a permis de réaliser un arbre phylogénétique (Figure 7) mettant en évidence l'existence de 5 sous-familles : LA authentique, LARP1, LARP4, LARP6 et LARP7 (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Il apparaît que toutes les familles ne sont pas représentées dans toutes les espèces et que chaque sous-famille peut comprendre plusieurs membres au sein d'un même génome. Les sous-familles des protéines LA authentiques et des protéines LARP1 sont représentées dans tous les taxons contrairement aux autres sous-familles : LARP6 (protistes, plantes, animaux), LARP4 et LARP7 (protistes, animaux) (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009; Merret et al., 2013b). Cette classification est soutenue par la conservation/variabilité des motifs RRM ainsi que l'acquisition dans certaines sous-familles de motifs additionnels spécifiques (Figure 8) (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). En effet, on constate que les différents types de motifs RRM1 : canoniques ou RRM1-L sont spécifiques de chaque sous-famille. D'autre part, les différentes sous-familles ont acquis des motifs spécifiques : RRM2 (LA et LARP7), DM15 (LARP1), PAM2 (LARP4 et LARP6), LSA (LARP6) (cf. chapitre suivant). Ces résultats permettent de mettre en évidence une co-évolution des motifs LA et RRM(-L) mais aussi l'acquisition de motifs supplémentaires dans certaines sous-familles suggérant une évolution des interactions ARN et des fonctions réalisées par ces protéines.

### **II.4.3 Les autres motifs des LARP**

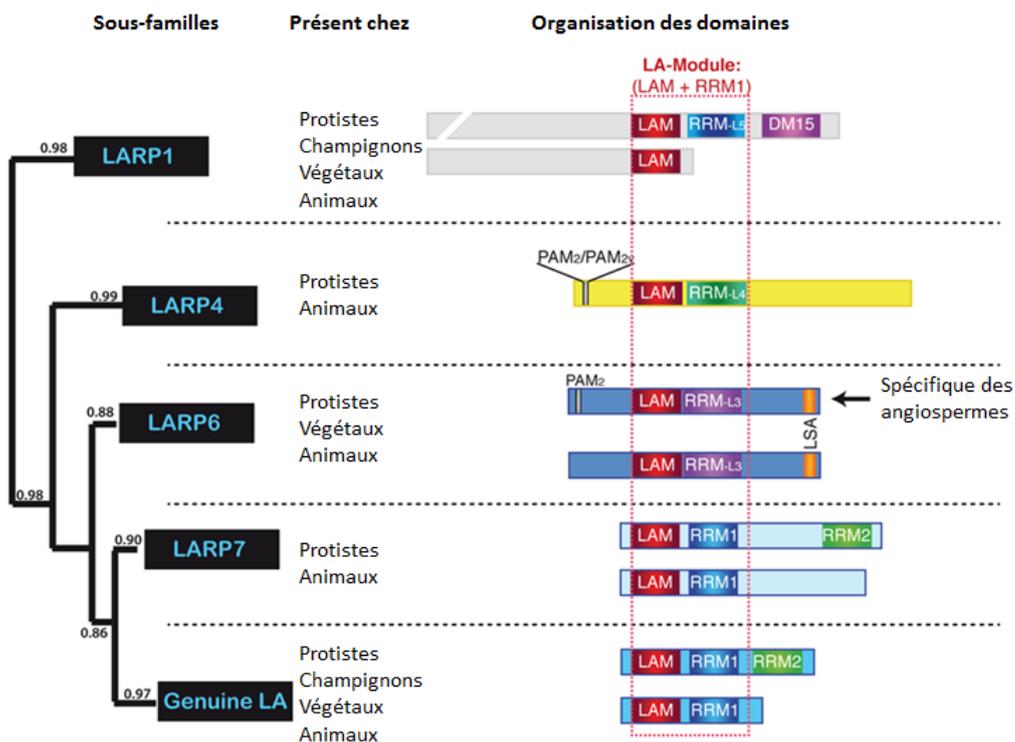
Etant donné qu'il existe des motifs spécifiques des différentes sous-familles de LARP et potentiellement impliqués dans les interactions et les fonctions réalisées par ces protéines, il est intéressant de se pencher sur les caractéristiques de ces motifs.

#### **II.4.3.a Le motif RRM2 ou xRRM**

Le motif RRM2 ou xRRM a été décrit dans les parties C-terminales des protéines LA et LARP7 (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Ce domaine, d'environ 100 acides aminés,

## Figure 7: Relations phylogénétiques entre les domaines LAM-RRM(-L)

A : Arbre phylogénétique réalisé sur la séquence LAM-RRM(-L) de 113 protéines. Les sous-familles sont séparées par des lignes en pointillés. La couleur d'écriture des noms des protéines correspond au taxon auquel elles appartiennent : bleu = protistes, marron = champignons, vert = plantes, rouge = animaux. B: Représentation schématique des structures des protéines présentes dans chacune des sous-familles. Figure modifiée de Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009. Abréviation des noms d'espèces : *Apis mellifera* (Am), *Arabidopsis thaliana* (At), *Aspergillus niger* (An), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Capitella sp.* (Cs), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Ciona intestinalis* (Ci), *Daphnia pulex* (Dp), *Dictyostelium discoideum* (Dd), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Fugu rubripes* (Fr), *Gallus gallus* (Gg), *Homo sapiens* (Hs), *Laccaria bicolor* (Lb), *Leishmania major* (Lm), *Lottia gigantea* (Lg), *Naegleria gruberi* (Ng), *Nematostella vectensis* (Nv), *Oriza sativa* (Os), *Phanerochaete chrysosporium* (Pc), *Phycomyces blakesleanus* (Pb), *Physcomitrella patens* (Php), *Phytophthora sojae* (Ps), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Strongylocentrotus purpuratus* (Stp), *Trypanosoma brucei* (Tb), *Xenopus tropicalis* (Xt).



## Figure 8: Relations phylogénétiques entre les sous-familles de protéines à motif LA et organisation des domaines protéiques

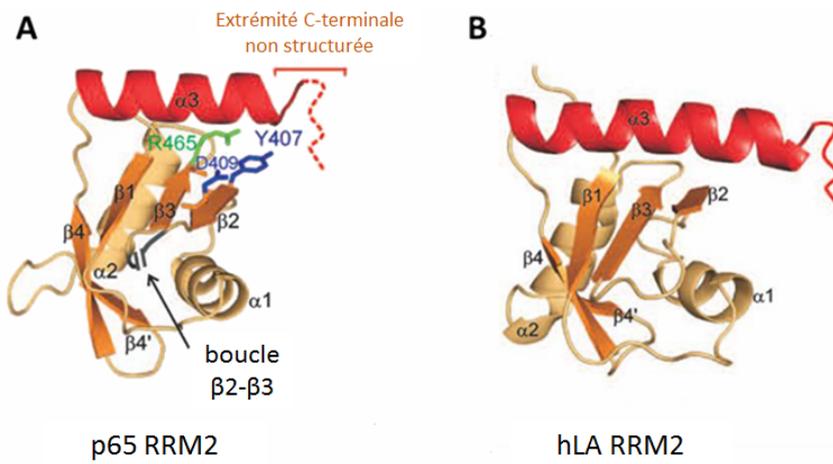
Partie gauche de la figure : relations phylogénétiques entre les sous-familles sur la base de l'alignement du module LA. A côté de chaque sous-famille sont indiqués les grands groupes de la classification dans lesquels sont représentées les sous-familles.

Partie droite de la figure : organisation des domaines protéiques dans chacune des sous-familles. Figure modifiée de Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009; Deragon & Bousquet-Antonelli, 2015.

ne présente pas les caractéristiques classiques d'un motif RRM. En effet, le motif RRM2 adopte une structure  $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4'\beta 4\alpha 3$  donnant ainsi 5 feuillets  $\beta$  antiparallèles (Jacks et al., 2003; Singh et al., 2012) au lieu de 4 classiquement (Nagai et al., 1990) (Figure 9). De plus, une l'hélice  $\alpha 3$  vient bloquer la surface classique d'interaction à l'ARN (Jacks et al., 2003). Cependant, il est impliqué dans les interactions avec l'ARN dans le cas des deux familles de protéines à motif LA. Pour la protéine LARP7 humaine, il a été montré que le RRM2 est impliqué dans la liaison à une tige boucle de l'ARN 7SK (Uchikawa et al., 2015). Le motif RRM2 de la protéine p65 (LARP7 chez *T.thermophila*) est quant à lui capable de lier l'ARN simple brin et double brin (Singh et al., 2012). Le motif RRM2 de la protéine LA humaine n'interviendrait que dans certaines interactions comme dans le cas de l'interaction avec l'ARNm du virus de l'hépatite C (domaine IV de l'IRES -Internal Ribosome Entry Site- où il agit de concert avec le module LA) (Martino et al., 2012). Ainsi il semblerait que la présence d'un motif additionnel sur la protéine soit suffisante pour moduler l'affinité et la spécificité d'interaction du module LA pour ses cibles ARN.

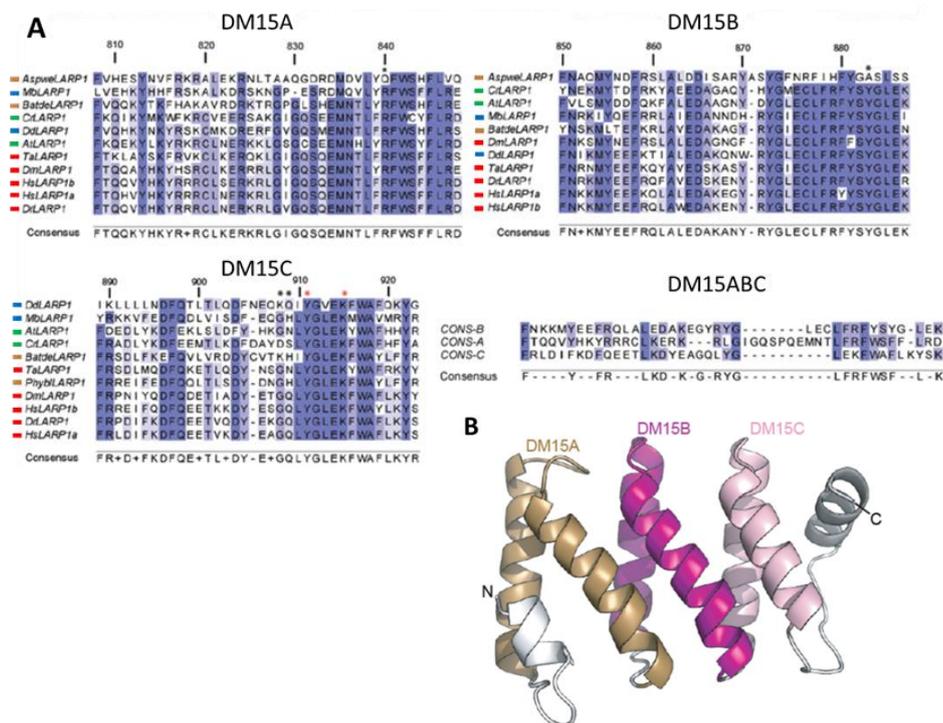
### II.4.3.b Le motif DM15 ou domaine LARP1

Le motif DM15 est présent chez certains membres de la famille LARP1 et ce, quelles que soient les espèces considérées (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009; Nykamp et al., 2008; Ponting et al., 2001). Il s'agit d'un motif d'environ 40 acides aminés présent sous forme de répétitions en partie C-terminale de la protéine LARP1. Ce motif a la particularité d'être spécifique des protéines LARP1 étant donné qu'il n'a été identifié sur aucune autre protéine. Le motif DM15 est composé (sauf chez les levures) de trois sous-unités appelées A, B et C très conservées entre espèces et entre elles (Figure 10A). L'étude structurale du motif DM15 de la protéine LARP1 humaine a montré que ce domaine consiste en huit hélices  $\alpha$  organisées en deux couches (Figure 10B). Chacun des motifs A, B et C forme deux hélices  $\alpha$  et chaque couche comprend une hélice issue de chaque motif. Cette structure rappelle l'organisation en « helix-turn-helix » des motifs HEAT, domaine ubiquitaire d'interaction protéine-protéine et retrouvé entre autres sur la protéine eIF4G du complexe de liaison à la coiffe 5' des ARNm (Lahr et al., 2015). Des analyses menées *in vitro* en 2008 ont proposé que le motif DM15 de *C. elegans* possède des propriétés de liaison à l'ARN (Nykamp et al., 2008). Récemment, il a été montré par gel retard que la région DM15 de la protéine LARP1 humaine est capable d'interagir de manière directe



**Figure 9: Structure 3D du motif RRM2**

Structure du motif RRM2 des protéines (A) p65 (homologue de LARP7) et (B) hLA (Singh et al., 2013).



**Figure 10: Alignement et structure 3D du motif DM15**

A : Alignement des boîtes A,B et C du motif DM15. Les boîtes A, B et C issues de protéines LARP1 de différentes espèces sont alignées (DM15A, DM15B et DM15C). Les séquences consensus de chacune de ces boîtes sont également alignées (DM15ABC).

Aspwe : *Aspergillus wentii*, At : *Arabidopsis thaliana*, Batde: *Batrachochytrium dendrobatidis*, Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*, Dd: *Dictyostelium discoideum*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Dr : *Danio rerio*, Hs: *Homo sapiens*, Mb : *Monosiga brevicollis*, Phybl: *Phycomyces blakesleeanus*, Ta : *Trichoplax adhaerens*. Les rectangles colorés situés à gauche des noms indiquent le règne auquel appartient l'espèce : protiste (bleu), champignons (marron), végétal (vert) et animal (rouge).

B : Le motif DM15 humain comprend 8 hélices  $\alpha$  dont trois répétitions « helix turn helix ».

Figures issues de Lahr et al., 2015.

avec les séquences TOP (5' terminal oligo pyrimidine tracts) de certains ARNm codant des protéines ribosomales (Lahr et al., 2015).

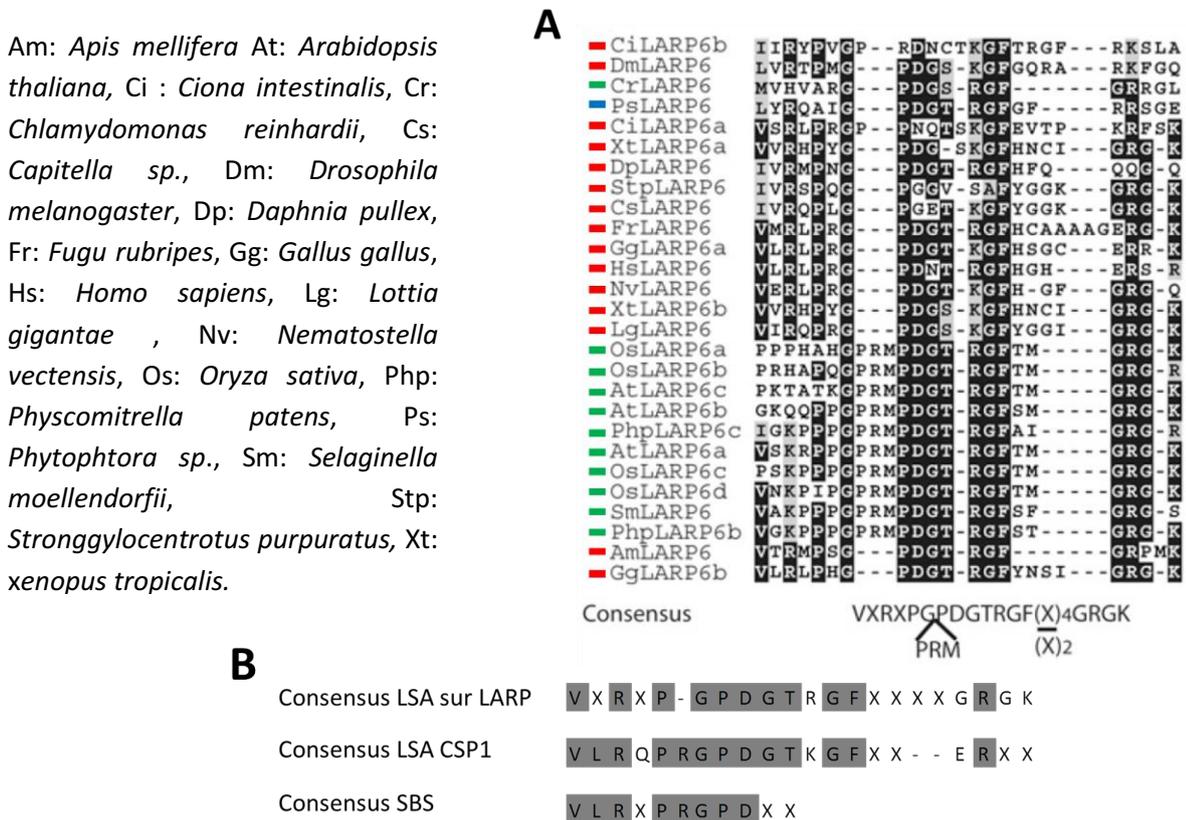
### II.4.3.c Le motif LSA

Le motif LSA (**LA and S1 Associated**) a été identifié en 2009 chez les protéines de la sous-famille LARP6, il est composé de 20 à 30 acides aminés situés en position C-terminale de la protéine. Cette séquence est conservée mais présente cependant chez les protéines LARP6 de plantes une insertion de trois acides aminés (PRM) dans la première moitié du motif (Figure 11A). Il n'est pas spécifique des LARP6 étant donné qu'il a aussi été identifié sur les protéines animales CSP1 (**Cold Shock response Protein 1**) qui portent un motif S1 de liaison à l'ARN (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). En 2013 une étude réalisée sur la protéine LARP6 humaine fait état d'une interaction protéine/protéine indépendante de l'ARN entre LARP6 et STRAP (**Sérine-Thréonine kinase Receptor Associated Protein**, aussi appelée unrip) via le motif SBS pour **STRAP Binding Sequence** (Vukmirovic et al., 2013). Ce motif de 27 acides aminés situé en partie C-terminale de la protéine LARP6 humaine correspond à une partie du motif LSA précédemment identifié (Figure 11B) et est retrouvé dans les séquences des protéines LARP6 de plusieurs espèces. Ainsi le motif LSA pourrait avoir un rôle dans les interactions protéiques entre LARP6 et des partenaires.

### II.4.3.d Le motif PAM2

Le motif PAM2 (**PAB interacting Motif 2**) constitué d'environ 12 acides aminés (Figure 12) interagit avec un domaine structuré de 70 acides aminés caractéristique de la région C-terminale des protéines PAB (**PolyA Binding protein**), nommé CTC (**Carboxyl-Terminal Conserved domain**), MLLE (**Mademoiselle**) ou encore PABC (**Poly-Adenylate Binding protein C-terminal domain**) (Jinek et al., 2010; Kozlov & Gehring, 2010; Kozlov et al., 2001, 2010a, 2010b). Le motif PAM2 permet aux protéines régulatrices de la fonction des protéines PABP d'interagir avec cette dernière. Ces interactions sont régulées dans certains cas par phosphorylation autour du motif PAM2 (Huang et al., 2013).

A vrai dire, il n'est pas juste de parler du motif PAM2 mais plutôt **des** motifs PAM2. En effet, certains de ces motifs présentent des substitutions : leucine en phénylalanine en

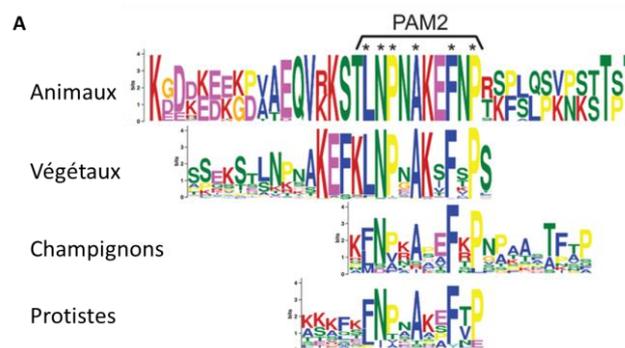


**Figure 11: Conservation du motif LSA des protéines LARP6 et comparaison des motifs LSA et SBS**

A: Alignement des séquences du motif LSA chez les protéines LARP6.

Les séquences des motifs LSA de différentes espèces sont alignées, la séquence consensus est indiquée en dessous de l’alignement (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Le rectangle à gauche du nom des protéines correspond au règne auquel appartient les espèces correspondantes : animal (rouge), plante (vert), « protiste » (bleu).

B: La première séquence correspond à la séquence consensus du motif LSA dans les protéines LARP6, la seconde séquence correspond au consensus suite à l’alignement des motifs LSA identifiés sur les protéines CSP1 (cold shock protein 1)(Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). La troisième séquence représente la séquence consensus des motifs SBS identifiés chez trois interactants de la protéine STRAP LARP6, Gemin7 et Unr ; Vukmirovic et al., 2013 ; séquence consensus générée à l’aide du logiciel MEME à partir des motifs publiés.



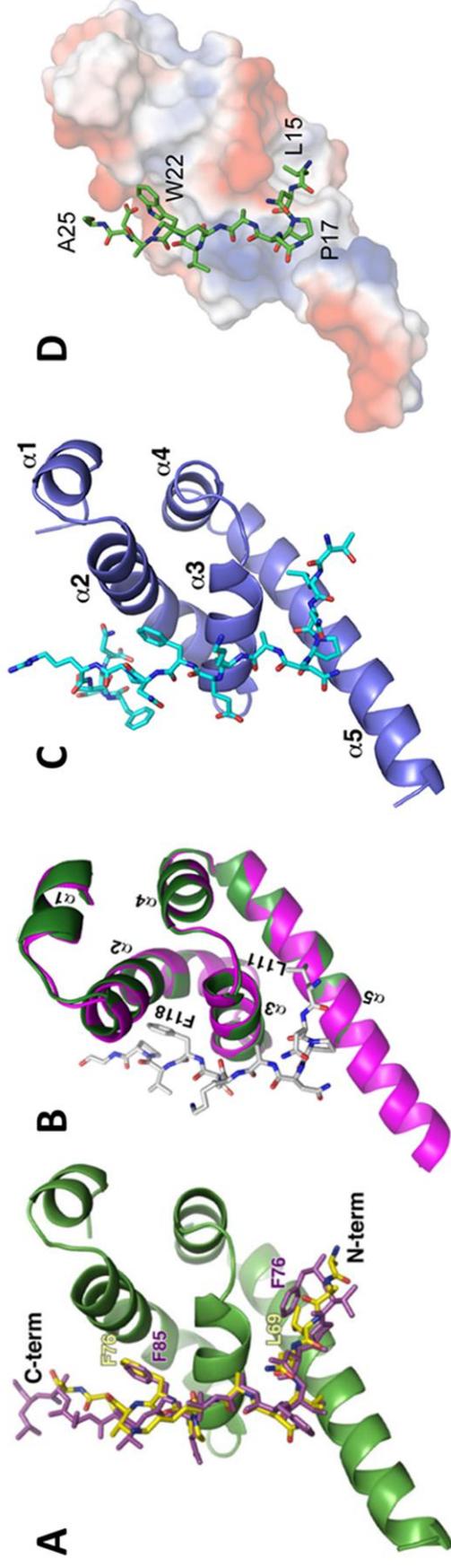
**Figure 12: Alignement du motif PAM2 consensus issu des différents règnes**

Les motifs PAM2 consensus des animaux, végétaux, champignons et protistes sont alignés révélant la forte conservation de 6 acides aminés (\*). Modifié de Jiménez-lópez & Guzmán, 2014.

position 3 pour le PAM2 de LARP6c (Merret et al., 2013b), phénylalanine en tryptophane en position 10 pour le PAM2 de LARP4 (Yang et al., 2011). La substitution en position 10 du motif PAM2 de la protéine LARP4 n'a pas de conséquence sur la capacité du motif PAM2 à interagir avec le motif MLLE (Yang et al., 2011). Quant à la substitution en position 3 du motif PAM2, une étude réalisée entre le motif PAM2 de la protéine Paip2 et le motif MLLE de PAB a montré que cet acide aminé est impliqué dans l'interaction via la liaison à une poche hydrophobe du motif MLLE (Kozlov et al., 2010a) (Figure 13). La protéine Tob2, par exemple, possède elle aussi un motif PAM2 possédant la substitution en position 3. L'analyse de la capacité de ce motif à fixer le motif MLLE a montré que cette mutation abolit la fixation au motif MLLE issu d'une protéine ubiquitine isopeptide ligase E3 HYD/EDD/Rat100 (**HY**perplastic **D**iscs/**E3** isolated by **D**ifferentia **D**isplay) mais permet, tout de même, la fixation au motif MLLE de PAB (Lim et al., 2006).

Les motifs de type PAM2 ont été repérés dans 148 protéines réparties dans 25 espèces eucaryotes (Albrecht & Lengauer, 2004; Xie et al., 2014). Parmi elles, on trouve des protéines impliquées dans la dé-adénylation (**eRF3** : eukaryotic **R**elease **F**actor **3** (Figure 13A), **Tob1/2** : transducer of ERBB2, **GW182**, **PAN3** : PAB-dependant poly(A) **N**uclease **3**) et la régulation de la traduction (**PAIP1/2** : PAB Interacting Protein) (Figure 13B). L'**ataxin-2**, quant à elle, présente selon les espèces, des homologues impliqués dans la maturation de la queue polyA ou la régulation de la traduction (Figure 13C). Les protéines **TTC3** (**T**etra**T**ri**C**opeptide repeat domain **3**) et **USP10** (**U**biquitin **S**pecific **P**eptidase **10**) sont respectivement des protéines de ligation et d'hydrolyse de l'ubiquitine possédant un motif PAM2. Dans ces deux cas, le mode d'action précis de ces protéines et le rôle du motif PAM2 ne sont pas connus. Pour plusieurs de ces protéines la présence d'un motif PAM2, et donc la possibilité d'interagir avec la protéine PAB, leur permet de réguler cette dernière et par conséquence d'intervenir sur le devenir des ARNm (maturation de la queue polyA, dé-adénylation ou encore régulation de la traduction). Il faut noter que bon nombre des protéines citées précédemment ont été observées au sein de granules de stress ou de P-bodies.

Le motif PAM2 est présent chez certaines protéines LARP appartenant aux sous-familles LARP4 (Bayfield et al., 2010; Yang et al., 2011) (Figure 13D) et LARP6 (Merret et al., 2013b). Alors que le motif PAM2 est présent chez toutes les protéines LARP4 des vertébrés, il n'est que faiblement représenté au sein des LARP4 d'invertébrés. En ce qui



**Figure 13: Structure 3D de l'interaction MLLLE/PAM2**

- A: Interaction entre des motifs PAM2 de la protéine eRF3 humaine (PAM2-N en jaune et PAM-C en magenta) avec le motif MLLLE de la protéine PABPC1 humaine en vert (Kozlov & Gehring, 2010).
- B : Interaction entre le motif PAM2 de Paip2 (gris) et le MLLLE (magenta) de PAB humaine, la structure verte correspond au motif MLLLE lorsqu'il n'interagit pas avec le motif PAM2 (Kozlov et al., 2010a).
- C : Interaction entre le motif PAM2 de l'Ataxin-2 humaine (cyan) et le motif MLLLE (violet) de PABPC1 humaine (Kozlov et al., 2010b).
- D: Interaction entre le motif PAM2w de la protéine LARP4 humaine et le motif MLLLE de la protéine PABPC1 humaine (Yang et al., 2011).

concerne les protéines LARP6, chez les végétaux, seuls certains membres de la sous-famille LARP6 possèdent ce motif qui est complètement absent chez les protistes et les animaux (Merret et al., 2013b) (cf. Résultats préliminaires et objectifs). Chez *Arabidopsis thaliana*, on connaît environ 20 protéines possédant un motif PAM2 (Albrecht & Lengauer, 2004), parmi lesquelles on retrouve deux représentants de la sous-famille LARP6, et la famille des protéines CID (**CTC Interacting Domain**) (Bravo et al., 2005). CID1 aussi connue sous le nom de ERD15 est impliquée dans la réponse au stress et la régulation de la traduction *in vitro* (Aalto et al., 2012). La protéine CID12 ou encore RBP37 possède des motifs RRM de liaison à l'ARN (Hecht et al., 1997) mais sa fonction n'a pas été caractérisée à ce jour.

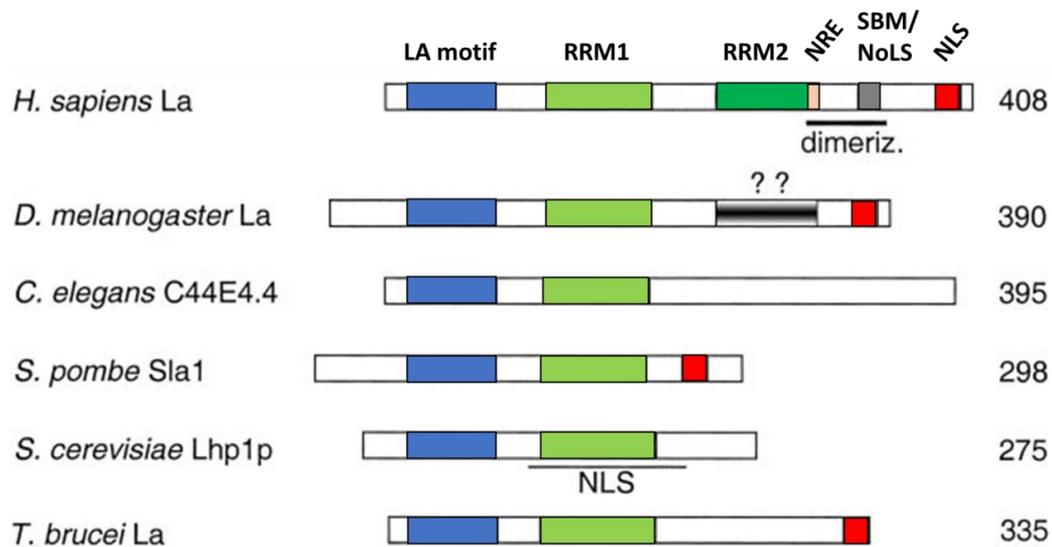
### **III. Caractéristiques fonctionnelles des 5 sous-familles de LARP**

#### **III.1. Les protéines LA authentique**

##### **III.1.1 Phylogénie, structure**

La protéine LA authentique est une phosphoprotéine modulaire présente chez les protistes, les champignons, les plantes et les animaux. Ces protéines sont essentielles chez des espèces animales (*D. melanogaster* (Yoo & Wolin, 1994), de protiste (*T. brucei*) (Westermann & Weber, 2000) et végétale (*A. thaliana*) (Fleurdépine et al., 2007), contrairement à des espèces de champignons (*S. pombe* -Van Horn et al., 1997- et *S. cerevisiae* -Yoo & Wolin, 1994-) où leur délétion n'affecte pas la viabilité de l'individu (pour revue Bayfield et al., 2010). De manière générale, leur structure comprend un motif LA suivi d'un motif RRM1 et parfois d'un motif RRM2 (cf. II.4.3.a Le motif RRM2 ou xRRM) selon les espèces (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009).

La figure 14 reprend la structure plus en détail des protéines LA authentiques chez différentes espèces et permet de voir qu'une majorité possèdent un motif NLS (**Nuclear Localisation Sequence**) d'adressage au noyau. La protéine humaine possède de plus un motif NRE (**Nuclear Retention Element**) (Jacks et al., 2003) ainsi qu'un motif SBM (**Short Basic Motif**) contenant un motif Walker A potentiel (Wolin & Cedervall, 2002). Les motifs Walker A sont capables de lier l'ADN ou l'ARN et peuvent posséder une activité



**Figure 14: Organisation de la structure des protéines LA authentiques dans différentes espèces**

Les motifs LA (bleu), RRML-1 (vert clair), RRML-2 (vert foncé), SBM (Short Basic Motif) et NoLS (gris), NLS (Nuclear Localization Sequence) (rouge ou souligné) et NRE (Nuclear retention element) (orange) (Jacks et al., 2003) sont représentés sur les protéines de différentes espèces (*Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Trypanosoma brucei*) dont la taille est indiquée à droite (nombre d'acides aminés). La protéine LA authentique humaine présente un domaine de dimérisation (dimeriz.). Figure modifiée de Jacks et al., 2003; Wolin & Cedervall, 2002.

hélicase (Hühn et al., 1997). Un motif NoLS (Nucleolar Localization Signal) d'adressage au nucléole d'environ 32 acides aminés a aussi été identifié enjambant le motif Walker A (Horke et al., 2004). D'autre part, la protéine LA authentique semble être capable de former des dimères via une séquence située à proximité du motif SBM, cependant, cette information est controversée (Jacks et al., 2003).

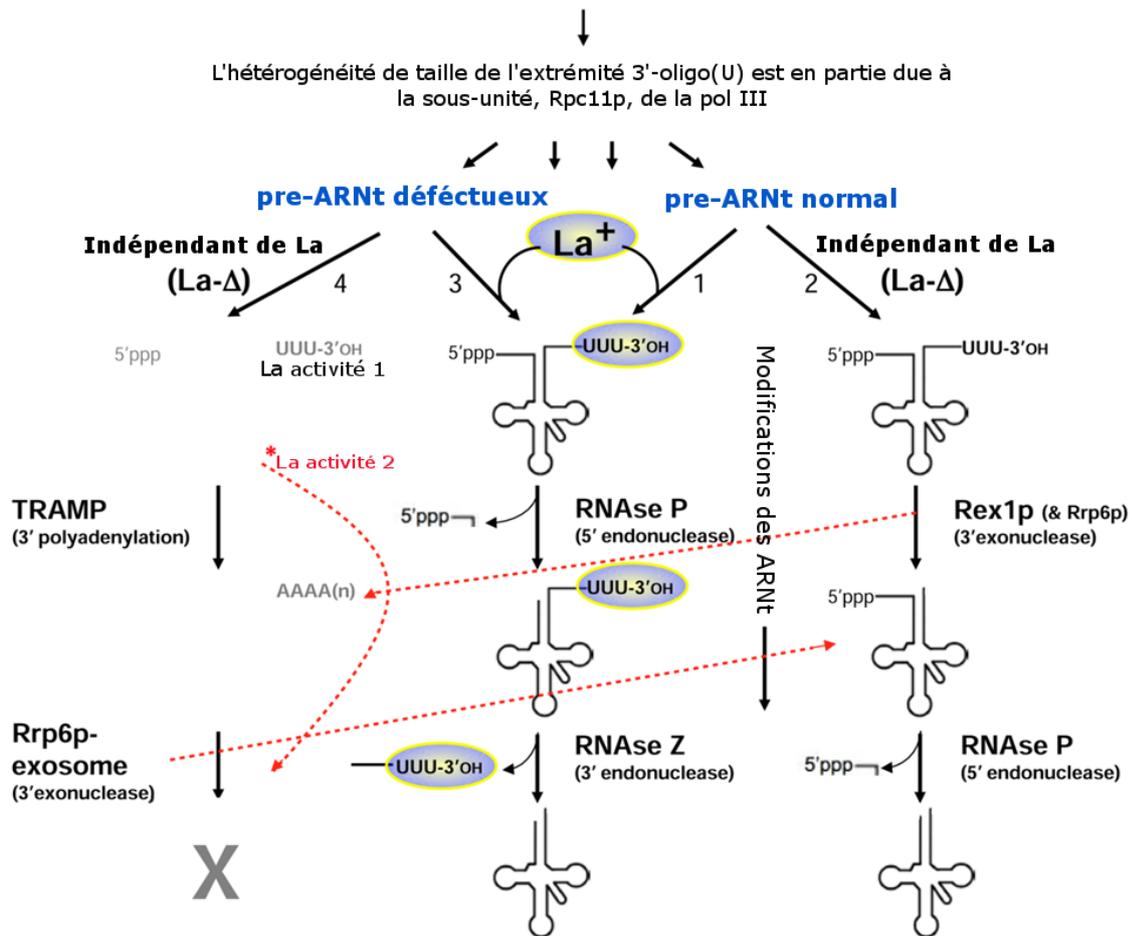
### III.1.2 Impact de la phosphorylation de la protéine LA authentique

La protéine LA authentique possède une localisation subcellulaire majoritairement nucléaire, les motifs NLS et NRE l'adressant et la maintenant dans le noyau. Cependant, les motifs RRM1 et RRM2 de cette protéine interviennent, quant à eux, dans son export du noyau et du nucléole respectivement (Bayfield et al., 2007; Horke et al., 2004) rendant sa localisation subcellulaire très dynamique. On trouve ainsi la protéine LA authentique dans le noyau, le nucléole et le cytoplasme. Il a été montré que l'état de phosphorylation de la protéine LA sur la sérine 366 influence également sa localisation au moins chez l'Homme et *S. pombe* (Intine et al., 2004). La forme non phosphorylée de la protéine LA a été identifiée dans le noyau (Fairley et al., 2005), le nucléole (Intine et al., 2004) ainsi que le cytoplasme (Intine et al., 2003; Schwartz et al., 2004). Cependant la forme phosphorylée, la plus abondante, se concentre dans le noyau. Ainsi, selon les compartiments cellulaires considérés, les protéines LA ne sont pas toutes dans le même état de phosphorylation et remplissent des fonctions différentes. De plus, il a été montré que l'état de phosphorylation peut influencer l'affinité de ces protéines pour leurs cibles (Bayfield et al., 2010).

### III.1.3 Les cibles de la protéine LA authentique

L'une des caractéristiques principales de la protéine LA authentique concerne sa capacité à lier l'ARN possédant une extrémité 3'-OH-5' et par conséquent des transcrits issus de la transcription par la polymérase III (pol III) (Stefano, 1984). En effet, le signal de terminaison de la transcription pol III est formé d'un enchaînement de thymidines qui est généralement retiré lors des étapes de maturation. Ainsi parmi les cibles identifiées on trouve les transcrits primaires de la polymérase III c'est-à-dire des ARN non codants tels que : les ARN de transfert (tRNA), l'ARN ribosomique 5S (rRNA), les ARN d'épissage (UsnRNA) : **small nuclearRNA**, les ARN du complexe 7SL SRP (**S**ignal **R**ecognition **P**article), les ARN d'éléments transposables non autonomes (rétrotransposons SINE (**S**hort

## Terminaison de la transcription par l'ARN polymérase III



**Figure 15: Rôle de la protéine LA authentique de *S. cerevisiae* dans la maturation des ARN de transfert**

Quatre voies sont empruntées par les précurseurs de tRNA selon s'il sont « déficients » ou non (defective pre-tRNA/ normal pre-tRNA ) et si la protéine LA est présente ou non (1-4).

Les voies 1 et 3 montrent le rôle de la protéine LA dans la maturation des pré-tRNA qu'ils soient « normaux » ou non. La voie 2 montre la maturation d'un pré-tRNA « normal » en l'absence de la protéine LA. La voie 4 quant à elle indique le devenir d'un pré-tRNA « déficient » en l'absence de la protéine LA authentique. Modifié de Bayfield et al., 2010.

Interspersed Nuclear Element). Elle interagit également avec certains ARN non codants de type snoRNA (small nucleolar RNA) transcrits par la polymérase II mais comportant des résidus uridines dans leurs séquences internes qui seront rendus 3' terminaux par maturation. D'autre part, la protéine LA authentique est aussi capable d'interagir avec d'autres ARN ne présentant pas de séquence 3'-UUU-OH, tels que certains ARN messagers (transcrits pol II) endogènes ou viraux. Ces ARN ont la particularité de posséder des contextes de traduction atypiques : sites d'entrée interne du ribosome (IRES) (Martino et al., 2012), portions 5' terminales de pyrimidines (TOP), cadre de lecture amont (uORF). La protéine LA authentique, via son motif Walker A, est aussi capable d'interagir avec l'extrémité 5'-ppp non modifiée des ARNm (Bayfield et al., 2010; Bhattacharya et al., 2002).

### III.1.4 Les fonctions de la protéine LA authentique

La protéine LA authentique intervient sur ses cibles ARN à de nombreuses étapes de leur métabolisme ainsi qu'en tant que chaperonne. Sa fonction majeure concerne la maturation des ARN par protection de leur extrémité contre la dégradation en 3' et leur adressage vers la voie de maturation adéquate. La protéine LA authentique intervient aussi dans la régulation de la transcription, de la traduction ou encore de la réplication virale.

#### III.1.4.a Maturation des ARNt

L'étude de la protéine LA authentique a révélé son rôle dans la maturation des ARN de transfert (ARNt) chez *S. cerevisiae*, *X. laevis*, *H. sapiens*, ainsi que chez de nombreuses autres espèces (pour revue Bayfield et al., 2010; Wolin & Cedervall, 2002). La figure 15 présente l'impact de l'absence de la protéine LA sur la maturation des ARNt dans différentes situations. Un ARNt correctement structuré peut être maturé en présence ou en absence de la protéine LA (voies 1 et 2). Par contre lorsque l'ARNt est déficient avant maturation la protéine LA devient essentielle à sa maturation (voie 3). En l'absence de celle-ci, l'ARNt entre dans la voie de dégradation (voie 4). La maturation des ARNt nécessite le retrait des extrémités du pré-ARNt par digestion endonucléolytique. Il a été montré que l'absence de la protéine LA entraîne une dégradation 3' exonucléolytique de l'ARNt jusqu'à atteindre une partie structurée (Figure 15). L'existence d'une compétition entre la protéine LA et l'exonucléase Rex1 a été mise en évidence chez la levure *S. cerevisiae* (Copela et al., 2008).

De plus, l'absence de fixation de la protéine LA à l'ARNt entraîne un défaut de repliement de celui-ci ce qui a diverses conséquences sur la maturation et/ou sa stabilité (Yoo & Wolin, 1997). Chez *S. cerevisiae*, la protéine LA (Lhp1p) intervient dans le repliement de certains ARNt en stabilisant les structures correctement formées (Chakshusmathi et al., 2003). Ainsi la protéine LA authentique est impliquée dans la maturation des ARNt en les protégeant de la dégradation en 3' et en participant au repliement correct de la forme mature. Il a été montré chez *S. cerevisiae* que ces fonctions de la protéine LA sont redondantes avec des enzymes de modification des ARNt ce qui expliquerait le fait qu'elle ne soit pas indispensable à la survie de ces organismes (Copela et al., 2006).

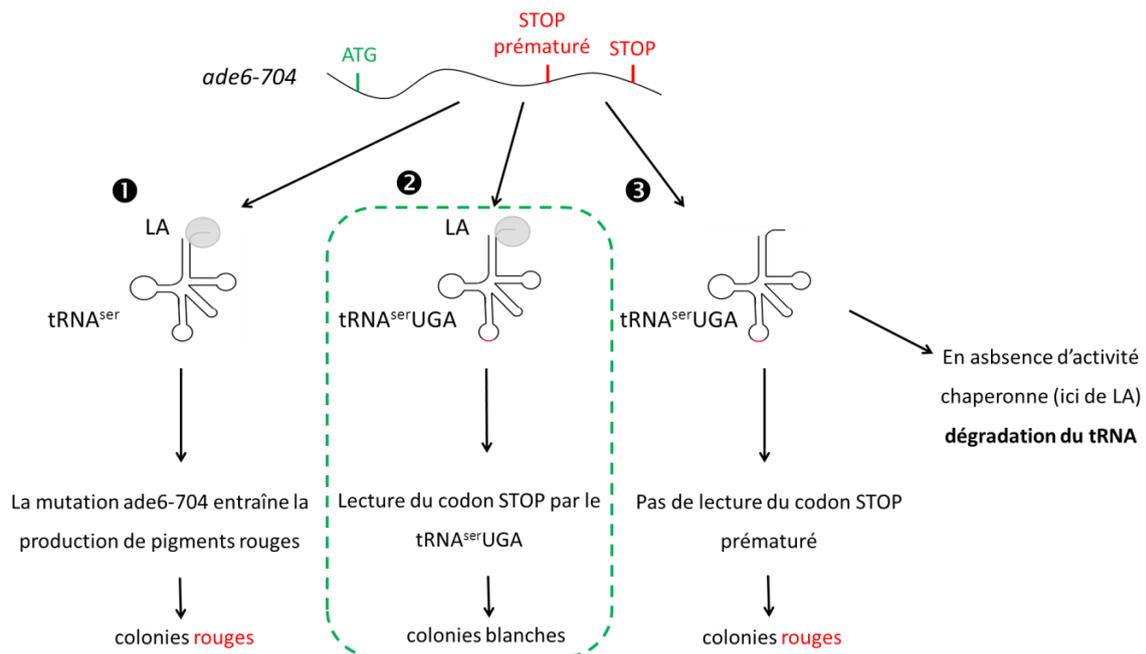
### III.1.4.b Rôle dans la transcription et la traduction.

Un rôle de la protéine LA dans la transcription pol III a été proposé chez l'Homme durant les étapes de terminaison et de ré-initiation dès la fin des années 1980 (Gottlieb & Steitz, 1989a, 1989b). Cependant, d'autres groupes de recherche ont validé le fait que la pol III est capable de réaliser la transcription en absence de la protéine LA chez *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *X. laevis* (pour revue Wolin & Cedervall, 2002). En 2005, une étude réalisée chez l'Homme vient relancer le débat d'un rôle de la protéine LA dans la transcription. Cette protéine est en effet trouvée associée à la chromatine au niveau des gènes transcrits par la polymérase III (Fairley et al., 2005). Trois ans plus tard, des études réalisées chez la levure viennent étayer cette hypothèse. En effet, l'absence de la protéine LA authentique entraîne un excès de polymérase sur les gènes, ce qui pourrait être causé par un défaut de terminaison de la transcription (French et al., 2008). Ces résultats semblent donc indiquer un rôle de la protéine LA dans la terminaison de la transcription chez la levure et au moins un rôle au niveau des gènes pol III chez l'Homme.

La protéine LA est aussi impliquée dans le contrôle de la traduction de certains ARNm endogènes et viraux. Elle intervient majoritairement sur les ARNm présentant un site interne de fixation des ribosomes (IRES) ou bien une séquence riche en pyrimidine en position 5' (TOP). Les séquences TOP sont conservées et retrouvées à l'extrémité 5'-terminale des ARNm codant les composants de la machinerie de traduction; tels que les facteurs d'initiation, les protéines ribosomales ou encore la protéine PAB (pour revue Meyuhas & Kahan, 2015). Cette boîte permettrait de co-réguler post-

transcriptionnellement l'expression de ces gènes, particulièrement en réponse aux conditions environnementales (Meyuhas & Kahan, 2015). En 2003, la protéine LA a été trouvée associée aux ARNm TOP dans les polysomes chez le xénope (Cardinali et al., 2003) et a ensuite été impliquée dans la régulation de la traduction de l'ARNm codant la protéine ribosomale L37 chez l'Homme (Schwartz et al., 2004). Parmi les ARNm endogènes cibles de la protéine LA on trouve aussi des ARNm à IRES. Deux d'entre eux codent des protéines impliquées dans l'apoptose : les ARNm XIAP chez l'Homme (**X**-linked **I**nhibitor of **A**poptosis **P**rotein) (Wolin & Cedervall, 2002) et *repear* de drosophile (Vazquez-Pianzola et al., 2005). Chez l'Homme, l'ARNm à IRES codant la chaîne lourde de l'immunoglobuline (BiP) est aussi régulé par la protéine LA lors de sa traduction (Kim et al., 2001). La traduction de l'ARNm codant la protéine Mdm2 impliquée dans la dégradation du suppresseur de tumeur p53 est aussi régulée par la protéine LA alors que cet ARNm ne possède ni IRES ni TOP, cependant il présente une région possédant 70% d'homologie avec la séquence fixée par la protéine LA sur l'ARNm BiP (Trotta et al., 2003).

Beaucoup d'ARNm viraux sont traduits via des IRES, c'est-à-dire de manière indépendante de la coiffe, ce qui fait d'eux des cibles potentielles pour la protéine LA. En effet, LA intervient, par exemple, dans la traduction du virus de l'hépatite C (Domitrovich et al., 2005), du giardiavirus (Garlapati et al., 2011) et du poliovirus (Costa-mattioli et al., 2004). Il a été montré que l'interaction de la protéine LA à la structure de l'IRES du virus de l'hépatite C implique les motifs LA, RRM1 ainsi que le RRM2 de la protéine LA humaine (Martino et al., 2012). Dans le cas du poliovirus, la protéine LA permettrait le recrutement des ribosomes sur le messenger (Meerovitch et al., 1993). Dans le cas du virus du HIV, la traduction ne passe pas par un IRES cependant la protéine LA est capable de fixer une structure tige boucle en 5' de l'ARNm nommé élément TAR (Chang et al., 1994) et influencerait par ce biais la traduction de l'ARNm (Svitkin et al., 1994). Ainsi, la protéine LA régulerait le cycle de développement de certains virus. En effet, lors d'infections virales, elle est relocalisée du noyau vers le cytoplasme, comme dans les cas suivants : poliovirus en cellule de mammifère (Meerovitch et al., 1993), adénovirus, cytomégalovirus, Epstein-Barr en cellule humaine (Baboonian et al., 1989; Fok et al., 2006; Wolin & Cedervall, 2002). Mais il a aussi été montré que la protéine LA intervient dans la réplication du virus de l'hépatite C (Domitrovich et al., 2005). Etant donné le rôle



**Figure 16: Principe de l'expérience de « tRNA mediated suppression »**

Cette expérience est réalisée chez *S. pombe*. La partie supérieure du schéma représente l'allèle *ade6-704* possédant un codon STOP prématuré. Trois voies sont ensuite représentées selon le déroulement de la traduction de l'ARNm correspondant. Voie 1 : en conditions normales, la traduction de l'ARNm s'arrête au codon STOP prématuré. Ceci entraîne la formation de pigments rouges qui colorent les colonies. Voie 2 : l'ARNt de la sérine est muté de manière à reconnaître le codon STOP prématuré. Cet ARNt est ainsi capable de supprimer le phénotype engendré par l'allèle *ade6-704*. En présence de la protéine LA, l'ARNt muté est correctement structuré et permet la traduction normale du gène. Les colonies sont donc blanches. Voie 3: l'absence de l'activité chaperonne de la protéine LA authentique entraîne la dégradation de l'ARNt celui-ci ne peut donc pas restaurer la mutation *ade6-704*, les colonies se pigmentent donc en rouges. Schéma réalisé d'après Bayfield & Maraia, 2009; Hussain et al., 2013.

essentiel de la protéine LA dans la traduction de ce virus, il n'est pas étonnant de voir qu'elle est une cible de la protéase granzyme H (acteur de la réponse immunitaire). Cette protéase vient tronquer la protéine LA authentique conduisant à sa relocalisation et diminuant ainsi son activité positive sur la traduction de l'ARNm viral via son IRES (Romero et al., 2009). Dans le cas du virus respiratoire syncytial, LA semble aussi faciliter le développement du virus ; elle bloque la fixation de la protéine activatrice de l'interféron sur la séquence "leader" de l'ARN viral diminuant ainsi l'efficacité de la réponse immunitaire (Bitko et al., 2008).

### III.1.4.c Activité chaperonne de la protéine LA authentique

Dans plusieurs cas, la protéine LA authentique a été associée à une activité de chaperonne ARN. Chez la levure, cette protéine intervient dans la stabilisation des snRNA U4 et U6 impliqués dans l'épissage des ARNm et transcrits respectivement par les polymérases II et III (Pannone et al., 2001, 1998; Xue et al., 2000). Le snoRNA U3 (transcrit par la polymérase II) est lui aussi pris en charge et stabilisé par la protéine LA au cours de sa maturation (Kufel et al., 2000). Certains de ces ARN ne présentent pas de séquence 3' riche en uracile au niveau du transcrit primaire. Cependant, il a été montré que la maturation de ces ARN par des RNase et exonucléase permet de placer en position terminale un enchaînement d'uraciles qui se trouvait préalablement au sein de l'ARN (Kufel et al., 2000), permettant ainsi la fixation de la LA authentique. D'autre part, une étude réalisée chez l'Homme sur la stabilité des ARNm d'histone a identifié la protéine LA comme stabilisatrice d'un ARNm d'histone (McLaren et al., 1997).

Des expériences *in vitro* ont été réalisées chez *S. pombe* afin de tester l'activité chaperonne de la protéine LA authentique (Bayfield & Maraia, 2009). L'utilisation de la méthode de « tRNA mediated suppression » (suppression de mutation médiée par un ARNt) permet de tester l'activité chaperonne de la protéine ou du motif protéique de son choix en observant sa capacité à sauver de la dégradation un ARNt supresseur (Figure 16). Cet ARNt permet de restaurer le phénotype sauvage de souches possédant une mutation colorant les colonies en rouge. Dans le cas de la protéine LA authentique, cette dernière permet la maturation normale de l'ARNt supresseur et ainsi la restauration du phénotype sauvage. Ceci indique que cette protéine possède une activité chaperonne (Bayfield & Maraia, 2009). L'activité chaperonne d'autres protéines à motif LA a pu être testée, ce qui a permis de montrer

qu'au moins les modules LA des protéines LARP7, LARP4 et LARP6 humaines possèdent cette activité *in vitro* (Hussain et al., 2013).

### III.1.4.d Autres fonctions moléculaires ou physiologiques de la protéine LA authentique

La protéine LA possède plusieurs autres fonctions et cibles ARN dont les mécanismes sont plus ou moins bien documentés.

Dans sa fonction de rétention des ARN au noyau, la protéine LA aurait plusieurs cibles ARN. Il s'agit du snRNA U6 et de l'ARN NL-15 de *Xenopus laevis*, de l'ARN Y1 d'*Homo sapiens* et des ARN viraux d'Epstein-Barr (EBER) et de l'herpès (HVP) (pour revue Wolin & Cedervall, 2002). Malgré l'absence de preuves directes de l'action de la protéine LA, les expériences réalisées montrent par exemple, qu'un ARN Y1 délété de sa séquence riche en uraciles est exporté au cytoplasme quatre fois plus rapidement qu'un ARN possédant cette séquence suggérant un rôle de la protéine LA dans la rétention nucléaire de cet ARN (Simons et al., 1996). Aucun indice de ce type n'a pu être trouvé chez la levure, laissant penser que les protéines LA authentiques de vertébrés pourraient avoir acquis cette fonction ultérieurement (Wolin & Cedervall, 2002).

La protéine LA semble également intervenir, de manière au moins indirecte, dans le processus de biogenèse des ribosomes dans le cytoplasme et le nucléole. Dans le nucléole, la protéine a été identifiée au niveau des sites de formation des ribosomes et interagit via son motif SBM avec la nucléoline (Intine et al., 2004) (protéine impliquée dans la maturation des ARN ribosomiques -Allain et al., 2000-). Au niveau du cytoplasme, la protéine LA authentique est impliquée dans la traduction de l'ARNm à motif TOP codant la protéine ribosomale L37 (Schwartz et al., 2004). La protéine végétale AtLA1 est présente au niveau du nucléole, son absence entraîne la modification de la taille du nucléole, suggérant un rôle dans l'activité nucléolaire et potentiellement dans la biogénèse des ribosomes (Fleurdépine et al., 2007). Ces observations suggèrent un rôle plus ou moins direct de la protéine LA authentique dans la formation des ribosomes.

Finalement, la protéine LA pourrait aussi être impliquée dans la méiose chez *S. pombe*, où une version tronquée de la protéine entraîne des méioses ectopiques (Tanabe et al., 2003).

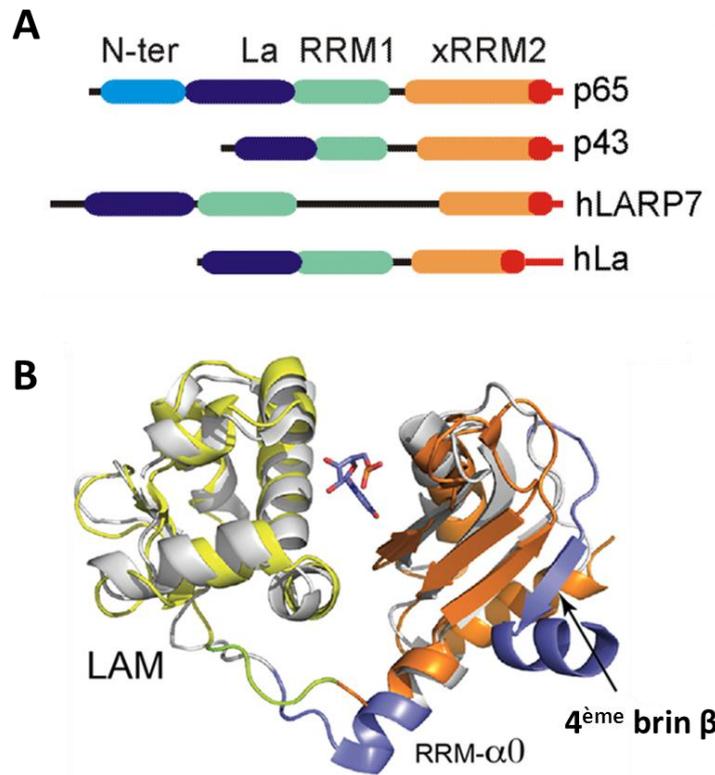
Les informations disponibles ne permettent pas de dire s'il s'agit d'une fonction directe de la protéine LA.

### III.1.5 La protéine LA chez *Arabidopsis thaliana*

Il existe peu d'informations sur les protéines LA chez *Arabidopsis thaliana*. En 2007, deux homologues de la protéine LA ont été identifiés : AtLA1 (At4g32729) et AtLA2 (At1g79880) (Fleurdépine et al., 2007; Fleurdépine, 2007). Les gènes codant ces protéines sont exprimés dans toute la plante avec cependant une expression globalement plus forte d'*AtLA1*. Les deux protéines co-localisent dans le nucléoplasme et le nucléole. Contrairement à AtLA2, AtLA1 est capable de lier les ARN à extrémités 3'-UUU-OH chez *A. thaliana* et de compléter les défauts moléculaires et les défauts de croissance induits par la délétion de la protéine LA chez *S. cerevisiae*. D'autre part, la mutation de la protéine AtLA1 induit un défaut de structure du nucléole ainsi qu'un arrêt du développement au stade embryonnaire. Ce phénotype s'explique par le rôle d'AtLA1 dans la maintenance du méristème apical. En effet, AtLA1 est capable d'interagir avec la structure IRES de l'ARNm codant le facteur de transcription WUSCHEL (WUS, critique pour le maintien du stock de cellules méristématiques) et ainsi de réguler sa traduction (Cui et al., 2015). Or ce facteur de transcription intervient dans le maintien des cellules du méristème. Cette fonction de la protéine AtLA1 nécessite une relocalisation de la protéine du noyau vers le cytoplasme. D'autre part, il a été montré que cette relocalisation et ; par conséquent, le rôle d'AtLA1 dans la traduction IRES-dépendante de WUS sont modulés par exposition à un stress environnemental (Cui et al., 2015). Ainsi, AtLA1 semble être capable d'intervenir sur les ARN à extrémité 3'-UUU-OH ainsi que sur la traduction d'au moins un ARNm à IRES, cette dernière étant régulée par les conditions environnementales.

### Conclusions

La protéine LA authentique est très conservée et présente chez la majorité des eucaryotes étudiés. Cette phosphoprotéine possède, en plus de son motif LA, un motif RRM1 canonique et un motif RRM2 non canonique ainsi que des signaux de localisation au noyau. Ceci lui confère une localisation très dynamique avec les formes non phosphorylées et phosphorylées réparties entre le cytoplasme, le noyau et le nucléole. De plus, sa localisation est affectée par les infections virales par exemple. Ainsi, selon son état de



**Figure 17: Organisation des protéines et structure du module LA des protéines LARP7**

A : Représentation des domaines protéiques des protéines LARP7 (p65 de *Tetrahymena*, p43 d'*Euplotes*, LARP7 humaine) et LA authentique humaine (Singh et al., 2012).

B : Structure de la partie N-terminale de LARP7 humaine en comparaison de la même région de la LA authentique humaine. Le module LA de la protéine LA authentique apparaît en gris, le module LA de LARP7 apparaît en jaune (motif LA) et orange (RRM1). La structure en bleu correspond à des séquences du RRM1 de la LA authentique absentes chez LARP7. Au centre la structure de l'ARN est représentée en « bâtonnets ». Modifié de Uchikawa et al., 2015.

phosphorylation et le compartiment cellulaire dans lequel se trouve la protéine, les cibles auxquelles elle a accès changent. Son état de phosphorylation influence aussi sa fonction. Ses cibles préférentielles sont les transcrits à extrémité 3'-UUU-OH (issus de la transcription par la polymérase III) ou encore certains ARN non codants (issus de la transcription par la polymérase II). Elle intervient dans ce cas dans la maturation de ces ARN en limitant leur dégradation par des exonucléases 3', en facilitant leur repliement et leur assemblage en RNP. Dans le noyau, toujours, la protéine LA pourrait aussi être impliquée dans la transcription des gènes pol III ou encore dans la formation des ribosomes au sein du nucléole. Dans le cytoplasme, la protéine LA authentique est impliquée dans la traduction des ARNm possédant des sites de fixation interne des ribosomes (IRES) ou des séquences riches en pyrimidines (5' TOP). Finalement, elle intervient également sur les ARN viraux en facilitant leur traduction ou leur réplication.

### **III.2. Les protéines LARP7**

#### **III.2.1 Phylogénie et structure**

La famille LARP7 constitue la famille de LARP la plus proche évolutivement de la famille des protéines LA (Figure 8). Il existe des représentants de cette famille seulement au sein des protistes et des animaux (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Tout comme pour les protéines LA, le module LA est présent dans la partie N-terminale et est composé du motif LA associé à un motif RRM1 (Figure 17, A et B). Bien que les motifs RRM1 des sous-familles LA authentique et LARP7 aient été initialement décrits comme similaires, des données structurales récentes ont montré que le motif RRM1 de la sous-famille LARP7 diverge du motif RRM1 canonique (Uchikawa et al., 2015). La Figure 17B montre la divergence du motif RRM1 entre la protéine LARP7 et la protéine LA authentique (Uchikawa et al., 2015). On constate que le motif RRM1 de la sous-famille LARP7 est plus petit que chez les protéines LA authentique, ce qui est dû à l'absence du brin 4 dans le feuillet  $\beta$  et de l'hélice  $\alpha 3$ . Un point commun des protéines LARP7 avec la famille LA authentique concerne la présence dans 80% des cas, d'un motif RRM2 (cf. II.4.3.a Le motif RRM2 ou xRRM) en partie C-terminale de la protéine (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Cependant, il a aussi été montré que la partie C-terminale est la portion de la protéine assurant la spécificité d'interaction de la protéine LARP7 par rapport à la

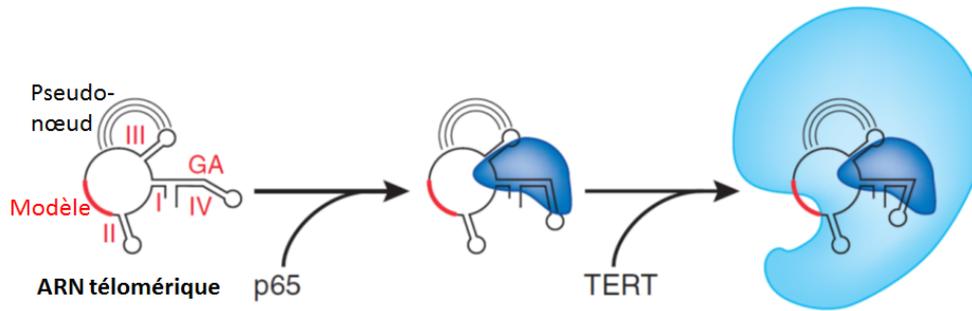
protéine LA authentique (He et al., 2008). La première protéine LARP7/p43 a été identifiée chez une espèce appartenant aux ciliés (protistes) *Euplotes aediculatus* (Lingner & Cech, 1996). D'autres homologues ont ensuite pu être identifiés tels que : p65 chez *Tetrahymena thermophila* (cilié), multisex-combs (MXC) chez *Drosophila melanogaster* et HDCMA18/PIP7S (**P**-TEFb-Interaction **P**rotein for **7**SK **S**tability) chez l'Homme (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009; Mori et al., 2002; Remillieux-Leschelle et al., 2002; Witkin & Collins, 2004).

### III.2.2 Fonctions des protéines LARP7

Les membres de la sous-famille LARP7 semblent s'être spécialisés pour un type unique de transcrits pol III et, contrairement aux protéines LA, ils restent associées de façon stable à leur cible et font partie intégrante de leur structure RNP. Selon les organismes, la protéine LARP7 s'associe à différents ARN permettant, entre autres, leur protection contre la dégradation. La protéine LARP7 de ciliés s'associe ainsi à l'ARN de la télomérase (Aigner et al., 2000) alors que LARP7 animale interagit avec l'ARN 7SK (He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008). Il est intéressant de constater que l'ARN de la télomérase est issu d'une transcription par la polymérase III uniquement chez les ciliés (pour revue Collins, 2006), il possède ainsi une extrémité 3'-UUU-OH. D'autre part, l'ARN 7SK aussi issue de la transcription pol III est quant à lui très conservé chez les vertébrés, quelques représentant plus divergents ont aussi pu être identifiés chez des invertébrés (Gruber et al., 2008). Il faut noter, d'autre part, que le module LA de la protéine LARP7 a été montré *in vitro* par « tRNA mediated suppression » (Figure 16) comme impliqué dans une activité chaperonne (Hussain et al., 2013).

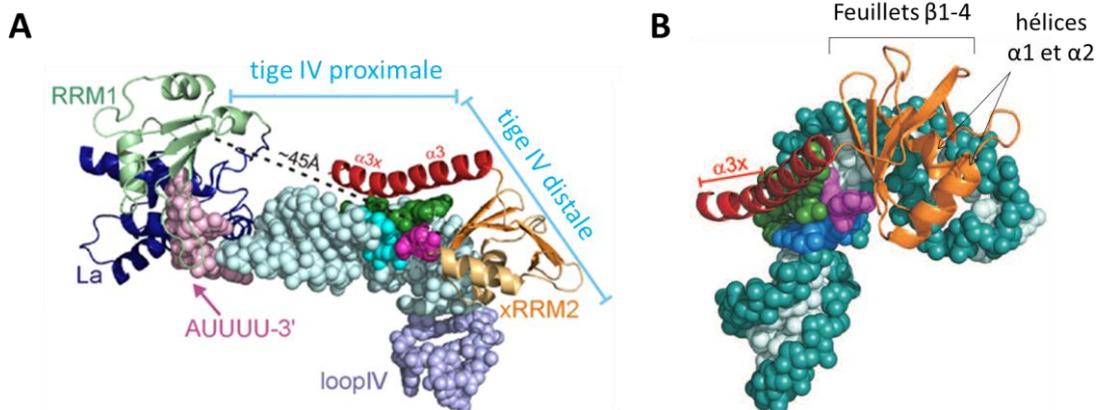
#### III.2.2.a Assemblage de la télomérase chez les ciliés.

La télomérase joue un rôle essentiel dans le maintien de la taille des télomères au niveau des chromosomes linéaires. Ce complexe ribonucléoprotéique comprend de nombreuses protéines, dont une transcriptase inverse, associées à l'ARN télomérique. La transcriptase inverse utilise le brin de l'ARN télomérique comme modèle afin de compléter la séquence du télomère par transcription inverse (Collins, 2006). C'est lors de la purification de la télomérase d'*Euplotes aediculatus* qu'a été identifiée une protéine de 43 KDa nommée p43 (Lingner & Cech, 1996), nouveau composant de la télomérase (Aigner et al., 2000).



**Figure 18: Formation de la télomérase**

L'ARN télomérique est pris en charge par la protéine p65/LARP7 au niveau de sa tige IV, ce qui entraîne un changement conformationnel de cette dernière. A partir de là, le complexe formé va être capable de recruter la télomérase reverse transcriptase (TERT), ce qui, là aussi, entraîne un léger repliement de la tige IV Modifié de Teixeira & Gilson, 2007.



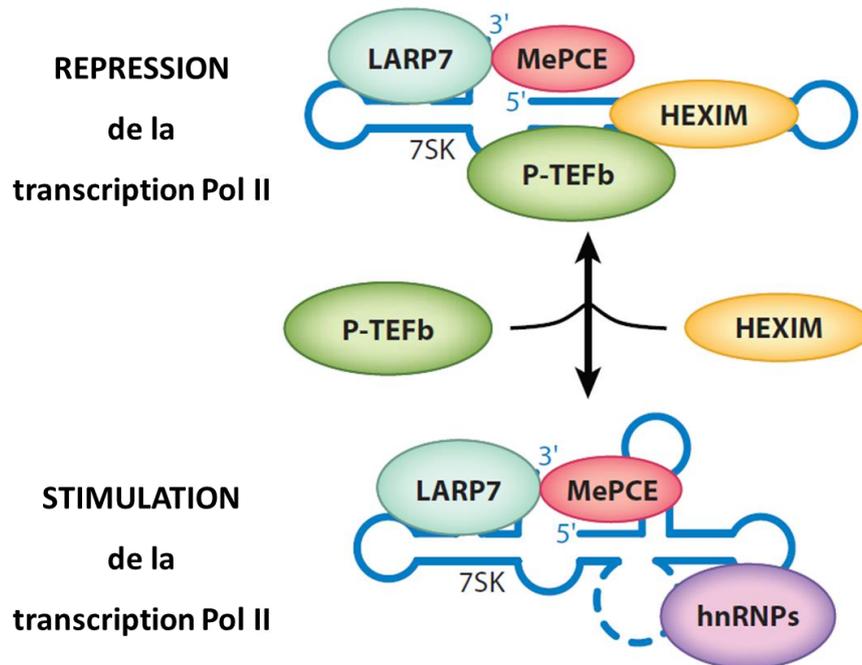
**Figure 19: Structure 3D de l'interaction entre la protéine p65 et l'ARN télomérique**

A: Modèle de l'interaction entre les motifs LA, RRM1 et xRRM2 avec la boucle IV de l'ARN télomérique. Les structures des motifs LA et RRM1 sont modélisés à partir de la structure de la protéine hLA (PDB ID 2VOP), la boucle IV de la télomérase provient de PDB ID 2H2X (Singh et al., 2012).

B: Modèle de l'interaction du motif RRM2 avec la tige boucle IV de l'ARN télomérique. Ce modèle est basé d'une part sur la structure du motif RRM2 de la protéine p65/LARP7 lié à la tige IV de l'ARN télomérique (PDB ID 4ERD). Ce motif, en représentation ruban, présente l'hélice  $\alpha 3$  (rouge), les feuillets antiparallèles (orange) et les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  (orange). D'autre part, le modèle de la tige boucle IV provient d'un assemblage entre la tige existante dans la structure et la boucle IV (PDB ID 2M21). Modifié de Singh et al., 2013.

Il s'est avéré par la suite qu'il s'agit d'un membre de la famille des protéines à motif LA appartenant à la sous-famille LARP7 (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Contrairement aux protéines LA, p43/EaLARP7 possède une seule cible dont elle est très spécifique : l'ARN télomérique issu de la transcription par la polymérase III (Aigner et al., 2003). Ces résultats se sont confirmés lorsque l'homologue de p43/EaLARP7, la protéine p65, a été identifiée chez *Tetrahymena thermophila*. L'absence de cette protéine induit une déstabilisation de l'ARN télomérique ainsi qu'un raccourcissement des télomères (Witkin & Collins, 2004) montrant l'importance de p65 dans l'assemblage et la stabilité du complexe. En effet, il a été montré que la protéine p65/TthLARP7 permet de stabiliser l'ARN télomérique en le protégeant de la dégradation en 3' et en favorisant l'assemblage de la particule. Elle intervient dans une des premières étapes de ce processus en interagissant avec la tige IV de l'ARN située en position 3' (Figure 18) (Prathapam et al., 2005). Cette association entraîne un léger repliement de la tige IV de l'ARN télomérique au niveau du renflement possédant la séquence GA (Stone et al., 2007) et favorise ainsi le recrutement de la télomérase transcriptase inverse (TERT- **T**Elomerase **R**everse **T**ranscriptase). Ceci provoque un nouveau réarrangement de la tige IV (Teixeira & Gilson, 2007) et la formation du complexe fonctionnel.

Alors que les protéines LARP7 constituent la famille évolutivement la plus proche de la famille LA authentique, seules les protéines LARP7 reconnaissent de manière très spécifique l'ARN télomérique. L'interaction entre le module LA de LARP7 représentée dans la Figure 19A a été modélisée à partir des données de structure connues du module de la protéine LA authentique (Singh et al., 2012). Le module LA de la protéine p65 pourrait ainsi reconnaître l'extrémité uridyliée de l'ARN télomérique en 3' de manière similaire à ce qui peut être observé dans la famille LA authentique. Il faut cependant prendre en compte que l'analyse structurale de la protéine LARP7 humaine a montré que le RRM1 n'est pas canonique (Uchikawa et al., 2015). Il est donc possible que le motif RRM1 des protéines LARP7 de ciliés soit lui aussi divergent et donc que l'interaction avec la tige IV de l'ARN télomérique soit modifiée. D'autre part, la partie C-terminale de la protéine p65/LARP7 contenant le motif RRM atypique (RRM2) intervient aussi dans l'interaction à l'ARN télomérique (Singh et al., 2012). Ce domaine est impliqué dans l'interaction entre p65/LARP7 et la tige IV en 3' de l'ARN télomérique Figure 19A et B (Singh et al., 2013). Ce système de régulation et d'assemblage de la télomérase n'est



**Figure 20: Complexe 7SK snRNP sous ses deux formes**

Les protéines LARP7 et MePCE sont constitutives du complexe. Les protéines P-TEFb et HEXIM sont présentes lorsque le facteur P-TEFb doit être séquestré et sont absentes lorsque le facteur P-TEFb accomplit sa fonction de régulation positive de l'élongation de la transcription par PolII. Dans ce cas, le changement de conformation du complexe entraîne le recrutement de hnRNPs. Modifié de Zhou et al., 2012.

pas strictement conservé chez les animaux, chez lesquels la transcription de l'ARN télomérase est réalisée par la polymérase II (Collins, 2006). Ainsi la protéine LARP7 animale n'intervient pas dans l'assemblage de la télomérase posant ainsi la question de sa fonction chez les animaux.

### III.2.2.b Fonction de la protéine LARP7 chez l'homme : rôle dans la particule 7SK

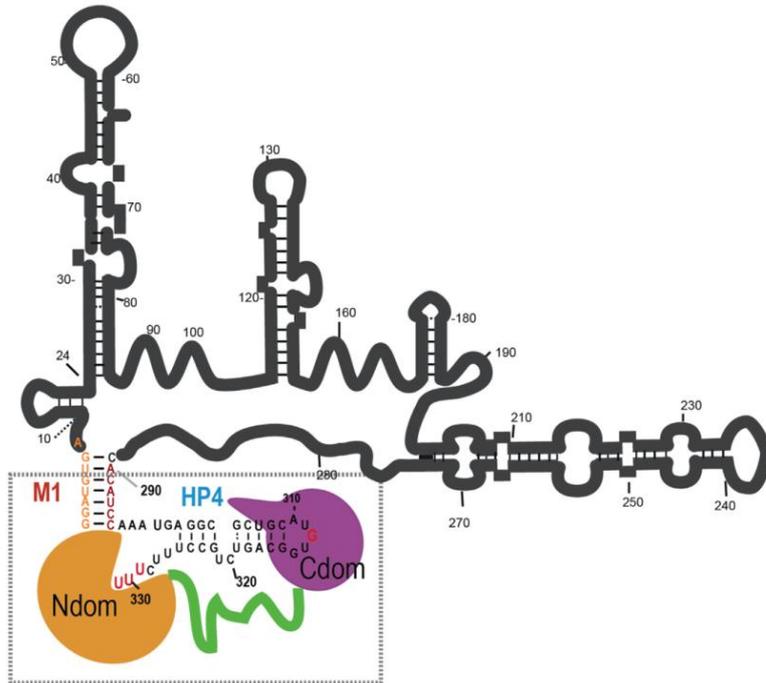
Chez les animaux, les protéines LARP7 ont été identifiées lors de recherches de gènes impliqués dans des cas de cancers (Mori et al., 2002; Nguyen et al., 2012; Remillieux-

Leschelle et al., 2002). Bien que le rôle de LARP7 chez les animaux soit différent, on note certains points communs avec les protéines de ciliés. En effet, la protéine LARP7 humaine ne présente elle aussi qu'une seule cible connue, issue de la transcription par la polymérase III. Il s'agit de l'ARN 7SK impliqué dans la régulation de la transcription par la polymérase II via la séquestration du facteur P-TEFb (cf. encadré) (Diribarne & Bensaude, 2009; Zhou et al., 2012). Ainsi LARP7 constitue avec MePCE l'un des deux facteurs ubiquitaires de la particule 7SK RNP. En 2008, les études publiées sur

#### **Le complexe 7SK snRNP**

Le complexe 7SK snRNP est un complexe nucléaire permettant la régulation de l'élongation de la transcription par la polymérase II. Pour cela, il séquestre et/ou libère un facteur positif d'élongation de la transcription : P-TEFb. P-TEFb est une kinase dépendante de la cycline qui permet l'élongation de la transcription par la polymérase II en phosphorylant deux régulateurs négatifs de la transcription, DSIF et NELF. Le complexe 7SK snRNP existe sous deux formes (Figure 20), une contenant le facteur P-TEFb et l'autre correspondant à la forme ayant libéré le facteur. Ce complexe est composé de l'ARN 7SK associé à plusieurs protéines dont seulement deux sont constitutives : MePCE (**Methyl Phosphate Capping Enzyme**) et LARP7. Dans sa forme séquestrant P-TEFb, le complexe comprend donc MePCE, LARP7, P-TEFb, ainsi que la protéine HEXIM1 ou 2 (hexamethylene bisacetamide inducible protein) qui a pour rôle de séquestrer P-TEFb. La protéine à bromodomaine BRD4 est l'une des protéines capables de venir déclencher la libération de P-TEFb. Pour cela, HEXIM et P-TEFb sont dissociées du complexe, ce qui entraîne la fixation de hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) ainsi qu'une modification de conformation du complexe. La dissociation du complexe étant réversible, P-TEFb peut ensuite être recruté dans le complexe. Cette étape consiste à ré-associer dans un premier temps la protéine HEXIM et nécessite la présence de protéines hnRNP (pour revue Zhou et al., 2012).

la protéine LARP7/PIP7S chez l'Homme (He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008) permettent de montrer qu'elle intervient dans l'assemblage et la stabilisation de la snRNP7SK.



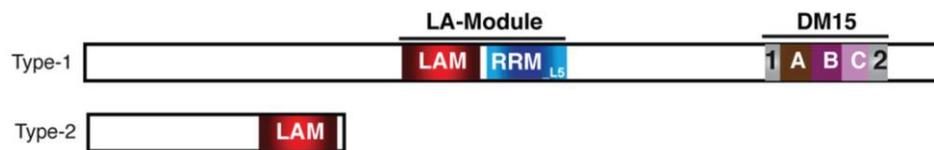
**Figure 21: Modèle 2D de l'interaction de la protéine LARP7 humaine avec l'ARN 7SK**

Ce schéma montre l'interaction de la partie N-terminale de LARP7 (module LA, orange) avec à la fois l'extrémité 3'-UUU-OH de l'ARN 7SK (nucléotides en rouge) et la portion 5' (notée M1) à la base de la structure en épingle à cheveu de l'ARN 7SK (nucléotides en orange). D'autre part, la partie C-terminale de LARP7 (motif RRM2, violet) interagit avec la structure en épingle à cheveu 4 (HP4) (Uchikawa et al., 2015).

Tout comme la protéine LARP7 de ciliés, la protéine LARP7 humaine reconnaît la séquence uridyliée en 3' de l'ARN via son module LA. Cependant, bien que les motifs RRM1 des protéines LA et LARP7 soient similaires, des études structurales récentes indiquent des variations entre ces deux motifs (Uchikawa et al., 2015). De plus la reconnaissance de la séquence 3'-UUU-OH ne semble pas faire intervenir les mêmes acides aminés (Uchikawa et al., 2015). L'interaction à l'ARN 7SK serait ainsi réalisée conjointement par le module LA (N-ter) et le motif RRM2 (C-ter). Le module LA interagit avec l'extrémité 3'-UUU-OH ainsi qu'avec une région en 5' de l'ARN située à la base d'une structure en épingle à cheveu (Figure 21). Le motif RRM2, quant à lui interagit, avec l'épingle à cheveu 4 en 3' de l'ARN (Figure 21) (Uchikawa et al., 2015). Cette interaction permet la protection de l'ARN 7SK contre la dégradation par des exonucléases. D'autre part, il a été montré que l'interaction de LARP7 avec l'ARN 7SK est aussi nécessaire au recrutement du facteur P-TEFb dans la particule 7SK RNP (Muniz et al., 2013). L'interaction entre l'ARN 7SK et LARP7 fait intervenir, en plus du module LA, d'autres parties de la protéine afin de diriger la spécificité d'interaction (Bayfield et al., 2010; He et al., 2008). Le rôle de la protéine LARP7 dans la particule 7SK est essentiel, étant donné que l'absence ou la diminution de la protéine LARP7 entraîne chez l'Homme des cancers ou encore des cas de nanisme primordial (Alazami et al., 2012; Cheng et al., 2012; He et al., 2008; Ji et al., 2014) et ce, par libération du facteur P-TEFb conduisant à la transcription de gènes impliqués dans le cancer.

### **Conclusions sur les protéines LARP7**

Les protéines LARP7 sont strictement retrouvées chez les protistes et les animaux. Elles sont des constituants canoniques et structurants de deux types de RNP : le complexe télomérase chez les ciliés et la snRNP 7SK chez l'Homme. Au niveau cellulaire elles sont donc respectivement requises pour le maintien de l'intégrité des télomères et la régulation de l'élongation de la transcription pol II. Chez les animaux comme chez les ciliés, les protéines LARP7 interagissent avec une cible issue de la transcription par la polymérase III et restent associées dans le complexe. Par le biais d'interactions avec des parties structurées de l'ARN (en plus de la reconnaissance de la séquence 3'-UUUU-OH), ces protéines parviennent à fixer leur cible de manière spécifique et stable. Leur rôle consiste



**Figure 22: Organisation des domaines des deux types de protéines LARP1**

Les protéines de type 1 possèdent un module LA (motif LA + RRM-L5) ainsi qu'un motif DM15, alors que les protéines de type 2 sont plus courtes et ne possèdent qu'un motif LA (Deragon & Bousquet-Antonelli, 2015).

ensuite à protéger l'ARN de la dégradation par des exonucléases, mais aussi à permettre la formation du complexe auquel il appartient. Ainsi, de manière indirecte, l'absence de la protéine LARP7 entraîne des cancers/pseudo-tumeurs chez l'Homme (Cheng et al., 2012; He et al., 2008; Mori et al., 2002) ; chez la Drosophile, l'homologue potentiel de LARP7, multi-sex combs, agit également comme suppresseur de tumeur (Remillieux-Leschelle et al., 2002). Chez les ciliés, l'homologue de LARP7 intervient dans la télomérase, or il a été montré chez d'autres espèces que le défaut de maintien des télomères est impliqué dans des cas de cancer (pour revue Martínez & Blasco, 2015).

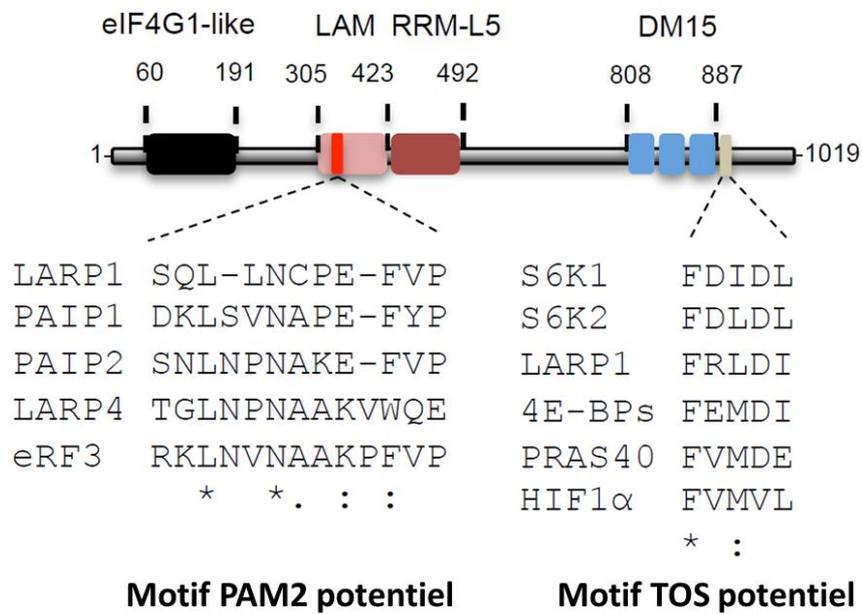
### **III.3. Les protéines à motif LA capables de fixer les ARNm.**

Alors que les membres des sous-familles LA authentique et LARP7 sont principalement impliqués dans la liaison aux ARN non codants, ceux des sous-familles LARP1, LARP4 et LARP6 semblent être des constituants de mRNP et ont pour cibles les ARN messagers dont elles régulent l'expression/le devenir.

#### **III.3.1 La sous-famille LARP1**

##### III.3.1.a Phylogénie, structure et localisation

La sous-famille LARP1 est représentée chez tous les eucaryotes où elle compte de un à trois membres selon les espèces (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). De manière générale, les protéines LARP1 sont des protéines cytoplasmiques, aussi présentes au niveau de foci de type granules de stress ou p-bodies, suggérant un rôle dans la réponse au stress (Fonseca et al., 2015; Merret et al., 2013a; Mitchell & Parker, 2014; Nykamp et al., 2008). On peut globalement distinguer deux structures pour les protéines LARP1. La première, et la plus répandue, comprend un motif LA très conservé associé à un motif RRM non canonique (RRM-L5) en position centrale de la protéine ainsi qu'un motif DM15 (Figure 10) en position C-terminale (Figure 22, Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). La deuxième structure de protéine LARP1, quant à elle, ne comprend qu'un motif LA en position C-terminale et présente une séquence plus courte que les autres LARP1 (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009; Deragon & Bousquet-Antonelli, 2015). Les protéines LARP1 ont été principalement étudiées chez *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D.*



**Figure 23: Position des nouveaux domaines potentiels identifiés sur la protéine LARP1 humaine**

Le motif eIF4G1-like est représenté en noir en position N-terminale, le motif PAM2-like est représenté en rouge au sein du motif LA, le motif TOS est représenté en gris clair immédiatement après le motif DM15 Modifié de Fonseca et al., 2015.

*melanogaster*, *H. sapiens* et *A. thaliana* (Deragon & Bousquet-Antonelli, 2015). Certaines de ces études ont permis de montrer que les protéines LARP1 sont capables d'interagir avec des protéines et des ARN via des régions auparavant non identifiées sur la séquence des protéines LARP1 (Figure 23). Ainsi la protéine LARP1 humaine posséderait un motif PAM2-like au sein du motif LA, ce motif pourrait lui permettre d'interagir avec la PAB (Fonseca et al., 2015). Un motif potentiel TOS-like (**T**OR **S**ignaling motif) serait présent immédiatement après le motif DM15 et pourrait être impliqué dans l'interaction directe de LARP1 avec les TOP d'ARNm (Fonseca et al., 2015; Lahr et al., 2015). La partie N-terminale de la protéine LARP1 posséderait de plus un motif eIF4G-like (Fonseca et al., 2015).

### III.3.1.b Fonctions des protéines LARP1

Les protéines LARP1 ont été impliquées dans de nombreuses voies métaboliques dont les fonctions moléculaires n'ont pas été systématiquement identifiées. Cependant, il en ressort que les LARP1 sont des protéines de mRNP essentielles dans la régulation de la stabilité et/ou de la traduction des ARNm (Deragon & Bousquet-Antonelli, 2015).

- Impact des protéines LARP1 sur la stabilité des ARNm.

Les protéines LARP1 ont été à de nombreuses reprises impliquées dans la régulation de la stabilité des ARNm, que ce soit de façon positive ou négative, et ce dans plusieurs espèces. Deux cas de régulation négative de la stabilité des ARNm via LARP1 (de manière plus ou moins directe) ont été étudiés chez *C. elegans* et *A. thaliana*. Il a été montré chez *C. elegans* que CeLARP1 est un régulateur négatif, direct ou indirect, de la quantité de l'ARNm FEM-3, régulant ainsi le passage de l'état mâle à l'état femelle (oogenèse) chez cette espèce hermaphrodite (Zanin et al., 2010). CeLARP1 intervient aussi, de manière directe ou indirecte, dans l'oogenèse via la diminution de la quantité à l'équilibre d'ARNm de la voie de signalisation des Ras-MAPK (**R**as-**M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase) (Nykamp et al., 2008). Chez *A. thaliana*, la protéine LARP1a (de type 1) intervient dans la régulation positive ou négative d'environ 450 ARNm, en conditions normales de croissance. En condition de stress thermique, la fonction de LARP1a semble être reprogrammée en co-facteur de la dégradation de plus de 4500 ARNm (Merret et al., 2013a). Elle aurait pour rôle de diriger une 5'-3' exoribonuclease (XRN4) vers les ARNm

en cours de traduction (Merret et al., 2015). Un rôle de LARP1 dans la régulation négative de la stabilité des ARNm a aussi été proposé dans le cadre d'une régulation de la méiose et de la mitose chez *D. melanogaster* (Blagden et al., 2009; Ichihara et al., 2007).

Il a aussi été montré à plusieurs reprises que LARP1 pouvait être un régulateur positif des ARNm. Outre le cas des LARP1 (LARP1b et c de type 2) chez *A. thaliana* impliqués dans la régulation de la sénescence (Zhang et al., 2012), LARP1 apparaît à plusieurs reprises comme régulateur positif des transcrits chez *S. cerevisiae*, par exemple lors de la résistance au cuivre via Slf1p/LARP1. Mais surtout, les deux protéines LARP1 de type 1 (Sro9p et Slf1p, type 2) régulent les transcrits impliqués dans la traduction, facilitant celle-ci.

- Impact des protéines LARP1 sur la traduction

Comme indiqué précédemment, le premier aspect de la régulation de la traduction via les protéines LARP1 consiste en la stabilisation de transcrits codant des protéines impliquées dans la traduction facilitant ainsi la mise en place de celle-ci. Chez *S. cerevisiae*, les deux homologues de LARP1, Slf1p et Sro9p, s'associent aux PAB, aux facteurs d'initiation de la traduction ainsi qu'aux polysomes (Sobel & Wolin, 1999). La protéine Slf1p permet l'augmentation de la traduction des transcrits de réponse au stress oxydatif. Ces transcrits seraient ciblés via la reconnaissance d'une séquence riche en adénines et uridines en 3' de leur séquence (Kershaw et al., 2015; Schenk et al., 2012). La protéine Sro9p, quant à elle, interviendrait dans la régulation positive des ARNm impliqués dans la traduction (pour revue Deragon & Bousquet-Antonelli, 2015). Chez *H. sapiens*, LARP1 est capable de réguler de manière globale la traduction (Burrows et al., 2010) en intervenant sur les ARNm présentant une séquence 5' TOP. En effet, les ARNm à 5' TOP codent majoritairement des protéines impliqués dans la traduction. Il a été proposé que LARP1 régule ces ARNm en intervenant dans la voie de régulation de mTOR (Target Of Rapamycin) (Aoki et al., 2013; Fonseca et al., 2015; Tcherkezian et al., 2014). LARP1 pourrait ainsi réguler la traduction d'un groupe d'ARNm possédant cette séquence afin d'influencer le taux de traduction global. De plus, la protéine LARP1 a été trouvée associée aux polysomes et serait capable d'interagir avec la protéine PAB (Blagden et al., 2009; Tcherkezian et al., 2014), l'extrémité 3' des queues polyA (Aoki et al., 2013), ainsi que les TOP situés en 5' des ARNm (Fonseca et al., 2015; Lahr et al., 2015).

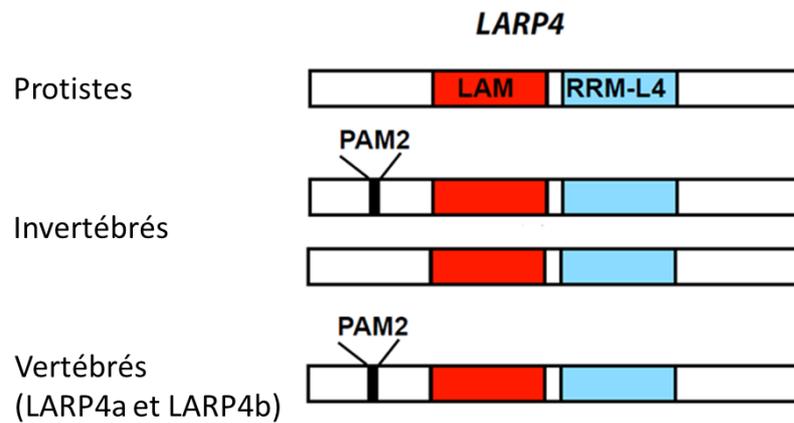
- Les autres fonctions des protéines LARP1

Toujours en lien avec le métabolisme des ARNm, d'autres fonctions ont été mises en évidence pour les protéines LARP1. Chez *S. cerevisiae*, Sro9p/LARP1 serait impliquée dans la stimulation de la transcription par la polymérase II (Tan et al., 2000). D'autre part, Sro9p/LARP1 serait membre du complexe HMC (**H**igh **M**olecular weight **C**omplex) formé en absence d'hème, suggérant un rôle de chaperonne de la protéine Sro9p (Hon et al., 2001; Lan et al., 2004). LARP1 a également été décrite comme un biomarqueur du cancer chez *H. sapiens*. En effet, via sa capacité à réguler de nombreux ARNm, elle intervient dans la progression des cancers en termes de migration cellulaire, d'invasion, de régulation de l'actine, etc... (Burrows et al., 2010; Kagami et al., 1997; Sobel & Wolin, 1999). De plus, LARP1 serait capable, d'après des études récentes, de réguler les ARNm mTOR dans deux types cellulaires (Mura et al., 2014). Or mTOR est une protéine kinase centrale dans la régulation de nombreux métabolismes cellulaires.

- Les protéines LARP1 chez *Arabidopsis thaliana*

Il existe trois représentants des protéines LARP1 chez *A. thaliana*, la protéine LARP1a (la plus étudiée) est la seule LARP1 de type 1, les protéines AtLARP1b et c étant de type 2. *AtLARP1a* et *AtLARP1c* s'expriment dans tous les tissus de la plante ; dans le pollen mature ou en germination, *AtLARP1c* est plus exprimé qu'*AtLARP1a* dont le niveau d'expression est relativement faible (Schmid et al., 2005). La protéine AtLARP1c est impliquée dans la sénescence, où elle agirait comme régulateur positif de l'expression de gènes associés à la sénescence (*SAG*) (Zhang et al., 2012).

AtLARP1a est une protéine cytoplasmique et se trouve dans des granules de stress et/ou p-bodies en conditions de stress (Merret et al., 2013a). Plusieurs arguments montrent le rôle d'AtLARP1a dans la régulation de la stabilité des ARNm. En effet, cette protéine est présente au niveau des polysomes et intervient en conditions de stress (stress thermique à 38°C) dans la dégradation, à l'aide de XRN4 (exoribonucléase 5'-3' homologue de XRN1), de milliers d'ARNm codant des « protéines de ménage » ou de croissance. Cette dégradation serait réalisée en



**Figure 24: Structure des protéines LARP4**

Organisation des domaines des protéines LARP4 dans les différents taxons. Chez les invertébrés l'unique protéine LARP4 du génome peut selon les espèces posséder un motif PAM2 ou non. Données supplémentaires. Modifié de Merret et al., 2013b.

réponse au stress et de manière co-translationnelle afin de rapidement reprogrammer la synthèse de protéines (Merret et al., 2013a, 2015).

### III.3.2 Les protéines LARP4

#### III.3.2.a Phylogénie et structure

La sous-famille LARP4 possède une répartition relativement restreinte. En effet, de même que les protéines LARP7, les membres de cette sous-famille sont présents uniquement chez certains protistes et chez les animaux (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009); elles sont en particulier absentes des génomes de plantes. Le nombre de copies de LARP4 par génome varie de 1 à 3 ; à ce jour, seul *Danio rerio* semble posséder 3 copies du gène LARP4. En règle générale, il n'existe qu'une seule copie de LARP4 sauf chez les vertébrés où l'on trouve deux copies : *LARP4a* et *LARP4b*, précédemment appelée *LARP5* (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009; Merret et al., 2013b). Les deux protéines codées par ces gènes appartiennent cependant à deux sous-groupes évolutivement distincts. Il a été montré chez l'Homme que ces deux protéines sont cytoplasmiques et capables de co-sédimer avec les polysomes ; de plus, on les retrouve au niveau des granules de stress où elles se relocalisent après traitement à l'arsenite (Schäffler et al., 2010; Yang et al., 2011). Quant à la structure, comme toutes les LARP, les protéines membres de la sous-famille LARP4 possèdent, en position centrale, un motif LA associé à un motif RRM1 qui est de type non canonique et nommé RRM-L4 (Figure 24) (Merret et al., 2013b). Il s'avère que le motif LA des protéines LARP4 est le plus divergent de toutes les LARP étant donné que plusieurs acides aminés clés de l'interaction à l'ARN ne sont pas conservés (Bayfield et al., 2010; Merret et al., 2013b). Des analyses phylogénétiques ont montré que la conservation du motif LA est affectée par la présence en position N-terminale d'un motif PAM2 (Merret et al., 2013b). Le motif PAM2, capable d'interagir avec le motif MLLE ou PABC, est présent sur toutes les LARP4 de vertébrés (a et b), quelques protéines LARP4 d'invertébrés, mais est absent des protéines LARP4 de protistes (Merret et al., 2013b). En réalité, il s'agit plus exactement d'un motif PAM2-like étant donné que certains acides aminés clés de l'interaction avec le motif MLLE (Kozlov & Gehring, 2010) sont mutés, ce qui n'affecte cependant pas ses capacités de fixation *in vitro* (Yang et al., 2011). La présence chez les membres de la sous-famille LARP4, de divergences au niveau d'acides

aminés clés dans les motifs de liaison à l'ARN et dans le motif d'interaction protéine-protéine, suggère une néo-fonctionnalisation de cette sous-famille et un type de cibles et/ou un mode de reconnaissance distincts.

### III.3.2.b Interactions mises en place avec les protéines LARP4

Les études concernant la fonction des protéines LARP4 ont été réalisées chez l'Homme et traitent donc des protéines LARP4a et LARP4b. Comme indiqué précédemment, les protéines LARP4 sont présentes au niveau des polysomes, il a été montré, que la présence de LARP4a dans les polysomes est dépendante des interactions ARN et protéique que celle-ci est capable d'établir (Yang et al., 2011). En effet, cette protéine, hormis sa fonction de protéine de liaison à l'ARN, est capable d'interagir avec PAB et RACK1 (**R**eceptor for **A**ctivated **K**inase **1**, protéine cœur de la petite sous-unité 40S du ribosome ; (Gandin et al., 2013), ainsi qu'avec la protéine TDP-43 impliquée dans des maladies humaines (sclérose et myopathies, Freibaum et al., 2010). Toutes ces interactions évoquent donc une implication dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, particulièrement dans le contrôle de la stabilité et/ou de la traduction des ARNm. L'analyse de ces interactions a permis de révéler les régions de la protéine LARP4a impliquées dans chacune des interactions. Evidemment, l'interaction avec PAB est médiée par le motif PAM2 de LARP4a mais fait aussi intervenir une région située après le motif RRM. Etonnemment, cette région intervient également dans l'interaction avec RACK1 et la petite sous-unité du ribosome (Yang et al., 2011). En termes d'interaction LARP4/ARN, les informations disponibles proviennent d'une étude menée sur la protéine LARP4b humaine et montrent que cette protéine lie un vaste sous-groupe d'ARNm via une reconnaissance de séquences riches en adénosines et uraciles présentes dans la région 3' UTR (Küspert et al., 2015). Les protéines LARP4a et LARP4b semblent avoir des propriétés relativement proches, étant donné que toutes deux sont cytoplasmiques et polysomales. L'interaction de LARP4b avec les ARNm ainsi que l'interaction de LARP4a avec plusieurs protéines impliquées dans la régulation de la traduction vont dans le sens d'un rôle de ces protéines dans cette étape du métabolisme des ARN.

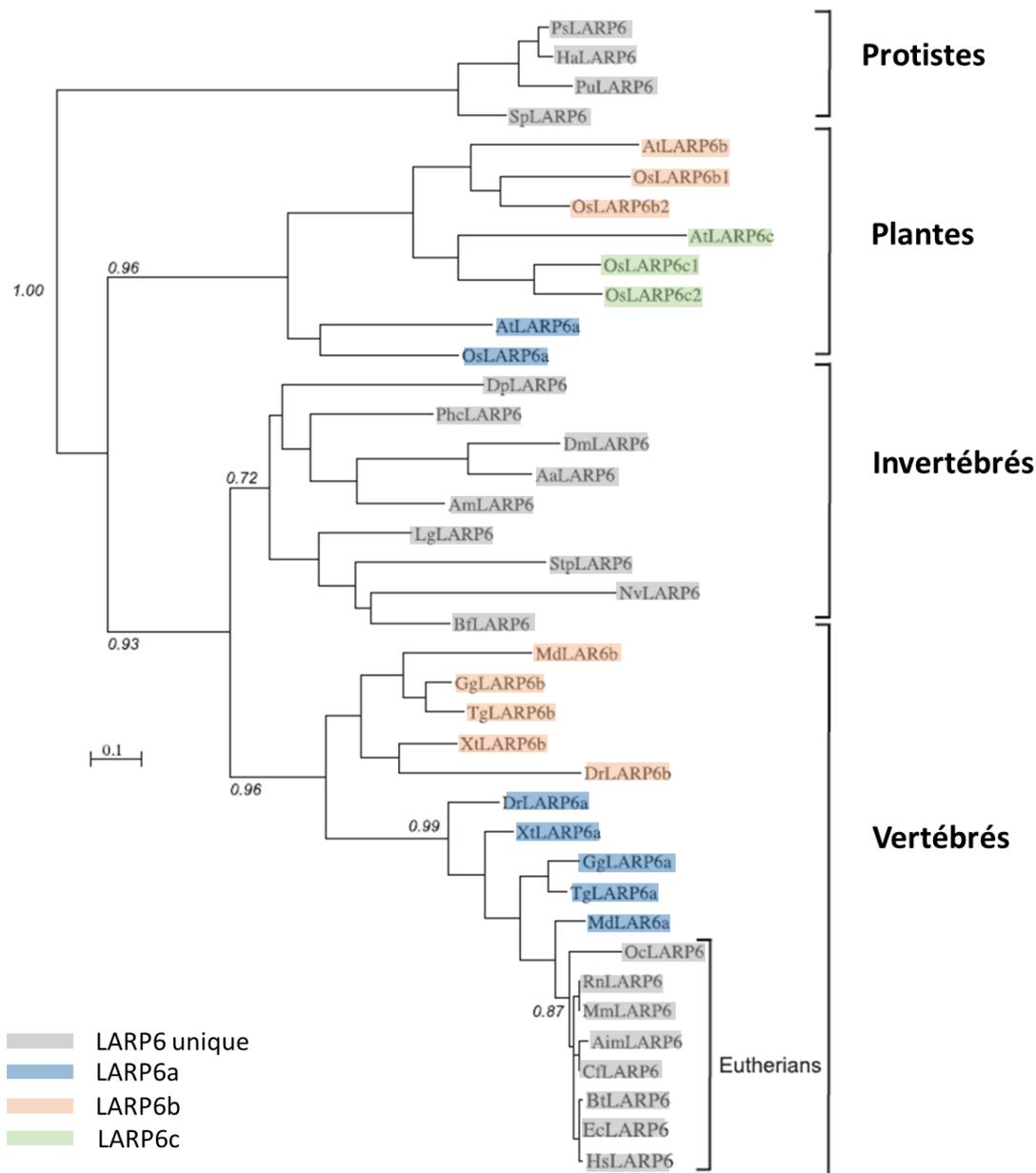
### III.3.2.c Fonction des protéines LARP4.

En termes de fonction moléculaire, les délétions des protéines LARP4a ou LARP4b humaines ont montré une diminution globale de la traduction. Ainsi, ces protéines seraient des facteurs positifs de régulation de la traduction (Schäffler et al., 2010; Yang et al., 2011). En 2010, il a été mis en évidence que l'ARNm codant la protéine LARP4a est la cible d'un miRNA (Takane et al., 2010). Il a ainsi été suggéré que la régulation effectuée par le miRNA sur la quantité de protéine LARP4 pourrait être un moyen de régulation général de la traduction. Il a aussi été montré que les délétions des protéines LARP4a ou LARP4b provoquent une diminution de la stabilité des ARNm (Küsper et al., 2015; Yang et al., 2011). Cependant, il est difficile de dire si la diminution de la traduction est la conséquence d'une plus forte dégradation des ARNm ou bien si le faible taux de traduction entraîne une dégradation prématurée des ARNm. Étant donné l'importance de la régulation de la traduction dans une cellule, il n'est pas étonnant de voir que les protéines LARP4 soient impliquées de manière plus ou moins directe dans plusieurs maladies. Il a aussi été montré que la protéine LARP4a intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0 dans un type de leucémie probablement par régulation d'un ou plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire (Zhang et al., 2014). Dans d'autres études, LARP4a est impliquée dans la migration cellulaire en cellules HeLa (Bai et al., 2011) et présente une expression différentielle dans les cas d'adénocarcinome pulmonaire (Zhou et al., 2013). Une activité chaperonne du module LA de la protéine LARP4, *in vivo* en système hétérologue, a aussi été mise en évidence (Hussain et al., 2013). Ainsi les protéines LARP4 animales interviennent sur le métabolisme des ARNm de manière générale par régulation positive de la stabilité et/ou de la traduction. À ce jour, le niveau de redondance fonctionnelle entre les protéines LARP4a et LARP4b n'est pas déterminé.

### III.3.3 Les protéines LARP6

#### III.3.3.a Evolution de la sous-famille LARP6

L'analyse phylogénétique basée sur la comparaison des séquences des motifs LA et RRM(-L) de 113 protéines eucaryotes, et publiée en 2009, révèle qu'il existe des représentants de la sous-famille LARP6 chez les protistes, chez les végétaux (algues vertes, bryophytes et plantes vasculaires) et chez les animaux (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009).



**Figure 25: Arbre phylogénétique détaillé de la sous-famille LARP6 chez les eucaryotes**

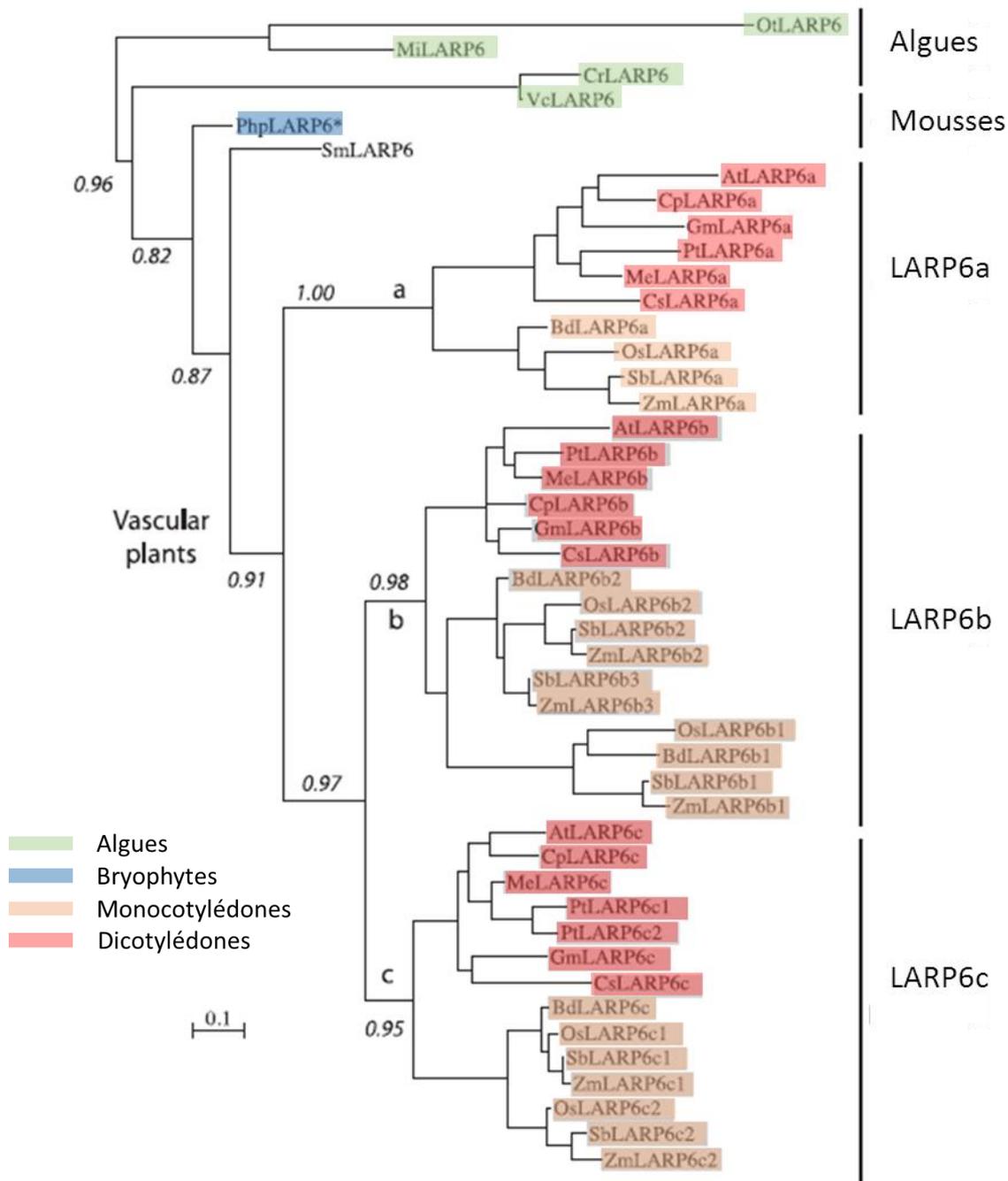
Abréviation des noms d'espèce : *Aedes aegypti* (Aa), *Ailuropoda melanoleuca* (Aim), *Apis mellifera* (Am), *Arabidopsis thaliana* (At), *Branchiostoma floridae* (Bf), *Bos taurus* (Bt), *Canis familiaris* (Cf), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Daphnia pullex* (Dp), *Danio rerio* (Dr), *Equus caballus* (Ec), *Gallus gallus* (Gg), *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Ha), *Homo sapiens* (Hs), *Lottia gigantea* (Lg), *Monodelphis domestica* (Md), *Mus musculus* (Mm), *Nematostella vectensis* (Nv), *Oryctolagus cuniculus* (Oc), *Oryza sativa* (Os), *Pediculus humanus corporis* (Phc), *Phytophthora sp.* (Ps), *Pythium ultimum* (Pu), *Rattus norvegicus* (Rn), *Saprolegnia paraistica* (Sp), *Strongylocentrotus purpuratus* (Stp), *Xenopus tropicalis* (Xt). Modifié de Merret et al., 2013b.

Cependant le nombre de copies LARP6 est très variable, ce qui est mis en évidence par l'analyse évolutive plus détaillée réalisée en 2013 (Merret et al., 2013b). Cette étude a été menée sur 41 protéines LARP6 issues de 28 espèces et révèle qu'il n'existe qu'une copie de LARP6 chez les protistes, invertébrés et les végétaux non vasculaires, deux copies chez les vertébrés à l'exception des euthériens (mammifères placentaires, 1 copie), trois copies chez la majorité des angiospermes eudicotylédones et six copies chez la plupart des angiospermes monocotylédones (Figures 25 et 26). Ainsi, la version ancestrale de LARP6 a très probablement subi une duplication dans l'ancêtre commun des vertébrés il y a environ 525 millions d'années, aboutissant à l'obtention de deux gènes *LARP6a* et *LARP6b* chez les vertébrés. La présence d'un seul gène chez les euthériens suggère que *LARP6b* a ensuite été perdu dans cette branche (il y a 125 millions d'années). Pour ce qui est des végétaux, une seule copie est présente chez les algues, les bryophytes (mousses) et les sélaginelles. Chez les angiospermes, on retrouve trois sous-familles *LARP6a*, *LARP6b* et *LARP6c*. Alors qu'il n'y a toujours qu'une seule copie de *LARP6a*, il peut exister chez les angiospermes plusieurs copies des gènes *LARP6b* et *LARP6c* (Figure 26). Ceci suggère des duplications successives au sein des plantes vasculaires. L'analyse phylogénétique montre que les sous-familles *LARP6b* et *LARP6c* sont évolutivement plus proches entre elles que de la sous-famille *LARP6a*. Ceci se confirme avec l'observation que les protéines *LARP6b* et *LARP6c* possèdent un motif PAM2 conservé mais absent des protéines *LARP6a*. Cette étude a permis de voir que les protéines LARP6 sont présentes dans une grande variété d'espèces et que leur nombre de copies varie; allant jusqu'à 6 copies chez les angiospermes monocotylédones. Les différentes duplications du gène *LARP6* ancestral semblent être dues à des événements distincts chez les vertébrés et les angiospermes.

### III.3.3.b Les motifs protéiques chez les protéines LARP6

- Structure des protéines LARP6

Il existe chez les eucaryotes de nombreuses protéines LARP6 issues d'évènements de duplication et délétion différents selon les espèces que l'on considère (Merret et al., 2013b). Toutes ces protéines possèdent des structures proches avec la présence du motif LA (Figure 27 et 28A) en position centrale de la protéine suivi d'un motif RRM1 non canonique appelé RRM-L3 (Figure 27 et 28A). La séquence du motif LA dans la protéine



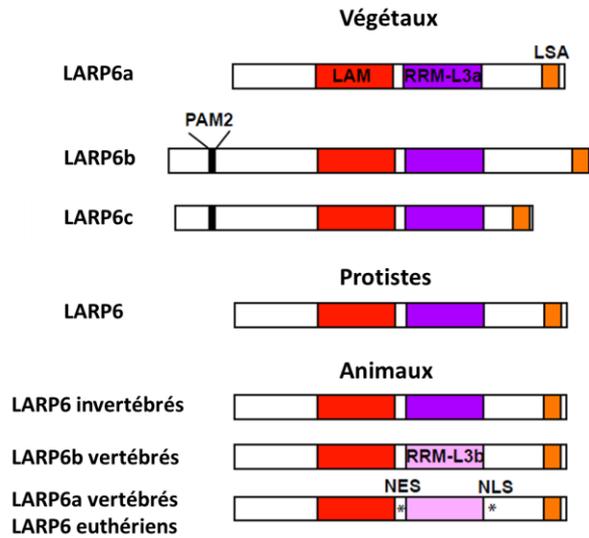
**Figure 26: Arbre phylogénétique détaillé de la sous-famille LARP6 chez les végétaux**

Abréviation des noms d'espèce :

*Arabidopsis thaliana* (At), *Brachypodium distachyon* (Bd), *Carica papaya* (Cp), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Cucumis sativus* (Cs), *Glycine max* (Gm), *Manihot esculenta* (Me), *Micromonas* (Mi), *Oryza sativa* (Os), *Ostreococcus tauri* (Ot), *Physcomitrella patens* (Php), *Populus trichocarpa* (Pt), *Sorghum bicolor* (Sb), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Volvox carteri* (Vc), *Zea mays* (Zm). Modifié de Merret et al., 2013b.

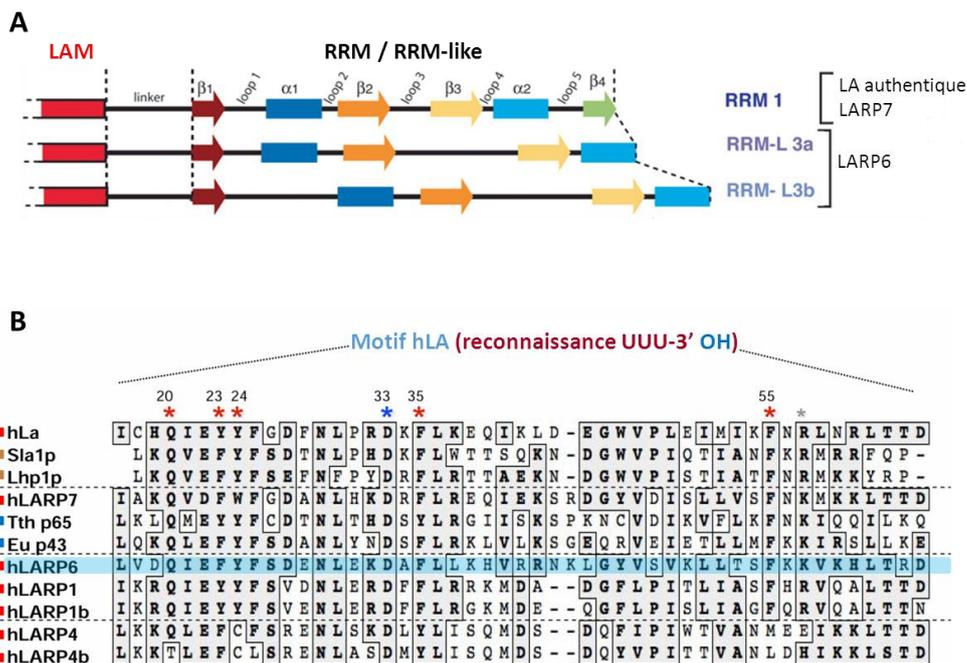
LARP6 humaine montre une forte conservation des acides aminés de la protéine LA authentique impliqués dans la reconnaissance des séquences UUU-3'-OH (Bayfield et al., 2010) (Figure 28). Cependant, des analyses structurales du motif LA et du motif RRM1 de la protéine LARP6 humaine suggèrent que le module LA ne pourrait pas adopter la même configuration que le module LA de la protéine LA humaine (Figure 29). Comme indiqué précédemment toutes les protéines LARP6 possèdent en position C-terminale un motif LSA (Figure 11A) qui est cependant légèrement divergent dans les LARP6 végétales (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). Des immunoprécipitations réalisées avec la protéine LARP6 humaine ont permis de décrire le motif SBS (partie du motif LSA) comme impliqué dans une interaction protéine/protéine avec la protéine STRAP (Vukmirovic et al., 2013). Les protéines LARP6a de vertébrés et LARP6 d'euthériens possèdent, d'autre part, un motif NLS, fonctionnel au moins chez l'Homme (Cai et al., 2010a) (Figure 27).

Les protéines LARP6b et LARP6c des angiospermes possèdent, de plus, un motif PAM2 en position N-terminale qui, comme indiqué précédemment, est impliqué dans l'interaction avec le motif MLLE ou PABC des protéines PAB. La présence de ce motif PAM2 implique une légère divergence du motif LA (cf. paragraphe suivant). Il s'avère que ces deux sous-familles de protéines LARP6 présentent aussi des divergences en termes de séquence, notamment au niveau du motif RRM. En effet, on constate que toutes les protéines LARP6 ne possèdent pas toutes le même RRM (Figure 28B). Alors que toutes les protéines LARP6 végétales possèdent un motif de type RRM-L3a, les protéines LARP6 animales peuvent présenter un motif RRM-L3a (LARP6 des invertébrés) ou bien RRM-L3b (LARP6a et b de vertébré, LARP6 des Euthériens). Ces motifs présentent tous les deux une boucle 3 plus longue que le motif RRM1 de la LA authentique. L'analyse de la séquence de ces motifs laisse supposer l'absence du feuillet  $\beta$ 4 (Figure 28) ; cependant l'analyse structurale du motif RRM-L3b a montré qu'un feuillet  $\beta$  équivalent est bien présent, au moins sur ce motif. D'autre part, deux hélices  $\alpha$  supplémentaires ont aussi été identifiées dans ce motif (Martino et al., 2014). Les motifs RRM-L3a et RRM-L3b diffèrent entre eux par la longueur de leur boucle 1 (loop1), située entre le feuillet  $\beta$ 1 et l'hélice  $\alpha$ 1, qui est près de trois fois plus longue dans le cas du motif RRM-L3b (Figure 28B) (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009).



**Figure 27: Organisation des motifs protéiques chez les protéines LARP6 animales et végétales**

Modifié de Merret et al., 2013b (données supplémentaires).



**Figure 28: Conservation du module LA dans les sous-familles**

A : Organisation des motifs RRM1 (LA authentique/ LARP7) et RRM-L3 (LARP6) modifié de Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009. A noter qu'une analyse structurale du motif RRM-L3b a révélé en 2014 la présence d'un feuillet  $\beta_4$  (Martino et al., 2014).

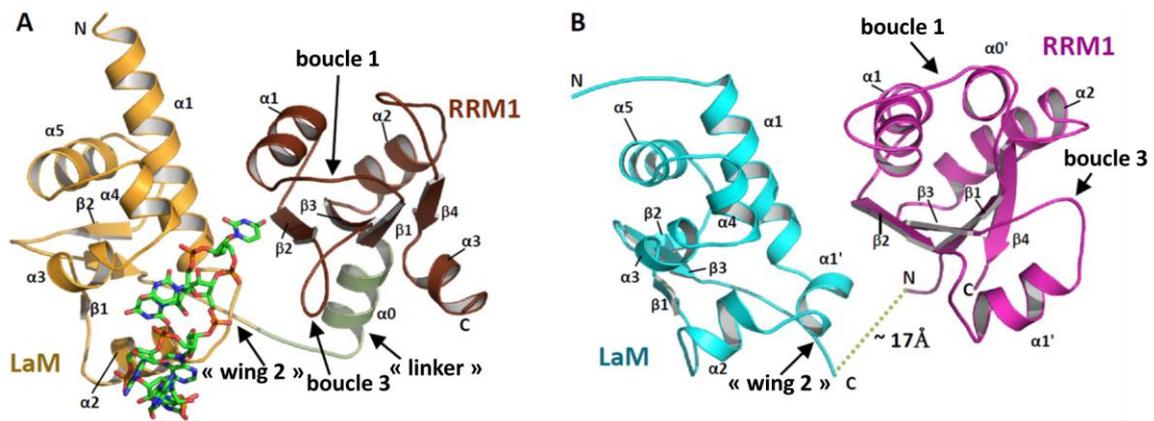
B : Conservation des acides aminés clés du motif LA au sein de différentes familles de LARP modifié de Bayfield et al., 2010. Les règnes auquel appartiennent les espèces dont sont issues les protéines sont représentés par un rectangle coloré : protiste (bleu), champignon (marron) et animal (rouge).

- Acquisition du motif PAM2 chez les protéines LARP6 de plantes.

Le motif PAM2 constitué de 12 acides aminés possède 6 acides aminés très conservés (Figure 12) définis ici comme la séquence consensus. Chez les angiospermes, les protéines LARP6b et LARP6c possèdent un motif de type PAM2, cependant ce motif n'est pas identique chez ces deux sous-familles. En effet, le motif présent sur la protéine LARP6b est identique à la séquence consensus du motif PAM2 alors que le motif identifié dans LARP6c correspond au motif possédant une substitution de la leucine en phénylalanine en position 3 (Merret et al., 2013b). Comme indiqué précédemment, l'étude de la protéine Tob2, a montré que le motif PAM2 possédant cette substitution, ne parvient pas à fixer tous les motifs MLLE mais est capable de fixer le motif MLLE de la protéine PAB (cf. II.4.3.d Le motif PAM2). Ainsi, il est très probable que le motif PAM2 de LARP6c soit capable de fixer certains motifs MLLE, mais avec un mode d'interaction et/ou une affinité différente de LARP6b.

L'acquisition du motif PAM2 n'a pas été sans conséquence pour les motifs LA et RRM de LARP6 (Merret et al., 2013b). Il a été observé que les protéines LARP possédant un motif PAM2 subissent un réarrangement du motif LA. Parmi les six acides aminés définis comme clés dans la séquence du motif LA (cf. II.3.2 Le module LA), deux à trois sont mutés dans les protéines LARP6b et LARP6c. L'analyse de la conservation du motif LA chez les protéines LARP4, qui possèdent elles aussi un motif PAM2 (Bayfield et al., 2010; Yang et al., 2011), confirme le lien entre acquisition du PAM2 et mutation du LAM (Merret et al., 2013b). D'autre part, l'acquisition du motif PAM2 affecte aussi le motif RRM-L3a des LARP6b/c en modifiant la taille de la boucle 3 (Merret et al., 2013b). Ces modifications d'éléments intervenant dans les interactions des motifs LA et RRM suggèrent un impact sur l'affinité de ces domaines pour leurs cibles ARN.

Ces informations, issues d'analyses de séquences et d'analyses évolutives, permettent de mettre en évidence les modifications survenues suite à la duplication des gènes et donnant naissance, chez les angiospermes, à deux nouvelles sous-familles de protéines : LARP6b et LARP6c. De plus, ces résultats suggèrent un impact de l'évolution sur les interactions réalisées par ces protéines et donc potentiellement une néo-fonctionnalisation et/ou une spécialisation.



**Figure 29: Comparaison de l'organisation des motifs LA et RRM1 des protéines LA et LARP6 humaines**

A : Structure du module LA de la protéine LA humaine en complexe avec un polymère d'uridine (représentation en bâtonnets), représentation issue des bases de données (PDB 2VOD, Kotik-Kogan et al., 2008).

B : Structure potentielle du module LA de la protéine LARP6 humaine à partir des structures du motif LA et du motif RRM1. L'orientation des motifs a été réalisée en se basant sur le module LA de la protéine LA humaine en complexe avec son ARN. Figure modifiée de Martino et al., 2014.

### III.3.3.c Fonction des protéines LARP6

A l'heure actuelle, l'intégralité des analyses fonctionnelles publiées concernant les protéines LARP6 traitent de ces protéines chez des espèces animales. Ainsi, aucune information n'est disponible concernant leurs fonctions chez les protistes ou les végétaux.

- LARP6 en tant que chaperonne

Comme indiqué précédemment, plusieurs protéines à motif LA possèdent une activité de chaperonne d'ARN. Les expériences de « tRNA mediated suppression » réalisées avec la protéine LARP6 ont permis de montrer *in vitro* que la région comprenant le module LA et les acides aminés situés immédiatement après le RRM est capable d'assurer une fonction chaperonne tout comme cela a été montré pour les protéines LARP7 et LARP4 (Hussain et al., 2013).

- Rôle de LARP6 dans la différenciation cellulaire

La première identification d'un membre de la famille LARP6 date de 2007, lors de la recherche de gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée durant le développement chez *Manduca sexta* (Valavanis et al., 2007). Le gène identifié code une protéine homologue de LARP6, alors nommée, Acheron\*. Ce gène est exprimé au moment de la mort cellulaire au niveau des muscles intersegmentaux, étape nécessaire au développement. Cette étude a montré que la protéine Acheron/LARP6 s'exprime dans les muscles et les neurones, et mis en évidence un rôle dans la répression du facteur de transcription Myf5 (l'un des premiers acteurs de la différenciation cellulaire des muscles).

\***Acheron** : le nom « Acheron » donné à cette protéine fait référence dans la mythologie grecque au fleuve Achéron (fils du soleil et de la terre et affluent du Styx) sur lequel Charon transportait, sur sa barque, les âmes errantes des défunts vers le royaume des morts. Ce nom a été choisi en raison du rôle de la protéine dans la mort cellulaire. L'eau de l'Achéron coule en Epire (Grèce), où le fleuve prend sa source sur le Mont Tomaros et le Massif du Souli pour se jeter, 58 km plus loin, dans la mer Ionienne.

Le rôle de la protéine LARP6 dans la différenciation des muscles a ensuite été mis en évidence chez des vertébrés (cellules musculaires de souris C2C12, et embryon du poisson zèbre *Danio rerio* ; Glenn et al., 2010; Wang et al., 2009). Dans ces études, il a été prouvé

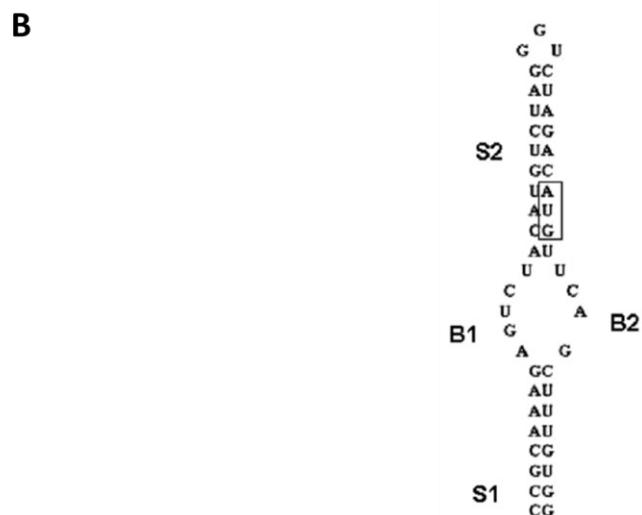
qu'Achéron/LARP6 intervient en amont du facteur de transcription MyoD dans la régulation de la myogenèse (Wang et al., 2009) et régule l'expression d'une sous-unité de l'intégrine impliquée dans la transmission de signaux de différenciation et dans l'adhésion des cellules (Glenn et al., 2010).

Les rôles d'Acheron/LARP6 dans le développement ne s'arrêtent pas là, avec la mise en évidence chez la souris (*Mus musculus*) et chez l'Homme (*Homo sapiens*) d'une interaction directe avec CASK-C (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent serine protein kinase). L'interaction a lieu via la partie C-terminale de LARP6 et le domaine CAMKII-like de CASK-C (Weng et al., 2009). Cette portion de la protéine LARP6 contient le domaine LSA ; cependant les analyses réalisées ne permettent pas de définir si ce motif est impliqué ou non dans l'interaction. La protéine CASK-C fait partie de la famille des MAGUK (**M**embrane-**A**ssociated **G**Uanylate **K**inase protein) et constitue une isoforme de CASK/Lin-2 impliquée dans la différenciation via la régulation de la signalisation (canaux ioniques, récepteurs, etc...). CASK est, de plus, un interactant d'un facteur de transcription inhibiteur de la différenciation (Id) impliqué dans la prolifération, la différenciation et l'oncogenèse. Ainsi, Acheron fait partie du complexe Acheron/Id/CASK, au moins via son interaction à CASK-C, ce qui lui permet d'intervenir dans la régulation du développement et potentiellement dans l'oncogenèse.

L'implication de LARP6 dans les cancers et autres maladies a été étudiée à de nombreuses reprises chez l'Homme où les ARNm codant LARP6 sont sur-accumulés dans le stroma des kératokystes (tumeurs odontogéniques kératokystiques ; Jiang et al., 2014) ainsi que dans les cas d'infection par le virus de l'hépatite C (Liu et al., 2010; Papic et al., 2012). Une étude publiée en 2012 montre l'impact de la protéine LARP6 humaine sur la prolifération du cancer du sein (Shao et al., 2012). Dans ce cas, LARP6 intervient dans le noyau et permet l'expression de MMP-9 et VEGF (vascular endothelial growth factor), tous deux impliqués dans le développement de métastases. Dans les cas de cancer du sein, LARP6 affecte, entre autres, la prolifération et l'invasion. L'impact de LARP6 sur l'expression de VEGF lui permettrait d'autre part d'intervenir dans la prolifération endothéliale, l'angiogenèse ainsi que la guérison des blessures dans les cellules ombilicales lors d'un traumatisme. Cette action ferait intervenir l'interaction avec l'intégrine B1 ainsi que le facteur Id1 présentés précédemment (Sun et al., 2011). La protéine LARP6 de souris apparaît, elle aussi, dans une recherche de protéines régulant la calcification lors d'un

**A**

<u>CAAAGAGTCTACATGTCTGAATAAGAGACATGT</u>	<u>TCAGCTTTG</u>	Poisson	$\alpha 1(I)$
<u>CAAAGAGTCTACATGTCTAATATTTAGACATGT</u>	<u>TCAGCTTTG</u>	Poussin	$\alpha 1(I)$
<u>CCACAAAGAGTCTACATGTCTAGGGT</u>	<u>CTAGACATGTTTCAGCTTTGTGG</u>	Homme	$\alpha 1(I)$
<u>CACAAGGAGTCTGCATGTCTGCT</u>	<u>TAGACATGCTTCAGCTTTGTG</u>	Poisson	$\alpha 2(I)$
<u>CACAAGGAGTCTGCATCTCTAGCAAGTAGACATGC</u>	<u>TCAGCTTTGTG</u>	Poussin	$\alpha 2(I)$
<u>CACAAGGAGTCTGCATGTCT AAGTGCTAGACATGC</u>	<u>TCAGCTTTGTG</u>	Homme	$\alpha 2(I)$
<u>CAGAGAGTCTCATGTCTAATATTTATACATGA</u>	<u>TGAGCTTTG</u>	Poussin	$\alpha 1(III)$
<u>CACAAAGAGTCTCATGTCTGATA</u>	<u>TTTAGACATGA</u>	Homme	$\alpha 1(III)$
<b>S1</b>	<b>B1 S2 B2 S1</b>		



**Figure 30: Partie 5' des séquences du collagène de type I et III**

A: Alignement des séquences de la partie 5' tige boucle du collagène chez des vertébrés (poisson, Homme, poussin).

B: Structure adoptée par la partie 5' tige boucle du collagène  $\alpha 1(I)$  humain. S1 et S2 : portion de la tige 1 et 2, B1 et B2 : portion de la boucle 1 et 2.

Modifiée de Cai et al., 2010a.

trauma (Rai et al., 2015). Toutes ces informations montrent le rôle de LARP6 dans plusieurs mécanismes liés à la différenciation et la prolifération l'impliquant dans des cas de cancer et de réponse à la blessure.

- Le rôle de LARP6 dans la régulation de la traduction des ARNm codant le collagène de type I.

### **La régulation du collagène chez l'Homme.**

Le collagène de type I est une protéine très abondante chez l'Homme représentant environ 4kg du poids total d'un adulte (EL-Harake et al., 1998). Cette protéine représente la forme majoritaire du collagène, on la trouve dans la matrice extracellulaire, principalement dans des tissus comme la peau, les os, les muscles, le foie et, les tendons. Elle est composée de trois sous-unités : 2 sous-unités  $\alpha1(I)$  et 1 sous-unité  $\alpha2(I)$ . Lorsque les ARNm respectifs sont synthétisés, ils sont envoyés vers la membrane du réticulum endoplasmique afin d'y être traduits. Les protéines ainsi formées sont modifiées et assemblées en hétérotrimères avant de sortir de la cellule (Kivirikko, 1998). Il a été montré que l'assemblage du collagène en homotrimère de la sous-unité  $\alpha1(I)$  entraîne de nombreuses maladies telles que l'hyperélasticité de la peau et des tendons, et l'ostéogenèse imparfaite aussi appelée « maladie des os de verre » (Nicholls et al., 1984). Ceci indique l'importance de la régulation de la synthèse et de l'assemblage en hétérotrimère  $2\alpha1(I)$ ,  $1\alpha2(I)$  du collagène de type I. De plus, un contrôle rapide de la synthèse du collagène est aussi nécessaire lors de la cicatrisation. Ce contrôle passe essentiellement par la régulation de la stabilité et de la traductibilité des ARNm codant les deux sous-unités du collagène de type I. En effet, cette régulation fait intervenir aussi bien la séquence même de l'ARNm (sites de polyadénylation multiples, 5'SL : 5' Stem Loop) que des facteurs de liaison protéique parmi lesquels on trouve la protéine  $\alpha CP$  (régulation de la stabilité de l'ARNm  $\alpha1(I)$  via la partie 3' UTR) et la protéine LARP6 (Stefanovic, 2013).

### **La tige boucle des ARNm du collagène.**

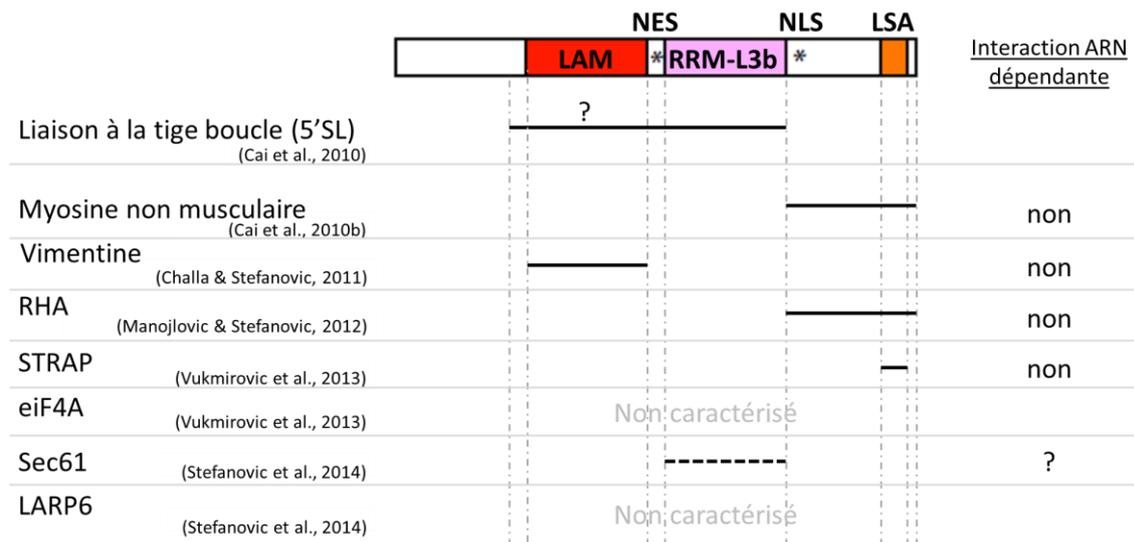
Dès les années 1980, la fabrication d'ADNc à partir des ARNm du collagène de poussins a permis d'identifier une séquence conservée d'environ 50 nucléotides entourant le codon d'initiation de la traduction et formant une structure tige boucle (Yamada et al., 1983- Figure 30). Cette structure présente sur les ARNm codant le collagène de type I ( $\alpha1$  et  $\alpha2$ )

et l'ARNm du collagène de type III ( $\alpha 1$ ) est nommée 5'SL (5' Stem Loop). La première étude réalisée ne montre pas d'impact de la structure tige boucle sur la stabilité ou la traduction d'un ARNm et ne parvient pas à mettre en évidence l'interaction de protéines avec cette structure (Bornstein et al., 1988). Plus tard, il est mis en évidence que la structure 5'SL associée à un gène rapporteur entraîne la déstabilisation de l'ARNm en cellules HSC (**H**epatic **S**tellate **C**ells) quiescentes de rat (Stefanovic et al., 1999). Cependant, il sera montré par la suite que le stade et le type cellulaire utilisés dans cette étude ne permettent pas de reproduire le contexte cellulaire dans lequel se trouvent les ARNm du collagène lors de leur production, biaisant par conséquent les résultats obtenus.

Il s'avère que la structure tige boucle présente en région 5' de l'ARNm du collagène de type I est essentielle à la synthèse du collagène. En effet, il a été montré que l'ajout d'un leurre possédant une structure 5'SL est capable d'entrer en compétition avec la tige boucle du collagène et induit une forte diminution de la quantité d'ARNm et de propeptides dans différents types cellulaires (fibroblastes de souris, HSC activées de rat, HSC humaines) (Stefanovic et al., 2002). De plus, la mutation de la structure tige boucle du collagène en cellules de souris HSC et MEF (**M**ouse **E**mbyonic **F**ibroblast) entraîne une diminution de la quantité d'ARNm  $\alpha 1(I)$ , l'inhibition de la formation de la triple hélice de collagène, ainsi qu'un défaut de sécrétion de celui-ci (Parsons et al., 2011).

### **Interaction de LARP6 avec la 5'SL**

La mise en évidence d'interactions protéiques au niveau de la tige boucle 5'SL du collagène est réalisée en 1999, à partir de cellules de fibroblastes de souris (cellules 3T3) par gel retard (Stefanovic et al., 1999). Par la suite, une étude confirme cette interaction en fibroblastes de poumon humain, entre autres, et identifie (par « cross-link UV ») une protéine de 65 KDa comme interagant de la 5'SL (Cai et al., 2010a). L'identité de cette protéine est ensuite révélée par gel retard à l'aide de clones exprimant les ADNc présents en fibroblastes humains, et n'est autre que LARP6. Plusieurs techniques confirment alors ce résultat (immunoprécipitation à l'aide d'une protéine étiquetée suivie de RT-PCR, gel retard en présence d'anticorps dirigés contre la protéine LARP6- Cai et al., 2010a). Ainsi, LARP6 est la protéine capable d'interagir avec la structure 5'SL présente sur le collagène de type I et de type III, et ce sans l'aide d'autres partenaires protéiques et sans modification post-traductionnelle (gel retard à l'aide de protéines recombinantes produites en système bactérien).



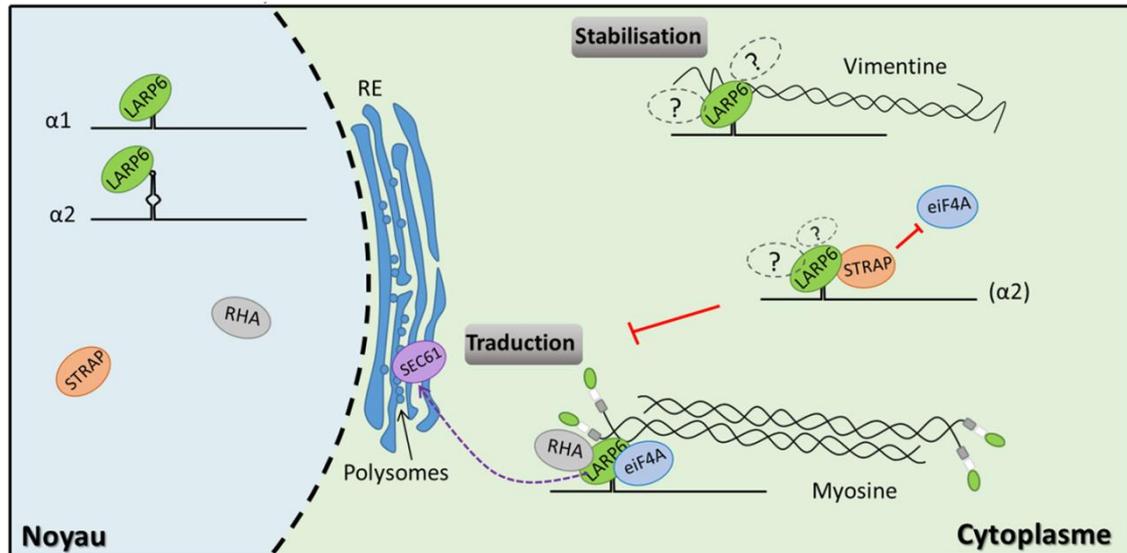
**Figure 31: Domaines de la protéine LARP6 humaine impliqués dans des interactions ARN et protéiques lors de sa fonction de régulation du collagène de type I**

Un trait plein représente une région contenant le domaine nécessaire et suffisant à l'interaction, un trait en pointillés représente une région qui contient des séquences nécessaires à l'interaction. Un « non » dans la dernière colonne indique que les interactions protéiques sont réalisées de manière ARN indépendante. Schéma de la protéine tiré de Merret et al., 2013b (Figure S1).

Afin de distinguer les modalités de l'interaction, des gels retard ont été effectués à l'aide de mutants de la structure 5'SL ou bien de la protéine LARP6. Les résultats montrent que l'interaction se fait via la reconnaissance de la structure et de la séquence primaire de la 5'SL. Certains nucléotides sont essentiels à la fixation étant donné que la mutation d'un seul U en A dans la boucle de la 5'SL empêche l'interaction. En ce qui concerne LARP6, l'utilisation de versions tronquées a permis de montrer que le motif LA et le motif RRM-L3b sont nécessaires à l'interaction avec la tige boucle du collagène. De plus, les acides aminés présents immédiatement en N-terminal du motif LA (inf à 10 AA) sont, eux aussi, essentiels à l'interaction (Figure 31). L'analyse structurale des motifs LA et RRM1 de la protéine LARP6 humaine ont montré que la région C-terminale du motif LA, ainsi que la région située entre ces deux motifs, sont elles aussi essentielles à l'interaction, probablement en intervenant sur l'orientation des motifs LA et RRM l'un par rapport à l'autre (Martino et al., 2014).

### **Les partenaires protéiques de LARP6.**

Essentiellement pour des raisons médicales, de nombreuses études se sont focalisées sur la fonction de la protéine LARP6 humaine sur la régulation du collagène. En effet, comme indiqué précédemment, une dérégulation de la sécrétion du collagène est responsable de nombreuses maladies. Ceci a permis d'identifier de nombreux interactants de la protéine LARP6 : la myosine non musculaire, la vimentine, STRAP, RHA (**R**NA **H**elicase **A**), eiF4A, SEC61 ainsi que LARP6 elle-même (Stefanovic, 2013; Stefanovic et al., 2014). La formation d'un dimère de LARP6 est une information relativement récente ; il a été montré en cellules HEK293 (**H**uman **E**mbyonic **K**idney **293**) que la protéine LARP6 étiquetée est capable de former deux types de complexes, l'un représentant l'association d'un monomère de LARP6 à la tige boucle du collagène, l'autre représentant l'association d'un dimère de LARP6 sur une seule tige boucle de collagène (Stefanovic et al., 2014). Dans ce cas, comme dans le cas de l'interaction avec eiF4A, les séquences impliquées dans ces interactions ne sont pas identifiées. Cependant, les motifs impliqués dans les autres interactions protéiques ont pu être mis en évidence avec plus ou moins de précision (Figure 31). Tout d'abord, le motif LA est nécessaire et suffisant à l'interaction avec la vimentine (Challa & Stefanovic, 2011). Le motif RRM1 est, quant à lui, impliqué dans l'interaction avec la protéine Sec61. Cependant, on sait simplement que des mutations au sein de la boucle 3 du RRM abolissent l'interaction, ceci ne permet donc pas de savoir si



**Figure 32: Rôle de la protéine LARP6 humaine dans le métabolisme des ARNm du collagène de type I via ses interactions protéiques**

LARP6 fixe de manière spécifique la tige boucle des ARNm  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène de type I dans le noyau. Dans le cytoplasme, LARP6 va permettre de recruter sur l'ARNm des protéines avec lesquelles elle interagit afin de réguler le devenir des ARNm. Dans le cas où les ARNm sont envoyés à la traduction, LARP6 interagit avec RHA, eiF4A ainsi que la myosine et transporte les ARNm vers le réticulum endoplasmique et les polysomes. A cet endroit, LARP6 interagit avec la protéine SEC61 et la traduction peut avoir lieu. Dans le cas, où les ARNm sont stockés et stabilisés en attente de la traduction, LARP6 interagit avec la protéine STRAP qui entre en compétition avec eiF4A empêche ainsi l'envoi vers la traduction. Il n'est pas exclu que cette étape fasse intervenir d'autres partenaires protéiques de LARP6 qui ne sont pas encore identifiés à l'heure actuelle. Pour revue Stefanovic, 2013. RE : réticulum endoplasmique.

d'autres séquences sont impliquées dans cette interaction (Stefanovic et al., 2014). La partie C-terminale de LARP6 est impliquée dans deux interactions différentes, l'une avec la myosine non musculaire, et l'autre avec la protéine RHA (Cai et al., 2010b; Manojlovic & Stefanovic, 2012). Dans les deux cas, cette séquence est nécessaire et suffisante à l'interaction. Finalement, la protéine STRAP interagit avec LARP6 via le motif SBS de la protéine LARP6 (Vukmirovic et al., 2013) qui n'est autre qu'une partie du motif LSA conservé chez les protéines LARP6 (Figure 31). En effet, l'alignement des séquences consensus montre la forte conservation d'acides aminés entre ces séquences (Figure 11).

### **Impact de la protéine LARP6 sur les ARNm du collagène.**

La protéine LARP6 interagit de manière très spécifique avec la structure tige boucle présente en position 5' des ARNm du collagène de type I et de type III (5'SL). Le rôle de cette protéine semble être de recruter sur l'ARNm différents acteurs protéiques régulant la traduction de cet ARNm (Figure 32). Ainsi LARP6 intervient dans la régulation fine de la traduction des ARNm du collagène en faisant le lien entre ARNm et régulateurs protéiques. En effet, il a été montré que la sous-expression de LARP6 (knock-down par siRNA), aussi bien que sa sur-expression entraînent une diminution de la traduction du collagène de type I. Ceci se traduit par une diminution de la localisation des ARNm au niveau des polysomes (sur-expression), par une diminution de la synthèse et de la sécrétion du collagène pour un taux d'ARNm stable (délétion de LARP6), ainsi que par l'hypermodification post-traductionnelle des polypeptides de collagène (Cai et al., 2010a; Wang & Stefanovic, 2014). L'hypermodification des polypeptides du collagène est une conséquence d'une mauvaise co-régulation du taux de traduction et du taux d'assemblage des différentes sous-unités (Lamandé & Bateman, 1999; Pace et al., 2008). Il est important de garder en mémoire que la formation de l'hétérotrimère de collagène nécessite : (i) une coordination spatiale de la traduction afin que toutes les sous-unités se trouvent à proximité au moment de l'assemblage de l'hétérotrimère de collagène, (ii) une coordination temporelle de la traduction afin d'obtenir le bon ratio de chacune de ces sous-unités.

La fonction de LARP6 sur l'ARNm dépend principalement de la fonction de ses interactants. Si l'on s'intéresse à la myosine non musculaire, on constate que l'intégrité de ce filament, ainsi que son activité motrice, permet via l'interaction avec LARP6, la co-localisation des sous-unités de collagène, et par suite favorise l'assemblage de l'hétérotrimère. Le désassemblage des filaments de myosine, via un inhibiteur de la chaîne

légère (ML-7), mène à la sécrétion d'homodimères  $\alpha 1$  (Cai et al., 2010b) ainsi qu'à l'accumulation de polypeptides dans le cytosol (Wang & Stefanovic, 2014). L'étude de l'impact de LARP6 et de la myosine sur la synthèse du collagène a montré que ces deux protéines sont nécessaires à la localisation des ARNm du collagène au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Wang & Stefanovic, 2014). Ainsi, la myosine non musculaire intervient, via LARP6, dans la coordination spatiale de la traduction celle-ci étant réalisée au niveau du RE. Un autre interactant de LARP6 va dans le sens d'un adressage des ARNm du collagène au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, il a récemment été montré que l'interaction de LARP6 avec la protéine SEC61 (translocon de la membrane du RE) est nécessaire à la bonne production du collagène (Stefanovic et al., 2014). Dans cette expérience, un mutant de la protéine LARP6, capable d'interagir avec la tige boucle du collagène mais pas avec la protéine SEC61, a mené à une diminution de la production des polypeptides du collagène. Ceci confirme le rôle de LARP6 dans l'adressage des ARNm du collagène au RE via des interactions protéiques.

En ce qui concerne le rôle de LARP6 dans la régulation du taux de traduction des ARNm, il faut se pencher sur les interactions qu'elle réalise avec les protéines, RHA, STRAP et la vimentine. La protéine RHA est une protéine connue pour stimuler la traduction des ARNm viraux possédant une séquence PCE (**P**ost transcriptional **C**ontrol **E**lement). Cette séquence est en fait une région structurée présente en 5' des ARNm, ce qui rappelle la tige boucle 5'SL présente sur les ARNm du collagène. En effet, il a été montré que l'inactivation de RHA (par siRNA) entraîne la diminution de la quantité d'au moins un des polypeptides du collagène ( $\alpha 1$ ). Cette délétion n'affecte pas la quantité totale d'ARNm mais affecte cependant leur localisation polysomale (Manojlovic & Stefanovic, 2012). Ainsi, RHA serait nécessaire à la formation de polysomes sur les ARNm du collagène participant ainsi à la stimulation de leur traduction. Ceci semble cohérent au niveau physiologique, étant donné que son expression augmente dans les cellules HSC juste avant l'activation de la production de collagène dans ces cellules. D'autre part, LARP6 est aussi capable d'interagir avec la protéine eIF4A (Vukmirovic et al., 2013), clairement impliquée dans la traduction via son interaction avec une sous-unité ribosomale, ainsi que de par son rôle dans le dépliement des ARN. Cependant, une bonne régulation de la traduction d'un ARNm nécessite aussi l'intervention de régulateurs négatifs de celle-ci. Et en effet, LARP6 est aussi capable d'interagir avec la protéine (Vukmirovic et al., 2013). La délétion de cette

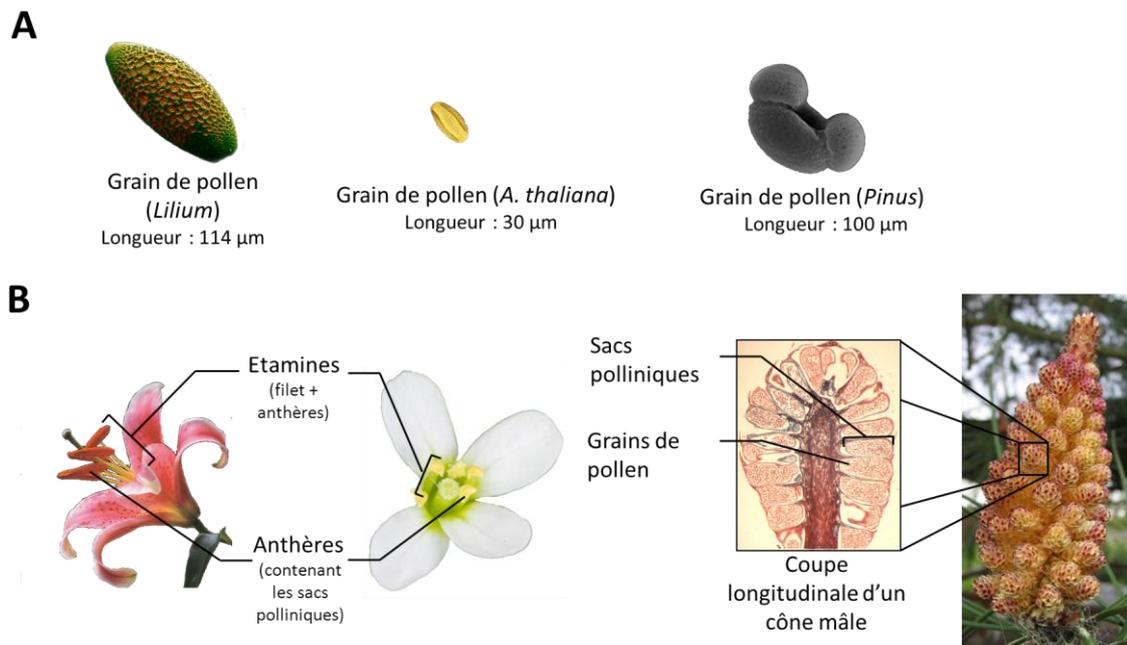
protéine entraîne, en fibroblastes embryonnaires de souris, une surproduction de polypeptides et donc une augmentation du nombre de formes monomériques, signe d'une levée de régulation négative de la traduction. Il s'avère qu'en présence de STRAP, l'interaction entre LARP6 et eIF4A est déstabilisée. Ainsi, le rôle négatif de STRAP consisterait à limiter l'interaction de LARP6 avec un facteur positif de traduction (eIF4A). LARP6 interagit donc avec plusieurs facteurs contrôlant de manière positive ou négative la traduction, ce qui suggère qu'elle a un rôle central dans la régulation fine de la traduction des différentes sous-unités du collagène de type I.

Cependant, quel est le devenir des ARNm qui pour des raisons de coordination de la traduction ne sont pas traduits ? La réponse se trouve dans l'interaction de LARP6 avec la vimentine. Les filaments intermédiaires de vimentine (composants du cytosquelette dans les fibroblastes) ont un rôle clé dans la rapidité de la régulation de la traduction. En effet, il a été montré que l'absence de vimentine a pour conséquence une diminution de la demi-vie des ARNm du collagène (Challa & Stefanovic, 2011). Ainsi, la vimentine permet la stabilisation de ces ARNm. Cette protéine n'est pas identifiée dans les fractions polysomales et montre une interaction plus forte avec LARP6 lorsque la traduction est inhibée. Toutes ces informations indiquent que l'interaction de LARP6 avec la vimentine permet le stockage des ARNm du collagène dans le cytoplasme, en attente d'un besoin de ces ARNm dans la traduction.

L'ensemble des interactions protéiques médiées par LARP6 sur les ARNm du collagène de type I permet une régulation fine et dynamique de la traduction, à la fois en termes de localisation et de synchronisation, contrôlant ainsi la formation des hétérotrimères. Il faut noter qu'à priori les ARNm  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  ne sont pas traités de manière identique dans la cellule. En effet, les études réalisées ont montré que l'ARNm  $\alpha 2$  serait fixé de manière plus forte par LARP6 que l'ARNm  $\alpha 1$  (Stefanovic et al., 2014). De plus, à deux reprises, dans le cas de la vimentine et de la myosine, il semblerait que l'interaction de l'ARNm  $\alpha 2$  via LARP6 ne soit possible que si l'ARN  $\alpha 1$  est capable de réaliser l'interaction avec LARP6 également (Cai et al., 2010b; Challa & Stefanovic, 2011). Pour finir, il semblerait que la délétion de STRAP ou LARP6 affecte davantage l'ARNm  $\alpha 2$  que l'ARNm  $\alpha 1$ . La prise en charge légèrement différente de ces deux ARNm semble cohérente avec la nécessité pour la cellule de synthétiser deux fois plus du peptide  $\alpha 1$  que du peptide  $\alpha 2$  afin d'assembler l'hétérotrimère.

### **Conclusions : Fonction des protéines LARP6**

Deux grandes fonctions peuvent être distinguées pour la protéine LARP6, la première concerne le développement, via son action sur la différenciation cellulaire dans le muscle chez les insectes et les vertébrés, dont les mammifères. Dans ces organismes, LARP6 intervient également dans la régulation de l'adhésion cellulaire et de la migration, lui conférant un rôle dans certains cancers. L'autre rôle bien étudié de LARP6 concerne la régulation de la traduction du collagène de type I chez l'Homme. Dans ce cas, LARP6 permet de recruter sur les molécules d'ARNm codant le collagène de type I les différents acteurs protéiques intervenant dans la corégulation post-transcriptionnelle de la production des différentes sous-unités. Bien que cette fonction de la protéine LARP6 humaine soit bien documentée, il ne faut pas perdre de vue que cette protéine pourrait aussi intervenir dans d'autres fonctions, notamment via son interaction à CASK-C. Chez les plantes, où le collagène n'existe pas, la fonction des protéines LARP6 est complètement inconnue et constitue un sujet de recherche très intéressant étant donnée l'importance de cette protéine chez d'autres espèces.



**Figure 33: Morphologie et localisation du pollen chez les spermatophytes**

A : Illustration de la morphologie des grains de pollen issus (de gauche à droite) du Lys (genre *Lilium*, monocotylédone), de l'Arabette (*Arabidopsis thaliana*, eudicotylédone) et du pin (genre *Pinus*, gymnosperme).

B : Localisation du pollen chez chacune de ces espèces.

Photos :

**Fleur de Lys** : Fleur : <http://decoration-dinterieur.com/deko/decoration/comment-profiler-de-la-beaute-et-le-parfum-des-lys/>, Pollen © Roetz Hagen, <http://www.fei.com/image-gallery/lilium-pollen-on-carbon-pad/>  
**Arabidopsis thaliana** : Fleur © Pierre Goujon, [http://abiris.snv.jussieu.fr/herbier/Arabette\\_de\\_Thalius.html/](http://abiris.snv.jussieu.fr/herbier/Arabette_de_Thalius.html/), Pollen © Jürgen Berger, Heiko Schoof, Electron Microscopy Unit, Max Planck Institut Tübingen, Germany. **Cône mâle de Pin (Genre Pinus)**: <http://www.visoflora.com/photos-nature/photo-grand-cone-male-du-pin-quelques-jours-apr.html/>, Coupe longitudinale d'un cône mâle de Pin (Genre Pinus) : lame commerciale, Pollen : © Marie Majaura, [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pinus\\_mugo1-1.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pinus_mugo1-1.jpg)

## **IV. Le pollen chez *Arabidopsis thaliana***

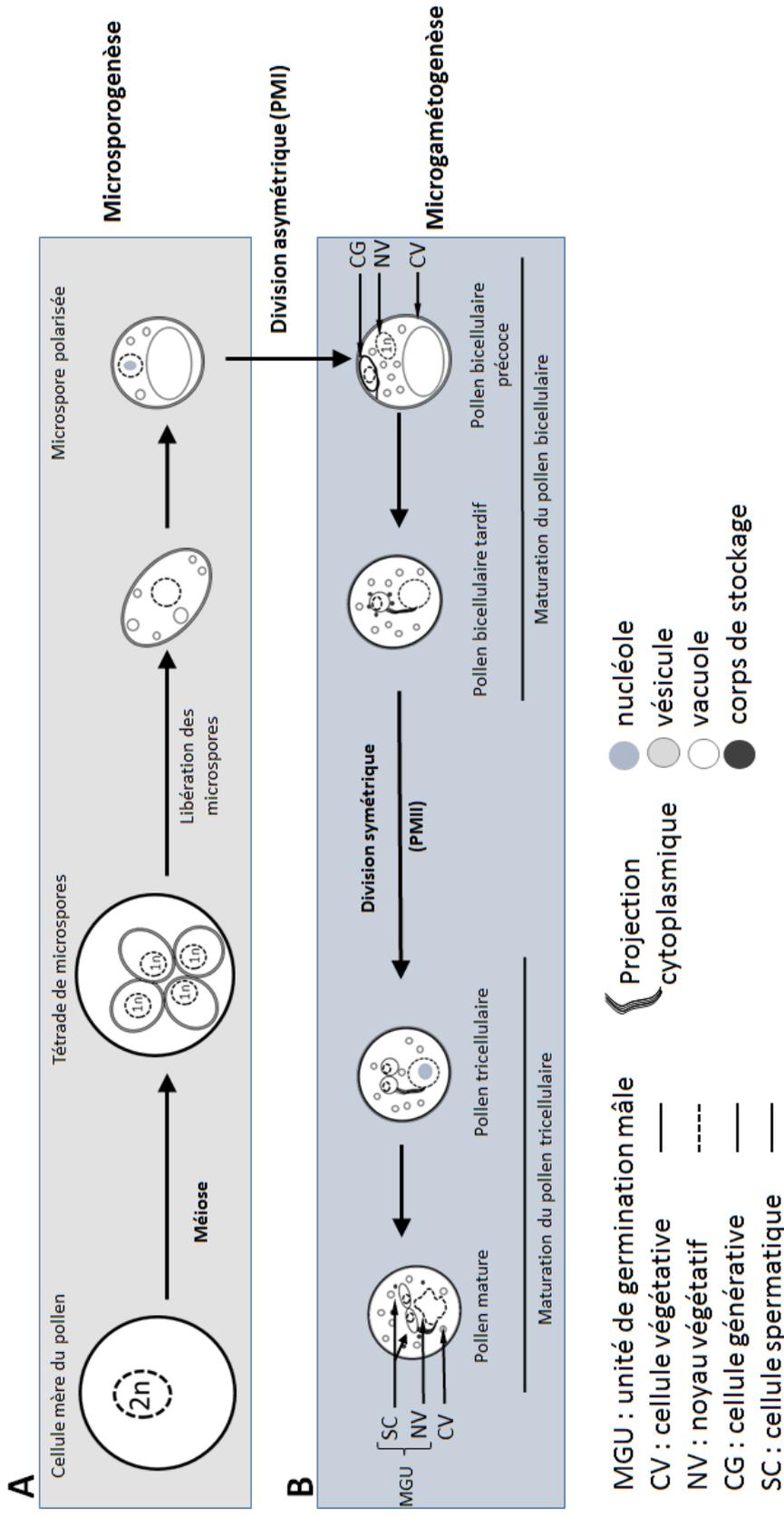
### **IV.1. Développement du pollen**

#### **IV.1.1 Généralités sur le pollen**

Le pollen est bien connu du grand public pour son rôle dans la composition du miel mais aussi pour les allergies qu'il provoque. Le pollen se développe à partir d'une microspore, issue de méiose, il constitue le gamétophyte mâle et donc la phase haploïde mâle du développement. Ainsi, c'est au sein du grain de pollen que vont être générés les gamètes mâles nécessaires à la reproduction sexuée de la plante. L'apparition du pollen, couplée à de nombreuses autres modifications des structures reproductrices, ont permis aux végétaux de s'affranchir du milieu extérieur lors de cette étape. Ceci a permis l'apparition d'une nouvelle classe de végétaux, les Spermatophytes (plantes à graines), au dévonien tardif, il y a plus de 350 millions d'années (pour revue Hilton, 1998). Ainsi on trouve du pollen chez les gymnospermes (notamment les conifères) et les angiospermes (plantes à fleurs), et plus précisément des pollens étant donné qu'il existe une grande diversité morphologique au niveau de cette structure (Figure 33A). Il est produit, chez les gymnospermes, dans les sacs polliniques des cônes mâles. Chez les angiospermes, il se développe dans les étamines des fleurs mâles ou hermaphrodites, et plus particulièrement au niveau des anthères dans les sacs polliniques (Figure 33B).

#### **IV.1.2 Formation du grain de pollen**

Sur 200 espèces d'Angiospermes, 70% libèrent du pollen bicellulaire contre 30% du pollen tricellulaire (Brewbaker, 1967). *Arabidopsis thaliana* fait partie de ces 30% d'espèces à pollen tricellulaire. La principale différence entre le pollen bicellulaire et tricellulaire réside dans la réalisation de la dernière mitose permettant la formation des cellules spermatiques (les gamètes). La formation du grain de pollen comporte deux phases: la microsporogénèse suivie de la microgamétogénèse ; c'est-à-dire la phase de formation des spores mâles suivie de la formation des gamètes mâles (Figure 34). La formation du pollen, au sein des sacs polliniques, débute par la méiose de ce que l'on appelle la cellule mère, qui donne 4 microspores haploïdes organisées en tétrade entourée



**Figure 34: Schéma des étapes de microsporogénèse et microgamétogénèse chez *Arabidopsis thaliana***

**A :** Microsporogénèse. Durant cette étape, la cellule mère du pollen diploïde subit une méiose formant 4 microspores haploïdes. Après leur libération, chacune des microspores va se polariser avant d'entrer dans l'étape de microgamétogénèse.

**B :** Microgamétogénèse. Cette étape débute lorsque la microspore polarisée subit une division asymétrique PMI (pollen mitosis I) formant le pollen bicellulaire précoce qui contient un noyau végétatif ainsi qu'un noyau génératif. Des réarrangements au sein du pollen forment le pollen bicellulaire tardif près à subir une division symétrique PM II (pollen mitosis II) formant le pollen tricellulaire qui contient un noyau végétatif et deux cellules spermatiques. A cette étape le pollen se prépare à la future élongation du tube pollinique. Une fois les réarrangements et modifications nécessaires effectués, le pollen est dit mature.

d'une paroi de callose (Figure 34A). Ces microspores se séparent ensuite (sous l'action d'une callase) et sont libérées. Dans chacune des cellules, une vacuole se forme et le noyau migre pour se positionner contre la paroi et donner une microspore polarisée ; c'est la dernière étape de la microsporogénèse. Débute alors, par une division asymétrique (PMI: Pollen Mitosis I), la phase de microgamétogénèse (Figure 34B). C'est parce que le noyau est accolé à la paroi de la cellule, que, lors de la cytokinèse, la répartition du cytoplasme n'est pas égale, donnant des cellules filles différentes (McCormick, 2004). On obtient alors un pollen bicellulaire dont le cytoplasme de la cellule végétative contient un noyau (le noyau végétatif) et une cellule (cellule générative).

Le pollen bicellulaire précoce subit plusieurs étapes de maturation affectant tout aussi bien le noyau végétatif que la cellule générative pour mener au pollen bicellulaire tardif. L'ADN du noyau végétatif est décondensé, permettant ainsi l'expression de gènes provenant de ce noyau. La cellule végétative permet, quant à elle, la croissance de la cellule germinale et l'élongation du tube pollinique. Le noyau végétatif est transcriptionnellement actif et la cellule végétative se charge de faire des réserves. Elle accumule lipides, transcrits, protéines, etc..., qui seront en partie utilisés lors de la formation du tube pollinique. D'autre part, elle stocke des molécules qui permettront de protéger protéines et membranes lors de la déshydratation du pollen (revue Borg et al., 2009). La cellule générative voit, quant à elle, sa paroi partiellement digérée afin de se détacher de la paroi du pollen et de préparer sa division. D'après une étude menée chez *Tradescantia virginiana*, la position de la cellule générative dans le pollen est maintenue par des microtubules dès le stade bicellulaire (Palevitz & Cresti, 1989).

### **IV.1.3 Le pollen tricellulaire et mature**

La dernière étape de maturation du pollen repose sur une dernière division cellulaire (ou PM II) qui est cette fois symétrique et affecte uniquement la cellule générative (Figure 34B). Cette division permet la formation du pollen tricellulaire qui contient les deux cellules spermatiques (les gamètes). Selon les espèces, cette division intervient avant la libération du pollen des sacs polliniques ou après la germination du tube pollinique. Autrement dit, certaines espèces libèrent du pollen bicellulaire alors que d'autres libèrent du pollen tricellulaire. Evolutivement, le pollen tricellulaire serait apparu de manière indépendante dans plusieurs groupes (Webster et al., 1982; Williams et al., 2014), il aurait

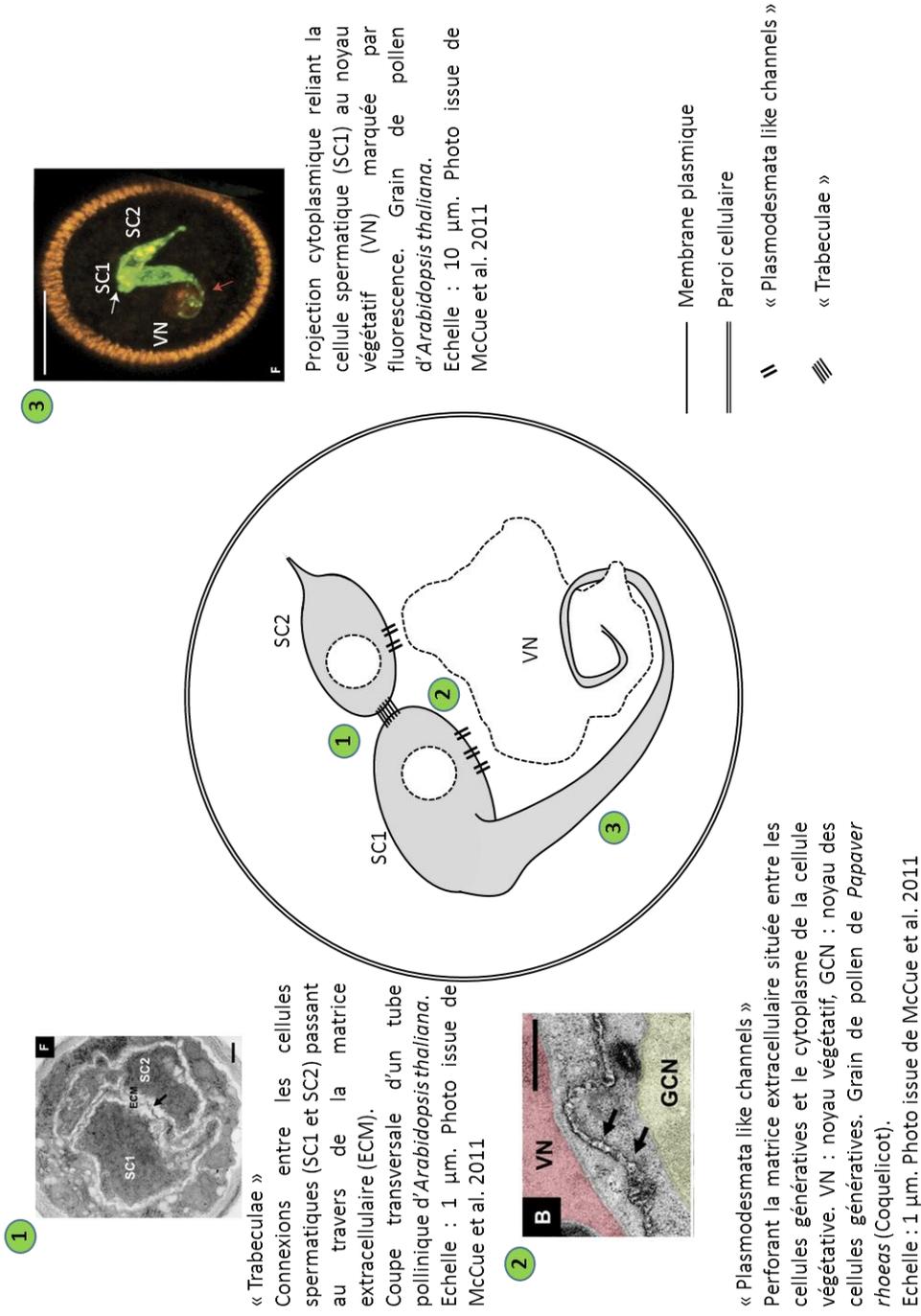
une viabilité plus réduite que le pollen bicellulaire mais serait capable d'initier la germination du tube pollinique plus rapidement (Brewbaker, 1967). Il est intéressant de constater qu'il existe des espèces capables de générer les deux types de pollen (pour revue Williams et al., 2014). Comme indiqué précédemment, *Arabidopsis thaliana*, est une espèce à pollen tricellulaire, la dernière division de mitose a donc lieu au niveau de l'étamine avant l'ouverture du sac pollinique et donc la libération du pollen. Le pollen tricellulaire subit des étapes de maturation le préparant à l'étape de formation du tube pollinique. Ceci passe par une réorganisation des noyaux afin de compléter la formation de l'Unité de Germination Mâle (MGU- voir ci-dessous) facilitant notamment leur transport le long du tube pollinique (Ge et al., 2011). Lors de l'ouverture des sacs polliniques, le pollen est alors mature et partiellement déshydraté.

### **IV.2. Les connexions cellulaires au sein du pollen**

Il a été montré que, lors de la maturation du pollen, les deux puis trois cellules du pollen vont se trouver assemblées et interconnectées dans ce que l'on appelle l'Unité de Germination Mâle (MGU), cette dénomination étant apparue en 1985 (Dumas et al., 1985). La MGU existe aussi bien dans le pollen bicellulaire que dans le pollen tricellulaire (McCue et al., 2011 pour revue). Il existe trois types de connexions liant les cellules du grain de pollen.

#### **IV.2.1 Connexion impliquant les cellules spermatiques.**

Les deux cellules spermatiques dérivent d'une division mitotique symétrique (PMII). A la suite de cette division, les deux cellules formées ne possèdent pas véritablement de paroi cellulaire mais une simple membrane plasmique associée à une matrice extracellulaire de polysaccharides. A l'issue de la mitose II, les deux cellules ne se séparent pas entièrement (Charzynska et al., 1989), la séparation n'ayant lieu que peu de temps avant la fécondation (McCue et al., 2011). Il existerait entre les cellules spermatiques des connexions cytoplasmiques observées par microscopie électronique nommées « trabeculae » (Dumas et al., 1985) (Figure 35-1).



**Figure 35: Connexions entre les cellules du pollen mature**

- 1** « Trabeculae » : connexions reliant les deux cellules spermatisques entre elles.
  - 2** Plasmodesmata-like : connexions reliant le cytoplasme des cellules spermatisques au cytoplasme de la cellule végétative
  - 3** Projection cytoplasmique reliant la cellule spermatisque 1 au noyau de la cellule végétative.
- SC1 et 2 : cellules spermatisques 1 et 2. VN : noyau végétatif. Pour revue McCue et al., 2011.

### **IV.2.2 Connexion entre cellules spermatiques et cellule végétative.**

Un autre type de lien a été mis en évidence puis controversé depuis les années 70. Il s'agirait de connexions mettant en relation la cellule végétative et les cellules spermatiques. Ce type de connexion se caractériserait par des canaux traversant la « paroi » des cellules spermatiques. Ces canaux, qui connecteraient donc le cytoplasme de la cellule végétative avec le cytoplasme des cellules spermatiques ont été décrits comme « plasmodesmata like channels» (Cresti et al., 1987) (Figure 35-2). En effet, ceux-ci ressembleraient aux connexions observées dans les cellules végétales et permettant les échanges au travers de la paroi pectocellulosique. Cependant, l'existence de ces connexions a été controversée étant donné que ces canaux seraient transitoires et non-essentiels à la viabilité des cellules spermatiques (Faure et al., 1994; Twell, 1995).

### **IV.2.3 Connexion entre une des cellules spermatiques et le noyau végétatif.**

Il existe une connexion impliquant une des cellules spermatiques nommée SC1 (Sperm Cell 1) et le noyau végétatif. Cette connexion a été évoquée pour la première fois par Jensen et Fischer (Jensen & Fisher, 1970) (Figure 35-3).

#### IV.2.3.a Caractéristiques et formation

En 1981, cette connexion est décrite chez une espèce d'Angiosperme: *Plumbago zeylanica* (Russell & Cass, 1981). Les travaux effectués font mention d'une projection cytoplasmique reliant la cellule spermatique 1 (SC1) au noyau de la cellule végétative. Cette projection a pour origine les cellules spermatiques (Engel et al., 2005). Il a été montré que la taille de la projection cytoplasmique varie au fil du développement du pollen (Yu et al., 1992). Il faut noter, de plus, que la cellule spermatique 2 (SC2) possède tout de même une légère projection cytoplasmique, qui n'est cependant pas reliée au noyau végétatif (Russell & Cass, 1981) (Figure 35).

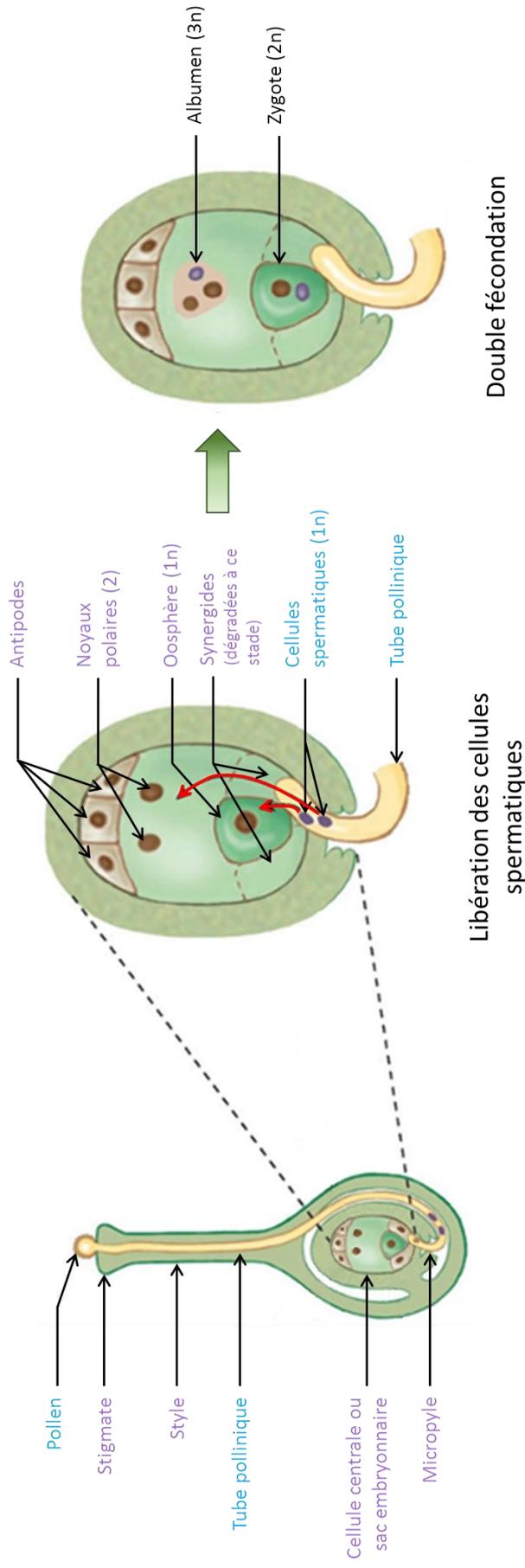
La mise en place de la projection cytoplasmique reliant le noyau végétatif a lieu dès la fin de la mitose I, lors de la formation de la cellule générative et de sa migration en position centrale du grain de pollen (McCue et al., 2011). La croissance de la projection cytoplasmique est accompagnée par la mise en place de microtubules et la formation de

vésicules à l'extrémité de la projection (Yu et al., 1992). La projection va ainsi s'enrouler partiellement autour du noyau végétatif et traverser les régions riches en réticulum endoplasmique sur la partie du noyau faisant face aux cellules spermatiques (Russell & Cass, 1981; Yamamoto et al., 2003). La nature de la projection cytoplasmique est encore mal connue ; cependant, elle contient des microtubules au moins chez *Brassica rapa* (Mcconchie et al., 1985), *Tradescantia virginiana* (Palevitz & Cresti, 1988) et *Nicotiana tabacum* (Oh et al., 2010).

### IV.2.3.b Fonctions

Le rôle de cette projection cytoplasmique est encore peu connu ; cependant plusieurs hypothèses ont été évoquées et semblent soutenues par les données actuelles. La fonction première attribuée à la projection cytoplasmique est de permettre la formation de l'« unité de germination mâle » en rapprochant les cellules spermatiques du noyau végétatif (pour revue McCue et al., 2011). Lors de la fécondation, les deux cellules spermatiques doivent être délivrées en même temps à la cellule centrale du gamétophyte femelle et à l'oosphère (gamète femelle), réalisant ainsi ce que l'on nomme la double fécondation. Ainsi, lors de la croissance du tube pollinique (dirigée par la cellule végétative – chapitre suivant), un mouvement des cellules spermatiques et du noyau végétatif s'organise vers l'extrémité du tube pollinique. Il a été suggéré que cette projection cytoplasmique sert à maintenir groupés les cellules spermatiques et le noyau végétatif lors de la croissance du tube pollinique, permettant ainsi d'organiser la double fécondation et de coordonner la libération des gamètes (Dumas et al., 1998). De façon cohérente avec ce modèle, il a été montré que des mutants déficients dans l'organisation de la MGU présentent un biais de fécondation (transmission du gamète mâle à la descendance) ainsi qu'un mouvement aléatoire des cellules spermatiques dans le tube pollinique (Ge et al., 2011; Lalanne & Twell, 2002).

Plus récemment, il a aussi été proposé que cette projection cytoplasmique permet d'échanger du matériel entre le noyau végétatif et les cellules spermatiques (Slotkin et al., 2009). Une équipe travaillant sur la régulation des éléments transposables dans le pollen a mis en évidence le fait que des éléments transposables sont réactivés dans la cellule



**Figure 36: Schéma des étapes de la double fécondation**

Chez la femelle, le sac embryonnaire ou cellule centrale contient, dans son cytoplasme, deux noyaux (dits polaires) et 6 cellules. Ces six cellules sont : les cellules antipodales (3), les synergides (2) et l'oosphère (gamète femelle). A son arrivée au niveau du micropyle, le tube pollinique, fusionne avec une des synergides menant à leur destruction. Les cellules spermatisques du tube pollinique sont alors libérées dans le sac embryonnaire où une d'elle fusionne avec l'oosphère formant le zygote, tandis que l'autre fusionne avec les deux noyaux de la cellule centrale afin de former l'albumen. Schéma modifié à partir d'un schéma de la double fécondation © De Boeck Université 2007 (<http://www.djelfa.info/vb/archive/index.php/t-1258291.html>).

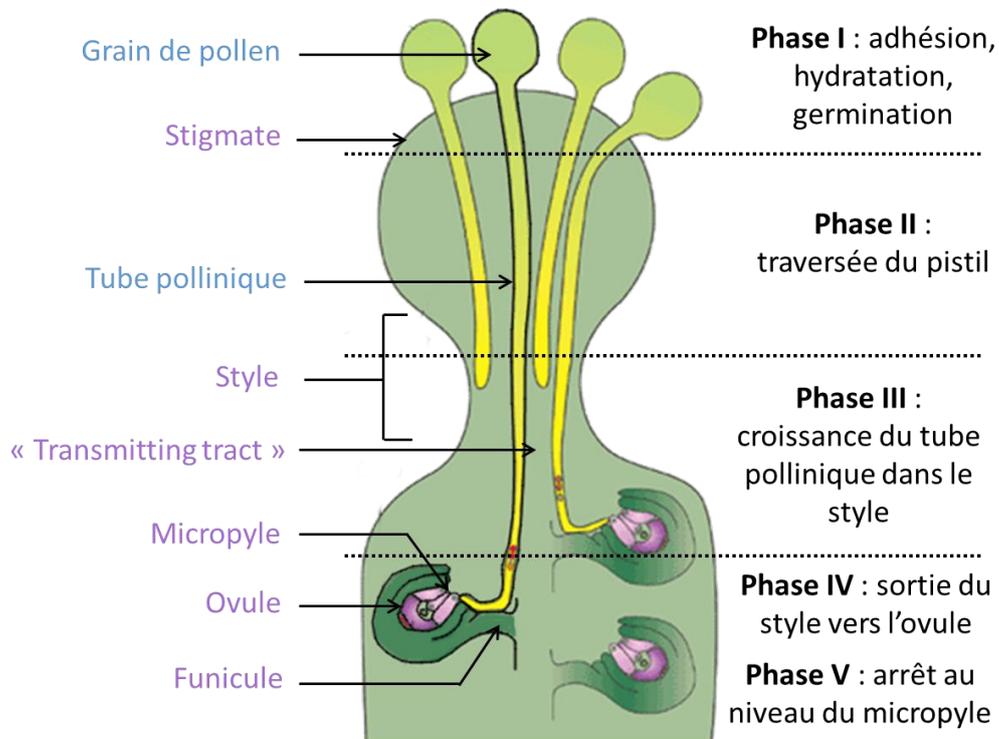
végétative (non germinale) mais pas dans les cellules spermatiques (gamètes). Il a tout d'abord été observé que les cellules spermatiques présentent un enrichissement en siRNA (de 21 nucléotides) impliqués dans la répression du transposon *Athila* alors qu'aucun transcrit de cet élément transposable n'est détecté dans ces cellules. L'hypothèse proposée est que ces siRNA auraient été produits dans la cellule végétative (suite à la réactivation des éléments transposables), puis transportés dans les cellules spermatiques pour réguler négativement la mobilité de ces mêmes éléments. Cette hypothèse a été soutenue par l'utilisation d'un rapporteur fluorescent et d'un micro-ARN artificiel capable de réprimer l'expression de ce rapporteur. Le micro-ARN a été exprimé spécifiquement dans le noyau végétatif et a permis la répression de l'expression du marqueur fluorescent dans les cellules spermatiques. Ceci montre qu'il y a vraisemblablement un transfert de matériel entre le noyau végétatif et les cellules spermatiques (Slotkin et al., 2009). D'autre part, plusieurs études ont montré qu'il existe, au niveau du noyau végétatif, une polarisation des pores nucléaires, qui sont plus denses en direction de la connexion cytoplasmique (McCue et al., 2011) appuyant l'hypothèse d'un rôle de la connexion cytoplasmique dans le transfert de matériel.

### **Conclusions : le pollen chez *Arabidopsis thaliana***

Le pollen mature chez *Arabidopsis thaliana* est issu de plusieurs événements de division cellulaire menant à la formation, au sein de la cellule végétative du pollen mature, d'une « unité de germination mâle » (MGU). Cette structure regroupe les deux cellules spermatiques et le noyau végétatif. Après sa libération des sacs polliniques, le pollen mature atteint le stigmate du pistil, où il pourra germer et guider les gamètes vers les ovules. La double fécondation pourra ainsi avoir lieu, permettant la formation de la graine.

### **IV.3. De la germination du tube pollinique à la fécondation**

Chez les angiospermes, la reproduction met en jeu une double fécondation (Figure 36). La fusion d'une cellule spermatique avec l'oosphère (gamète femelle) forme l'embryon diploïde alors que la fusion entre l'autre cellule spermatique et la cellule centrale diploïde du sac embryonnaire (gamétophyte femelle) forme l'albumen triploïde (réserves de la graine). Suite à sa libération des sacs polliniques, le pollen mature a pour fonction de mener les cellules spermatiques immobiles qu'il contient au niveau de l'ovule afin d'y



**Figure 37: Etapes du transport des cellules spermatiques à l'ovule**

Lors de sa croissance dans les tissus femelle, le tube pollinique passe par cinq phases de croissances décrites ci-dessus. Les organes/tissus femelle sont écrits en violet, ceux du mâle sont écrits en bleu. Schéma modifié à partir de Twell, 2006 avec l'aide de la publication Dresselhaus & Franklin-Tong, 2013.

réaliser cette double fécondation. Ce transport est permis par la formation et l'élongation du tube pollinique.

### **IV.3.1 Le périple du tube pollinique**

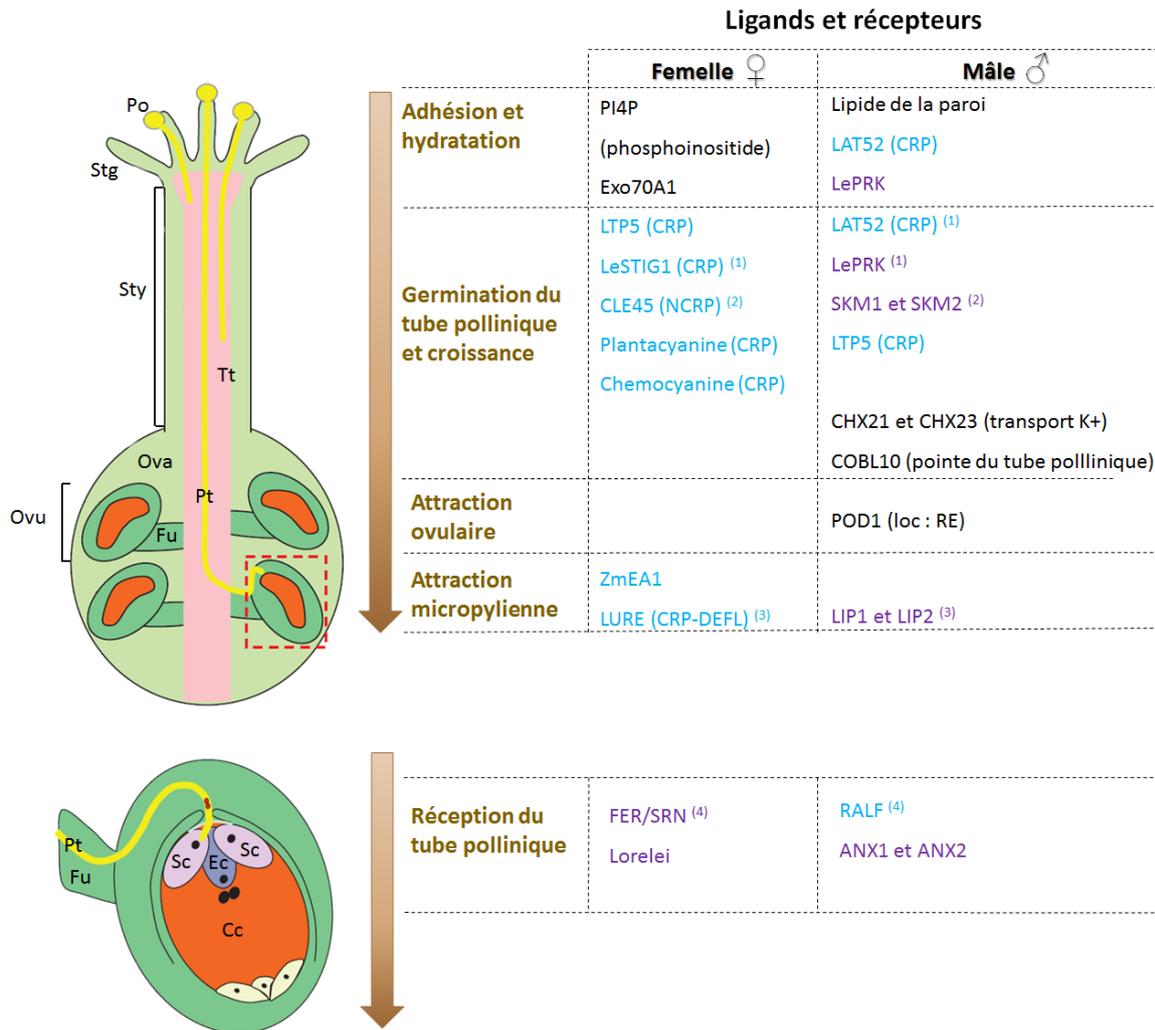
Le transport des cellules spermatiques au travers des tissus femelles est très contrôlé et comprend 5 étapes (Figure 37). La phase I comprend l'adhésion du pollen sur le stigmate, l'hydratation et la germination du tube pollinique. Durant la phase II, le tube pollinique traverse la partie supérieure du pistil jusqu'à atteindre le style. La croissance du tube pollinique dans le style pour atteindre l'ovaire constitue la phase III. La sortie du tube pollinique du « transmitting tract » en direction de l'ovule via le funicule représente la phase IV. L'étape IV comprend deux phases d'attraction successives du tube pollinique : l'attraction funiculaire et l'attraction micropylaire. L'attraction funiculaire est contrôlée par le sporophyte et le gamétophyte femelles et entraîne le changement de direction du tube pollinique vers le funicule reliant l'ovule au placenta. L'attraction micropylaire issue du gamétophyte femelle uniquement permet l'attraction du tube pollinique dans les derniers 100-200  $\mu\text{m}$  avant les synergides (revue, Dresselhaus & Franklin-Tong, 2013). Finalement, durant la phase V, la croissance du tube pollinique s'arrête au niveau du micropyle de l'ovule, où l'interaction tube pollinique/synergides va avoir lieu menant à la libération des cellules spermatiques dans le sac embryonnaire. Alors que les différentes étapes menant à la double fécondation sont assez bien connues, les mécanismes moléculaires régulant ces différentes étapes restent beaucoup moins clairs.

### **IV.3.2 La communication mâle/femelle**

Les différentes phases de la fécondation impliquent la mise en place de processus de communications entre mâle et femelle afin de permettre, entre autres, des étapes de reconnaissance et de guidage du mâle.

#### **IV.3.2.a Les étapes d'adhésion et d'hydratation**

Les étapes d'adhésion et d'hydratation sont réalisées avant de permettre la germination du tube pollinique. L'adhésion consiste à établir une interaction stable entre le pistil et le grain de pollen par le biais de protéines membranaires. C'est à ce moment qu'intervient la



**Figure 38: Croissance du tube pollinique dans les tissus femelle et communication**

Po : pollen, Stg : stigmat, Sty : style, Tt : « Transmitting tract », Ova : ovaire, Ovu : ovule, Fu : funicule, Pt : tube pollinique, Sc : synergides, Ec : oosphère, Cc : cellule centrale.

Les peptides sont écrits en bleu, les récepteurs en violet.

CRP : cystein rich peptides, NCRP : non CRP, DEFL: defensin-like

ANX 1/2: Anxur 1/2, CHX21/23 : cation H<sup>+</sup> antiporter 21/23, CLE45: CLV3/ESR related 45, COBL10 : cobra like 10, FER/SRN: Feronia/Sirene receptor like kinase, LAT52 : anther specific protein LAT52, LePRK: *Lycopersicon esculentum* pollen receptor kinase, LeSTIG1 : *Lycopersicon esculentum* stigma specific protein 1, LIP1/2: lost in pollen guidance, LTP5 : SCA like LTP (SCA : stigma/style cystein rich adhesin, LTP: lipid transfer protein), PI4P : phosphatidylinositol-4-phosphate, POD1 : pollen defective in guidance, RALF: rapid alkalization factor, SKM1/2 : sterility regulating kinase member 1/2, ZmEA1 : *Zea mays* egg apparatus 1. Les chiffres en indice renseignent sur les caractéristiques de l'interaction ligand/récepteur : <sup>(1)</sup> Ligands et récepteurs dont l'interaction est validée, <sup>(2)</sup> Ligands et

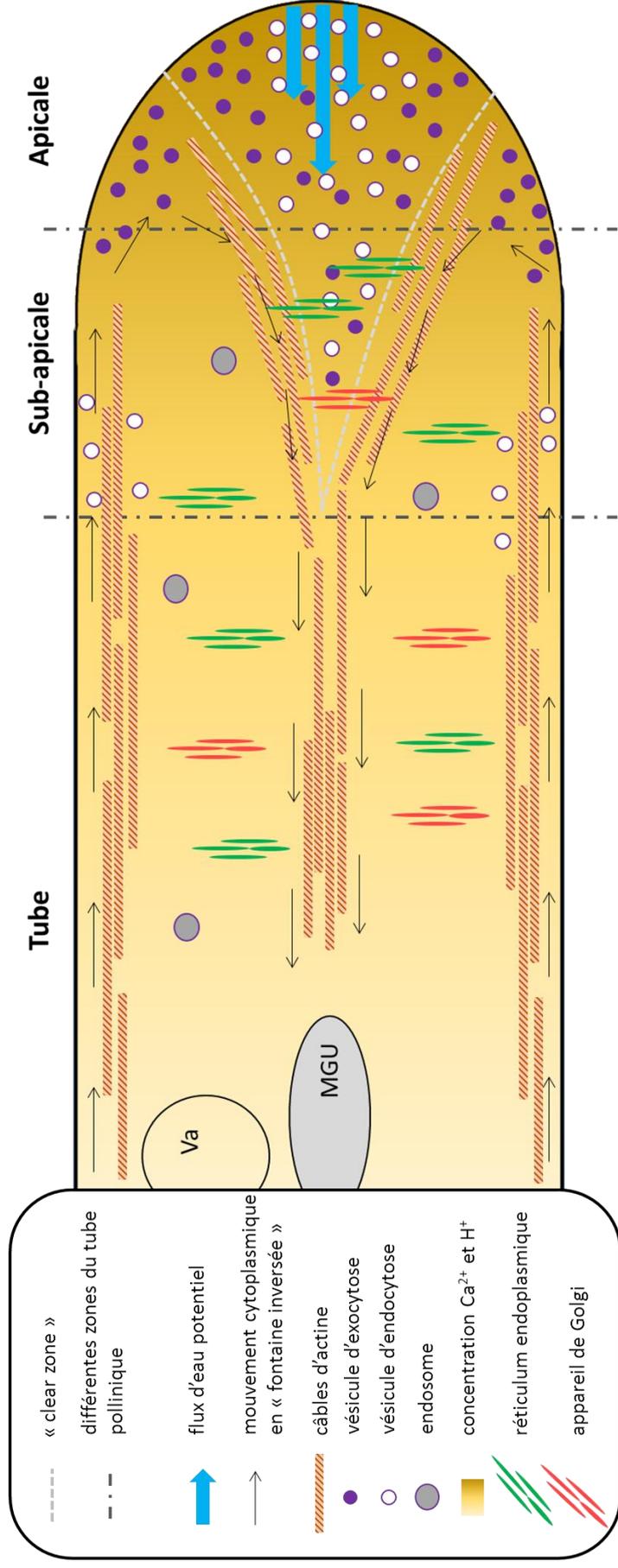
<sup>(3)</sup> récepteurs directs dont l'interaction n'a pas été confirmée, <sup>(4)</sup> Interaction indirecte.

Schéma modifié de Qu et al., 2015 avec des informations tirées de Dresselhaus & Franklin-Tong, 2013; Higashiyama & Takeuchi, 2015.

première étape de sélection du pollen ; en effet, l'adhésion du pollen sur un même pistil est plus ou moins efficace selon l'espèce dont il est issu (revue, Dresselhaus & Franklin-Tong, 2013). Ceci permet notamment de faciliter la fécondation par des individus compatibles. Intervient ensuite l'étape d'hydratation, où le stigmate sert de source d'eau pour réhydrater le grain de pollen. La régulation de cette étape fait intervenir, au niveau du mâle, les lipides de la paroi du grain de pollen et, au niveau de la femelle, des phosphoinositides ou encore la protéine Exo70A1 (Figure 38). Cette dernière pourrait intervenir via son rôle dans le complexe exocyste, qui permet le transport de vésicules à la membrane (revue, Dresselhaus & Franklin-Tong, 2013). Ce n'est que lorsque le pollen est réhydraté qu'il va pouvoir germer pour former le tube pollinique.

### IV.3.2.b La croissance du tube pollinique jusqu'à l'ovule

Le tube pollinique constitue une extension de la cellule végétative contenant le MGU et fait ainsi partie des cellules eucaryotes dont la croissance est parmi les plus rapides (de 58 à 400 nm/sec selon les espèces) (Cheung & Wu, 2008). Il s'agit d'une croissance dirigée au travers de 7 types cellulaires femelles, et régulée par de nombreux acteurs moléculaires permettant une véritable communication entre mâle et femelle. Au départ, la majorité des outils de communication identifiés étaient d'origine femelle. En effet, la matrice extracellulaire (ECM) présente dans le style permet la sécrétion de nutriments ainsi que de signaux de courtes et longues distances afin de favoriser et guider la croissance du tube pollinique. Cependant, de plus en plus de publications indiquent l'existence d'acteurs issus du mâle dans cette communication. Ainsi, près de 1000 gènes sont différenciellement exprimés entre le stade pollen mature et le tube pollinique dont 383 seraient spécifiques de l'interaction avec le pistil (Qin et al., 2009). Bon nombre de ces gènes sont impliqués dans le transport vésiculaire et la sécrétion de protéines. Les recherches concernant la communication mâle/femelle chez les Angiospermes durant la fécondation ont été réalisées majoritairement sur les espèces *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Zea mays* (maïs) et des Brassicacées. Les moyens de communication sont très divers, allant de molécules gazeuses (monoxyde d'azote NO) aux peptides ou acides aminés, en passant par le GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) et les ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Dresselhaus & Franklin-Tong, 2013; Higashiyama & Takeuchi, 2015; Qu et al., 2015). Il existe deux grandes catégories de peptides sécrétés lors de la fécondation : les CRP (Cystein Rich Peptides) qui font moins de 170 acides aminés



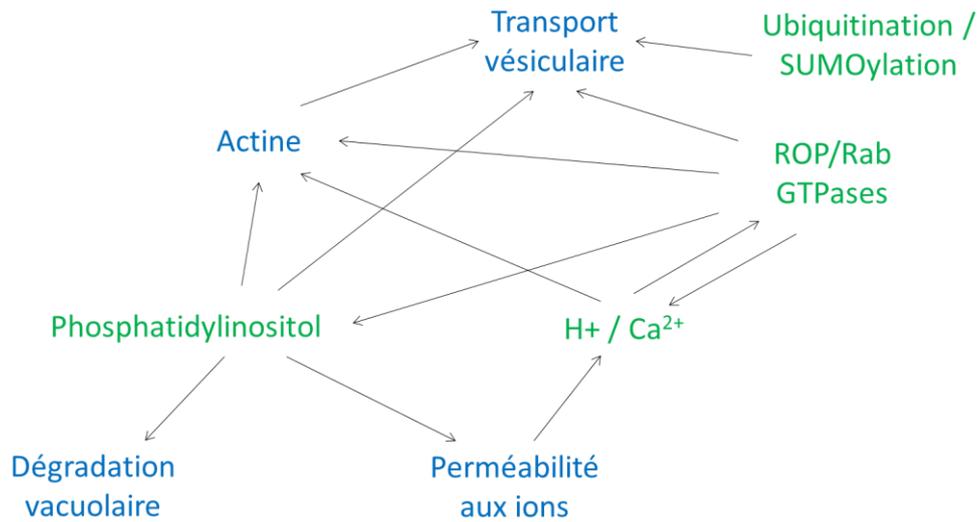
**Figure 39: Schéma de l'organisation du tube pollinique durant sa croissance**

Le schéma représente les différentes zones de la pointe du tube pollinique ainsi que l'organisation de certains organites et composés cellulaires dans le tube pollinique en croissance. Ce schéma concentre l'attention sur l'organisation du cytosquelette, du transport vésiculaire, des mouvements cytoplasmiques, ainsi que sur les gradients d'ions impliqués dans la régulation de la croissance du tube pollinique. Unité de germination mâle (MGU), vacuole (Va). Schéma inspiré de Cheung & Wu, 2008; Guan et al., 2013; Hepler & Winship, 2015; Zonia & Munnik, 2008.

et les NCRP (non CRP) qui font environ 10 acides aminés. Parmi les peptides sécrétés par la femelle on retrouve une majorité de peptides appartenant à la famille des CRP et intervenant dans plusieurs étapes de la croissance dirigée du tube pollinique afin de stimuler, d'attirer et de guider le tube pollinique (Figure 38). De son côté, le mâle possède des récepteurs membranaires afin de percevoir les signaux sécrétés par la femelle. A l'heure actuelle, encore peu de couples ligand/récepteur ont été caractérisés. Comme indiqué précédemment, on sait maintenant que la femelle n'est pas la seule à sécréter des peptides en direction du mâle, l'inverse existant aussi. Ainsi, des peptides de type CRP sont sécrétés par le tube pollinique et des récepteurs membranaires commencent à être identifiés chez la femelle (Figure 38). En 2014, une méthode d'analyse du sécrétome du tube pollinique a été publiée, permettant l'identification des peptides et métabolites sécrétés par le mâle (Hafidh et al., 2014).

### **IV.3.3 Organisation au sein du tube pollinique**

La formation du tube pollinique commence par la germination, et donc l'expansion de la cellule végétative du pollen. Le tube pollinique, dont les parois sont composées de cellulose, de callose et de pectine, croît dans sa partie apicale. Ce type de croissance est typique de seulement quelques types cellulaires tels que les poils absorbants chez les plantes (au niveau des racines) ou encore les neurites chez les animaux. La croissance du tube pollinique se fait « par oscillation », en effet, plusieurs phases régulières de croissance rapide puis lente ont été identifiées et associées à une réorganisation de la structure et du métabolisme à l'intérieur du tube pollinique. Le cytoplasme de la cellule végétative contenant le MGU se déplace dans le tube pollinique au fur et à mesure de sa croissance. Des dépôts de callose en partie distale permettent de fermer les parties du tube pollinique déjà traversées. La pointe du tube pollinique peut être divisée en 3 régions représentées dans la figure 39 : la partie apicale, la partie sub-apicale et la partie correspondante au tube (« shank »). Une zone supplémentaire, nommée « clear zone », a aussi été décrite formant un cône inversé à l'extrémité du tube et traversant les régions apicales et sub-apicales. Cette zone ne contient pas de vacuole mais est riche en vésicules, réticulum endoplasmique, etc... et constituerait une zone d'entrée d'eau nécessaire à la croissance du tube pollinique (Hepler & Winship, 2015). Le tube pollinique est très dynamique et implique la mise en place et la régulation fine de nombreux mécanismes durant sa



**Figure 40: Représentation schématique des voies de régulations majeures au sein du tube pollinique en croissance**

Les acteurs « directs » de la croissance du tube pollinique sont représentés en bleu, les acteurs indirects sont représentés en vert.

croissance. Il existe dans le tube pollinique un « courant » cytoplasmique en « fontaine inversée » principalement mis en place par le cytosquelette (Figure 39). En effet, alors que les microtubules sont impliqués dans le transport du MGU en tant qu'unité, le cytosquelette d'actine guide la croissance du tube pollinique et est impliqué dans le transport vésiculaire. Le transport vésiculaire comprend notamment les mécanismes d'exocytose qui permettent la relocalisation à la membrane de transporteurs et récepteurs, mais aussi la sécrétion de signaux de communications et de composés pariétaux (enzymes, pectines méthyl-estérifiées,...). Ces composés sécrétés dans la partie apicale du tube pollinique peuvent ensuite être « endocytés » afin d'être à nouveau sécrétés ou bien dégradés (Zonia & Munnik, 2008). Il existe des mécanismes de régulation très variés et interconnectés de la croissance du tube pollinique dont certains sont représentés de manière schématique et non exhaustive en figure 40. Ce schéma permet d'avoir un aperçu des liens entre les mécanismes de régulation du cytosquelette d'actine et du transport vésiculaire notamment. On constate par exemple les rôles centraux des phosphatidylinositol, des ions ( $H^+/Ca^{2+}$ ) et des GTPases (Cheung et al., 2008; Guan et al., 2013). On note, de plus, que le  $Ca^{2+}$  et les ROP GTPases sont capables de s'inter-réguler. D'autre part, la figure ne montre pas le rôle important des pectines méthyl-estérases impliquées dans la modification de la rigidité des parois du tube pollinique, entre autres (pour revue Guan et al., 2013). Les pectines méthyl-estérifiées synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi sont adressées à la partie apicale du tube pollinique, zone de croissance, la dé-estérification des pectines dans la partie sub-apicale permet d'augmenter la rigidité des parois qui ne sont plus en croissance (pour revue Guan et al., 2013).

### **Conclusions : croissance du tube pollinique et fécondation.**

La fécondation nécessite la compatibilité entre le pollen et le pistil. Après reconnaissance du pollen compatible, celui-ci pourra germer sur le stigmate du pistil afin de déposer les cellules spermatiques qu'il contient dans l'ovule et réaliser ainsi la double fécondation. La croissance du tube pollinique dans les tissus femelle est possible grâce à la mise en place d'une communication entre mâle et femelle, et à la modification très spécifique du métabolisme et des activités de transport au sein du tube pollinique.

---

**RESULTATS PRELIMINAIRES ET  
OBJECTIFS**

---

### **RESULTATS PRELIMINAIRES ET OBJECTIFS**

Les travaux publiés en 2013 dans RNA (Merret et al., 2013b) ont été le point de départ de ce travail de thèse. Cet article retrace, dans un premier temps, l'évolution des sous-familles de protéines LARP à motif PAM2 (LARP4 et LARP6). Chez les plantes, la sous-famille LARP4 ne possède aucun représentant ; cependant la sous-famille LARP6 est bien présente chez les végétaux. Dans la sous-famille LARP6, seules les protéines LARP6b et c possèdent un motif PAM2, ce dernier étant plus conservé chez LARP6b que chez LARP6c où un acide aminé impliqué dans la liaison au MLLE est muté (substitution leucine en phénylalanine en position 3). Qu'il s'agisse des protéines LARP4 ou LARP6, l'acquisition du motif PAM2 est couplée à un réarrangement du module LA, celui-ci dirigeant la liaison à l'ARN. Ces réarrangements passent par la substitution d'acides aminés clé du motif LA (LARP4 et LARP6) et la modification de la taille de la boucle 3 du RRM-L3 (LARP6), ce qui suggère une modification des modalités d'interaction et donc potentiellement une néofonctionnalisation de ces protéines.

Les résultats publiés dans cet article s'orientent, dans un deuxième temps, vers les capacités de fixation protéine/protéine et protéine/ARN des protéines LARP6a (*At5g46250*), LARP6b (*At2g43970*) et LARP6c (*At3g19090*) d'*Arabidopsis thaliana*. Des expériences d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry), ont montré que le motif PAM2 des protéines LARP6b et LARP6c est capable *in vitro* d'interagir avec le domaine MLLE de la protéine PAB2 d'*A. thaliana*. Ces résultats sont validés *in vivo* (en système hétérologue), les protéines LARP6b et LARP6c étant capables d'immunoprécipiter la protéine PAB2, contrairement à la protéine LARP6a qui ne possède pas de motif PAM2. La même expérience répétée avec des protéines LARP6b et LARP6c délétées de leur motif PAM2 montre des implications différentes du motif dans l'interaction avec PAB. En effet, le motif PAM2 de LARP6b semble entièrement responsable de la fixation à PAB, celui de LARP6c ne semble être, quant à lui, impliqué dans l'interaction que de manière partielle, celle-ci n'étant pas complètement abolie par la délétion du motif PAM2. Ceci suggère que les motifs LA, RRML3 et/ou LSA pourraient intervenir dans l'interaction. Ceci pourrait être une conséquence de la plus faible conservation du motif PAM2 chez LARP6c.

## RESULTATS PRELIMINAIRES ET OBJECTIFS

---

D'autre part, la capacité de ces protéines à lier l'ARN a été testée. Pour cela, des analyses d'ITC ont été réalisées afin de tester la capacité de fixation du module LA à différents homopolymères. Des problèmes techniques n'ont pas permis d'obtenir de résultat pour la protéine LARP6b mais seulement pour les modules LA des protéines LARP6a et LARP6c. Ceux-ci nous indiquent que le motif LA de la protéine LARP6c possède des capacités de fixation différentes du motif LA de LARP6a, ce qui est probablement dû aux modifications de séquences liées du motif LA suite à l'acquisition du motif PAM2. Ainsi, le module LA de LARP6c a la capacité, *in vitro*, de fixer des homopolymères d'uridines, la fixation étant dépendante de la taille du polymère (l'affinité augmente avec l'augmentation de la taille du polymère). Contrairement à ce qui a pu être observé pour la protéine LA authentique, cette interaction n'est pas sensible à la présence d'une extrémité 3'-OH. LARP6c interagirait donc avec PAB et serait capable de fixer des séquences riches en uridines.

Ces nouvelles informations sur les protéines LARP6 suggèrent leur néo-fonctionnalisation. Afin d'obtenir plus d'informations sur les fonctions potentielles de ces protéines chez *Arabidopsis thaliana*, leur localisation subcellulaire a été testée par expression transitoire. Les résultats montrent que les trois protéines sont présentes dans le nucléole et le cytoplasme. Il est très intéressant de constater que deux de ces protéines (LARP6b et LARP6c) co-localisent avec PAB2 dans le cytoplasme au sein de granules de stress au cours d'un stress hypoxique contrairement à LARP6a.

Ces nouvelles données à propos des protéines LARP6 d'*A. thaliana* suggèrent que ces protéines se sont néo-fonctionnalisées. En effet, on constate que les protéines LARP6b et LARP6c forment des sous-familles évolutivement distinctes de la sous-famille LARP6a. De plus, ces deux sous-familles ont acquis un motif PAM2, contrairement à LARP6a, entraînant un réarrangement de leur module de fixation à l'ARN. Ce réarrangement entraîne, au moins chez la protéine LARP6c, une modification des affinités de liaison. Finalement, les différences de localisations subcellulaires des protéines LARP6a d'un côté et LARP6b/c d'autre part appuient également cette hypothèse d'une néofonctionnalisation au moins de LARP6b et LARP6c. Ces deux protéines sont donc capables d'interagir avec la protéine PAB, via leur motif PAM2, ainsi qu'avec des ARN, via leur module LA. De plus, elles ont été identifiées, dans le cytoplasme, au sein de granules de stress. Ceci suggère un rôle de LARP6b et LARP6c dans les mRNP, potentiellement dans la régulation

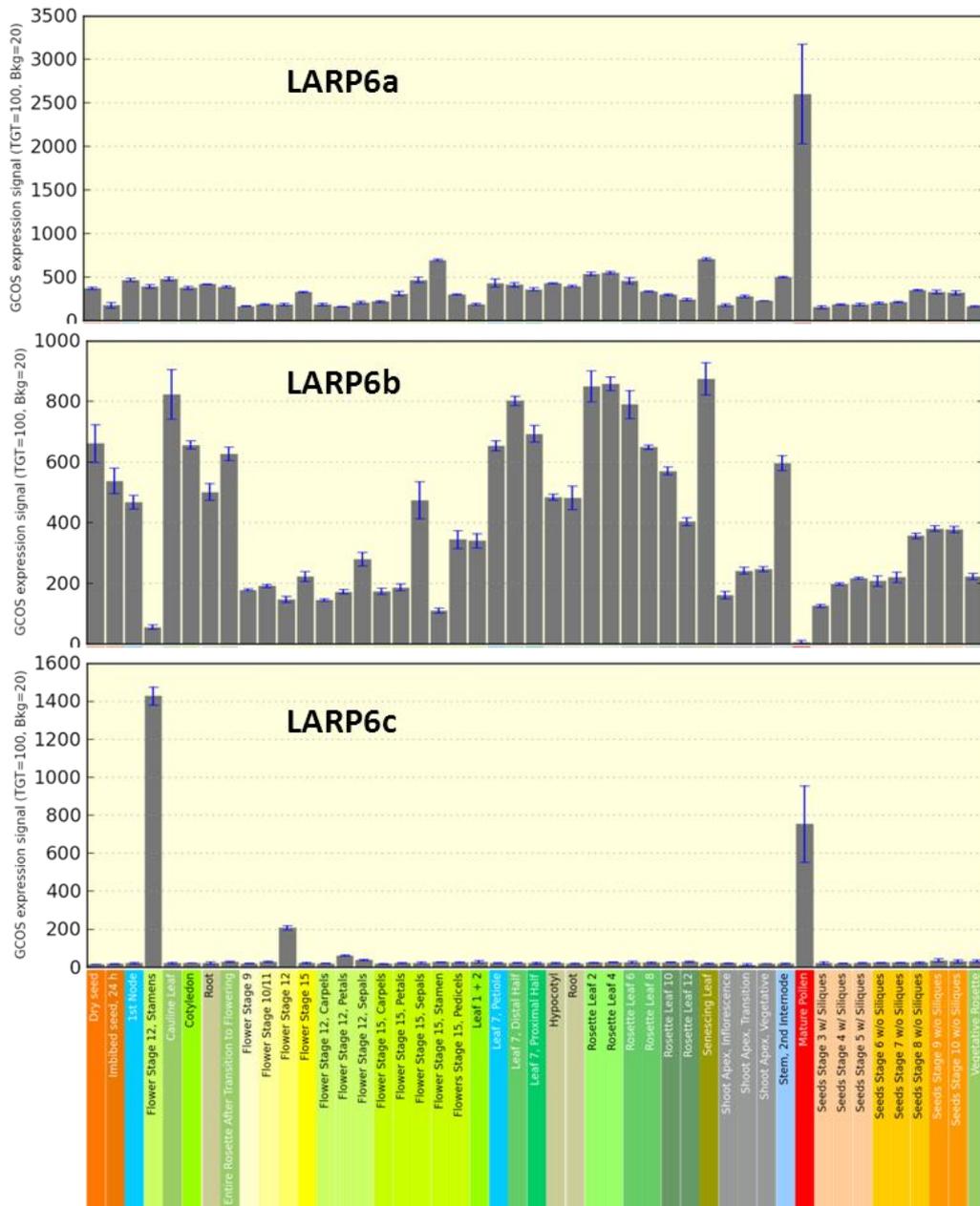
de la traduction et/ou de la stabilité des ARNm par le biais d'une interaction à la fois avec l'ARN et avec PAB.

C'est dans ce cadre qu'ont été déterminés les objectifs de ce travail de thèse, qui visent à préciser les fonctions des protéines LARP6b et LARP6c chez *Arabidopsis thaliana*. Afin de caractériser leurs rôles physiologiques et moléculaires, 4 axes de recherches ont été définis : (i) étude de l'impact physiologique des protéines LARP6, (ii) caractérisation de la localisation subcellulaire de ces protéines *in vivo*, (iii) identification des partenaires protéiques et (iv) recherche de cibles ARN.

---

## **RESULTATS**

---



**Figure 41: Profil d'expression des gènes *LARP6a*, *LARP6b* et, *LARP6c* dans différents tissus**

Expression des gènes de la famille *LARP6* chez *Arabidopsis thaliana*, données issues des bases de données disponibles en ligne (Winter et al. 2007).

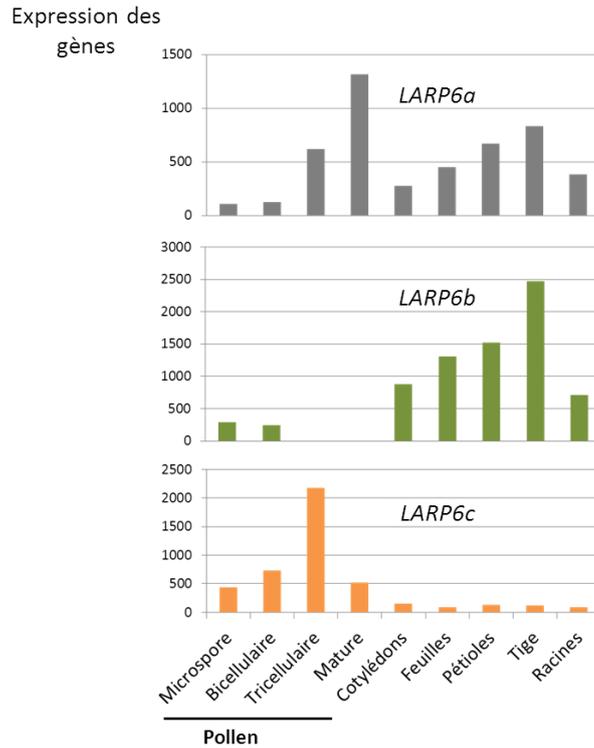
## RESULTATS

### **I. Analyse comparative des protéines LARP6a, LARP6b et LARP6c**

#### **I.1. Analyse des profils d'expression des gènes et protéines de la sous-famille LARP6.**

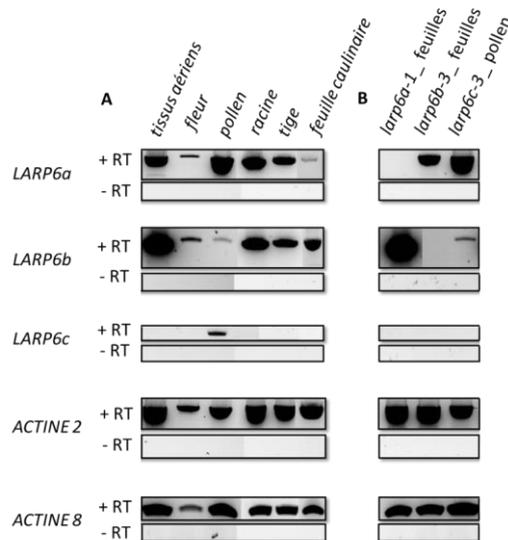
##### **I.1.1 Profils d'expression des gènes LARP6 chez *Arabidopsis thaliana*.**

Les gènes codant les protéines de la famille des LARP6 possèdent, d'après les bases de données disponibles (Schmid et al., 2005; Winter et al., 2007), des profils d'expression très spécifiques (Figure 41). Le gène *LARP6a* (*At5g46250*) est exprimé dans tous les tissus et s'exprime près de 8 fois plus dans le pollen mature que dans le reste de la plante. Le gène *LARP6b* (*At2g43970*), quant à lui, s'exprime dans tous les tissus à l'exception du pollen, et par conséquent très faiblement au niveau des étamines. Finalement, le gène *LARP6c* (*At3g19090*) s'exprime uniquement dans le pollen mature avec un niveau d'expression environ 3 fois moins important par rapport à *LARP6a* dans ce même tissu. Des données publiées en 2004 (Honys & Twell, 2004) précisent les profils d'expression observés pour les ARNm codant les protéines LARP6 chez *Arabidopsis thaliana* au sein du pollen. En effet, les résultats montrent que *LARP6a* voit son expression augmenter dans les stades tricellulaire et mature du pollen alors que *LARP6c* a une expression maximum dans le stade tricellulaire avec une diminution dans le stade mature (Figure 42). A noter que, contrairement à la figure précédente, ces résultats semblent indiquer une expression plus forte de *LARP6c* que de *LARP6a* dans le pollen ; cependant, d'autres études transcriptomiques soutiennent le fait que l'expression de *LARP6a* soit plus forte que celle de *LARP6c* dans le pollen (Qin et al., 2009). J'ai confirmé les profils d'expression cités précédemment par des analyses de RT-PCR réalisées à partir d'ARN extraits de tissus aériens, fleurs, pollen, racines, tiges ou feuilles caulinaires d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 43A). Les résultats confirment la présence d'ARNm codant LARP6a dans tous les tissus



**Figure 42: Expression des gènes *LARP6* dans différents tissus dont différents stades du pollen**

Représentation de l'expression des gènes *LARP6a*, *LARP6b* et *LARP6c* en feuilles, pétioles, tiges et racines, ainsi que dans les 4 stades de développement du pollen. Ces données sont issues d'une publication de Honys & Twell, 2004.



**Figure 43: Profil d'expression des gènes *LARP6* chez *Arabidopsis thaliana***

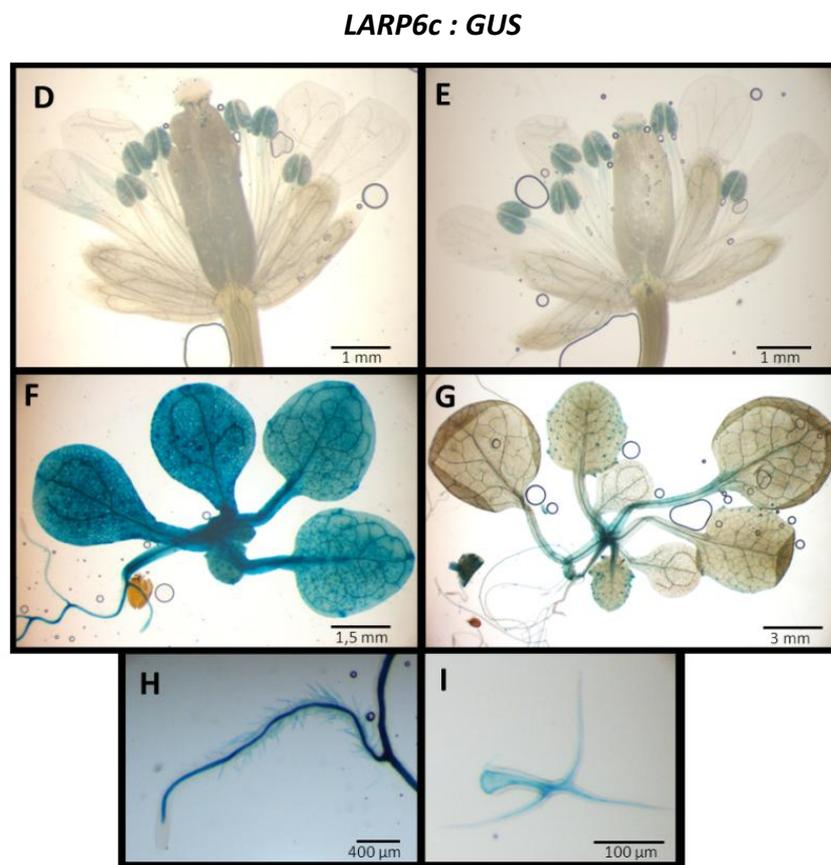
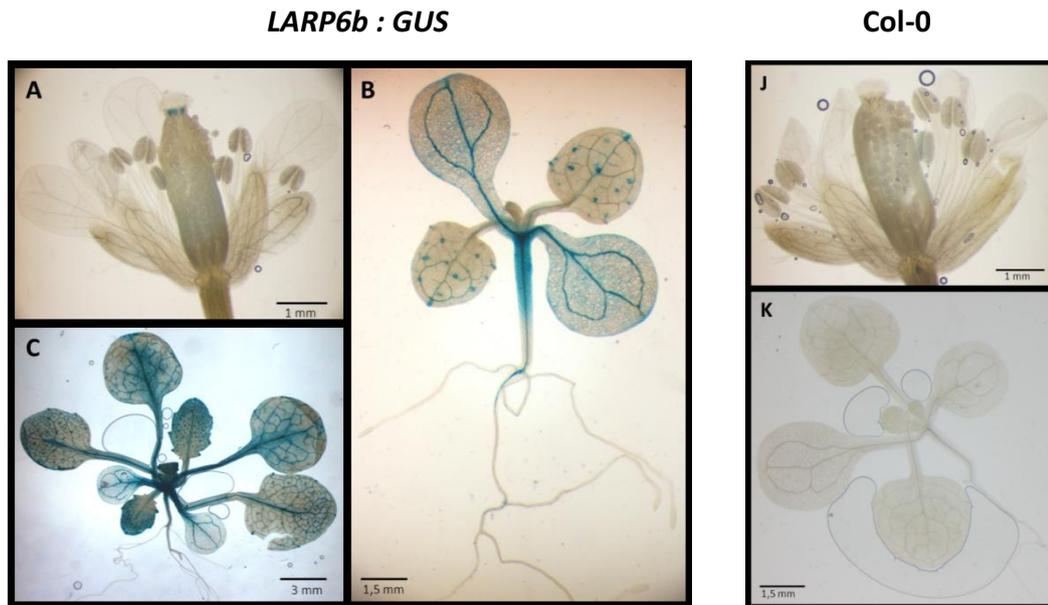
RT-PCR réalisées à partir d'ARN extraits de divers tissus d'*Arabidopsis thaliana* (A). Contrôle négatif : « -RT » correspond à la PCR réalisée sur l'ARN n'ayant pas subi la transcription inverse. Les lignées mutantes *larp6a-1*, *larp6b-3* et *larp6c-3* sont utilisées comme contrôle négatifs supplémentaires (B). L'*ACTINE 2* et l'*ACTINE 8* sont utilisés comme contrôle de charge.

testés alors que l'ARNm codant LARP6c est détecté uniquement dans le pollen mature. Concernant l'ARNm codant la protéine LARP6b, les résultats indiquent l'expression du gène dans tous les tissus, y compris une très légère expression dans le pollen mature, ce qui n'est pas en adéquation avec les informations présentes dans les bases de données. La figure 43B présente les résultats obtenus pour les lignées mutantes *larp6a-1*, *larp6b-3* et *larp6c-3* utilisées ici comme contrôles, et montre qu'aucun transcrite n'est détectable pour ces gènes dans leurs lignées mutantes respectives. La caractérisation de ces lignées mutantes est présentée ultérieurement dans le manuscrit (cf. I.2.1 Caractérisation des lignées d'insertion ADN-T). L'ensemble de ces résultats indique qu'au sein de la sous-famille *LARP6*, les trois membres possèdent des régulations transcriptionnelles et/ou post-transcriptionnelles différentes. Alors que *LARP6a* est ubiquitaire, les gènes codant LARP6b et LARP6c ont des profils d'expression opposés, *LARP6c* étant exprimé uniquement dans le pollen avec une accumulation maximale dans le stade tricellulaire.

### **I.1.2 Analyse des régions promotrices des gènes *LARP6b* et *LARP6c***

Les régions génomiques présentes en amont des gènes d'intérêt, *LARP6b* et *LARP6c*, ont été utilisées pour diriger l'expression du gène rapporteur GUS (bêta-glucuronidase) et ainsi analyser leurs profils d'expression. Les régions promotrices putatives considérées pour *LARP6b* et *LARP6c* comprennent respectivement 2000pb et 2281pb en amont du codon d'initiation de la traduction. Les analyses histochimiques de l'expression du rapporteur GUS (Figures 44A, B et C) montrent que la région promotrice de *LARP6b* permet l'expression du rapporteur dans la plantule mais pas en fleur à l'exception des tissus conducteurs du pistil. En effet, cette région promotrice permet l'expression au niveau des tissus conducteurs : à l'extrémité du pistil, dans la racine, dans les cotylédons et dans les premières feuilles. Au niveau de la plantule, le promoteur s'exprime dans l'hypocotyle, les cotylédons, les feuilles ainsi que dans les cellules de garde des stomates. Ces résultats semblent en adéquation avec le profil d'expression de l'ARNm de *LARP6b* obtenus précédemment (Figures 41-43).

Les résultats obtenus concernant le profil d'expression de la région promotrice de *LARP6c* sont, quant à eux, plus surprenants (Figures 44D à 44I). En fleurs, le gène rapporteur s'exprime uniquement dans le pollen, ce qui correspond au profil attendu. Cependant, lorsque l'on suit l'expression du gène rapporteur en plantule, on voit une expression très



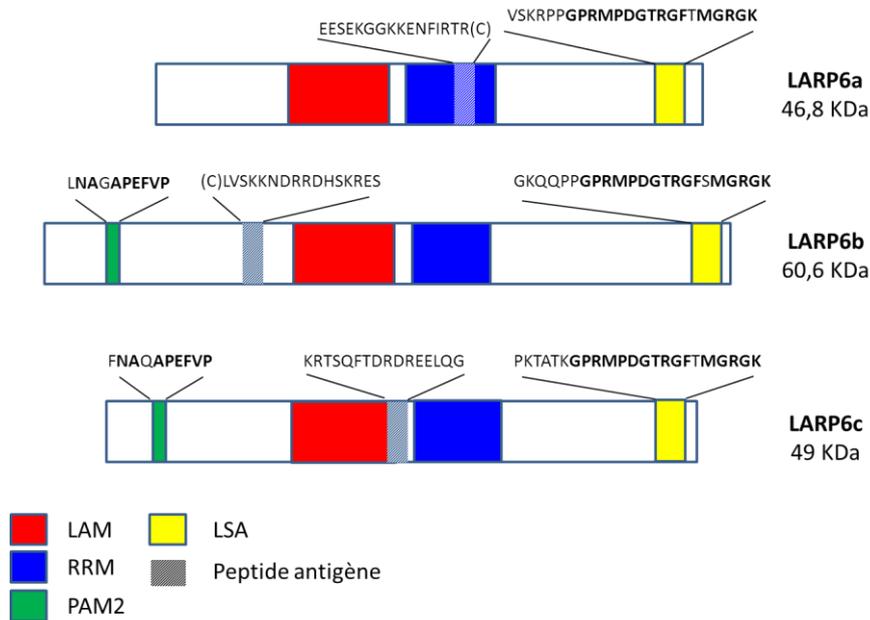
**Figure 44: Profil d'expression de la bêta-glucuronidase sous contrôle des régions promotrices de *LARP6b* et *LARP6c***

A,B,C : expression de la bêta-glucuronidase sous contrôle de la région promotrice de *LARP6b* en fleur (A) et en plantules de 12 à 15 jours dans deux lignées d'insertion différentes (B,C). D,E,F,G,H,I : expression de la bêta-glucuronidase sous contrôle de la région promotrice de *LARP6c* en plantules de 15 jours (F,G), dans les racines (H), dans les trichomes (I) et en fleurs (D,E). Col-0 (J, K)

variable selon les plantules. Dans les cas d'expression relativement faible, on peut voir un signal au niveau des pétioles, des trichomes, ainsi que des tissus conducteurs des racines. Dans le cas d'expression plus forte, la plantule est entièrement marquée. Bien entendu, les plantules Col-0 utilisées comme contrôle négatif ne présentent aucun signal (Figures 44J et 44K). Ces résultats ne sont pas en adéquation avec les résultats attendus et suggèrent ici que la région promotrice utilisée est incomplète. Cette région promotrice contient vraisemblablement la séquence responsable de l'expression dans le pollen étant donné le signal détecté dans celui-ci. Cependant, le signal observé dans le reste de la plante laisse penser qu'une région régulatrice venant inhiber l'expression dans ces tissus est absente de la région promotrice utilisée lors de l'expérience ou bien qu'une régulation post-transcriptionnelle n'est pas mise en place dans ces lignées. Ces résultats sont à prendre en compte lors de la suite des travaux, cette construction ne pourra donc être utilisée qu'afin de déterminer la localisation subcellulaire des protéines LARP6c mais en aucun cas leur expression dans différents tissus.

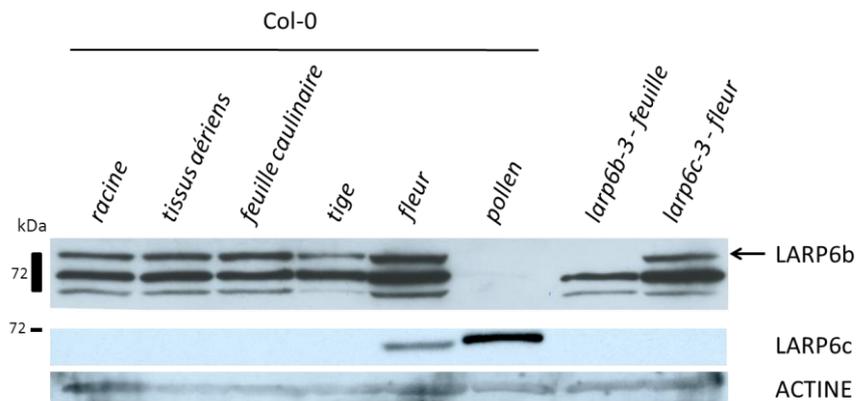
### **1.1.3 Profils d'expression des protéines LARP6b et LARP6c.**

Les gènes *LARP6b* et *LARP6c* présentent des profils d'expression mutuellement exclusifs. Afin de compléter ces données sur nos gènes d'intérêt au niveau protéique, des western blots ont été réalisés sur des extraits totaux préparés à partir de racines, rosettes, tiges, feuilles caulinaires, fleurs et pollen issus de plantes d'écotype Columbia-0. Les anticorps utilisés sont produits chez le lapin et dirigés contre un peptide de 16 acides aminés (aa) situé avant le motif LA pour LARP6b et contre un peptide de 16 aa situé entre le motif LA et le motif RRML3 pour LARP6c (chevauchant de 2 aa la fin du motif LA) (Figure 45). Les résultats présentés dans la figure 46 montrent que l'anticorps dirigé contre LARP6b détecte trois bandes dans les tissus sporophytiques. L'utilisation d'une lignée mutante pour LARP6b (*larp6b-3*) permet de déterminer que la bande correspondante à LARP6b se situe juste au-dessus de 72 KDa pour une taille théorique de 60,59 KDa. LARP6b est détectée dans tous les tissus à l'exception du pollen. LARP6c, quant à elle, est au contraire présente seulement dans le pollen, l'expression en fleur étant très probablement la conséquence de la présence de pollen dans la fleur. Contrairement aux résultats obtenus par RT-PCR, l'observation des profils d'expression protéique confirme l'absence de LARP6b dans le pollen et par suite confirme que les protéines LARP6b et LARP6c ne s'expriment pas dans



**Figure 45: Structure des protéines LARP6 chez *Arabidopsis thaliana***

Schéma de l'organisation des protéines LARP6a, LARP6b et LARP6c, représentant les domaines protéiques PAM2 (vert), LA (rouge), RRM-L3 (bleu), et LSA (jaune) (de l'extrémité N-terminale vers C-terminale). La portion hachurée correspond à la position du peptide reconnu spécifiquement par les anticorps utilisés pour détecter chacune des protéines.



**Figure 46: Profil d'expression des protéines LARP6b et LARP6c chez *Arabidopsis thaliana***

Détection des protéines LARP6b (photo du haut, supérieur à 72 kDa) et LARP6c (photo du milieu, inférieur à 72 kDa) en racine, tissus aériens, feuille caulinaire, tige, fleur et pollen à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines. Un anticorps dirigé contre l'actine est utilisé comme contrôle de charge (photo du bas, environ 50 kDa). *larp6b-3* correspond à un extrait de plantule issue de la lignée mutante pour LARP6b. *larp6c-3* correspond à un extrait de pollen issu de la lignée mutante pour LARP6c.

les mêmes tissus. Ces résultats montrent que ces deux membres de la sous-famille LARP6 possèdent des profils d'expression protéiques très différents, en accord avec les profils d'accumulation des transcrits correspondants. Ces informations permettent de tester, par western blot, les lignées exprimant les constructions de *LARP6c* sous contrôle du promoteur endogène (Figure 47). Les résultats montrent la présence de la protéine étiquetée en plantule pour les lignées LARP6c-RFP et LARP6c-FLAG-HA en fond Col-0. On notera de plus la présence d'une bande correspondant à une protéine LARP6c-RFP étiquetée tronquée dans la lignée correspondante. Le signal détecté en bas de la figure correspond à un signal aspécifique. Ces données montrent que le défaut d'expression observé via le gène rapporteur GUS se retrouve aussi au niveau protéique. Ceci n'exclut, donc, pas que le profil d'expression observé provienne d'un défaut de régulation transcriptionnelle ; mais il se pourrait aussi que la construction utilisée échappe à une régulation post-transcriptionnelle. Ce type de régulation suggère une spécialisation des protéines LARP6b et LARP6c, l'une dans le sporophyte et l'autre dans le gaméophyte mâle, respectivement. Ainsi, la question d'une redondance fonctionnelle partielle entre ces protéines se pose.

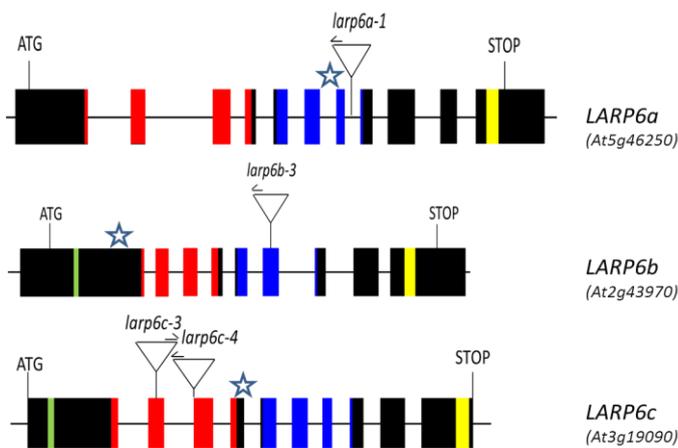
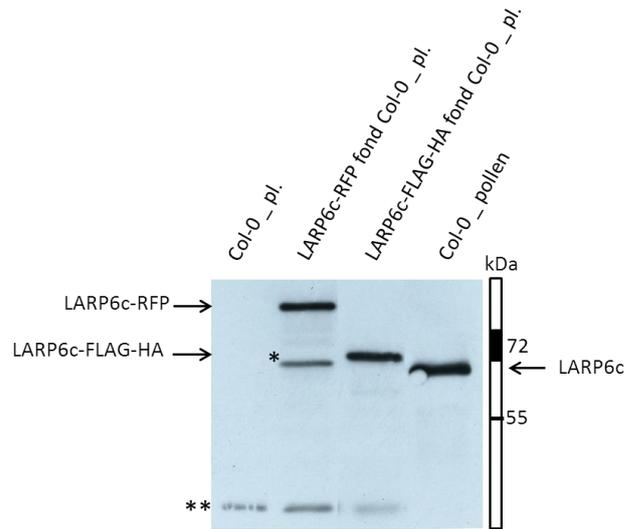
## I.2. Les protéines de la sous-famille LARP6 sont-elles redondantes ?

### I.2.1 Caractérisation des lignées d'insertion ADN-T.

L'étude des protéines LARP6 chez *Arabidopsis thaliana* a nécessité l'utilisation de lignées mutantes. Les lignées utilisées sont toutes issues d'une mutation par insertion d'ADN-T. On dispose de lignées d'insertion pour LARP6a : *larp6a-1* (SK39668), LARP6b : *larp6b-3* (Gabi282\_D09) et LARP6c : *larp6c-3* et *larp6c-4* (SAIL\_268E02 et *WiscDsLox 293 296*, respectivement). Des séquençages ont permis d'identifier le site exact d'insertion (Figure 48) et des génotypages par PCR ont permis la recherche de plantes homozygotes pour l'insertion. Pour chacune des lignées mutantes, l'absence de protéine correspondant au gène muté a été vérifiée par western blot (Figure 49). Pour les protéines LARP6a et LARP6b, la position des peptides antigènes, en amont du site d'insertion de l'ADN-T, permet de vérifier l'absence de forme tronquée, et par conséquent que les lignées mutantes sont KO (**K**nock **O**ut). Quant à LARP6c, la présence d'une forme tronquée fonctionnelle est peu probable, étant donnée l'insertion de l'ADN-T dès le début du gène. La mise au

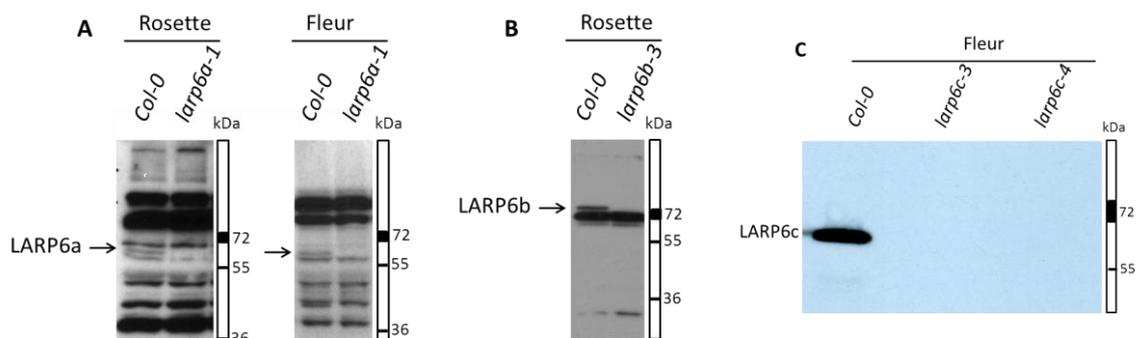
### Figure 47: Observation par western blot de la présence de protéines LARP6c étiquetées en tissus sporophytiques

L'anticorps dirigé contre LARP6c permet de détecter les protéines LARP6c étiquetées ou non. Les tissus *Col-0* (plantules et pollen) sont utilisés comme contrôle. La bande marquée d'un astérisque correspond probablement à une forme tronquée de la protéine étiquetée. Avec une taille d'environ 37 kDa, des bandes aspécifiques sont détectées en plantules. LARP6c (<72kDa, taille théorique 48,96 kDa), LARP6c-FLAG-HA (72 kDa, taille théorique : 53,76 kDa), LARP6c-RFP (95 kDa, taille théorique 76,23 kDa). \*\* bande aspécifique.



### Figure 48: Structure des gènes LARP6 chez Arabidopsis thaliana et position des insertions ADN-T

Organisation des gènes *LARP6a/b/c*, dont les tailles respectives sont 2971 pb, 2494pb et 2244pb ; les rectangles représentent les exons séparés par les introns. En couleurs sont représentées les séquences codant les différents motifs protéiques identifiés chez les LARP6 d'*A. thaliana*: PAM2 (vert), motif LA (rouge), RRM-L3 (bleu) et LSA (jaune). La position des insertions ADN-T correspondant aux différentes lignées mutantes est représentée sur les gènes, accompagnée du nom de la lignée. La flèche indique le sens de l'insertion (position de la bordure gauche indiquée par une flèche sortante). Les étoiles représentent les peptides antigènes contre lesquels sont dirigés les anticorps.



### Figure 49: Caractérisation des lignées mutantes par western blot

Les western blots ont été réalisés à l'aide des anticorps dirigés contre (A) LARP6a (65 kDa, taille théorique : 46,84 kDa), (B) LARP6b (72 kDa, taille théorique : 60,59 kDa) et (C) LARP6c (72 kDa, taille théorique : 48,96 kDa) sur des tissus issus de lignées *Col-0* et mutantes. Les tissus utilisés sont adaptés aux profils d'expression des protéines analysées : *larp6a-1* (plantule, fleur), *larp6b-3* (plantule), *larp6c-3* et *larp6c-4* (fleur).

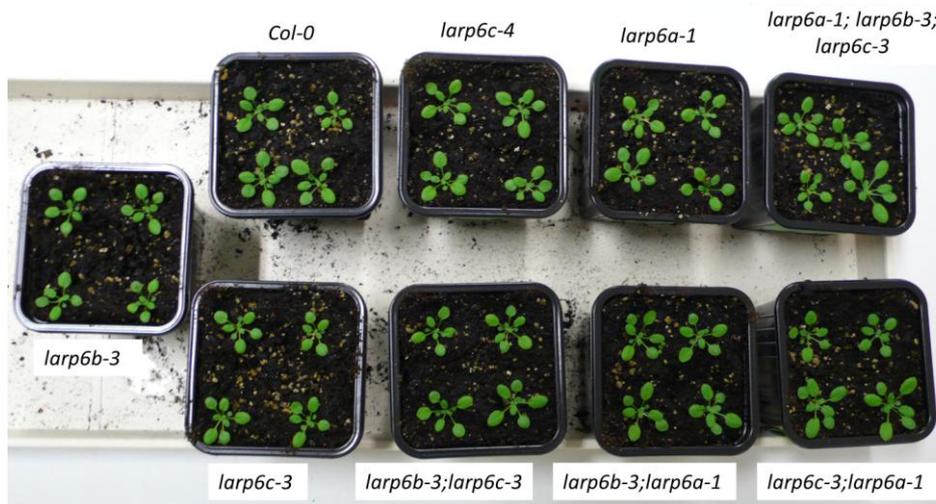
point des lignées *larp6a* et *larp6b* a été réalisée au sein de l'équipe, par Jean-Jacques Favory.

## **I.2.2 Étude de la redondance entre LARP6a et les protéines LARP6b/LARP6c**

### **I.2.2.a Étude phénotypique des plantules mutantes *larp6***

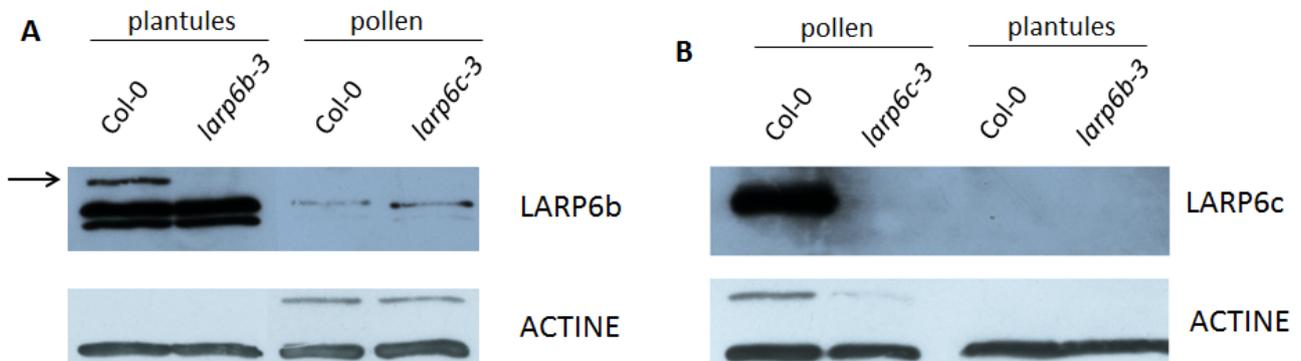
LARP6b et LARP6c possèdent des profils d'expression opposés alors que LARP6a est, quant à elle, ubiquitaire. Il existe donc, dans chaque tissu, au moins deux protéines LARP6 exprimées simultanément, ce qui amène à se questionner sur la redondance fonctionnelle entre ces protéines. Pour répondre à cette question, les lignées mutantes décrites précédemment ont été semées en terre en conditions de culture classiques. Après 20 jours, l'observation de ces lignées mutantes au stade plantules (Figure 50) n'a pas permis de mettre en évidence de phénotype visible associé à ces mutations. Ceci peut être dû soit à une absence de phénotype visible dans ces lignées ou bien à la redondance de LARP6a avec LARP6b et LARP6c.

Afin de vérifier ces hypothèses des croisements ont été réalisés entre ces lignées dans le but de générer des doubles et triple mutants. Les phénotypes des plantes obtenues sont également observés après 20 jours de culture en terre et ne montrent pas de phénotype visible (Figure 50). De plus, le suivi de ces plantes jusqu'à la récolte des graines n'a pas permis de mettre en évidence un quelconque phénotype dans les différentes étapes du développement. Ces résultats montrent tout d'abord que les protéines LARP6 ne sont pas essentielles au développement de la plantule puis de la plante, en conditions de culture classiques. De plus, le résultat obtenu dans les lignées doubles et triple mutantes indique que l'absence de phénotype dans les lignées simples, en tissus sporophytiques, n'est pas la conséquence d'une redondance des protéines LARP6. Cependant, ces résultats ne permettent pas de conclure sur une potentielle redondance entre les protéines LARP6 à ce stade de développement.



**Figure 50: Observation phénotypique des lignées mutantes *larp6***

Recherche des phénotypes des mutants *larp6* en plantules de 20 jours, semées sur terre et cultivées en conditions classiques de laboratoire.



**Figure 51: Etude de l'interdépendance de l'expression de LARP6b et LARP6c**

A : Expression de la protéine LARP6b dans la lignée mutante *larp6c-3*. La présence de LARP6b est testée en pollen issu de la lignée mutante *larp6c-3*, le pollen Col-0 ainsi que les plantules Col-0 et *larp6b-3* sont utilisées comme contrôles. L'ACTINE est utilisée comme contrôle de charge.

B : Expression de la protéine LARP6c dans la lignée mutante *larp6b-3*. La présence de LARP6c est testée en plantules issues de la lignée mutante *larp6b-3*, de plantules Col-0, ainsi que de pollen issu des lignées Col-0 et *larp6c-3* sont utilisées comme contrôles. L'ACTINE est utilisée comme contrôle de charge.

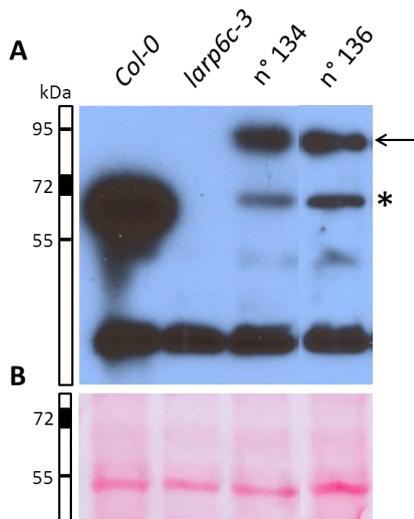
### I.2.2.b Etude de l'interdépendance des profils d'expression de LARP6b et LARP6c

Les protéines LARP6b et LARP6c étant très conservées et ayant des profils d'expression opposés, la question d'une interdépendance de ces profils d'expression se pose. L'absence de phénotype visible dans les mutants simples et doubles des protéines LARP6 ne permet pas d'apporter d'élément de réponse quant à la redondance potentielle de ces protéines. Les questions sont donc les suivantes : (i) LARP6b peut-elle, en absence de LARP6c, être exprimée dans le pollen afin d'assurer la fonction de LARP6c ? (ii) De même dans une lignée mutante pour LARP6b, LARP6c est-elle capable d'être réactivée dans les tissus sporophytiques afin d'assurer la fonction de LARP6b ? Pour répondre à ces questions, des western blots ont été réalisés sur les lignées mutantes *larp6c-3* et *larp6b-3* à l'aide des anticorps dirigés contre LARP6b et LARP6c. Les résultats (Figure 51) montrent que, en absence de LARP6b, la protéine LARP6c n'est pas exprimée en tissus sporophytiques, et par conséquent ne peut pas, « naturellement », remplacer LARP6b. De la même manière, la mutation de *LARP6c* n'affecte pas le profil d'expression de LARP6b qui reste uniquement sporophytique. Ceci suggère qu'aucune des deux protéines n'est capable « naturellement » d'assurer ne serait-ce que partiellement la fonction de l'autre protéine suite à l'absence de celle-ci. Ainsi ceci confirme que les lignées mutantes ne sont pas complémentées par la présence d'une protéine de la même sous-famille, que ce soit dans le sporophyte (ce qui avait déjà été montré par l'observation de la lignée triple mutante) ou dans le pollen. D'autre part, ces résultats suggèrent la spécialisation de ces protéines dans différents tissus. La protéine LARP6c aurait donc une expression restreinte au grain de pollen qui constitue un acteur clé de la fécondation. L'intérêt s'est donc tout d'abord axé sur la protéine LARP6c.

#### **Conclusions :**

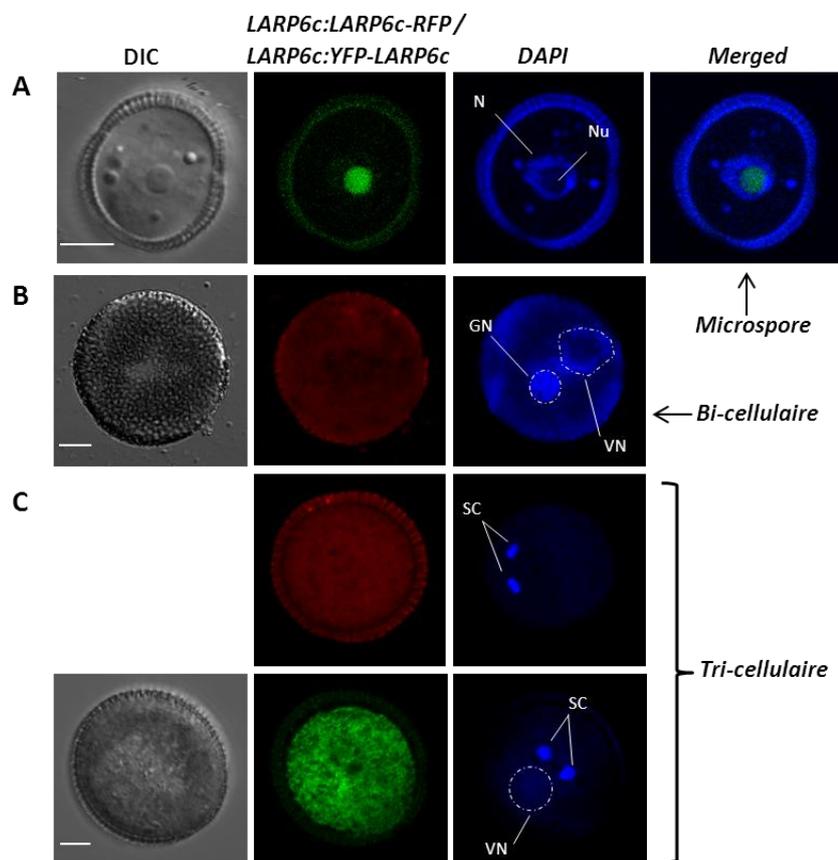
Les gènes *LARP6a*, *LARP6b* et *LARP6c* possèdent des profils d'expression spécifiques où *LARP6a* s'exprime dans toute la plante, alors que *LARP6b* ne s'exprime pas dans le pollen et *LARP6c* uniquement dans le pollen. Pour *LARP6b* et *LARP6c*, les profils d'expression géniques et protéiques sont similaires. Ces profils semblent être mis en place au niveau transcriptionnel, étant donné que l'analyse des régions promotrices présentes en amont de ces gènes permet d'établir la même spécificité d'expression d'un gène rapporteur.

Ces données semblent indiquer qu'il existe une régulation négative du gène *LARP6c* dans tous les tissus mis à part le pollen, potentiellement via un mécanisme génétique et/ou épigénétique, ou encore une régulation au niveau de l'ARNm. La caractérisation de lignées mutantes simples, doubles et triple a permis de mettre en évidence l'absence de phénotype visible en plantules ainsi que l'absence d'interdépendance des profils d'expression des protéines LARP6b et LARP6c. Fort de ces connaissances, l'étude des protéines LARP6b et LARP6c a été poursuivie. Cependant, rapidement l'intérêt s'est axé principalement sur la protéine LARP6c aux vues de son expression spécifique dans le pollen, et donc son rôle potentiel dans la fécondation.



**Figure 52: Analyse du niveau d'expression des protéines LARP6c-RFP**

A: Niveau d'expression des protéines LARP6c-RFP (désignées par une flèche) dans deux lignées indépendantes mutantes *larp6c-3* exprimant les constructions LARP6c:LARP6c-RFP (hétérozygote) par rapport à l'expression de la protéine LARP6c endogène (*Col-0*). La détection est réalisée avec un anticorps dirigé contre LARP6c. La lignée *larp6c-3* est utilisée comme contrôle de l'absence de LARP6c endogène dans les lignées transformées. L'astérisque désigne une forme tronquée de la protéine LARP6c-RFP. B: Contrôle de charge des échantillons (coloration au rouge ponceau).



**Figure 53: Localisation subcellulaire de LARP6c à différents stades de maturation du pollen**

A : localisation subcellulaire de la protéine YFP-LARP6c dans un grain de pollen unicellulaire ou microspore. B : localisation subcellulaire de la protéine LARP6c-RFP dans du pollen au stade bicellulaire. C : localisation subcellulaire des protéines LARP6c-RFP et YFP-LARP6c dans du pollen au stade tri-cellulaire. N: noyau, Nu: nucléole, GN : noyau génératif, VN : noyau végétatif, SC: cellule spermatique. Barre d'échelle 5  $\mu$ m.

## II. Etude de la protéine LARP6c

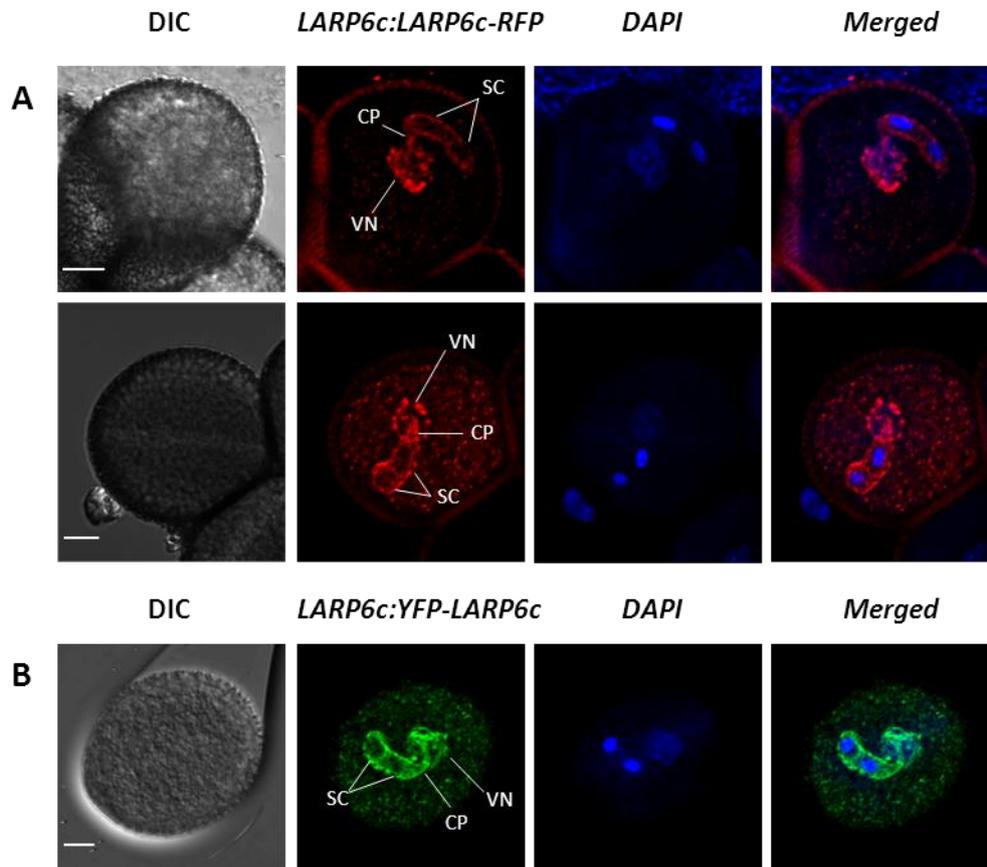
### II.1. Localisation subcellulaire dans le pollen

#### II.1.1 Obtention des outils

L'étude détaillée de la protéine LARP6c a nécessité la construction de lignées exprimant des versions étiquetées de la protéine. Quelle que soit l'étiquette ajoutée, les constructions présentent la séquence d'ADN génomique (introns + exons) codant la protéine, associée à une étiquette, fluorescente ou non, en position N-terminale ou bien C-terminale, le tout sous contrôle des séquences génomiques amont préalablement présentées. Le niveau d'expression des transgènes a été analysé par western blot afin de ne garder que les lignées ayant le niveau d'expression le plus proche possible de la protéine endogène. La figure 52 présente un exemple d'expression des protéines transgéniques, dans deux lignées exprimant la construction *LARP6c:LARP6c-RFP* à l'état hétérozygote (n°134 et 136) et utilisées lors des analyses suivantes. On constate que le niveau d'expression dans ces lignées n'atteint pas le niveau d'expression de la protéine endogène ; de plus ces lignées expriment, en plus de la version complète, une forme tronquée de la protéine étiquetée.

#### II.1.2 Localisation subcellulaire de LARP6c au cours des stades précoces de développement du pollen.

Les bouquets floraux sont constitués de bourgeons floraux et fleurs de maturités différentes au sein desquels le pollen subit les différentes étapes de maturation. Ainsi, le bouquet floral comprend les bourgeons contenant les microspores qui formeront le pollen (au centre), les fleurs ouvertes portant le pollen mature (le plus à l'extérieur), ainsi que tous les stades intermédiaires (cf. IV.1. Développement du pollen). L'utilisation d'une lignée exprimant la construction *LARP6c:YFP-LARP6c* a permis de déterminer que la protéine YFP-LARP6c est présente au sein du nucléole de l'unique noyau de la microspore (Figure 53A). Lors du processus de maturation, le noyau se divise par mitose, formant le stade bicellulaire du pollen. Pour la suite de ces analyses, deux types de constructions ont été utilisées : *LARP6c:YFP-LARP6c* et *LARP6c:LARP6c-RFP*. Ceci permet de s'assurer que les résultats obtenus sont représentatifs de la localisation subcellulaire de la protéine LARP6c



**Figure 54: Localisation subcellulaire de LARP6c dans le pollen mature**

Localisation subcellulaire en pollen mature des protéines LARP6c-RFP (A) et YFP-LARP6c (B). SC: cellule spermatique, VN : noyau végétatif, CP : projection cytoplasmique. Barre d'échelle 5  $\mu$ m.

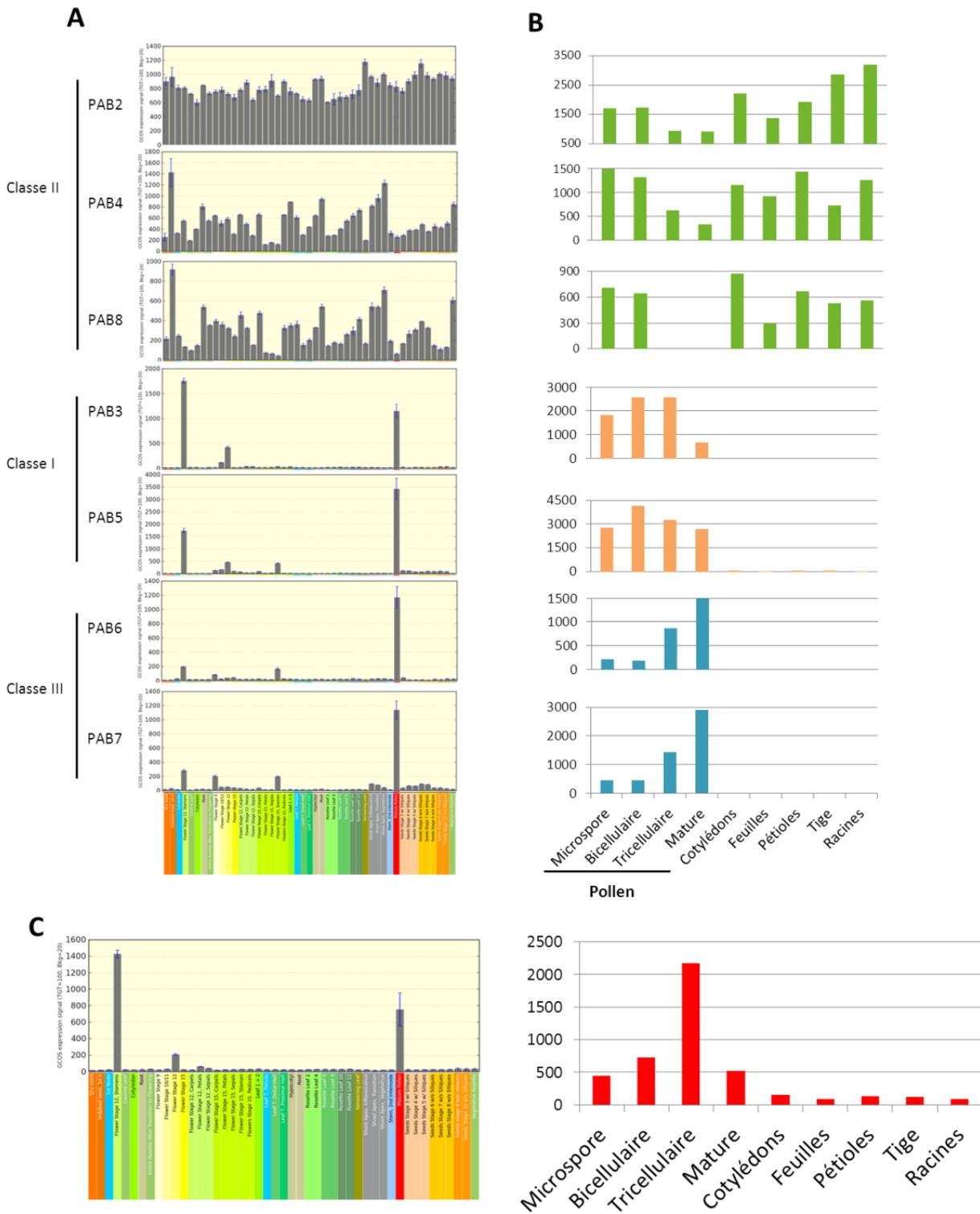
endogène, et ne sont pas liés à la forme tronquée de la protéine LARP6c-RFP ou encore à la position de l'étiquette sur la protéine (Figure 52). Dès le stade bicellulaire, la localisation de la version étiquetée de LARP6c est très différente, la protéine est alors présente de manière homogène dans le cytoplasme de la cellule végétative (Figure 53B). Cette localisation va perdurer jusqu'au stade tricellulaire du pollen, c'est-à-dire après la mitose du noyau génératif du pollen bicellulaire (Figure 53C). Ces résultats montrent que la localisation de la protéine évolue en fonction du stade de maturation du pollen.

### **II.1.3 Localisation de LARP6c dans le pollen mature**

La dernière étape de la maturation du pollen permet le passage du stade tricellulaire au stade pollen mature. Cette étape le prépare à la formation du tube pollinique et entraîne de nombreux réarrangements au sein du grain de pollen, dont la relocalisation de la protéine LARP6c étiquetée. Nous constatons dans un premier temps que les deux versions étiquetées de la protéine donnent les mêmes résultats, suggérant que la localisation observée correspond à celle de la protéine endogène. Tout comme au stade tricellulaire, LARP6c est présente dans le cytoplasme de la cellule végétative. Cependant, sa répartition n'est plus homogène mais se concentre au sein d'agrégats cytoplasmiques (Figure 54A, B). Parmi les changements observés, on peut voir que la protéine LARP6c s'accumule désormais autour du noyau végétatif mais aussi au niveau des deux cellules spermatiques. Ces cellules sont issues de la division du noyau génératif et restent associées l'une à l'autre à la suite de cette division (cf. IV.1.3 Le pollen tricellulaire et mature). LARP6c marque la membrane entourant les deux cellules spermatiques. Une localisation très intéressante de LARP6c apparaît aussi dans le pollen au niveau de la projection cytoplasmique qui relie le noyau végétatif aux cellules spermatiques, et plus particulièrement à la cellule spermatique I (SC I) (cf. IV.1.3 Le pollen tricellulaire et mature). Ces résultats montrent une grande réorganisation de la localisation de la protéine LARP6c dans le pollen mature autour de l'unité de germination mâle (MGU).

#### **Conclusion :**

L'ensemble des observations de la protéine LARP6c étiquetée (deux constructions différentes) montrent une localisation subcellulaire très dynamique au fil de la maturation du pollen, passant du nucléole du noyau de la microspore au cytoplasme des stades pollen



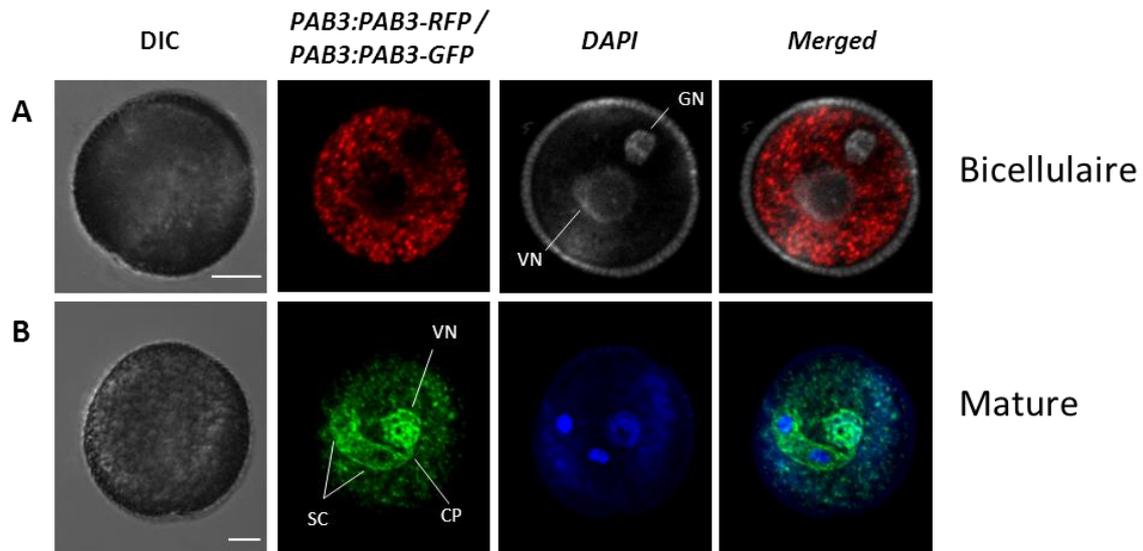
**Figure 55: Expression des gènes de classe I, II et III de la famille des *PAB* par rapport au profil d'expression de *LARP6c***

Profil d'expression génique dans différents tissus des classes I, II et III de *PAB*. Les profils d'expression proviennent : (A) d'une base de données disponible en ligne (Winter et al., 2007) et (B) d'une analyse par puce publiée par D. Honys et D. Twell (2004). Selon les mêmes sources, rappel du profil d'expression de *LARP6c* (C).

bi et tricellulaire pour finalement marquer de manière très claire l'unité de germination mâle (MGU) dans le pollen mature. Il est très intéressant de constater la présence de cette protéine au niveau de la projection cytoplasmique reliant le noyau végétatif aux cellules spermatiques. LARP6c présente une localisation subcellulaire très particulière dans le pollen mature, il serait intéressant de trouver des protéines capables de co-localiser avec LARP6c et qui serait, donc, des interactants potentiels. LARP6c possédant un motif de liaison aux PAB, nos expériences se sont axées sur ces protéines.

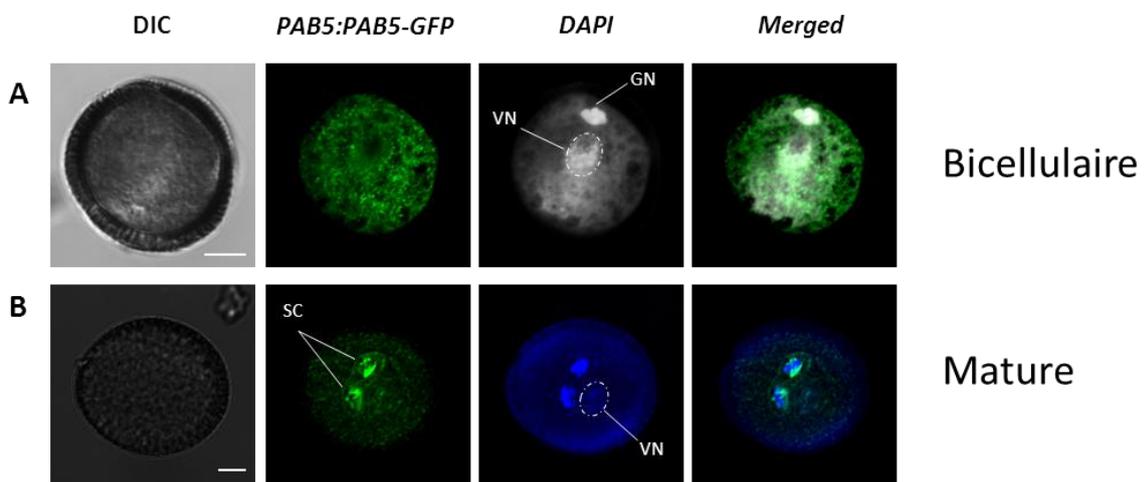
## II.2. Interactions entre LARP6c et les PAB

Nos résultats, publiés dans la revue RNA en 2013 (Merret et al., 2013b) et cités précédemment, montrent que LARP6c est capable d'interagir *in vitro* et *in vivo* en feuilles de tabac avec une protéine de la famille des PAB, PAB2. L'identification de partenaires de LARP6c chez *Arabidopsis thaliana*, nécessite de déterminer quels sont les membres de la famille PAB les plus enclins à réaliser une interaction avec notre protéine d'intérêt. Lorsque l'on s'intéresse aux profils d'expression des 8 PAB chez *A. thaliana* (Figure 55A), on constate que les gènes *PAB3*, *PAB5*, *PAB6* et *PAB7* sont, tout comme *LARP6c*, spécifiques du pollen. L'observation plus détaillée des profils d'expression de ces gènes en pollen (Honys & Twell, 2004) indique que les gènes *PAB6* et *PAB7* ont un profil plus proche de celui de *LARP6c* que *PAB3* et *PAB5* (Figure 55B). Cependant, les gènes de classe III (*PAB6* et *PAB7*) ont été décrits comme possédant une expression faible (Bravo et al., 2005), contrairement aux PAB de classe I (*PAB3* et *PAB5*). Le gène *PAB5* possède, notamment, le niveau d'expression le plus fort dans le pollen. D'autre part, les protéines PAB3 et PAB5 d'*Arabidopsis thaliana* sont capables de compléter, au moins partiellement, l'activité de PAB1 en levure (Belostotsky & Meagher, 1996 ; Chekanova et al., 2001; Chekanova & Belostotsky, 2003). Ceci suggère que ces deux protéines sont fonctionnelles, alors qu'aucune information de ce type n'est disponible pour les protéines PAB6 et PAB7. Ainsi nous avons entrepris d'étudier : (i) les localisations subcellulaires de PAB3 et PAB5, (ii) la capacité d'interaction de LARP6c avec ces protéines, et (iii) la présence de LARP6c au niveau des mRNP lors de la traduction.



**Figure 56: Localisation subcellulaire de *PAB3* dans le pollen bicellulaire et mature**

A : localisation subcellulaire de la protéine PAB3-RFP en pollen bicellulaire. B : localisation subcellulaire de la protéine PAB3-GFP en pollen mature. SC: cellule spermatique, VN : noyau végétatif, GN : noyau génératif, CP : projection cytoplasmique N: noyau Nu: nucléole. La barre d'échelle : 5  $\mu$ m. Deux types de constructions sont analysées dans chaque cas, les images présentées correspondant aux meilleures images en termes de représentativité et de qualité.



**Figure 57: Localisation subcellulaire de *PAB5* dans le pollen bicellulaire et mature**

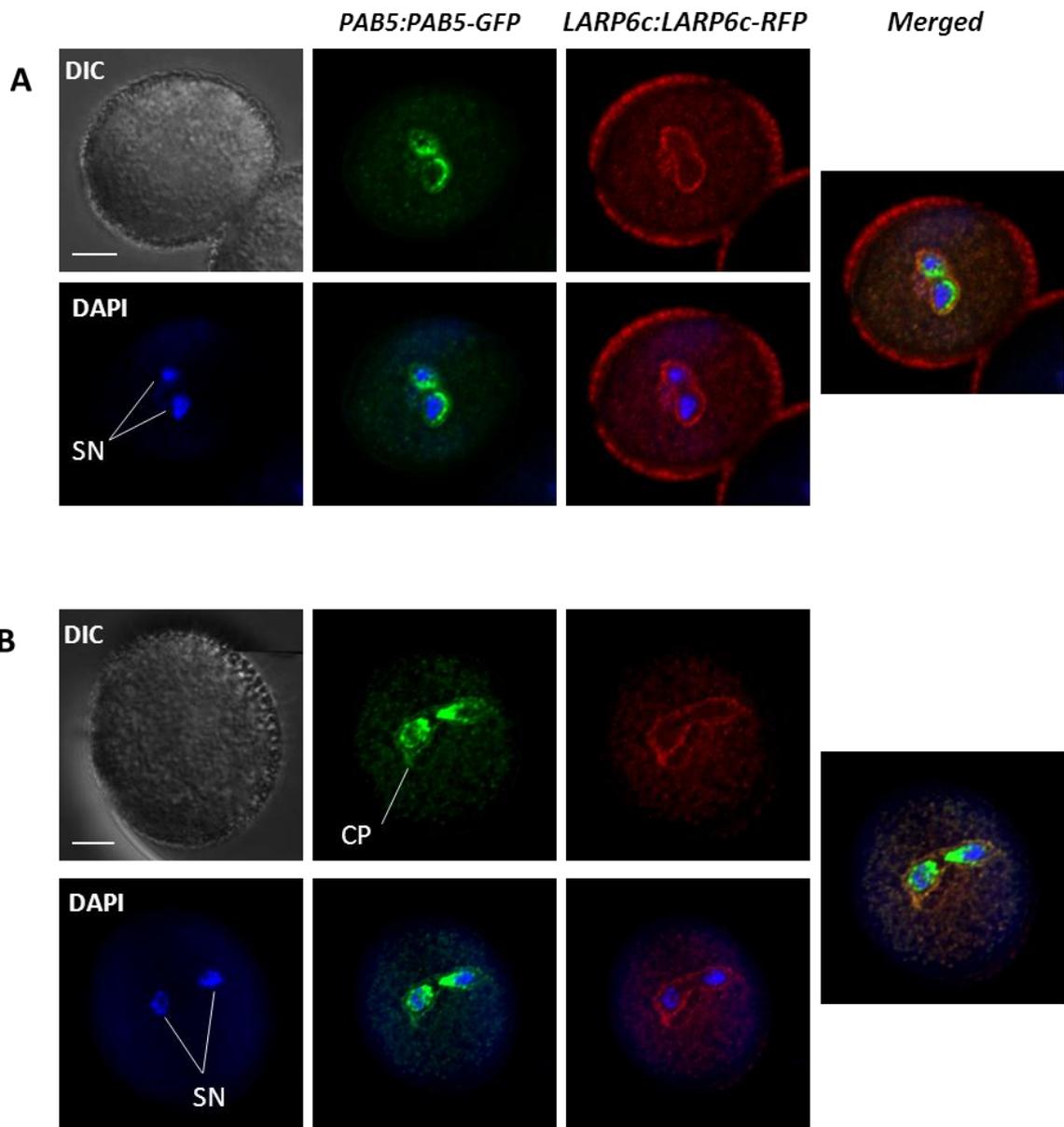
A : localisation subcellulaire de la protéine PAB5-GFP en pollen bicellulaire. B : localisation subcellulaire de la protéine PAB5-GFP en pollen mature. SC: cellule spermatique, VN : noyau végétatif, GN : noyau génératif, CP : projection cytoplasmique N: noyau Nu: nucléole. La barre d'échelle : 5  $\mu$ m.

### II.2.1 Localisation de PAB3 et PAB5 dans le pollen

La localisation subcellulaire de la protéine PAB3, associée à une étiquette RFP ou GFP, a été observée en pollens bicellulaire et mature. Les résultats présentés dans la figure 56A montrent que PAB3-RFP est présente dans le pollen bicellulaire au niveau du cytoplasme de la cellule végétative et est exclue des noyaux (noyaux génératif et végétatif). Au sein du cytoplasme, la protéine s'accumule sous forme d'agrégats. Cette localisation de la protéine est conservée au stade mature où l'on retrouve des agrégats de PAB3-GFP dans le cytoplasme de la cellule végétative (Figure 56B). Cependant, au stade pollen mature on peut voir une évolution de la localisation de PAB3-GFP qui est présente autour du noyau végétatif ainsi qu'autour des cellules spermatiques. Au niveau de ces cellules, la protéine est présente au niveau de la membrane ainsi que dans le cytoplasme alors qu'elle est exclue des noyaux spermatiques. De plus, on remarque la présence de PAB3-GFP dans la projection cytoplasmique reliant le noyau végétatif aux cellules spermatiques.

La localisation subcellulaire de PAB5-GFP dans le pollen bicellulaire est similaire à celle observée pour PAB3-RFP avec la présence de fluorescence au niveau d'agrégats dans le cytoplasme de la cellule végétative et une exclusion des noyaux (Figure 57A). Au stade mature, tout comme pour PAB3-GFP, la protéine est toujours présente dans le cytoplasme de la cellule végétative sous forme d'agrégats et au niveau de la membrane des cellules spermatiques (Figure 57B). Cependant la localisation au sein des cellules spermatiques diffère : alors que PAB3-GFP était localisée dans le cytoplasme, il semblerait qu'il n'y ait que très peu, ou pas, de protéines PAB5-GFP présentes dans le cytoplasme de ces cellules. La localisation de PAB5-GFP montre une forte accumulation en périphérie du noyau des cellules spermatiques.

Ces résultats montrent que les protéines PAB3 et PAB5 étiquetées possèdent des localisations globalement similaires dans le pollen bicellulaire ainsi que dans le pollen mature. Il existe cependant une différence de localisation au niveau des cellules spermatiques du pollen mature où PAB3-GFP est présente dans le cytoplasme alors que PAB5-GFP montre une forte accumulation de la protéine en périphérie du noyau.



**Figure 58: Co-localisation des protéines LARP6c et PAB5 au niveau des cellules spermatiques**

A : localisation subcellulaire de la protéine PAB5-GFP et LARP6c-RFP en pollen mature. B : localisation subcellulaire de la protéine PAB5-GFP et LARP6c-RFP en pollen mature, marquage partiel de la projection cytoplasmique. SN: noyau de cellule spermatique, CP : projection cytoplasmique. La barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$ .

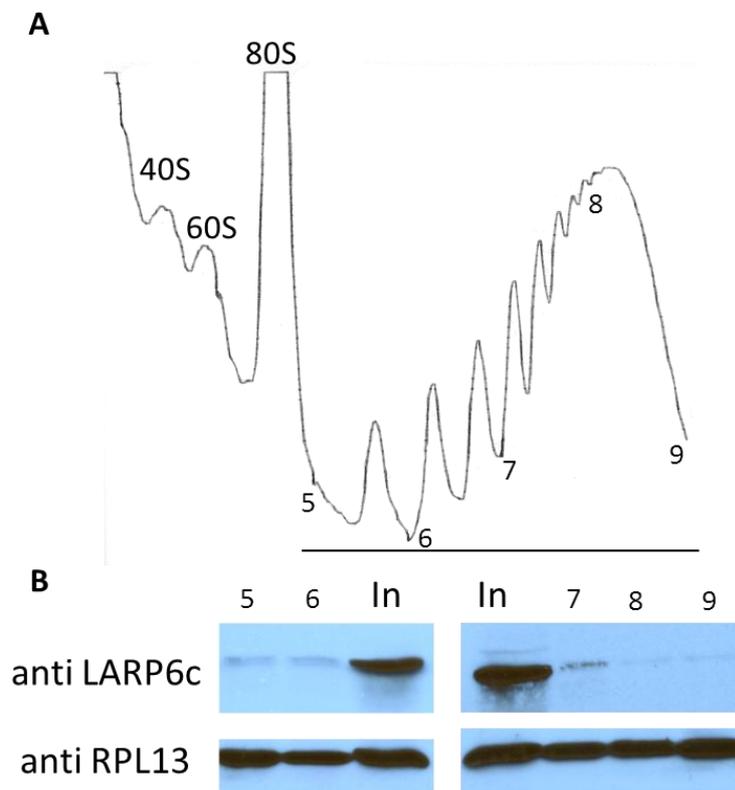
## **II.2.2 Analyse comparative des localisations de LARP6c avec PAB3 et PAB5**

L'intérêt d'étudier la localisation subcellulaire des protéines PAB réside dans la recherche de protéines PAB capables d'interagir avec LARP6c, impliquant leur co-localisation au moins partielle. L'observation précédente des localisations subcellulaires des protéines PAB3, PAB5 et LARP6c étiquetées nous a permis d'identifier les compartiments dans lesquels elles pourraient interagir. D'après les résultats obtenus, LARP6c pourrait co-localiser au stade pollen bicellulaire avec PAB3 ainsi que PAB5 dans le cytoplasme de la cellule végétative. Durant le stade pollen mature, les trois protéines sont présentes dans des agrégats cytoplasmiques mais aussi autour du noyau végétatif. On les retrouve aussi en périphérie des cellules spermatiques, potentiellement au niveau de la membrane (Figures précédentes PAB3, PAB5, 6c). Pour des raisons techniques, les co-localisations entre PAB3-GFP et LARP6c-RFP n'ont pas pu être réalisées à l'heure actuelle. Cependant, LARP6c ne semble pas être présente à l'intérieur des cellules spermatiques, ce qui se rapproche de la localisation observée pour PAB3 qui ne présente qu'un léger marquage cytoplasmique. De plus, LARP6c et PAB3 sont présentes au niveau de la projection cytoplasmique. Les études de co-localisation réalisées entre LARP6c-RFP et PAB5-GFP confirment que LARP6c-RFP n'est pas accumulée dans le cytoplasme des cellules spermatiques, contrairement à PAB5-GFP (Figure 58). Mais surtout, ces analyses montrent que LARP6c-RFP et PAB5-GFP co-localisent en périphérie des cellules spermatiques (probablement au niveau de la membrane), au niveau de la connexion cytoplasmique et dans le cytoplasme de la cellule végétative au niveau des granules (Figure 58).

Ces résultats montrent que LARP6c pourrait potentiellement interagir avec PAB3 et/ou PAB5 au stade pollen bicellulaire (dans le cytoplasme de la cellule végétative) ainsi que dans le pollen mature au niveau du cytoplasme de la cellule végétative, à la membrane des noyaux végétatif et spermatique ou encore au niveau de la projection cytoplasmique.

## **II.2.3 LARP6c est présente au niveau des polysomes**

Les protéines PAB étant impliquées, entre autres, dans la régulation de la traduction, une interaction de LARP6c avec une protéine de la famille des PAB suggérerait un lien entre LARP6c et la traduction. On sait, de plus, que LARP6c est une protéine capable de fixer l'ARN via son module LA (Merret et al., 2013b). Afin de savoir si la protéine LARP6c est



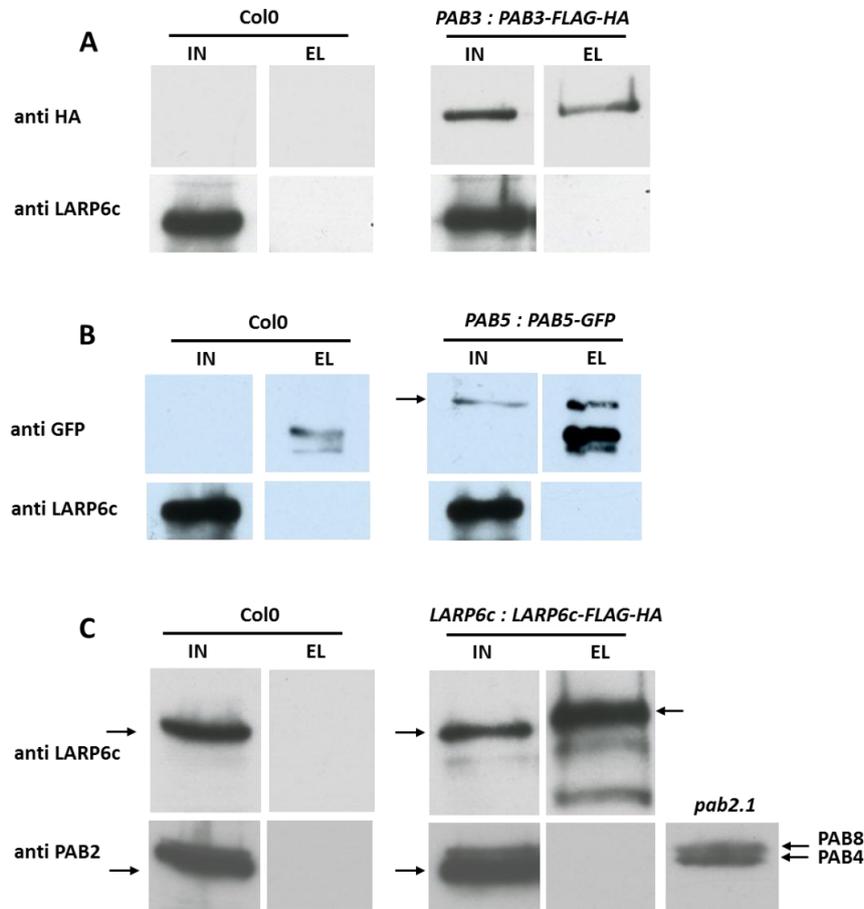
**Figure 59: Investigation de la présence de LARP6c dans les polysomes**

A : Profils polysomes en fleur issues de plantes Col-0 à 22°C, les complexes sont séparés en fonction de leur poids (axe des abscisses), la proportion relative de chacun de ces complexes est représentée sur l'axe des ordonnées. B : La présence de LARP6c dans les fractions polysomales (soulignées par un trait noir) à 22°C est testée par western blot. La détection de la protéine ribosomale RPL13 sert de contrôle positif. In = Input.

associée à des ARNm en cours de traduction, des purifications de polysomes en gradient de sucrose ont été réalisées sur des fleurs. Ainsi, les différents complexes séparés en fonction de leur poids moléculaire dans le gradient sont répartis en différentes fractions. La présence de la protéine LARP6c a ensuite été testée dans les fractions protéiques correspondantes aux fractions polysomales. Les résultats sont présentés dans la Figure 59 et montrent le profil de monosomes et polysomes obtenu (Figure 59A), ainsi que la détection de LARP6c à l'aide de l'anticorps dirigé contre cette protéine (Figure 59B). La détection de la protéine ribosomale, RPL13 (**R**ibosomal **P**rotein **L13**) aussi appelée BBC1 (Breast basic conserved 1) chez l'Homme, de la sous-unité 40S du ribosome est utilisée comme contrôle positif (Sáez-Vásquez et al., 2000). Ces résultats montrent que la protéine LARP6c est détectée au sein de fractions correspondantes aux polysomes, bien que de manière relativement faible. Ainsi, LARP6c serait une protéine présente au niveau des polysomes, et donc potentiellement associée avec des ARNm en cours de traduction et/ou avec la protéine PAB. Ces résultats, bien que préliminaires, vont dans le sens de l'hypothèse d'un rôle de LARP6c dans la régulation de la traduction, potentiellement via une interaction avec une PAB.

### II.2.4 Analyse de l'interaction entre LARP6c et PAB

Toutes les données recueillies vont dans le sens d'une interaction entre LARP6c et les protéines PAB3 et/ou PAB5. Pour tester cette hypothèse, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées en fleur. L'interaction entre LARP6c et la protéine PAB3 a été testée à l'aide d'une lignée exprimant la construction *PAB3:PAB3-FLAG-HA* et par le biais d'une immuno-précipitation dirigée contre l'étiquette FLAG. Les résultats présentés dans la figure 60A ne permettent pas de vérifier, dans les conditions de l'expérience, l'interaction entre ces protéines étant donnée l'absence de détection de LARP6c dans l'éluat. Un extrait issu de la lignée *PAB5:PAB5-GFP* a été utilisé en présence de billes anti-GFP afin de tester, là aussi, l'interaction avec la protéine LARP6c. Tout comme pour l'expérience avec PAB3, l'absence de LARP6c dans l'éluat ne permet pas de montrer une interaction entre ces protéines (Figure 60B). Etant donné les résultats négatifs obtenus, l'interaction de LARP6c a été testée avec PAB2. En effet, cette protéine de la famille des PAB possède la capacité d'interagir avec LARP6c *in vivo* en système hétérologue. De plus, le profil d'expression du gène codant PAB2 (Figure 55) indique que



**Figure 60: Test d'interaction PAB / LARP6c par co-immunoprécipitation (IP)**

A : Test d'interaction entre PAB3 (transgénique) et LARP6c (endogène), dans une lignée exprimant une construction *PAB3-FLAG-HA* (env. 80 kDa) par immunoprécipitation dirigée contre l'étiquette FLAG de PAB3. B : Test d'interaction entre PAB5 (transgénique) et LARP6c (endogène), dans une lignée exprimant une construction *PAB5:PAB5-GFP* (env. 120 kDa), par immunoprécipitation dirigée contre l'étiquette GFP de PAB5. C : Test d'interaction entre PAB2 (endogène) et LARP6c (transgénique), dans une lignée exprimant une construction *LARP6c:LARP6c-FLAG-HA* (72 kDa), par immunoprécipitation dirigée contre l'étiquette FLAG de LARP6c. *pab2.1* (lignée dépourvue de PAB2) est un contrôle négatif pour la révélation de PAB2 par western blot. Les différentes protéines (transgéniques et endogènes), sont révélées par western blot à l'aide de leurs anticorps respectifs (pour LARP6c et PAB2), ou des anticorps ciblés contre leurs étiquettes (pour PAB3 et PAB5). IN : Input, EL : Eluat.

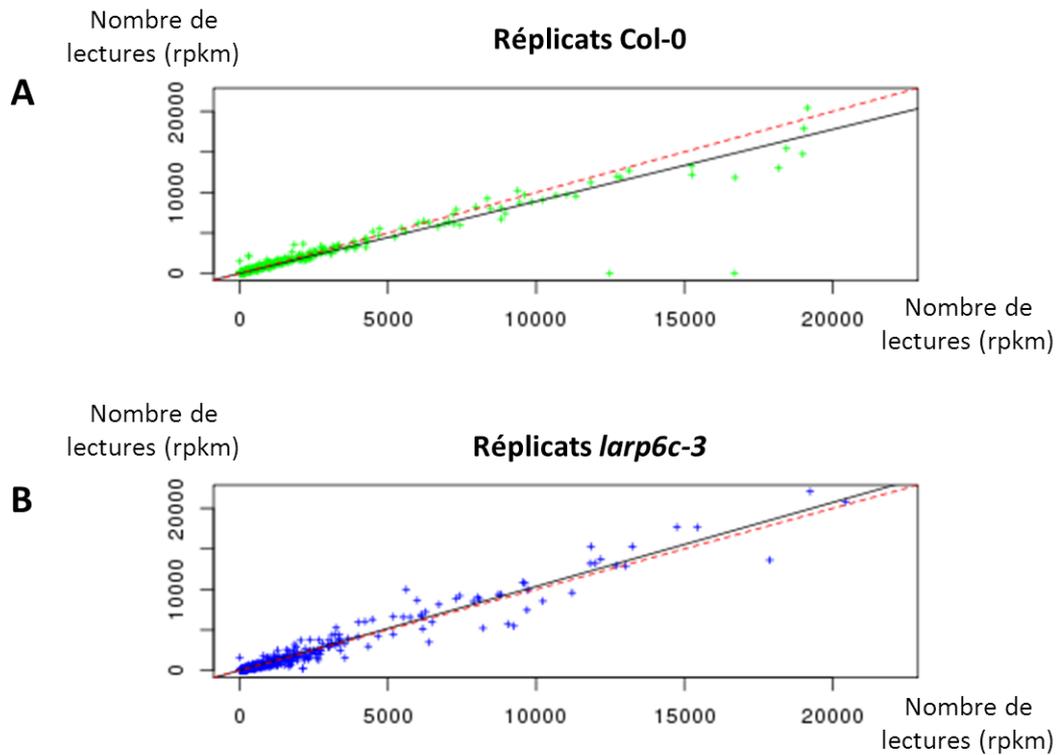
l'ARNm serait présent dans le pollen. Ainsi, un test d'interaction a été réalisé par immunoprécipitation à l'aide d'une lignée LARP6c:LARP6c-FLAG-HA. Là encore, aucun signal n'est détecté dans l'éluat, ce qui ne permet pas de valider d'interaction entre LARP6c et PAB2 *in vivo* en fleur (Figure 60C). Ce résultat est aussi valable pour les protéines PAB4 et PAB8 étant donné que l'anticorps dirigé contre PAB2 détecte aussi les protéines PAB4 et PAB8. Ces résultats ne permettent pas de montrer d'interaction *in planta* (en conditions normales) entre les protéines PAB et LARP6c.

## Conclusions

Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* en système hétérologue, publiés en 2013 (Merret et al., 2013b), ont montré que LARP6c est capable d'interagir avec une protéine PAB. Cette interaction fait intervenir au moins le motif PAM2 de la protéine LARP6c. Les analyses réalisées dans le but de vérifier cette/ces interaction(s) *in planta* ont permis d'accumuler un faisceau d'indices allant dans le sens d'une interaction entre ces protéines : co-localisation subcellulaire partielle et présence de LARP6c dans les fractions polysomales. Cependant, les tentatives de validation par co-immunoprécipitation sont restées infructueuses et ne valident pas la réalité de cette interaction *in planta*. Ceci peut être la conséquence d'un problème technique ne permettant pas de visualiser l'interaction dans les conditions de l'expérience mais peut aussi venir de fait que toutes les protéines n'ont pas été testées, y compris certaines spécifiques du pollen telles que PAB6 et PAB7.

### II.3. Analyse transcriptomique du mutant *larp6c*

Les informations disponibles sur LARP6c semblent indiquer que cette protéine puisse être partenaire d'une ou de plusieurs protéines PAB malgré les difficultés rencontrées à valider cette/ces interactions *in planta*. Ceci suggère la présence de LARP6c dans les mRNP. De plus, les protéines à motif LA sont des protéines capables de fixer l'ARN. Ainsi, dans ce contexte, il est essentiel de s'intéresser aux cibles ARNm de LARP6c. C'est dans ce cadre qu'une analyse de transcriptomique globale des variations de quantités d'ARNm à l'équilibre a été réalisée sur des extraits issus de plantes sauvages et de plantes délétées pour la protéine LARP6c.



**Figure 61: Réplicabilité des données de transcriptomique**

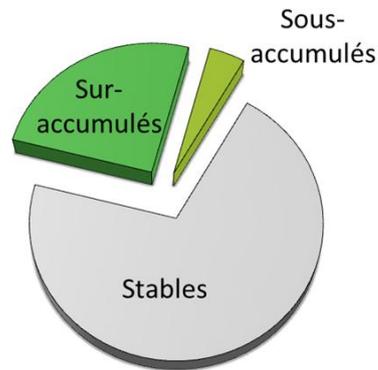
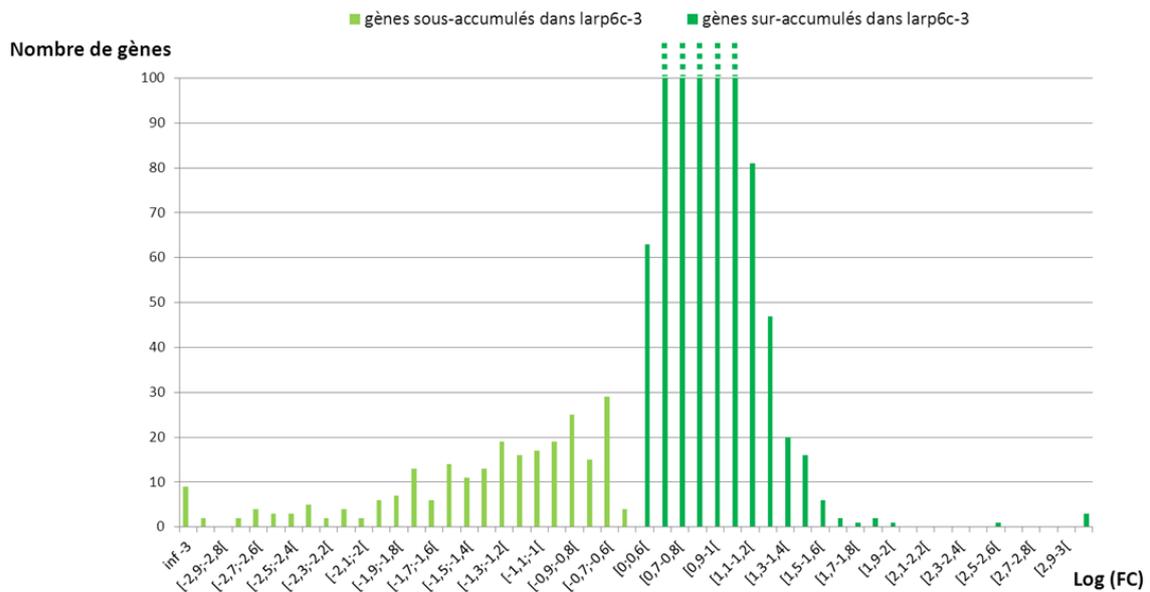
Illustration de la répliquabilité des données par représentation des corrélations entre réplicats pour les génotypes Col-0 (A) et *larp6c-3* (B). Ordonnée : nombre de lectures du réplicat II, Abscisse : nombre de lectures du réplicat I. La droite de régression est représentée en noir (trait continu). Les coefficients de régression ( $R^2$ ) de chacune des droites indiquent la représentativité de la droite vis-à-vis du jeu de données.  $R^2_{\text{Col-0}} = 0,94$ ,  $R^2_{\text{larp6c-3}} = 0,92$ .

### II.3.1 Analyses préliminaires de l'expérience de transcriptomique

L'analyse de transcriptomique a été réalisée à partir de pollen mature issu de plantes Col-0 et *larp6c-3* semées en serre. Cette expérience comprend, pour chaque génotype, deux réplicats constitués par deux lots de plantes semés en même temps à différentes positions dans la serre. La récolte de pollen, ainsi que les extractions d'ARN, ont été réalisées séparément sur chacun des réplicats. Les ARN extraits du pollen mature ont ensuite subi une purification polyA+ dans le but de ne séquencer que les ARN messagers. Le nombre de lectures (exprimés en rpkm, **read per kilobase per million**) obtenu par réplicat varie de 31 à 60 millions selon les banques. Afin de s'assurer de la solidité des données obtenues, plusieurs vérifications ont été réalisées. Tout d'abord, la réplicabilité de l'expérience a été testée par la réalisation d'une droite de régression pour les génotypes Col-0 et *larp6c-3* (Figure 61). Les résultats montrent, que dans les deux cas, les droites obtenues sont représentatives des jeux de données avec des  $R^2$  de 0,94 et 0,92, respectivement. De plus, les droites de régression sont très proches de la droite attendue en cas de réplicabilité parfaite, ce qui signifie ici que les réplicats présentent peu de variabilité entre eux. L'analyse des données a ensuite nécessité un tri ; pour cela, un seuil de 1 rpkm (lecture par kilobase par million) a été fixé comme étant le seuil d'accumulation minimal dans Col-0 ou *larp6c-3* pour être considéré comme significativement accumulé. De même, les données correspondant à des éléments autres que des gènes ont été supprimées. On trouve ainsi 6871 gènes exprimés dans le pollen mature sauvage. Ce résultat est comparable aux résultats obtenus par puces ADN et publiés en 2004 et 2005 (Honys & Twell, 2004; Pina et al., 2005). L'ensemble de ces observations va dans le sens d'une analyse solide permettant l'utilisation des données obtenues.

### II.3.2 Accumulation des ARNm du pollen mature dans *larp6c-3*

L'analyse de transcriptomique réalisée sur du pollen mature issu d'une lignée délétée pour LARP6c (*larp6c-3*) montre que cette protéine affecte, de manière directe et/ou indirecte, la quantité d'ARN messagers à l'équilibre. L'étude des données permet de constater que, globalement, le niveau d'accumulation des transcrits est légèrement plus élevé pour ceux issus de la lignée *larp6c-3* que pour ceux issus de la lignée Col-0. De ce fait, on trouve aussi plus de transcrits exprimés dans *larp6c-3* (7144) que dans Col-0 (6871).

**A****B**

### Figure 62: Représentation globale des gènes différentiellement accumulés

A : Représentation des proportions des transcrits différentiellement accumulés dans *larp6c-3* par rapport à *Col-0*. Stables : 70,63%, Sur-accumulés : 25,24%, Sous-accumulés : 4,13%. B : Histogramme représentant la répartition des transcrits DE en fonction du Log(FC). Log(FC) =  $\log_2(larp6c-3/Col-0)$ .

D'autre part, lorsque l'on s'attarde sur les niveaux d'expression observés dans les échantillons *Col0* ou *larp6c-3* on voit qu'environ 90% des gènes possèdent une expression inférieure ou égale à 100 rpkm, ce qui ne représente que 9% des lectures totales. Ceci signifie que quelques gènes sont très fortement exprimés et capturent la majorité des lectures. En effet, 78% des lectures sont réparties sur 3,2 % des gènes. Parmi ces ARNm très fortement accumulés, 220 possèdent un nombre de lectures supérieur à 600 rpkm dans *Col0*, dont 98% sont aussi présents dans l'analyse transcriptomique de pollen réalisée sur puce ATH1 en 2004 (Honys & Twell, 2004). D'ailleurs, en accord avec notre étude, ils font partie des 7,7 % de gènes les plus exprimés de leur analyse. Ceci confirme que les données obtenues lors de mon analyse sont cohérentes avec les données publiées.

On constate que 7406 transcrits sont détectés (1 rpkm min) dans *Col-0* ou *larp6c-3*. Deux filtres sont ensuite réalisés sur cette liste : le premier filtre est statistique et permet de ne conserver que les transcrits différentiellement accumulés entre les deux conditions ; le deuxième consiste simplement à placer un seuil afin de ne conserver que les transcrits qui présentent une différence d'accumulation d'au moins 1,5 fois. Selon ces critères, sur les 7406 gènes accumulés, environ 29% des gènes (2175) sont différentiellement accumulés dans la lignée mutante. La grande majorité des ARNm affectés par la mutation, soit environ 86% (1869 transcrits), sont sur-accumulés dans le génotype *larp6c-3* (Figure 62A). Cependant, alors qu'il y a plus de transcrits sur-accumulés, on peut voir que ces transcrits sont globalement moins affectés que les transcrits sous-accumulés qui présentent des variations plus importantes entre les génotypes sauvage et mutant (Figure 62B).

### **II.3.3 Expression différentielle des gènes impliqués dans le transport et la modification post-traductionnelle**

Afin de comprendre l'impact de la mutation *larp6c-3*, la question de la fonction des ARNm différentiellement accumulés se pose. Pour répondre à cela, la classification des gènes dans les catégories GO (Gene Ontology) a été utilisée. Le logiciel SEA (Singular Enrichment Analysis) disponible en ligne sur le site AgriGO (Du et al., 2010) a été utilisé afin de mettre en évidence les catégories GO surreprésentées parmi les gènes différentiellement accumulés. Lors de ces analyses, les gènes ne possédant pas d'annotation ont été retirés du jeu de données qui se compose alors de 1944 ARNm différentiellement accumulés dont 1694 (soit 87%) sur-accumulés contre 250 sous-

accumulés dans *larp6c-3*. Il faut noter que le fait de retirer les gènes non annotés ne biaise pas les proportions de gènes sur-accumulés et sous-accumulés. Etant donné que l'on travaille ici en pollen, la référence utilisée afin de révéler la surreprésentation de certaines catégories GO correspond à l'ensemble des gènes exprimés à 1 rpkm dans cette analyse de transcriptomique, à l'exception des gènes non annotés.

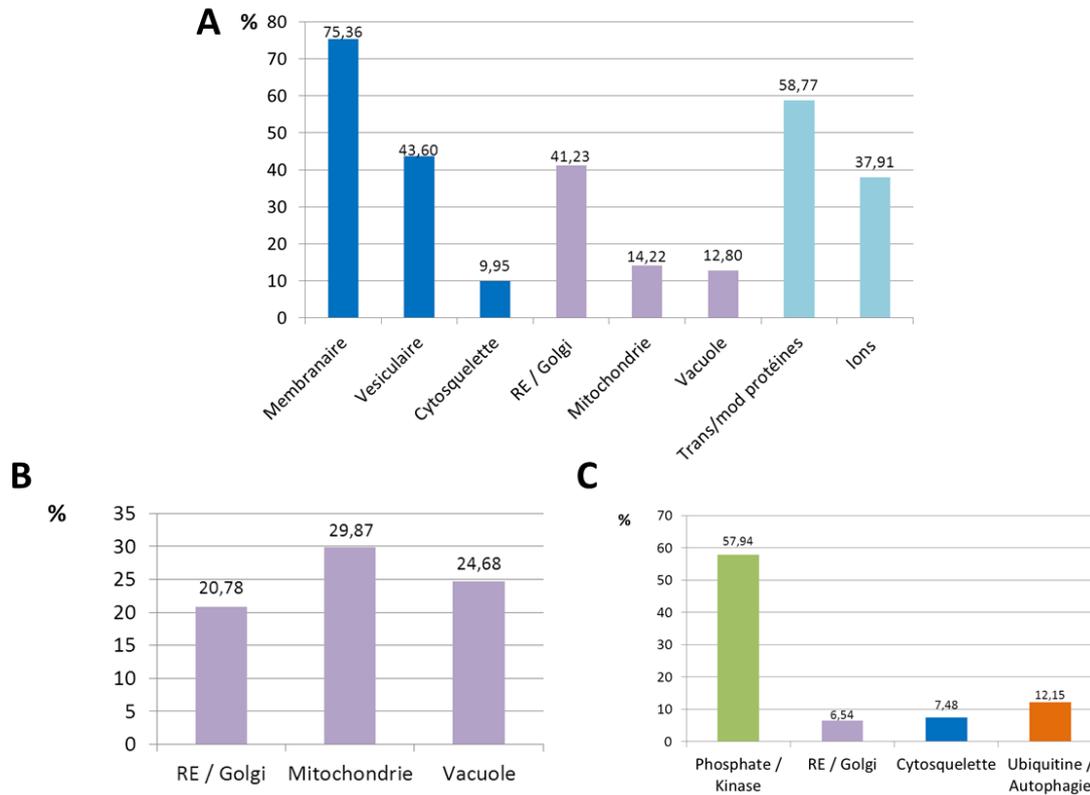
Lorsque le jeu de données comprenant tous les ARNm différentiellement accumulés est utilisé, les catégories surreprésentées correspondent aux processus biologiques impliqués dans la localisation (GO : 0051179, pvalue :  $2,35 \cdot 10^{-5}$ ), comprenant le transport (GO : 0006810, pvalue :  $3,61 \cdot 10^{-5}$ ) et la localisation des macromolécules (GO : 0033036, pvalue :  $2,86 \cdot 10^{-3}$ ), ainsi que dans la modification post-traductionnelle des protéines (GO : 0043687, pvalue :  $1,91 \cdot 10^{-3}$ ). En termes de fonctions moléculaires, on trouve, parmi les catégories GO surreprésentées, l'activité de transport transmembranaire (GO : 0022857, pvalue :  $4,4 \cdot 10^{-4}$ ) ainsi que l'activité ATPase couplée au mouvement transmembranaire de substances (GO : 0042626, pvalue :  $3,64 \cdot 10^{-4}$ ).

Lorsque l'on s'intéresse plus particulièrement aux 220 gènes très fortement accumulés (lectures supérieures à 600 rpkm), on constate que seulement 52 possèdent une expression différentielle entre l'échantillon mutant et l'échantillon sauvage d'au moins 1,5 fois. Ces ARNm affectés par la mutation *larp6c* seraient associés au système endomembranaire (GO : 0012505, pvalue :  $2,69 \cdot 10^{-5}$ ) et à l'activité des pectinesterase (GO : 0030599, pvalue :  $2,46 \cdot 10^{-6}$ ). En effet, on y retrouve de nombreux membres de la famille des pectines lyase-like et des pectines méthylesterases dont un homologue de VANGUARD I, impliqué dans la croissance du tube pollinique (Jiang et al., 2005).

Les résultats montrent que la délétion de LARP6c affecte les quantités à l'équilibre d'ARNm codant des protéines impliquées dans la localisation et le transport ainsi que dans la modification post-traductionnelle des protéines.

### **II.3.4 Les ARNm différentiellement accumulés sont principalement liés au transport vésiculaire et/ou transmembranaire**

La liste des gènes compris dans les catégories GO correspondant à la localisation et au transport, à la modification post-traductionnelle ainsi qu'au transport transmembranaire a été analysée afin de déterminer de manière plus précise la nature des ARNm affectés par la



**Figure 63: Annotation GO des transcrits différentiellement accumulés entre *Col-0* et *larp6c-3***

A : Annotation des transcrits DE associés au transport (GO:0006810), à la localisation (GO:0051179) et à la localisation de macromolécules (GO:0033036) (211 gènes). B : Annotation des transcrits DE associés à l'activité de transport transmembranaire actif (GO:0022857) (77 gènes). C : Annotation des transcrits DE associés à la modification post-traductionnelle des protéines (GO: 0043687) (106 gènes). La couleur des histogrammes renseigne sur les annotations des transcrits : cytosquelette et transport vésiculaire (bleu foncé), compartiments cellulaires (violet), fonction phosphatase/kinase (vert) et dégradation (orange) ; les pourcentages renseignent sur la proportion de gènes possédant les annotations en question.

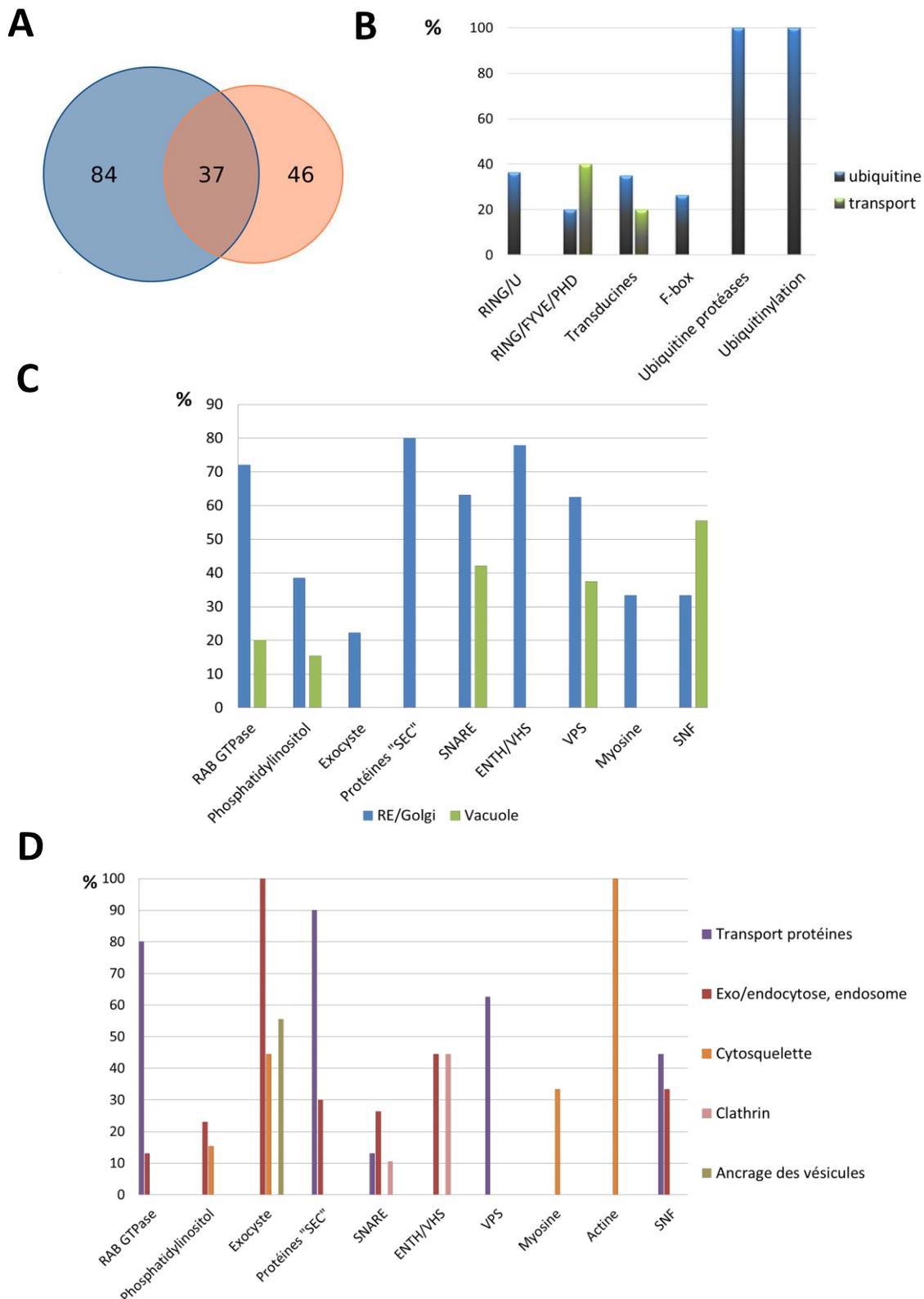
mutation. Pour cela, les listes de gènes ont été confrontées à une base de données d'annotation GO (disponible sur le site [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 63 et permettent de préciser les voies affectées par la mutation de *LARP6c*.

Lorsque l'on s'intéresse aux gènes impliqués dans la localisation et le transport, les catégories GO citées précédemment (211 gènes, Figure 63A) comprennent plus de 75% de gènes associés à du transport membranaire ou bien au transport de protéines dirigées vers la membrane ; ceci va de pair avec les 43% d'ARNm codant des protéines impliquées dans le transport vésiculaire et les presque 10% impliqués dans la formation du cytosquelette. De manière très intéressante, on constate que les localisations subcellulaires qui ressortent le plus pour les protéines codées par ces ARNm correspondent au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi, tous deux impliqués dans le transport vésiculaire. D'autres compartiments tels que la mitochondrie ou la vacuole font aussi partie des localisations subcellulaires les plus représentées, avec respectivement 14% et 12,8% de gènes associés à ces compartiments. Cette analyse a permis, de plus, de constater que plus de la moitié des gènes associés à la localisation codent des protéines impliquées dans le transport ou la modification de protéines, et près de 38% sont associés au transport d'ions.

L'analyse plus détaillée de la liste des gènes identifiés dans les catégories GO impliqués dans le transport transmembranaire (77 gènes, Figure 63B) confirme le lien entre le transport transmembranaire et les compartiments cellulaires identifiés précédemment, c'est-à-dire : réticulum endoplasmique / golgi (env. 21 %), mitochondrie (env. 30%) et vacuole (env. 25%).

Finalement, l'analyse de la liste de gènes associés à la modification post-traductionnelle (106 gènes, Figure 63C) indique que près de 58% des ARNm affectés codent des protéines impliquées dans l'activité phosphate/kinase, et qu'environ 12% sont liés au métabolisme de l'ubiquitine et/ou à l'autophagie. Il est intéressant de voir que, même dans cette catégorie, on trouve des gènes associés au duo réticulum endoplasmique / Golgi (6,5%) et au cytosquelette (7,48%).

L'ensemble de ces résultats montre que les ARNm affectés par la mutation de *LARP6c* codent des protéines impliquées dans le transport vésiculaire et/ou transmembranaire actif (donc associé à une consommation d'ATP) d'ions et de protéines.



**Figure 64: Les grandes familles de gènes affectés par la mutation *larp6c-3***

A : Diagramme de Venn représentant les gènes impliqués dans le transport vésiculaire uniquement (84), la dégradation de protéines uniquement (46) ou qui sont annotés comme impliqués dans les deux processus (37). B : Représentation, pour les familles géniques identifiées dans la catégorie « dégradation de protéines », de la proportion de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ubiquitine et/ou du transport. C,D : Représentation, pour les familles géniques identifiées dans la catégorie « transport vésiculaire », des compartiments cellulaires (C) et fonctions (D) impliquées.

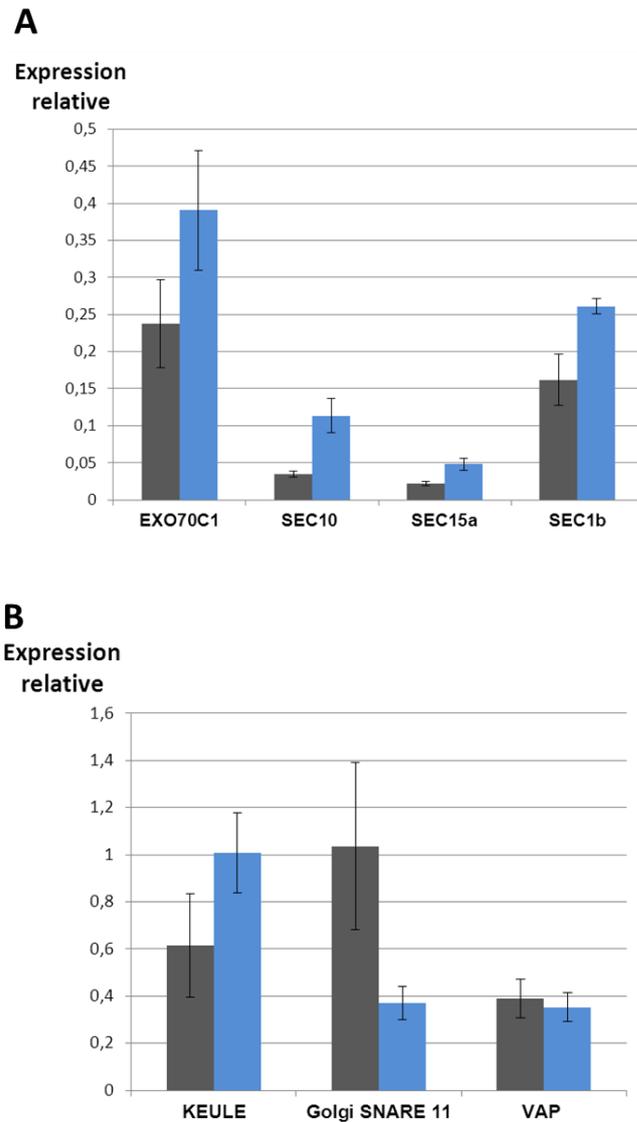
### **II.3.5 Identification de complexes et familles protéiques affectées par la mutation *larp6c-3* en lien avec le transport et la dégradation.**

De nombreux membres d'une même famille protéique ou d'un même complexe sont affectés simultanément par la mutation de *LARP6c*. Ces familles et/ou complexes peuvent être séparés en deux grandes catégories : (i) les familles impliquées dans le transport, et (ii) les familles impliquées dans la modification protéique par ubiquitinylation. La Figure 64A représente la proportion de gènes membres de familles géniques et appartenant à chacune de ces deux catégories.

Parmi les ARNm codant des protéines impliquées dans l'ubiquitinylation, on retrouve les familles des RING/U box (33 membres), des RING/FYVE/PHD zinc finger (10 membres), des transducines (20 membres), des protéines à domaine F-box (19 membres) ainsi que les protéases spécifiques de l'ubiquitine (8 membres) et les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (6 membres). La figure 64B montre la proportion de protéines de chaque famille impliquée dans le processus d'ubiquitinylation, les valeurs allant de 20% à 100%. Au sein de ces familles, certaines des protéines sont aussi impliquées dans le transport avec 20% des protéines de la famille des transducines et jusqu'à 40% des protéines de la famille des RING/FYVE/PHD zinc finger.

Les gènes codant des protéines appartenant à des familles impliquées dans le transport ont été analysés par deux approches. La première consiste à identifier les compartiments cellulaires en lien avec chaque famille génique ; les résultats sont présentés dans la figure 64C. La deuxième approche consiste, quant à elle, à identifier les fonctions ou métabolismes associés à chaque famille (Figure 64D). Parmi les familles identifiées dans cette catégorie GO, on note la présence de familles telles que les RAB GTPases (25), phosphatidyl inositol (13) et SNF (9). On retrouve, de plus, des familles de protéines impliquées de manière plus directe dans le transport avec des représentants des familles SNARE (19), ENTH/VHS (9), VPS (8), SEC (protéines de sécrétion (10), ainsi que le complexe exocyste (9). En plus de ces familles, des protéines impliquées dans la formation du cytosquelette sont aussi représentées par des familles impliquées dans la formation de l'actine (6) et de la myosine (12).

L'identification des compartiments cellulaires dans lesquels interviennent les familles listées ci-dessus fait principalement ressortir des protéines localisées au niveau du



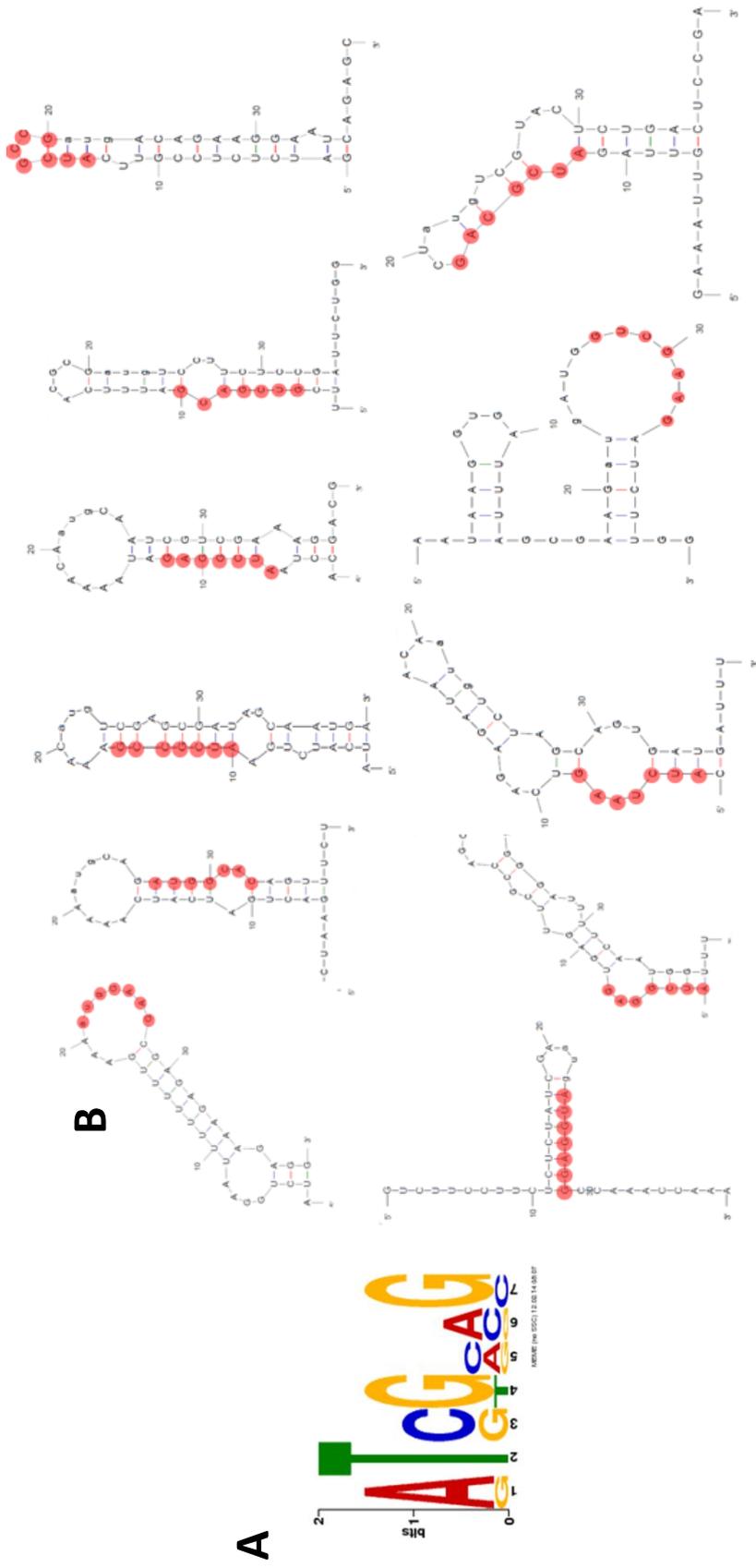
**Figure 65: Analyse par qRT-PCR des variations d'accumulation des transcrits du complexe exocyste dans le mutant *larp6c-3***

A : validation des cibles membres d'exocyste : *Exo70C1* (*At5g13150*), *SEC10* (*At5g12370*), *SEC15a* (*At3g56640*), *SEC1b* (*At4g12120*). B : validation des cibles associées au transport vésiculaire mais pas membre d'exocyste : *KEULE* (*At1g12360*), *Golgi SNARE 11* (*At1g15880*), *VAP* (*At3g60600*). Gris : *Col-0*, Bleu: *larp6c-3*. Les barres d'erreurs représente les écarts-types entre les réplicats biologiques.

réticulum endoplasmique et/ou de l'appareil de Golgi avec 72% des protéines de la famille des RAB GTPase, 80% des protéines de sécrétion et 78% des protéines de la famille des ENTH/VHS pour les plus fortes valeurs (Figure 64C). Lorsque l'on s'intéresse aux fonctions remplies par les protéines présentes dans les différentes familles (Figure 64D), on constate que, parmi les protéines impliquées dans l'exocytose, on retrouve les protéines du complexe exocyste, ainsi que 44% des protéines de la famille des ENTH/VHS. De plus, on retrouve des proportions importantes de protéines impliquées dans le transport protéique, notamment au sein des familles des RAB GTPase (80%), des protéines de sécrétion (90%), ainsi que des VPS (62,5%). Cette analyse permet, d'autre part, de mettre en évidence l'impact de la mutation *larp6c* sur des protéines impliquées dans l'endocytose, le transport vésiculaire (encrage des vésicules, clathrines), et localisées ou adressées à des compartiments tels que la vacuole.

Le complexe exocyste, impliqué dans le transport vésiculaire, semble avoir un rôle assez central vis-à-vis des fonctions et compartiments mis en relief par l'analyse présentée ici (Zárský et al., 2013). Pour cette raison, le niveau d'expression de 7 cibles potentielles de LARP6c, membres du complexe exocyste ou en lien avec celui-ci, a été analysé par qRT-PCR afin de confirmer les résultats obtenus par séquençage (Figure 65). Pour 6 cibles sur 7, les résultats de qRT-PCR confirment les résultats obtenus lors de l'analyse transcriptomique, la septième valeur va dans le sens attendu mais la différence observée n'est pas significativement différente entre les deux conditions. Ceci indique donc que la variation d'accumulation des transcrits codants ces protéines est bien affectée dans la lignée *larp6c-3* et vient supporter les données de transcriptomique.

Considérés globalement, ces résultats montrent un impact de la mutation de *LARP6c* sur de grandes familles et complexes ainsi que sur des ARNm appartenant aux catégories GO du transport, de la localisation, ou encore de la modification post-traductionnelle. Ceci suggère un lien, entre LARP6c et la régulation de l'expression des gènes codant des facteurs impliqués dans le transport vésiculaire de protéines, potentiellement en lien avec la dégradation protéique liée à l'ubiquitinylation. Notre hypothèse, concernant la fonction de LARP6c, est que cette protéine est une RBP capable d'intervenir dans la régulation d'un groupe d'ARNm, au sein de mRNP. L'analyse réalisée permet de confirmer le rôle de LARP6c sur certains ARNm mais ne permet pas, cependant, d'identifier ses cibles directes. Ainsi, pour avoir une meilleure compréhension des fonctions moléculaires de



**Figure 66: Recherche de motifs et structures conservés au niveau ARN parmi les membres du complexe exocyste affectés par la mutation *larp6c-3***

A : Motif identifié à l'aide du logiciel en ligne MEME, à partir de la portion 5' des ARNm (20 nucléotides de part et d'autre de l'ATG) correspondants aux gènes : *SEC5a*, *SEC5b*, *SEC8*, *SEC10*, *SEC15a*, *SEC15b*, *VPS51/VPS67*, *EXO70a2* : *AT5G52340*, *KEULE*, *SEC1b*, *SEC6*.

B : Structure prédite de la portion 5' des ARNm (20 nucléotides de part et d'autre de l'ATG) (mFold). Le motif identifié précédemment (A) est représenté en rouge sur les structures. dG : énergie minimum pour la formation de la structure. *SEC5a*: *At1g76850* (dG=-18,20), *SEC5b* : *At1g21170* (dG=-11,74), *SEC6* : *At1g71820* (dG=-8,94), *SEC8* : *At3g10380* (dG=-13,68), *SEC10* : *At5g12370* (dG=-13,45), *SEC11/KEULE* : *At1g12360* (dG=-11,75), *SEC13*: *At4g12120* (dG=-9,54), *SEC15a*: *At3g56640* (dG=-12,26), *SEC15b* : *At4g02350* (dG=-10,92), *PI-4Kbeta2*: *At5g09350* (dG=-12,20), *VPS51/VPS67/EXO84B*: *At1g10385* (dG=-7,65).

LARP6c, nous avons entrepris d'essayer d'identifier les transcrits avec lesquels elle interagit.

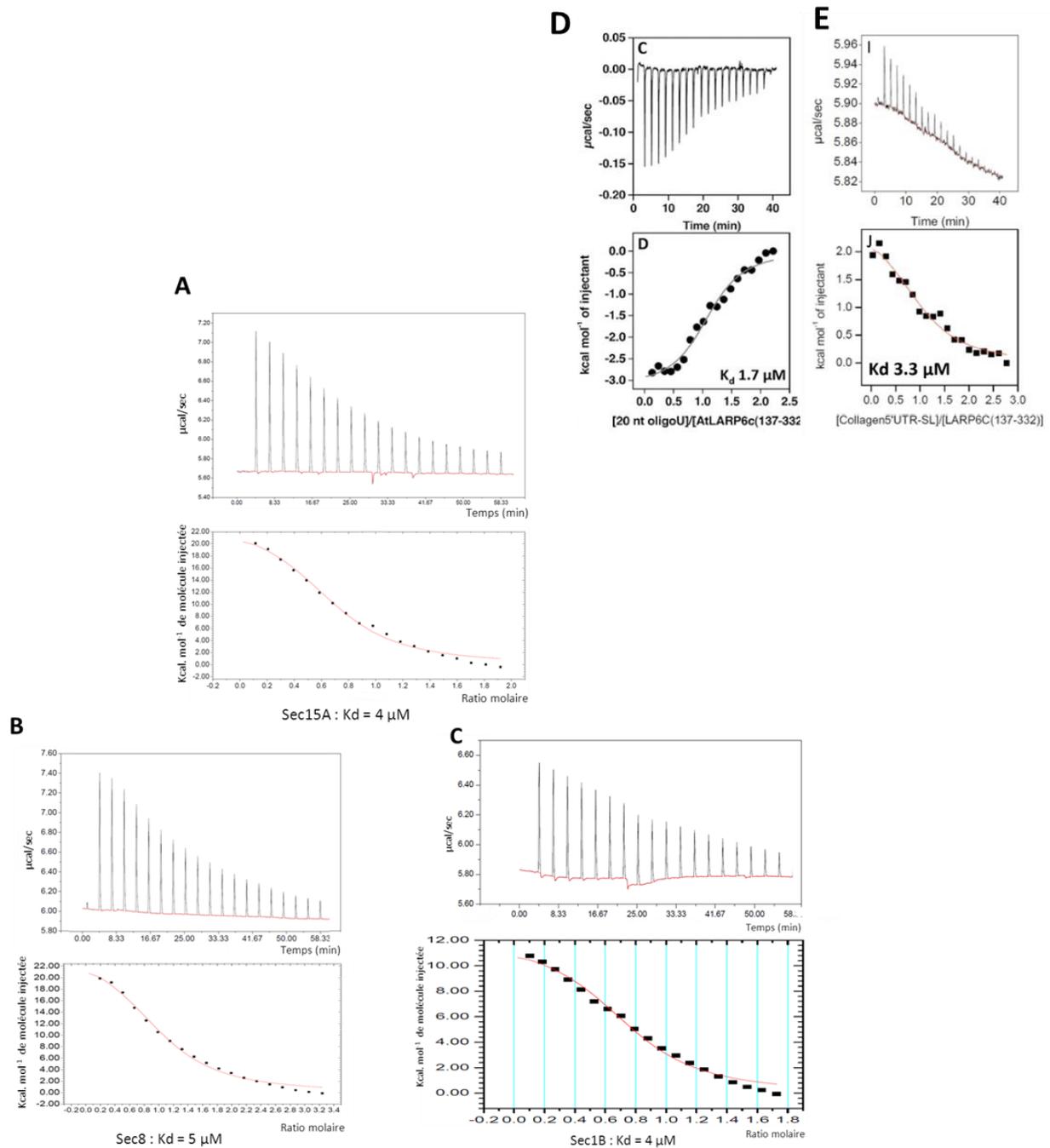
## **II.4. Identification des cibles directes de la protéine LARP6c**

Les protéines de liaison aux ARN, que l'on retrouve au sein des mRNP, sont capables de reconnaître leur transcrits cibles grâce à un ou plusieurs motifs conservés et situés, généralement, dans les régions régulatrices (5' et 3' UTR). Le partage d'un de ces motifs par un groupe d'ARNm permet leur co-régulation via les RBP. Ainsi, il est possible que LARP6c interagisse avec un groupe d'ARNm possédant une région spécifique conservée.

### **II.4.1 Recherche de motif / structure conservé dans les ARNm identifiés en transcriptomique**

Les analyses de transcriptomique présentées précédemment montrent que la protéine LARP6c joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le transport. Nous avons notamment mis en évidence un impact sur le transport vésiculaire, et tout particulièrement sur les ARNm codant les composants du complexe exocyste. Ainsi, on peut se demander si ces ARNm ont en commun une structure et/ou une séquence conservée qui permettrait une interaction directe avec LARP6c et donc une régulation par le biais de cette interaction.

Comme indiqué dans l'introduction, d'après les données disponibles chez l'Homme, la protéine LARP6 humaine reconnaît de manière très spécifique l'ARNm du collagène par fixation à une structure tige-boucle située sur ce dernier au niveau du codon d'initiation de la traduction (Cai et al., 2010a). Au sein de cette structure, certains nucléotides sont essentiels à la fixation de la protéine LARP6 humaine. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'il existe chez *Arabidopsis thaliana*, un mode de reconnaissance similaire entre LARP6c et ses cibles via une structure et/ou une séquence. Pour chaque ARNm codant une protéine du complexe exocyste ou en lien avec le complexe, une séquence de 40 nucléotides (-20/+20) autour de l'ATG (lorsque la séquence 5'UTR était disponible, 11 séquences) a été téléchargée et utilisée pour une recherche de motif via le logiciel en ligne MEME (Multiple Em for Motif Elicitation, Bailey & Elkan, 1994). Un motif de 7 nucléotides (Figure 66A) a ainsi été identifié dans toutes les séquences utilisées pour l'analyse.



**Figure 67: Test de l'interaction entre le module LA de LARP6c et les structures ARN des gènes codant *SEC1b*, *SEC8*, *SEC15a* par ITC**

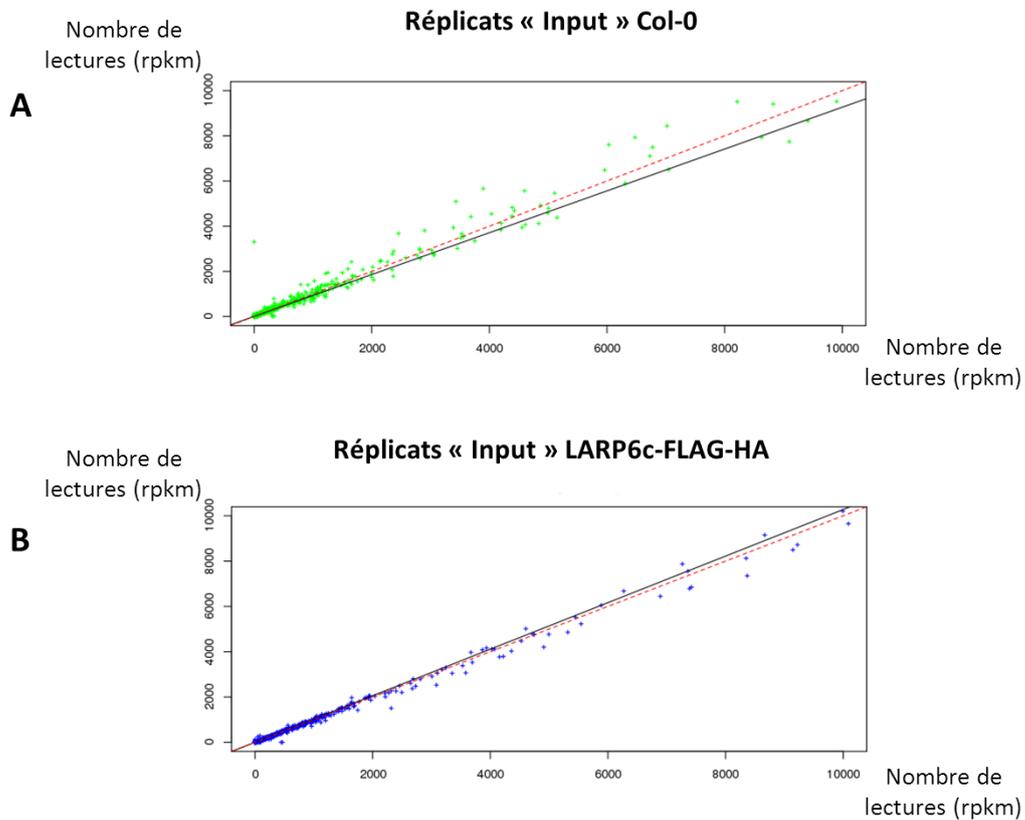
Pour chacun des ARN (*SEC15a* (A), *SEC8* (B), *SEC1b* (C)), le graphique du haut représente l'injection de l'ARN en fonction du temps, le graphique du bas représente la variation d'énergie (kcal/mol) liée à l'interaction. D : rappel des résultats d'ITC obtenus pour le module LA de LARP6c avec un oligonucléotide d'Uracile de 20 nt (Merret et al., 2013). E : résultats d'ITC obtenus pour l'interaction entre le module LA de LARP6c et la structure tige boucle du collagène de type I humain.

D'autre part, une analyse à l'aide du logiciel de prédiction de structure ARN mFOLD (Zuker, 2003) a permis de rechercher la présence de structure de type tige-boucle au niveau de ces séquences. Les structures identifiées sont présentées dans la figure 66B et sont différentes selon les ARNm. En effet, on peut voir des structures présentant seulement une tige (*SEC15a*), une tige accompagnée de deux boucles (*SEC15b*, *SEC5a*, *PI-4Kbeta2*, *VPS51*, *Sec1b*), une tige accompagnée de 3 boucles (*SEC8*, *SEC5b*) ou encore deux tiges se terminant par une boucle (*SEC6*). Cependant, le point commun à ces structures est qu'elles possèdent toutes, le motif présenté précédemment (Figure 66). Il semble donc qu'il pourrait exister, au sein des ARNm codant les membres du complexes exocyste et des protéines en lien avec celui-ci, un motif de régulation commun retrouvé sur leur 5' UTR et inclus dans une région structurée. Ces ARNm étant différentiellement accumulés dans la lignée mutante *larp6c-3*, il est intéressant de déterminer si le module LA de LARP6c est capable d'interagir avec ce motif et/ou cette structure.

### **II.4.2 Interaction *in vitro* de LARP6c avec les structures précédemment identifiées**

Afin de tester la capacité d'interaction de ces ARNm avec la protéine LARP6c, une expérience d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) a été réalisée en collaboration avec l'équipe de M. CONTE (King's College, Londres). Cette expérience permet de tester, *in vitro*, la capacité d'interaction d'un peptide avec des ARN. Le peptide utilisé dans cette expérience comprend le module LA (position 137 à 332) de la protéine LARP6c (Merret et al., 2013b). Trois aptamères synthétiques d'ARN, correspondant aux portions 5'-UTR des transcrits (*SEC8*, *SEC15A*, *SEC1B*, Figure 66B), ont été utilisés pour tester l'interaction avec le module LA de LARP6c. Ces aptamères de 40 nucléotides autour du codon d'initiation possèdent le motif identifié par prédiction (MEME) ainsi qu'une structure tige-boucle potentielle.

Les résultats de l'expérience d'ITC présentés dans la figure 67 montrent l'affinité du module LA pour les polymères d'ARN. Les trois profils sont très similaires et il semblerait qu'aucun des polymères ne soit préférentiellement fixé par rapport aux autres par le module LA. Les constantes de dissociation (Kd) semblent indiquer des interactions semblables thermodynamiquement avec des valeurs de 4  $\mu$ M pour *SEC15A* et *SEC1B* et 5  $\mu$ M pour *SEC8*. Cependant ces valeurs sont à considérer avec précaution : en effet, les



**Figure 68: Réplicabilité des données de RIP**

Illustration de la répliquabilité des données par représentation des corrélations entre répliquats pour les échantillons correspondant aux « Inputs » Col-0 (A) et LARP6c-FLAG-HA (B). Ordonnée : nombre de lecture du répliquat II, Abscisse : nombre de lecture du répliquat I. La droite de régression est représentée en noir (trait continu). Les coefficients de régression ( $R^2$ ) de chacune des droites indiquent la représentativité de la droite vis-à-vis du jeu de données.  $R^2_{In\_Col-0} = 0,92$ ,  $R^2_{In\_LARP6c-FLAG-HA} = 0,95$ ).

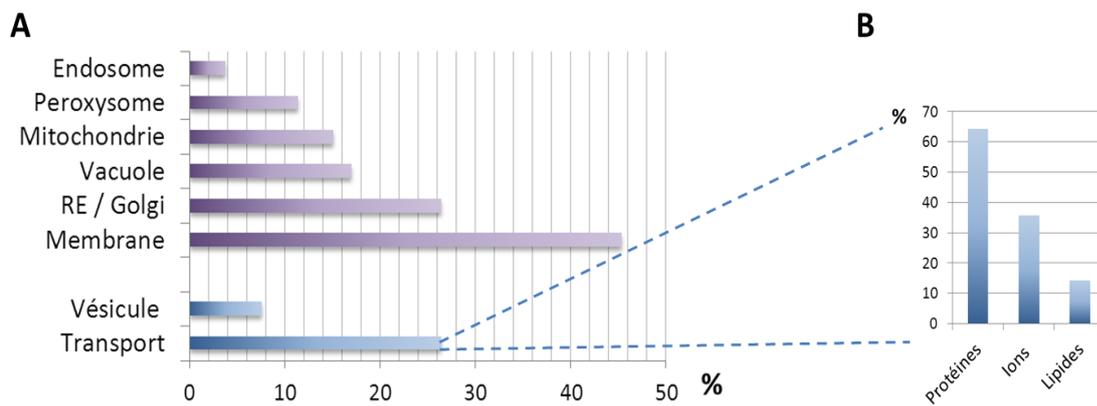
courbes présentées ici ne forment pas de véritables sigmoïdes, ce qui rend difficile l'extrapolation d'une constante de dissociation. Les résultats obtenus précédemment sont présentés à titre de comparaison et montrent les courbes obtenues pour l'interaction du module LA de LARP6c avec un oligonucléotide composé de 20 Uraciles (Figure 67D) ou avec la structure tige-boucle de l'ARNm du collagène de type I humain (Figure 67E). Il faut noter que, de toutes les interactions testées par ITC, l'interaction avec le polymère d'uracile est l'interaction la plus forte, avec une courbe formant une sigmoïde permettant de calculer une constante de dissociation de 1,7  $\mu$ M.

Ces résultats permettent de constater que les trois séquences testées sont fixées mais avec moins d'affinité que la structure tige boucle du collagène humain de type I ou encore qu'une séquence de 20 uraciles, qui reste le meilleur interactant *in vitro*. Ainsi, il est difficile de conclure quant à la capacité du module LA de LARP6c à fixer cette boîte potentielle de régulation des transcrits du complexe exocyste. Nous avons donc choisi de rechercher des interactants de LARP6c par le biais d'une approche plus globale.

### II.4.3 Recherche de cibles directes de LARP6c

Afin d'identifier des cibles directes de LARP6c dans le pollen mature, une immunoprécipitation a été réalisée en conditions non dénaturantes, les ARNm retenus par les billes ont ensuite été séquencés (RIP, **R**NA **I**mmuno**P**réci**P**itation). Le pollen utilisé a été récolté à partir de plantes cultivées en serre en même temps que celles utilisées pour l'expérience de transcriptomique, et donc dans les mêmes conditions. La lignée *LARP6c:LARP6c-FLAG-HA* a été utilisée pour fixer la protéine LARP6c-FLAG-HA sur des billes couplées à un anticorps dirigé contre l'étiquette FLAG, et une lignée sauvage a été utilisée comme contrôle. Les banques ont été créées après purification polyA+ des extraits correspondants aux « Input », sur colonne d'affinité oligo(dT) ; cette purification n'a cependant pas pu être réalisée pour les échantillons correspondant aux Eluats en raison de la faible quantité d'ARN disponible. Le séquençage a ensuite permis d'obtenir de 42 à 64 millions de lectures pour les « Input » et de 25 à 40 millions de lectures pour les « Eluats ».

La première étape de l'analyse a ensuite consisté à vérifier la répliquabilité des échantillons « Input ». Pour cela, les droites de régression réalisées permettent de valider les réplicats pour la condition « Input » Col-0 (Figure 68A) et la condition « Input » LARP6c-FLAG-



**Figure 69: Annotation des transcrits enrichis en RIP**

A : Localisation (en violet, partie supérieure) et fonctions (en bleu, partie inférieure) des protéines codées par les transcrits enrichis en RIP (n=53). B : Type de molécules transportées parmi les transcrits codant des protéines annotées impliquées dans le transport (n=14).

HA (Figure 68B). Afin de ne conserver que les interactants potentiels de LARP6c, des filtres successifs ont été appliqués sur les données. Dans un premier temps, les transcrits présentant des accumulations différentes dans les « Input » et plus exprimés dans la condition LARPP6c-FLAG-HA ont été supprimés. Dans un deuxième temps, seuls les transcrits présentant des nombres de lectures significativement plus important dans l'éluat de la condition LARP6c-FLAG-HA par rapport à la condition Col0 ont été sélectionnés. Finalement, le dernier critère concerne le nombre de lectures entre Input et Eluat pour la condition LARP6c-FLAG-HA : seuls les transcrits possédant dans l'Eluat un nombre normalisé de lectures au moins égal au nombre normalisé de lectures dans l'Input sont conservés. Les détails de l'analyse (ratio calculés, seuils,...) sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes et résumés dans la figure 92. L'application de ces filtres amène à la création d'une liste de 270 gènes enrichis dans la condition LARP6c-FLAG-HA.

L'analyse de ces gènes montre une forte représentation d'ARNm codant des protéines impliquées dans la phosphorylation des protéines (GO : 0006468,  $2,2 \cdot 10^{-7}$ ) et l'activité des protéines sérine/thréonine kinase (GO : 0004674,  $7,98 \cdot 10^{-9}$ ). Les ARNm analysés possèdent : (i) des accumulations similaires dans les « Inputs » ou plus faibles dans la condition LARP6c-FLAG-HA, (ii) un nombre de lectures plus important dans l'éluat LARP6c-FLAG-HA, (iii) ainsi qu'un nombre normalisé de lectures dans l'Eluat au moins égal à celui de l'Input. Cependant, un critère n'a pas encore été pris en compte, il s'agit de la comparaison entre l'enrichissement d'un transcrit entre les deux conditions (ratio entre « Input » et « Eluat »). Ainsi, un filtre supplémentaire est appliqué à la liste des 270 transcrits permettant de ne conserver que les transcrits possédant un enrichissement plus fort dans la condition LARP6c-FLAG-HA que dans la condition Col-0, ce qui aboutit à la création d'une liste de 53 ARNm (cf. Matériel et méthodes).

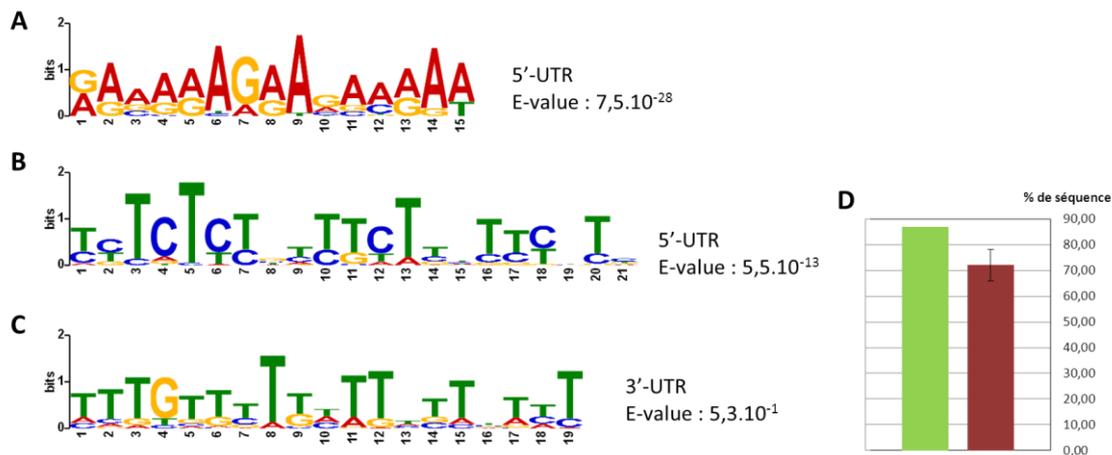
L'analyse GO de cette liste de 53 gènes (Annexe 4) est représentée dans la figure 69A et montre que plus de 45% des ARNm de la liste codent des protéines localisées au niveau des membranes. On note, de plus, que 26,42% sont présents au niveau du réticulum endoplasmique et/ou de l'appareil de Golgi, et près de 17% au niveau de la vacuole. En ce qui concerne le processus biologique dans lequel se placent les protéines codées par ces ARNm, on note, que plus de 25% d'entre elles sont impliquées dans le transport, dont 7,55 % dans le transport vésiculaire. La figure 69B met en évidence le type de molécules transportées par ces protéines : pour la majorité d'entre elles, il s'agit du transport de

protéines (64,29%), on trouve ensuite le transport d'ions (35,71%) et de lipides (14,29%). Une analyse plus détaillée permet de remarquer les ARNm codant une Ankyrine (transport vésiculaire), un membre de la famille de protéines à boîte RING/U, une protéine impliquée dans la sécrétion (SECY), et une protéine proche du complexe exocyste (EXO70H3). Cependant, aucun de ces transcrits n'avait été identifié comme différentiellement accumulé dans le mutant *larp6c*. Parmi les 53 ARNm sélectionnés comme cibles potentielles de LARP6c, 10 sont différentiellement accumulés dans le mutant *larp6c-3* d'après l'analyse de séquençage, dont 6 sont sur-accumulés et 4 sont sous-accumulés (Annexe 4). Aucune fonction ou localisation n'est surreprésentée au sein de ces 10 ARNm. On trouve cependant au sein de ces gènes des ARNm codant une pectine lyase (sous-accumulée) et une VPS (sur-accumulée), familles de protéines impliquées, respectivement, dans la croissance du tube pollinique et le transport vésiculaire.

Les résultats de la recherche de cibles potentiellement directes de LARP6c permettent de mettre en évidence de nombreux ARNm en lien avec le transport de protéines et codant des protéines le plus souvent associées à des membranes et/ou organites intracellulaires. Ces résultats vont dans le sens d'un lien entre LARP6c et le transport de protéines.

#### **II.4.4 Recherche de motifs communs aux cibles potentielles de LARP6c.**

L'analyse par immunoprécipitation des ARNm (RIP) a permis de mettre en avant 53 transcrits potentiellement fixés par la protéine LARP6c. LARP6c étant une protéine de type RBP (RNA binding protein), il pourrait exister un motif commun de reconnaissance de ses cibles. Pour répondre à cette question, les séquences non traduites (UTR) en 5' et 3' des transcrits ont été analysées afin d'identifier des motifs conservés dans ces régions. Le choix s'est axé sur les régions non traduites pour deux raisons : (i) la littérature montre que les régions d'un ARNm le plus souvent engagées dans la régulation de celui-ci se situent préférentiellement dans ses régions non traduites, les UTR, (ii) chez l'Homme, LARP6 interagit avec la tige-boucle du collagène en partie 5' de l'ARNm, cette tige boucle comprenant le codon d'initiation. Ainsi, pour chacun de nos transcrits, la séquence sélectionnée comprend la partie non traduite de l'ARNm ainsi que les 25 nucléotides consécutifs dans la séquence codante. La base de données utilisée (TAIR10) a permis d'obtenir les séquences 5'-UTR pour 84,9% des gènes étudiés (45 ARNm) et les séquences



**Figure 70: Motifs conservés au sein des séquences 5' UTR et 3' UTR des gènes enrichis en RIP**

A-C : Recherche de motifs à l'aide du logiciel MEME.

Motifs présents dans la portion 5' UTR des ARN enrichis en RIP, respectivement dans 57% des ARN (A), et 73% des ARN (B) (n=45). Le motif identifié sur la portion 3' UTR de l'ARN a été identifié dans 100% des séquences analysées (n=46). La taille des lettres est proportionnelle à la fréquence d'apparition du nucléotide pour chaque position. D : Proportion de séquences possédant au moins une fois le motif représenté en C, dans la liste de gènes issue du RIP (vert) en comparaison à la présence de ce motif dans une liste aléatoire (rouge, n=150). Recherche de motifs à l'aide du logiciel Fuzznuc (Emboss).

3'-UTR pour 86,7% des gènes étudiés (46 ARNm) ; pour 79,2% des gènes (42 ARNm) nous disposons de deux séquences.

L'utilisation du logiciel MEME sur ces séquences, a permis d'identifier trois motifs (Figure 70) ; un motif est présent dans la partie 3' UTR, les deux autres sont présents dans la partie 5' UTR. Les deux motifs présents dans la partie 5'-UTR des gènes sont très différents. L'un des motifs est riche en purines (Figure 70A, E-value =  $7,5 \cdot 10^{-28}$ ), long de 15 nucléotides et est présent sur plus de 57% des gènes étudiés. L'autre, quant à lui, est riche en pyrimidines (Figure 70B; E-value =  $5,5 \cdot 10^{-13}$ ), long de 21 nucléotides et est présent sur plus de 73% des séquences. Comme on peut le voir sur la figure 71, les motifs présents sur la région 5'-UTR n'ont pas d'organisation particulière et ne sont présents ensemble que pour 18 séquences sur les 45. Il faut, cependant, noter que les séquences 5'-UTR issues du TAIR peuvent être incomplètes ; il pourrait donc y avoir une proportion plus importante de transcrits possédant les deux motifs. L'analyse des séquences 3'-UTR des gènes a permis d'identifier un motif riche en thymines, ce qui signifie qu'il s'agit, en termes, de séquence ARN, d'un motif riche en uraciles (Figure 70C; E-value=  $5,3 \cdot 10^{-1}$ ) ; dans 91,3% des cas, ce motif se positionne après le codon STOP. Il faut noter que ce résultat est à considérer avec précaution, étant donné que, d'après le logiciel, ce motif n'est pas statistiquement fiable (E-value). Cependant, il est présent dans 100% des séquences analysées. De plus, ce motif est enrichi dans la liste de gènes issue du RIP par rapport à des listes de gènes aléatoires issues de TAIR10. En effet, le logiciel Fuzznuc disponible dans la suite de logiciel EMBOSS (Rice, 2000) a été utilisé afin de rechercher ce motif dans différentes listes de gènes générées aléatoirement. Le résultat présenté dans la figure 70D montre que le logiciel Fuzznuc parvient à détecter ce motif dans 87 % des séquences issues du RIP, contre seulement 72 % des séquences issues des listes aléatoires. Ceci confirme qu'il y a un enrichissement de ce motif dans les séquences des ARNm retenus par le RIP. En ce qui concerne la répartition des motifs, il est intéressant de voir que 88% des gènes possèdent à la fois le motif en 3'-UTR et au moins un des deux motifs en 5'-UTR. La présence de séquences enrichies en uraciles au niveau des régions non codantes des ARNm ciblés par LARP6c pourrait expliquer l'affinité de LARP6c pour ces séquences, étant donné les résultats obtenus en ITC montrant l'affinité du module LA de LARP6c pour un oligonucléotide d'uraciles (Figure 67D).



**Figure 71: Position des motifs identifiés en 5' des ARNm des gènes enrichis en RIP**

Position du motif riche en adénines et guanines (purines, rouge), position du motif riche en cytosines et thymines (pyrimidines, vert). Les séquences présentant les deux motifs sont marquées par un astérisque.

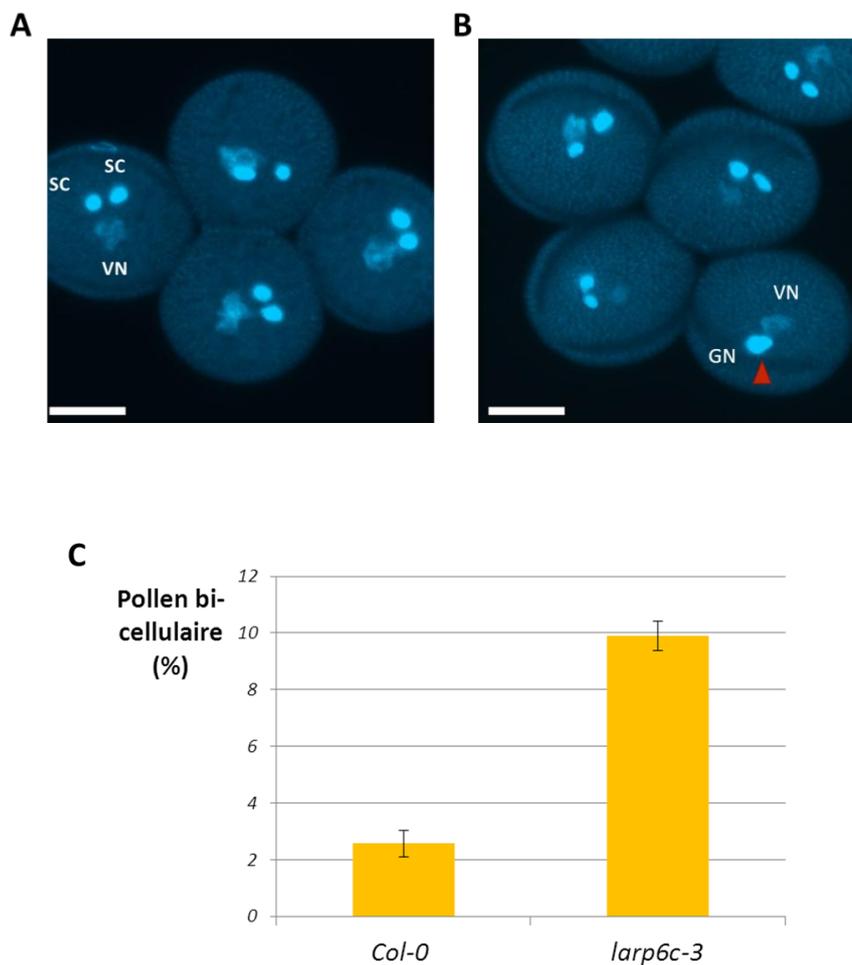
Les différentes analyses ont permis de montrer que la protéine LARP6c est présente dans le pollen à différents stades, notamment dans le stade pollen mature. A ce stade, les analyses de séquençage ARN et de RIP indiquent que LARP6c intervient, de manière directe et/ou indirecte, dans la régulation de l'accumulation d'ARNm codant des protéines liées au transport vésiculaire de protéines, et donc, potentiellement, dans leur régulation post-transcriptionnelle. Or le transport joue un rôle crucial dans la croissance dirigée du tube pollinique (cf. IV.3. De la germination du tube pollinique à la fécondation) et cette étape se produit immédiatement après le stade mature. Pour cette raison, il est intéressant d'étudier si LARP6c est impliquée dans les étapes de croissance du tube pollinique et de fécondation.

## **II.5. Rôle de LARP6c lors de la reproduction**

Afin de mieux comprendre la fonction physiologique de LARP6c, l'impact de la mutation de cette protéine a été étudié. Cette protéine étant exprimée de manière spécifique dans le pollen, une collaboration a été mise en place avec Saïd Hafidh, dans l'équipe de D. Honys (Laboratory of Pollen Biology, Institute of Experimental Botany, Prague). Les travaux d'analyse phénotypique en pollen (hormis les tests de transmissions et ségrégations) ont été réalisés par Said Hafidh.

### **II.5.1 LARP6c et la maturation du pollen**

L'observation des profils d'expression disponibles en ligne indique que *LARP6c* est exprimé dans le pollen tout au long de sa maturation, comme indiqué précédemment (Figures 41-44, 46). Ainsi, il est envisageable que LARP6c intervienne dans la maturation du pollen. Lors de son développement, le pollen passe par le stade bicellulaire où il contient un noyau végétatif et un noyau génératif (cf. IV.1.2 Formation du grain de pollen). Suite à la division mitotique du noyau génératif, le pollen devient tricellulaire et possède désormais un noyau végétatif et deux noyaux spermatiques. On fait ici l'hypothèse que LARP6c aurait un rôle dans la maturation du pollen, et plus particulièrement dans les dernières étapes, c'est-à-dire la réalisation de la division mitotique aboutissant à la formation des cellules spermatiques.



### Figure 72: Observation d'un défaut de maturation des grains de pollen

Observation des grains de pollen bicellulaire au sein du pollen libéré des sacs polliniques dans (A) *Col0* et (B) *larp6c-3* par coloration au DAPI. Echelle : 6  $\mu$ m.

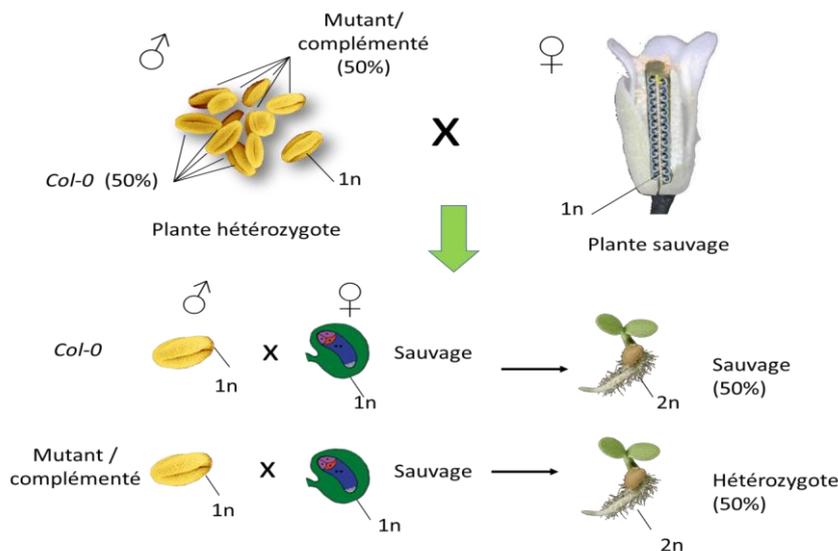
C : Proportion de grains de pollen encore bicellulaire après ouverture des sacs polliniques dans *Col-0* (n=1089) et *larp6c-3* (n=3231), ces valeurs soutenues par un test khi<sup>2</sup>, pvalue = 0. Barre d'erreur : écart-type de pourcentage. SC = cellules spermatique, VN = noyau végétatif, GN : noyau génératif.

Afin de tester cette hypothèse, du pollen mature incubé avec du DAPI (marqueur des noyaux) a été observé au microscope (Figure 72A et B). Les résultats montrent que dans la lignée mutante *larp6c-3*, la proportion de pollen bicellulaire (Figure 72C) au sein du pollen mature est variable, avec une moyenne de 9,9 %. Cette valeur est statistiquement différente des seulement 2,57% de pollen bi-cellulaire dans le cas de la lignée sauvage. Il existerait donc un léger défaut de maturation du pollen *larp6c-3*, s'exprimant par un arrêt ou un ralentissement de la maturation du grain de pollen au stade bicellulaire. Devant l'excès de pollen présent lors de la fécondation, il est peu probable qu'un tel défaut de maturation du pollen ait un impact sur la fécondation.

### II.5.2 LARP6c et la fertilité mâle chez *Arabidopsis thaliana*

LARP6c s'accumule dans le pollen mature mais n'affecte pas de manière très forte la maturation de celui-ci, puisque plus de 90% du pollen est bien tricellulaire à maturité. Il se pourrait donc que LARP6c soit accumulé dans le pollen mature afin de participer à la fécondation, en intervenant par exemple lors de la germination ou de la croissance du tube pollinique, ou encore lors de la fusion des gamétophytes. Afin de tester le rôle de cette protéine dans la fécondation, des tests de transmission ont été réalisés ; le principe de la technique est schématisé dans la figure 73. Le rôle des tests de transmission est de vérifier l'impact d'une mutation du gamète mâle sur sa capacité à féconder l'ovule (test de transmission mâle) ou bien de l'ovule muté à être fécondé par un pollen sauvage (test de transmission femelle). La réalisation de ces tests de transmission repose sur le principe de croisements réciproques sur une plante sauvage, permettent de mesurer le taux de transmission de gamètes mutants (mâle ou femelle selon le sens du croisement).

Ces expériences ont été réalisées sur les lignées mutantes *larp6c-3* et *larp6c-4* et montrent des résultats similaires (Tableau 1A). Dans les deux cas, l'absence de la protéine LARP6c n'a aucun impact sur la transmission du gamète femelle avec des efficacités de transmission proches de 100%. Cependant, la mutation de *LARP6c* affecte la transmission du gamète mâle avec des efficacités de transmission de 74,10% (*larp6c-3*) et 68,16% (*larp6c-4*). Afin de confirmer que le phénotype observé est bien dû à l'absence de la protéine LARP6c, la transmission des gamètes mâles de deux lignées exprimant la construction LARP6c-RFP dans un fond mutant *larp6c-3* a été testée. Les résultats présentés dans le tableau 1B montrent que l'efficacité de transmission des pollens mutants,



**Figure 73: Principe des tests de transmission**

L'exemple donné ici montre le croisement réalisé lors d'un test de transmission mâle, où 50% du pollen de départ est sauvage contre 50% mutant ou exprimant une construction de LARP6c associée à une étiquette. Lors de la fécondation entre du pollen issu d'une plante hétérozygote et le pistil d'une plante sauvage, on s'attend, s'il n'y a pas de défaut de transmission du pollen muté/complémenté, à une descendance composée à 50% d'individus sauvages et à 50% d'individus hétérozygotes. L'efficacité de transmission est ensuite calculé selon la formule : (effectif mutant / effectif sauvage) x 100. Photos : plantule, ©Mark Talbot et grain de pollen, ©Jürgen Berger/ Heiko Schoof.

<b>A</b>							
Génotype	Transmission testée	Femelle x Mâle	Individus F1	Efficacité de transmission	Effectif théorique	Effectif mutant	P Value
<i>larp6c-3</i>	Mâle	Col0 x <i>larp6c-3</i> (-/+)	827	74,10%	413,5	352	0
	Femelle	<i>larp6c-3</i> (-/+) x Col0	641	>100%	320,5	321	0,97
<i>larp6c-4</i>	Mâle	Col0 x <i>larp6c-4</i> (-/+)	1051	68,16%	525,5	426	0
	Femelle	<i>larp6c-4</i> (-/+) x Col0	1147	96,74%	573,5	564	0,57

<b>B</b>							
Génotype	Transmission testée	Femelle x Mâle	Individus F1	Efficacité de transmission	Effectif théorique	Effectif mutant	P Value
<i>LARP6c-RFP(+/+); larp6c-3(-/-)</i> (lignée 134)	Mâle	Col0 x <i>LARP6c-RFP(+/-); larp6c-3(-/-)</i>	401	92,79	220,5	193	0,45
<i>LARP6c-RFP(+/+); larp6c-3(-/-)</i> (lignée 136)	Mâle	Col0 x <i>LARP6c-RFP(+/-); larp6c-3(-/-)</i>	402	85,25	201	185	0,11

**Tableau 1: Test de transmission en lignées mutantes et étiquetées**

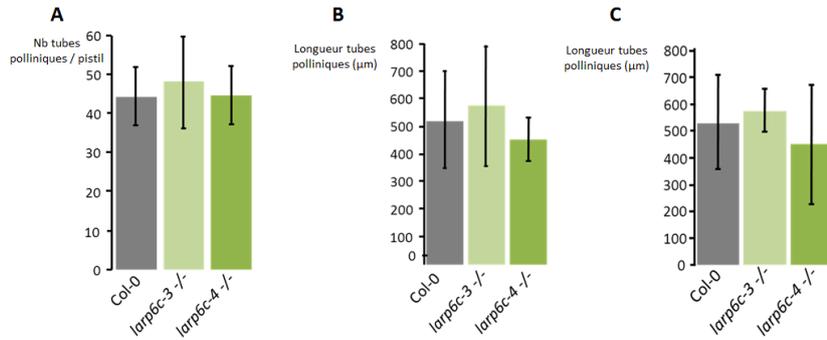
A : Tests de transmissions mâles et femelles en lignées mutantes *larp6c-3* et *larp6c-4*.

B : Tests de transmissions mâles et femelles en lignées mutantes *larp6c-3* exprimant la version étiquetée de la protéine. Dans ce cas, les effectifs mutants correspondent aux descendants possédant la mutation *larp6c-3* et n'exprimant pas le transgène. Les effectifs théoriques calculés correspondent à la transmission attendue en cas d'absence de défaut de transmission (50%). P-Value (à 2 décimales) calculée à partir du test du  $\chi^2$ . Efficacité de transmission : (effectif mutant / effectif sauvage) x 100.

donc n'exprimant pas la version transgénique de LARP6c, possèdent, respectivement, une efficacité de transmission de 92,79% et 85,25% dans deux lignées indépendantes (n°134 et 136). Ceci indique qu'il n'y a pas de différence significative d'efficacité de transmission entre un pollen exprimant le transgène ou ne l'exprimant pas. On constate, d'autre part, que l'efficacité de transmission du pollen mutant a tendance à être en deçà des 100%. Ceci suggère que la présence du transgène interviendrait, tout de même, partiellement dans la complémentarité de la mutation *larp6c-3*. Le phénotype observé suite à la délétion de LARP6c semble, quant à lui, convaincant étant donné qu'il est reproductible dans deux lignées mutantes indépendantes. Cependant, ces expériences ne permettent pas de déterminer de manière précise quelle étape de la fécondation est affectée par cette mutation. Or, on sait qu'à partir de l'étape « pollen mature », il reste plusieurs étapes clés pouvant affecter la fécondation telles que : (i) l'adhésion, l'hydratation et la germination du pollen, (ii) l'élongation et la croissance dirigée du tube pollinique vers l'ovule, (iii) la transmission des cellules spermatiques dans l'ovule, par exemple. Nous avons donc testé la capacité du pollen mutant *larp6c-3* et/ou *larp6c-4* à réaliser ces différentes étapes.

### II.5.3 LARP6c et la croissance du tube pollinique

La capacité du pollen à cibler les ovules à féconder constitue une étape déterminante dans la fécondation. Cette étape est déterminée par la formation d'un tube pollinique capable de déposer les cellules spermatiques au sein du sac embryonnaire (cf. IV.3. De la germination du tube pollinique à la fécondation). Les premières expériences menées ont donc consisté à vérifier si le pollen dépourvu de LARP6c était capable de former correctement un tube pollinique. Des analyses de germination du pollen en condition semi *in vivo* ont été réalisées sur des pistils issus de plantes *ms1* (*male sterility 1*). Cette lignée mutante ne forme pas de pollen et représente un outil très utile lors de l'analyse de la fertilité. En effet, elle permet l'obtention de pistils matures non fécondés directement utilisables pour réaliser les tests de germination ou fécondation. Les résultats montrent qu'en termes de quantité de tubes polliniques capables de germer semi *in vivo*, le pollen mutant ne présente pas de différence significative par rapport à un pollen sauvage (Figure 74A). D'autre part, l'analyse de tubes polliniques germés semi *in vivo* et *in vitro* (respectivement Figure 74B et C) révèle que la mutation étudiée n'affecte pas la longueur du tube pollinique quelle que soit la lignée mutante observée. Ces résultats montrent donc que la mutation de *LARP6c*, bien

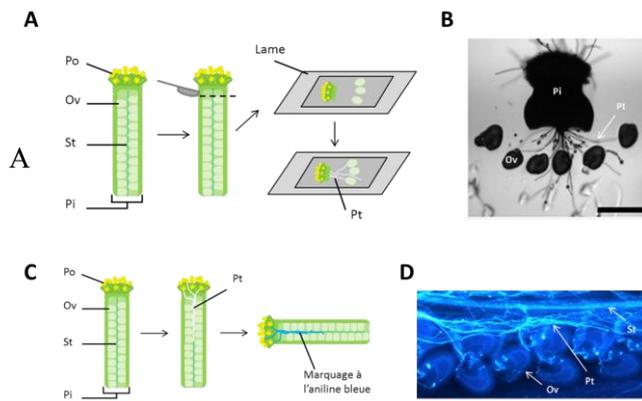


**Figure 74: Effet des mutations *tarp6c* sur la croissance du tube pollinique**

A : densité de tubes polliniques par pistil semi *in vivo*.

B - C: longueur des tubes polliniques *in vitro* (C) et semi *in vivo* (B).

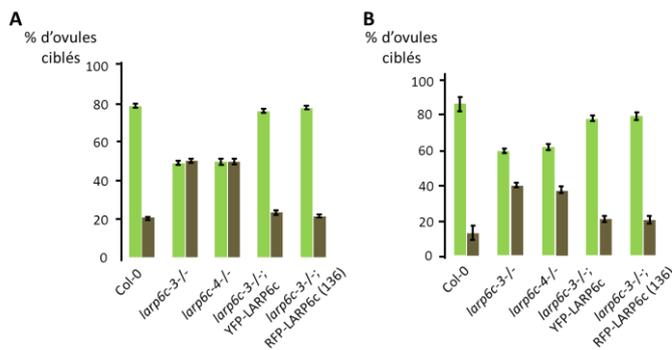
A: Pistil issus de plantes *ms1*. *Col-0* : n= 51, *tarp6c-3* : n=44, *tarp6c-4* : n=45. B : Pistil issu de plantes *ms1* (ttest = 0,196). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type dans la population.



**Figure 75: Principe des expériences testant la croissance dirigée des tubes polliniques vers les ovules**

: Schéma de la méthode employée pour tester la capacité des tubes polliniques à cibler les ovules semi *in vivo*. La partie supérieure du pistil (Pi), préalablement inoculée avec du pollen, a été découpée puis placée sur milieu de culture solide. Les ovules (Ov) sont disposés en arc de cercle

sous le fragment de pistil afin de stimuler la croissance des tubes polliniques (Pt). B: Micrographie de tubes polliniques en germination semi *in vivo*\*. Echelle : 30 µm. C: Schéma de la méthode employée pour tester la capacité des tubes polliniques à cibler les ovules *in vivo*. Les grains de pollen déposés sur le pistil émettent leur tube pollinique (Pt) qui longe le style (St) afin d'atteindre les ovules (Ov), un marquage à l'aniline bleue permet la visualisation. D: Micrographie de tubes polliniques en germination *in vivo* marqués à l'aniline bleue \*. \*Réalisé par Saïd Hafidh, Laboratory of Pollen Biology, République Tchèque).



**Figure 76: Test de la capacité du tube pollinique à cibler l'ovule par analyses semi *in vivo* et *in vivo***

La capacité du tube pollinique à cibler l'ovule est testée pour le pollen issu des lignées *Col-0* (contrôle), des lignées mutantes *tarp6c-3*, *tarp6c-4* et la lignée *tarp6c-3* comprenant différentes versions étiquetées de LARP6c. Les tube

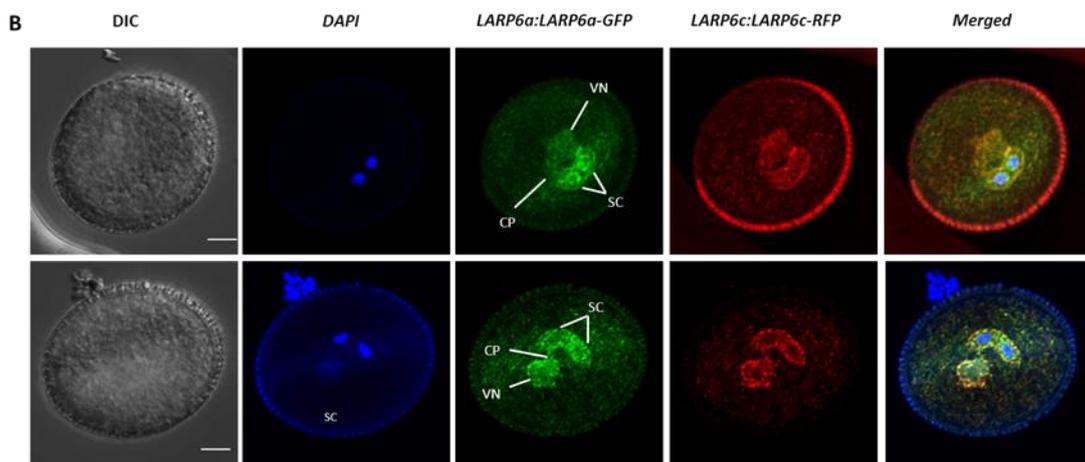
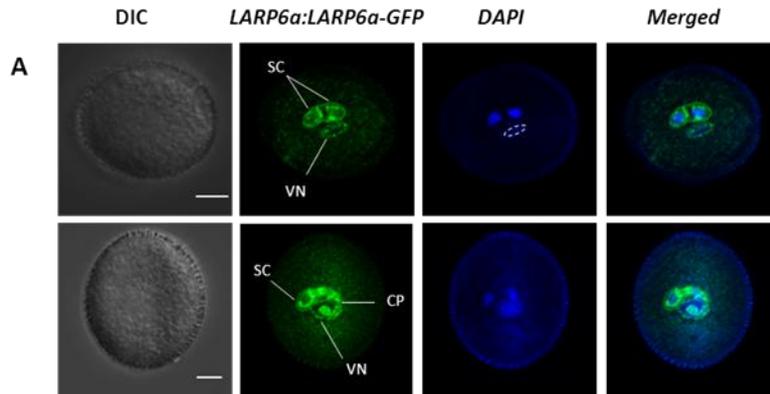
polliniques sont mis à germer semi *in vivo* (n>46) (A), ou *in vivo* où ils sont, dans ce cas, marqués à l'aniline bleue (B). Dans les deux cas, la figure représente la proportion d'ovules ciblés (barre verte, première barre) ou non (barre marron, deuxième barre) par le pollen après un croisement entre ovules *ms1* et pollen des différentes lignées testées. Les lignées complémentées correspondent aux insertions suivantes : *tarp6c-3*;YFP-LARP6c : lignée 1930; *tarp6c-3*;RFP-LARP6c: lignée 136.

qu'affectant la fertilité mâle, n'a pas d'impact sur la capacité du pollen à germer (semi *in vivo*), ni sur la croissance des tubes polliniques (semi *in vivo* et *in vitro*). Cette mutation affecte donc probablement un autre paramètre de la fécondation, côté mâle.

#### II.5.4 LARP6c et la reconnaissance de l'ovule par le tube pollinique

Lors de la fécondation, le pollen germé a pour rôle de déposer le matériel génétique mâle au sein de l'ovule. Pour cela, le pollen germe et le tube pollinique subit une croissance dirigée en direction de l'ovule (IV. 3. De la germination du tube pollinique à la fécondation). L'hypothèse d'un rôle de LARP6c dans cette étape de la fécondation a été testée. Pour cela, des expériences visant à tester la capacité du tube pollinique à croître vers l'ovule, semi *in vivo* et *in vivo* (Figure 75), ont été réalisées entre le pollen issu des lignées mutantes et des ovules issus de plantes *ms1*. L'analyse semi *in vivo* (Figure 76A) montre que le pollen sauvage (Col-0) est capable de cibler près de 80% des ovules, contre seulement 50 % pour les lignées *larp6c-3* et *larp6c-4*. Ces résultats indiquent que les lignées dépourvues de LARP6c possèdent un pollen moins apte à cibler les ovules que le pollen sauvage. Ceci suggère un rôle de LARP6c dans le guidage du tube pollinique vers l'ovule. Afin de déterminer si le défaut observé est spécifiquement lié à la perte de LARP6c, des tests de complémentations ont été réalisés. Lors des tests de complémentations des phénotypes observés, précédemment, en tests de transmission (II. 5. 2 LARP6c et la fertilité mâle chez *Arabidopsis thaliana*), aucune des deux lignées *larp6c-3*<sup>-/-</sup> ; *LARP6c-RFP* (n°134 et 136) n'a permis de restaurer un phénotype sauvage, ne montrant qu'une faible complémentation de la fonction de LARP6c. Les analyses de complémentations ont donc, dans ce cas, été réalisées avec l'une des lignées utilisées plus tôt mais aussi avec une lignée *larp6c-3*<sup>-/-</sup>; *YFP-LARP6c* (n°1930). L'utilisation de cette lignée permet de vérifier l'importance de la forme tronquée présente dans la lignée exprimant LARP6c-RFP et de la position de l'étiquette sur la protéine LARP6c . Les résultats montrent que l'ajout d'une version étiquetée de LARP6c dans ces lignées mutantes restaure une proportion d'ovules ciblés similaire à celle observée dans la lignée sauvage (env. 80%).

De plus, ces résultats ont été confirmés *in vivo* par visualisation de la pénétration des tubes polliniques dans le style jusqu'aux ovules, 18 heures après pollinisation manuelle d'un pistil *ms1*. Le marquage au bleu d'aniline permet de visualiser, et donc de compter, les



**Figure 77: Localisation subcellulaire des protéines LARP6a et LARP6c dans le pollen mature**

A : Localisation subcellulaire de la protéine LARP6a-GFP en pollen mature montrant le marquage des cellules spermatiques (SC), du noyau végétatif (VN) et de la projection cytoplasmique (CP).

B : Co-localisation entre la protéine LARP6c-RFP et la protéine LARP6a-GFP en pollen mature.

Barre d'échelle : 5  $\mu$ m.

tubes polliniques parvenant à entrer en contact avec les synergides de l'ovule et déverser leur contenu dans le sac embryonnaire. Les résultats sont présentés dans la figure 76B et montrent environ 85% d'ovules ciblés par les tubes polliniques sauvages contre environ 60% pour le pollen issu des lignées *larp6c-3* ou *larp6c-4*. Là encore, l'utilisation des lignées complémentées restaure un pourcentage d'ovules ciblés proche des 80% observés dans le cas du pollen sauvage.

Ces résultats montrent que la protéine LARP6c est impliquée dans la croissance dirigée du tube pollinique en direction de l'ovule. Or, nous avons mis en évidence, dans le paragraphe précédent, l'absence d'impact de la délétion de la protéine LARP6c sur la croissance du tube pollinique. Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle de LARP6c dans le guidage de la croissance du tube pollinique en direction des ovules, qui passe par une communication poussée entre mâle et femelle.

### **II.5.5 Le rôle de LARP6a dans la fertilité mâle**

Les observations réalisées montrent l'importance de LARP6c dans la communication entre le pollen et l'ovule lors de la fécondation. Cependant, il existe dans le pollen une deuxième protéine de la sous-famille LARP6 : LARP6a. Bien que cette protéine ne possède pas le motif PAM2, elle contient le module LA (motif LA + RRM-L3) capable de lier l'ARN *in vitro*.

Dans un premier temps, nous avons souhaité analyser la localisation de LARP6a dans le pollen, et notamment, sa co-localisation avec LARP6c. Les résultats montrent que LARP6a-GFP co-localise avec LARP6c, au moins partiellement, au niveau du contour des cellules spermatiques et de la projection cytoplasmique, même si certains agrégats cytoplasmiques semblent être spécifiques de LARP6a (Figure 77). Ainsi, nous avons voulu établir si les protéines LARP6a et LARP6c effectuent des fonctions redondantes dans le processus de fertilité mâle.

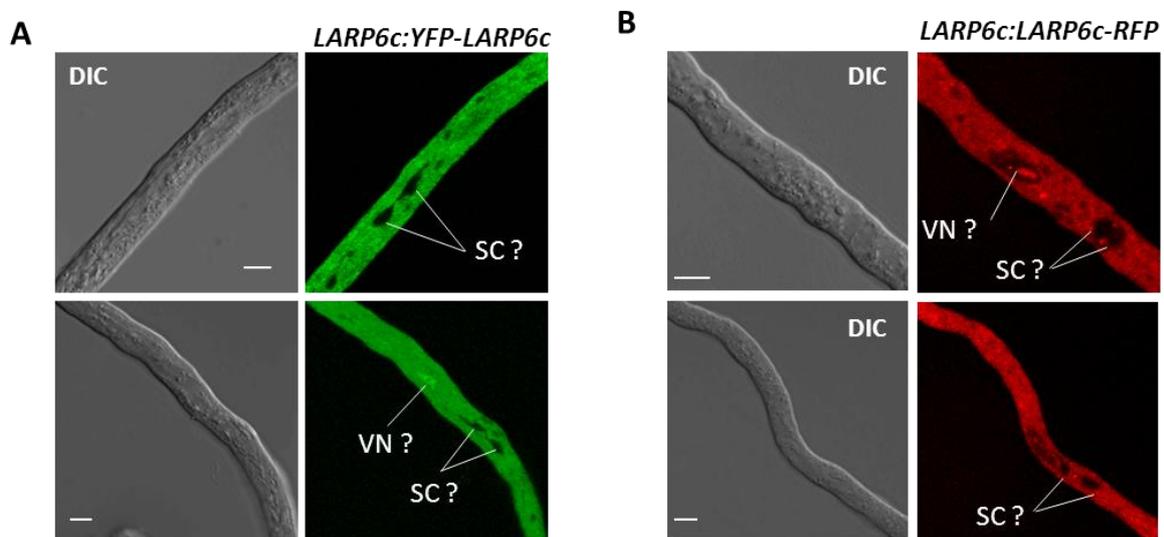
Dans un second temps, il nous a semblé intéressant de vérifier si : (i) la délétion de LARP6a a un impact sur la fertilité mâle, mais aussi si (ii) la délétion à la fois de LARP6c et de LARP6a a pour effet d'augmenter le phénotype observé dans les lignées simples *larp6c-3* et *larp6c-4*. Pour cela, des tests de transmission ont été réalisés sur des plantes possédant la double mutation (*larp6a-1 ; larp6c-3*). La première étape a consisté à vérifier

Génotype	Transmission testée	Femelle x Mâle	Individus F1	Efficacité de transmission	Effectif théorique	Effectif mutant	P Value
<i>larp6a-1</i>	Mâle	Col0 x <i>larp6a-1</i> (-/+)	973	95,38	486,5	475	0,46
<i>larp6a-1/larp6c-3</i>	Mâle	Col0 x <i>larp6a-1</i> (-/-), <i>larp6c-3</i> (-/+)	634	82,71	317 269,83 *	287	0,02 0,17

**Tableau 2: Test de transmission en lignées mutante *larp6a-1* et double mutante (*larp6c-3/larp6a-1*)**

Tests de transmission mâle réalisés sur du pollen issu d'une lignée mutante *larp6a-1* ou double mutante *larp6a-1* (-/-) et *larp6c-3* (-/+). L'effectif théorique calculé correspond à la transmission attendue en cas d'absence de défaut de transmission (50%). L'effectif théorique marqué d'un astérisque correspond à l'effectif d'individus mutants attendu dans le cas d'un défaut de transmission similaire à celui observé chez *larp6c-3*. P-Value (à 2 décimales) calculée à partir du test du  $\chi^2$ .

Efficacité de transmission : (effectif mutant / effectif sauvage) x 100.



**Figure 78: Localisation subcellulaire des protéines LARP6c et LARP6a dans le tube pollinique**

Localisation subcellulaire en tube pollinique des protéines YFP-LARP6c (A), LARP6c-RFP (B). SC: cellule spermatique, VN : noyau végétatif. Barre d'échelle : 5  $\mu$ m.

l'impact de la perte de LARP6a sur la fertilité du pollen. Le pollen issu d'une plante hétérozygote pour la mutation *larp6a-1* a été utilisé pour féconder un pistil sauvage. Les résultats présentés dans le tableau 2, montrent que la mutation *larp6a-1* n'a pas d'impact significatif sur la fertilité mâle avec une efficacité de transmission de 95 %. Ces résultats se confirment lors des tests de transmission réalisés avec du pollen hétérozygote pour la mutation *larp6c-3* et homozygote pour la mutation *larp6a-1*. En effet, les résultats présentés dans le tableau 2 montrent que ce pollen présente une efficacité de transmission de 82,71% ce qui est significativement différent d'une transmission à 100%, mais qui est comparable au taux de transmission observé pour le pollen simple mutant *larp6c-3*. Ceci vient confirmer les résultats présentés précédemment et indique qu'il ne semble pas y avoir de redondance fonctionnelle entre LARP6a et LARP6c, au moins en ce qui concerne la fertilité mâle.

### **II.5.6 Localisation de LARP6c dans le tube pollinique ?**

Etant donné le rôle de la protéine LARP6c dans la croissance dirigée du tube pollinique lors de la fécondation, il est important de s'intéresser à la localisation subcellulaire de la protéine dans le tube pollinique. Pour cela, les lignées LARP6c:YFP-LARP6c et LARP6c:LARP6c-RFP ont été utilisées. Il a été montré précédemment que la région promotrice utilisée dans ces lignées est probablement incomplète par rapport au promoteur endogène. Cependant, les observations précédentes montrent aussi que cette région promotrice permet l'expression dans la cellule végétative, or c'est bien une expansion cytoplasmique de la cellule végétative qui forme lors de la germination du pollen, le tube pollinique. Ainsi, l'observation de la localisation de LARP6c dans le tube pollinique n'est autre qu'une observation de localisation subcellulaire. Il est donc improbable que le biais au niveau de la région promotrice des constructions affecte cette localisation. Afin d'obtenir des tubes polliniques, les grains de pollen de ces lignées sont mis à germer *in vitro* sur un milieu de germination puis observés au microscope confocal. Les résultats, présentés dans la figure 78A, montrent la présence de la protéine YFP-LARP6c dans le cytoplasme du tube pollinique de manière homogène. Au sein du cytoplasme, on remarque, au niveau de deux structures relativement circulaires, l'absence de signal correspondant à YFP-LARP6c. Ces deux structures pourraient correspondre aux cellules spermatiques. De plus, on constate une légère accumulation du signal à proximité des cellules spermatiques,

Génotype	Individus F1	Effectif mutants		% observé	P value
		Théorique	Observé		
<i>larp6c-3</i>	2269	1701,75	1712	75,45	0,62
<i>larp6c-4</i>	692	519	519	75,00	1

Génotype	Individus F1	Effectif mutants		% observé	P value
		Théorique	Mutant		
<i>larp6c-3</i>	309	231,75	208	67,31	0
<i>larp6c-4</i>	436	327	295	67,66	0

**Tableau 3: Analyse de la ségrégation des lignées mutantes *larp6c***

Description des effectifs possédant ou non l'ADN-T de la lignée mutante *larp6c* dans la descendance de plantes hétérozygotes pour l'ADN-T auto-fécondées par auto-pollinisation (A) ou par pollinisation manuelle (B). L'effectif théorique calculé correspond à la transmission attendue du T-DNA en cas d'absence de défaut de transmission (75%). P Value (à 2 décimales) calculées à partir du test du  $\chi^2$ .

ce qui pourrait indiquer la présence de LARP6c dans le noyau végétatif. On voit, ici, que la protéine LARP6c ne présente plus d'accumulation au niveau des cellules spermatiques et ne forme plus de granules dans le cytoplasme du tube pollinique où elle se trouve répartie de manière homogène.

### **Conclusions :**

Les analyses phénotypiques présentées dans cette partie montrent l'importance de LARP6c dans la fertilité mâle. En effet, la délétion de cette protéine entraîne un défaut de transmission des gamètes mâle à la descendance. La recherche d'un tel phénotype pour la protéine LARP6a, elle aussi exprimée dans le pollen, montre qu'il n'y a pas de redondance entre ces deux protéines pour cette fonction. Ceci a donc permis de poursuivre les expériences visant à affiner la fonction de LARP6c. Mis à part, l'impact de faible intensité de la délétion de LARP6c sur la maturation du pollen, cette protéine intervient dans le tube pollinique où elle présente une localisation cytoplasmique homogène. L'absence de la protéine n'affecte cependant pas la capacité du tube pollinique à croître mais plus particulièrement sa capacité à cibler l'ovule. Ces résultats expliquent le rôle de LARP6c dans la fertilité mâle et suggèrent un lien avec la communication mâle/femelle nécessaire à la fécondation.

## **II.6. Rôle de LARP6c en conditions de stress**

### **II.6.1 Le phénotype de *larp6c* n'est pas visible en autofécondation.**

L'observation de la transmission du pollen mutant pour la protéine LARP6c montre le rôle de cette protéine dans la fertilité mâle. Etonnamment, l'effet de LARP6c sur la fertilité mâle n'est pas visible en condition d'autofécondation. En effet, si l'on considère l'impact de la mutation sur la fertilité mâle, l'ADN-T devrait ségréger de manière non-mendélienne dans le cas d'un individu hétérozygote, le pourcentage d'individus possédant l'ADN-T étant alors inférieur à 75%. Les résultats de la ségrégation des allèles dans la descendance d'une plante hétérozygote montrent des proportions comparables aux valeurs mendéliennes théoriques (75%) pour les deux lignées mutantes avec 75,45% pour *larp6c-3* (pvalue : <0.8) et 75% pour *larp6c-4* (pvalue : 1) (Tableau 3A).

Alors que l'autofécondation ne montre pas de biais de transmission, les tests de transmission, eux, révèlent un biais de transmission. La principale différence existant entre ces deux expériences concerne la méthode de croisement. En effet, dans le cas des tests de transmission, la fécondation est manuelle : une fleur est émasculée, ne laissant que le pistil non fécondé, afin de venir y déposer du pollen issu d'une fleur ouverte. Dans le cas des tests de ségrégation, la fécondation se fait sans intervention du manipulateur, et donc par autofécondation au sein d'une même fleur. On peut donc émettre l'hypothèse que le biais observé est révélé par des conditions de fécondation « non idéales », et entraînant donc un « stress ». En effet, lors d'un croisement manuel, la fleur subit un stress mécanique lié à l'émasculature. D'autre part, la fleur ne possédant plus de pétale et sépale, la fécondation ne se fait plus dans un espace clos affectant ainsi très probablement l'hygrométrie autour du pistil pendant la fécondation. Un autre biais important lors d'une fécondation manuelle concerne la synchronisation de la fleur. Lors d'une autofécondation, les différents organes de la fleur se synchronisent afin de favoriser au maximum le succès de la reproduction. Lors d'un croisement manuel, le pistil utilisé est encore immature (nécessité d'avoir un pistil non pollinisé) alors que le pollen, quant à lui, est mature depuis au minimum quelques heures étant donné qu'il provient d'une fleur ouverte et déjà fécondée.

Tous ces stress provoqués par la manipulation pourraient faire ressortir le défaut de transmission lié à la mutation *larp6c*, expliquant ainsi pourquoi un phénotype est observé par test de transmission mais pas par analyse de ségrégation. Afin de vérifier cette hypothèse, des tests de ségrégations ont été réalisés manuellement par le croisement de plantes hétérozygotes sur elles-mêmes. Les résultats présentés dans le tableau 3B montrent un pourcentage d'individus F1 possédant l'allèle mutant de 67,31% (pvalue : <0.05) pour la lignée *larp6c-3* et 67,66% (pvalue : <0,025) pour la lignée *larp6c-4* contre les 75% observés précédemment. Ces observations confirment donc que la fécondation réalisée dans des conditions « non idéales » met en évidence un biais dans la transmission du pollen qui est masqué lors d'une fécondation par auto-pollinisation.

### **II.6.2 Le phénotype de *larp6c* est augmenté en conditions de stress.**

Comme indiqué précédemment, il semblerait que les stress engendrés par la manipulation lors des croisements révèlent le phénotype lié à l'absence de la protéine LARP6c. Ainsi, on peut se demander si l'application d'un stress, tel que le stress thermique, pourrait avoir le

**A**

Génotype	Individus F1	Effectif mutants		% observé	P value
		Théorique	Observé		
<i>larp6c-3</i>	194	145,5	142	73,20	0,56
<i>larp6c-4</i>	202	151,5	149	73,76	0,68

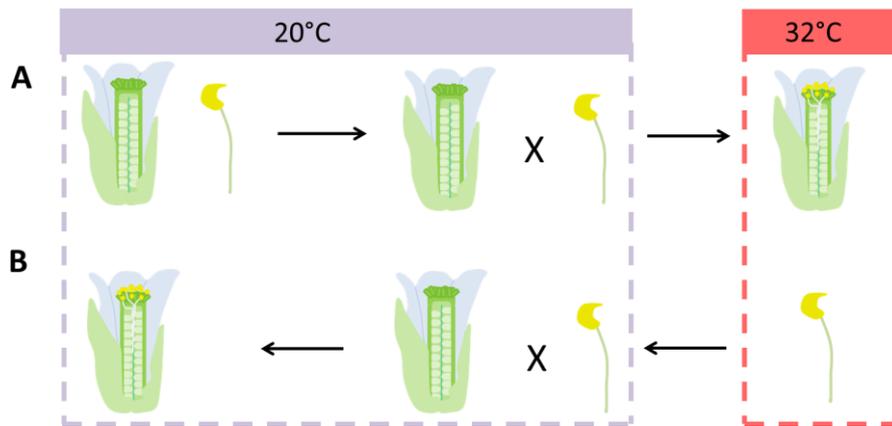
  

**B**

Génotype	Individus F1	Effectif mutants		% observé	P value
		Théorique	Observé		
<i>larp6c-3</i>	483	362,25	329	68,12	0
<i>larp6c-4</i>	446	334,5	319	71,52	0,09

**Tableau 4: Analyse par ségrégation des lignées mutantes *larp6c* en condition de stress thermique**

Description des effectifs possédant ou non l'ADN-T de la lignée mutante *larp6c* dans la descendance de plantes hétérozygotes pour l'ADN-T. La descendance est obtenue après auto-fécondation par auto-pollinisation à 20°C (A) ou à 32°C (B). L'effectif théorique calculé correspond à la transmission attendue du T-DNA en cas d'absence de défaut de transmission (75%). P Value (à 2 décimales) calculées à partir du test du Khi<sup>2</sup>.



**Figure 79: Principe des stress thermiques réalisés sur des croisements**

A : Schéma de la méthode employée pour tester l'impact d'un stress thermique sur les étapes d'hydratation, croissance du tube pollinique, et fécondation lors d'un croisement.

B: Schéma de la méthode employée pour tester l'impact d'un stress thermique sur les étapes de maturation du pollen.

même impact sur la fécondation réalisée par auto-pollinisation et ainsi mettre en avant le rôle de LARP6c en conditions de stress environnemental. Afin de tester cette hypothèse, des plantes hétérozygotes pour la mutation *larp6c-3* ou *larp6c-4* ont été cultivées en conditions classiques avant d'être transférées à 32°C (condition de stress thermique n'inhibant pas totalement la fécondation) pour une durée de 45h. Les plantes utilisées comme contrôles restent en conditions normales de culture (20°C). Après la formation des siliques, celles-ci sont récoltées afin d'analyser les proportions d'individus de la descendance possédant l'ADN-T. Les résultats présentés dans le tableau 4 montrent, pour les deux lignées mutantes en condition contrôle, une proportion d'individus possédant l'ADN-T d'environ 73% ce qui n'est pas statistiquement différent des 75% théoriques. En revanche, ce pourcentage descend à 68,12% et 71,52% pour les lignées *larp6c-3* et *larp6c-4*, respectivement, pour les plantes exposées au stress thermique (valeurs statistiquement différentes de la condition contrôle, *larp6c-3* : <0,05, *larp6c-4* : <0,1). Ceci indique que, dans les conditions naturelles de fécondation (auto-fécondation par auto-pollinisation), l'impact de l'absence de LARP6c est révélé en condition de stress thermique. Ainsi, le rôle de LARP6c semblerait plus important en condition de stress.

L'impact du stress thermique a ensuite été testé lors de croisements manuels afin de vérifier si l'addition du stress thermique augmente l'effet observé précédemment lors des tests de transmission. Pour cela, deux types de stress ont été réalisés dont le principe est représenté dans la figure 79. Le premier vise à affecter la fécondation, depuis la germination du pollen sur le stigmate jusqu'à la formation de la silique. Pour cela, les plantes cultivées en conditions classiques sont croisées avant d'être immédiatement transférées à 32°C pour 44h. Le deuxième stress, quant à lui, vise à affecter la maturation du pollen avant fécondation. Pour cela, des plantes incubées pendant 44h à 32°C sont croisées avant d'être incubées immédiatement en conditions normales. Les plantes contrôles sont cultivées et croisées à 20°C. Ces analyses (Tableau 5) n'ont pas permis d'obtenir de résultats clairs et soutenus pour la lignée *larp6c-4*, la quantité de graines analysées étant trop faible dans deux des trois conditions testées. Concernant la lignée *larp6c-3*, les résultats montrent une efficacité de transmission de 60% en conditions contrôles (Tableau 5A) ce qui reproduit le phénotype déjà observé. Lorsque la fécondation est réalisée à 32°C, on voit que l'efficacité de transmission chute de manière très importante à seulement 28% (Tableau 5B). Ceci confirme l'impact du stress thermique sur

<b>A</b>							
Génotype	Transmission testée	Femelle x Mâle	Individus F1	Efficacité de transmission	Effectif théorique	Effectif mutant	P Value
<i>larp6c-3</i>	Mâle	Col0 x <i>larp6c-3</i> (-/+)	64	60	32 27,24*	24	0,05 0,41
<b>B</b>							
Génotype	Transmission testée	Femelle x Mâle	Individus F1	Efficacité de transmission	Effectif théorique	Effectif mutant	P Value
<i>larp6c-3</i>	Mâle	Col0 x <i>larp6c-3</i> (-/+)	96	28	48 40,86*	21	0 0
<b>C</b>							
Génotype	Transmission testée	Femelle x Mâle	Individus F1	Efficacité de transmission	Effectif théorique	Effectif mutant	P Value
<i>larp6c-3</i>	Mâle	Col0 x <i>larp6c-3</i> (-/+)	201	39,58	100,5 85,54*	57	0 0
<i>larp6c-4</i>	Mâle	Col0 x <i>larp6c-4</i> (-/+)	116	41,46	58 49,37*	34	0 0

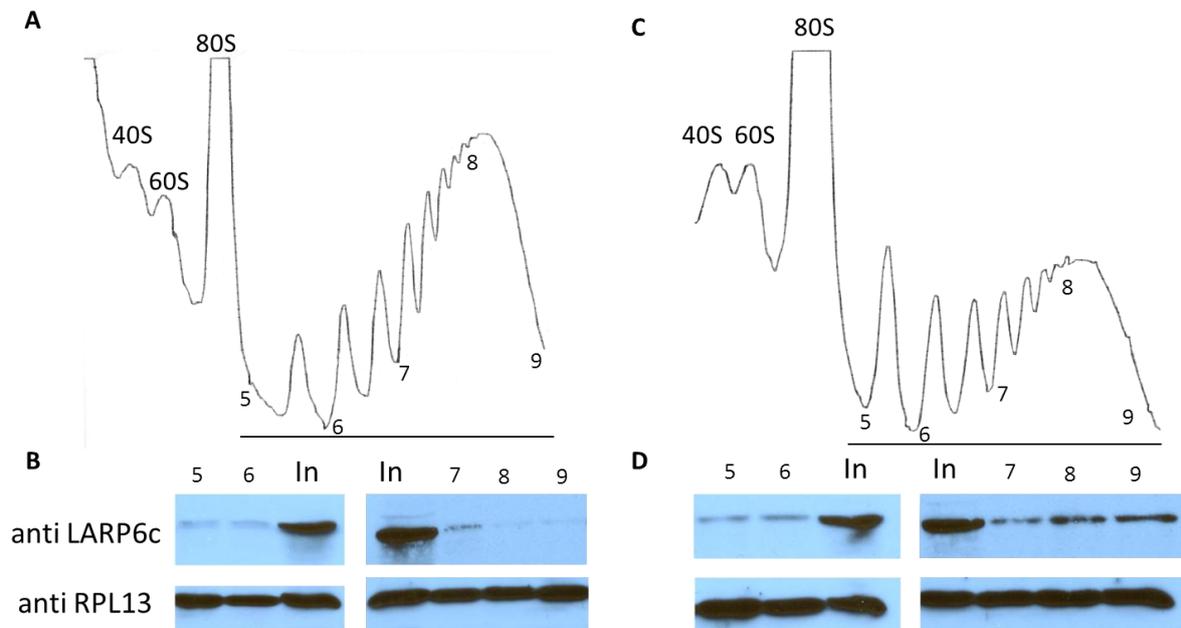
**Tableau 5: Test de transmission mâle en lignées mutantes en conditions de stress thermique**

Test de transmission mâle et femelle en lignées mutantes *larp6c-3* et *larp6c-4* à 20°C (A), à 32°C (B), ou à 20°C le pollen ayant subi préalablement un stress à 32°C (C). L'effectif théorique calculé correspond à la transmission attendue en cas d'absence de défaut de transmission (50%). L'effectif théorique marqué d'un astérisque correspond à l'effectif d'individus mutants attendu dans le cas d'un défaut de transmission similaire à celui observé chez *larp6c-3*. P Value (à 2 décimales) calculée à partir du test du  $\chi^2$ . Efficacité de transmission : (effectif mutant / effectif sauvage) x

la transmission des gamètes mâles *larp6c-3*. Lorsque l'on s'intéresse à l'impact du stress thermique sur la maturation du pollen avant fécondation, on constate des efficacités de transmission de 39,58% et 41,46% pour *larp6c-3* et *larp6c-4* respectivement (Tableau 5C). Ces valeurs sont statistiquement soutenues et indiquent un défaut de transmission supérieur à celui observé dans le mutant non exposé au stress. Ceci va de pair avec l'effet de l'absence de LARP6c observé lors des analyses phénotypique de la maturation du pollen. L'ensemble de ces résultats montre que la perte de LARP6c dans le pollen a un impact plus important lors d'un stress thermique et affecte aussi bien la maturation du pollen que la fécondation, avec cependant un impact plus fort sur les étapes de fécondations (de la germination du pollen à la délivrance des cellules spermatiques dans l'ovule).

### II.6.3 Etude de LARP6c dans les polysomes en conditions de stress

Les résultats précédents semblent indiquer que les conditions de stress thermique exacerbent la nécessité d'avoir une protéine LARP6c fonctionnelle, et donc que cette protéine aurait un rôle important dans ces conditions. Lors d'une analyse précédente, LARP6c avait été identifiée, bien que présente en faible quantité, dans les fractions polysomales ; étant données les dernières informations obtenues, la question du devenir de LARP6c dans les fractions polysomales en conditions de stress thermique est posée. Ainsi, des analyses préliminaires ont été réalisées afin de tester l'impact d'un stress thermique de 2 heures à 35°C sur la présence de LARP6c dans les polysomes. La figure 80 reprend les résultats obtenus précédemment en conditions normales (Figure 80, A et B) et présente les résultats obtenus en termes de profil polysomal (Figure 80, C), ainsi que la détection de LARP6c dans les fractions contenant les polysomes (Figure 80, D) en condition de stress. Le profil polysomal permet de constater, qu'effectivement, la plante a mis en place une réponse au stress thermique étant donné la diminution de la quantité de polysomes. De plus, il semblerait que LARP6c soit détectée dans les fractions polysomales, et en plus grande quantité que lors de la condition non stressée. Bien que ces résultats préliminaires soient à considérer avec précautions, il semblerait qu'en condition de stress thermique, la protéine LARP6c soit relocalisée ou tout du moins maintenue dans les fractions polysomales.

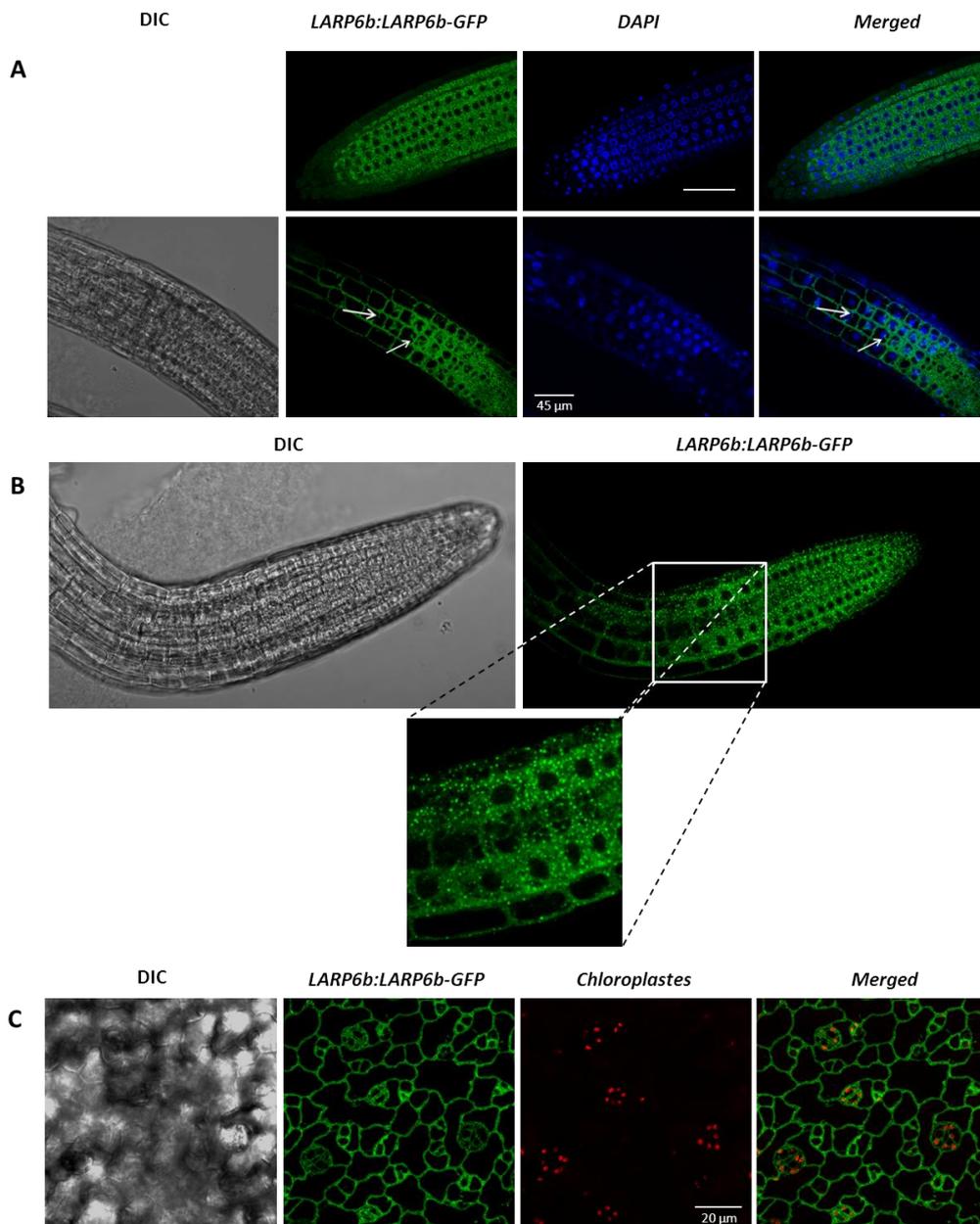


### Figure 80: Investigation de la présence de LARP6c dans les polysomes

Profils des polysomes en fleur issues de plantes *Col-0* à 22°C (A) et 35°C (C), les complexes sont séparés en fonction de leur poids (axe des abscisses), la proportion relative de chacun de ces complexes est représentée sur l'axe des ordonnées. La présence de LARP6c dans les fractions polysomales (soulignées par un trait noir) à 22°C (B) et 35°C (D) est testée par western blot. La détection de la protéine ribosomale RPL13 sert de contrôle positif. In = Input.

### **Conclusions :**

La délétion de LARP6c entraîne un défaut de fertilité mâle mis en évidence par une sous-représentation des individus possédant la mutation dans la descendance d'une plante hétérozygote. Ce défaut n'est, cependant, pas visible lors d'autofécondation de la plante hétérozygote sans intervention humaine. Il a été proposé que le phénotype observé soit augmenté, rendu visible ou bien induit par le stress subi par la plante lors des manipulations nécessaires à la réalisation des croisements. L'application de stress thermiques à 32°C sur la plante à différentes étapes, de la maturation à la fécondation, a permis de mettre en évidence que l'impact de l'absence de LARP6c est révélé en condition de stress. Des résultats très préliminaires montrent que LARP6c s'accumule dans les polysomes en condition de stress thermique (35°C). Ceci suggère un rôle de LARP6c dans la réponse au stress lors de la reproduction



**Figure 81: Localisation subcellulaire de LARP6b en racines et feuilles**

La localisation subcellulaire de la protéine LARP6b-GFP en racine (A, B) et en feuilles (C) les flèches mettent en évidence la présence de la protéine étiquetée au niveau des travées cytoplasmiques.

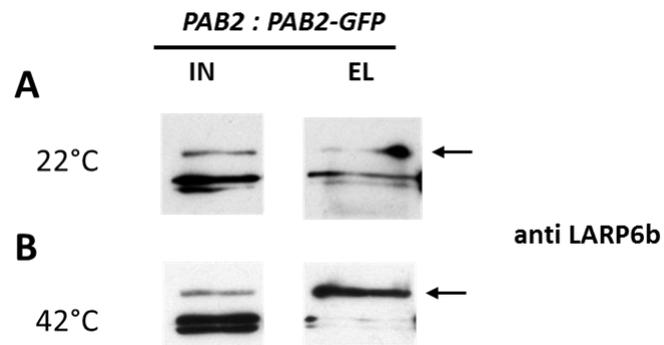
### III. Résultats complémentaires sur la protéine LARP6b.

Il a été montré que LARP6b et LARP6c sont deux protéines phylogénétiquement proches (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009; Merret et al., 2013b). En effet, ces deux protéines possèdent des motifs comparables et organisés de manière similaire (Figure 45). Cependant, *LARP6b* n'a pas de fonction connue et présente un profil d'expression distinct et complémentaire à celui de *LARP6c*. Comme indiqué précédemment dans les figures 41 à 43, le gène codant la protéine LARP6b est exprimé quasi exclusivement dans les tissus sporophytiques (bases de données, Winter et al., 2007, et publication, Honys & Twell, 2004) et RT-PCR, respectivement). L'analyse de l'expression du promoteur à l'aide de constructions GUS a montré l'absence d'expression dans les tissus gamétophytiques (cf. I.1.2 Analyse des régions promotrices des gènes *LARP6b* et *LARP6c*). De plus, l'analyse du profil d'expression de la protéine LARP6b par western blot montre une expression dans les racines, la tige, les tissus aériens de rosette, les feuilles caulinaires, la fleur mais pas dans le pollen. Quelques expériences préliminaires ont été réalisées, en parallèle du travail sur LARP6c, afin d'obtenir informations sur la localisation subcellulaire et les partenaires de LARP6b.

#### III.1. LARP6b pourrait être impliquée dans une voie métabolique faisant intervenir une PAB.

##### III.1.1 Localisation subcellulaire de LARP6b

Etant donnée la faible quantité d'informations disponibles sur LARP6b, l'analyse de sa localisation subcellulaire pourrait permettre d'en apprendre plus sur sa fonction. Pour cela, les lignées possédant la construction LARP6b:LARP6b-GFP ont été observées au microscope confocal au niveau des feuilles et des racines. L'observation des racines, présentée dans la figure 81A et B, montre que LARP6b-GFP a une localisation cytoplasmique et est exclue du noyau. On peut voir que cette protéine marque les travées cytoplasmiques dans les cellules de racines. Une localisation similaire est observée au niveau des cellules de feuilles (Figure 81C), bien que le cytoplasme soit très restreint dans ce type cellulaire. On note, de plus, la présence de LARP6b-GFP dans le cytoplasme des



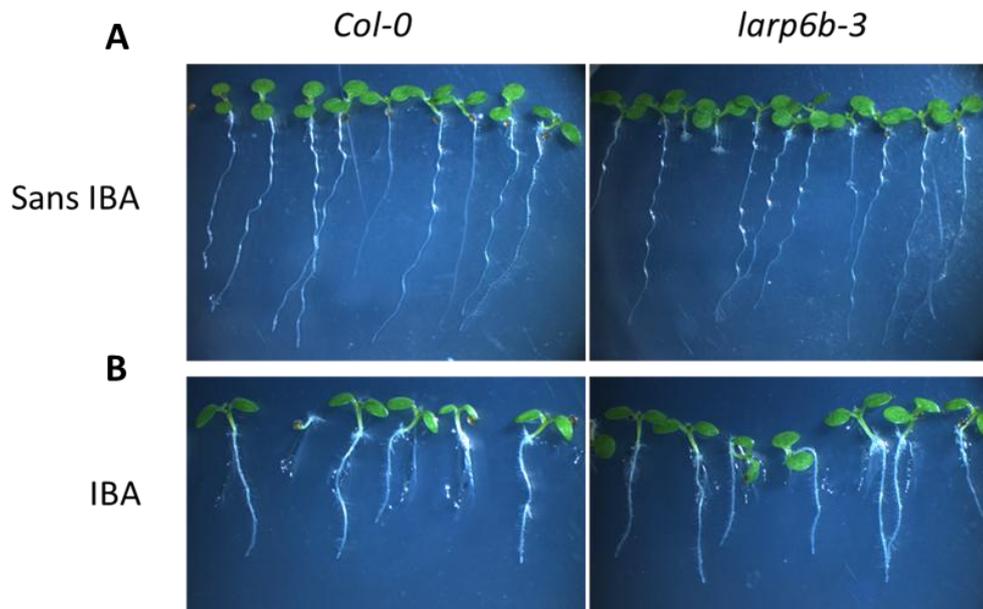
**Figure 82 : Test de l'interaction LARP6b / PAB2 par immunoprécipitation (IP)**

Immunoprécipitation de LARP6b (env. 80kDa) par la protéine PAB2-GFP en plantules à 22°C (A) et 42°C (B). IN : Input, EL : Eluat.

cellules de garde des stomates. Il est très intéressant de voir, en racines, et plus légèrement en feuilles, que LARP6b-GFP est capable de former des agrégats cytoplasmiques (Figure 81B). Ces agrégats n'étant pas présents systématiquement lors des observations, il est possible que leur formation soit causées par un stress dû à l'observation. Ces résultats indiquent donc que LARP6b-GFP est une protéine cytoplasmique capable de se relocaliser dans des agrégats cytoplasmiques potentiellement causés par un stress. Ceci n'est pas sans rappeler les localisations publiées en 2013 obtenues par expression transitoire de LARP6b en cellule d'oignon (Merret et al., 2013b). Il serait donc intéressant de poursuivre et préciser ces informations concernant la présence de LARP6b au sein d'agrégats subcytoplasmiques.

### III.1.2 Influence du stress sur l'interaction LARP6b/PAB2

D'après les résultats obtenus précédemment, *in vitro* et *in vivo* en système hétérologue, la protéine LARP6b est capable d'interagir avec le motif MLLE de la protéine PAB2 (cf. Résultats préliminaires et objectifs). D'autre part, les analyses de la localisation subcellulaire de LARP6b-GFP suggèrent une capacité de cette protéine à se relocaliser au sein d'agrégats cytoplasmiques. Or, on sait que PAB2 est une protéine cytoplasmique capable de se relocaliser dans des granules de stress suite à l'inhibition de la traduction en condition de stress (Weber et al., 2008). Ces informations vont dans le sens d'une interaction entre LARP6b et PAB2. Afin de valider *in vivo* chez *Arabidopsis thaliana* l'interaction entre LARP6b et PAB2, des immunoprécipitations ont été réalisées en plantules. Les résultats, bien qu'étant préliminaires (Figure 82A), suggèrent qu'il y aurait bel et bien une interaction entre LARP6b et PAB2-GFP *in vivo*. En effet, les billes possédant un anticorps dirigé contre la GFP ont été capables de retenir la protéine LARP6b d'un extrait contenant la construction PAB2-GFP. Etant donnée la localisation de LARP6b en granules cytoplasmiques et sa potentielle interaction avec PAB2, des expériences exploratoires ont été réalisées afin de tester l'impact d'un stress thermique sur l'interaction LARP6b/PAB2-GFP. Pour cela, une immunoprécipitation a été réalisée sur des plantules placées préalablement à 42°C ; les résultats présentés dans la figure 82B pourrait indiquer qu'en condition de stress, l'interaction entre ces deux protéines est plus efficace que celle observée précédemment. Ces résultats étant préliminaires ils ne peuvent servir que de point de départ à une réflexion autour du lien PAB2/LARP6b.



**Figure 83: Comparaison des racines des plantules *Col-0* et *larp6b-3***

Observation de la croissance des racines et poils absorbants de plantules *Col-0* et *larp6b-3* en conditions de croissance classiques (A) ou en présence d'IBA 5  $\mu$ M (B).

### III.2. Rôle de LARP6b dans la racine

Les recherches concernant la fonction des protéines LARP6 nous ont menés à nous intéresser à la croissance dirigée du tube pollinique dans laquelle intervient la protéine LARP6c. Lors de l'analyse de la lignée mutante *larp6b-3*, n'exprimant plus de protéine LARP6b, les résultats n'ont pas montré de phénotype visible sur la plantule. La question s'est alors posée de savoir si LARP6b pouvait être impliquée dans une fonction proche de celle observée pour LARP6c. La recherche de phénotype lié à la perte de LARP6b s'est alors axée sur un cas de croissance dirigée en tissus sporophytique c'est-à-dire : durant la croissance du système racinaire. En effet, l'émission des poils absorbants, situés au niveau des racines, constituent un autre exemple « d'excroissance » du cytoplasme d'une cellule en réponse à un signal. Ainsi, un rôle de LARP6b dans la régulation de la croissance des poils absorbant ferait le parallèle entre la fonction de LARP6c en pollen et la fonction de LARP6b dans les tissus sporophytiques. De plus il a été montré qu'il existe des similarités transcriptomique entre le tube pollinique et les poils absorbants (Becker et al., 2014). Afin de vérifier cette hypothèse, la croissance racinaire d'une lignée mutante pour LARP6b (*larp6b-3*) a été analysée en comparaison d'une lignée sauvage (*Col-0*). La figure 83A montre que la longueur des racines des plantules *larp6b-3* est comparable à celle des plantules *Col-0*. Ces résultats, bien que préliminaires, semblent indiquer qu'il n'y a pas d'effet de la mutation de la protéine LARP6b sur la croissance des racines. Afin de compléter ce résultat, l'impact de la mutation sur les poils absorbant a été étudié par ajout dans le milieu de culture d'acide  $\beta$  indole butyrique (IBA) connu pour stimuler la croissance des poils absorbants (Strader et al., 2010). Les résultats préliminaires présentés dans la figure 83B ne montrent pas de différence significative en ce qui concerne la longueur de la racine principale en réponse à l'IBA. D'autre part, on ne distingue pas d'effet de la mutation sur la longueur ou bien la quantité de poils absorbants présents sur la racine principale.

---

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

---

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

### **I. Deux protéines LARP6 à motif PAM2 chez *Arabidopsis thaliana***

Les protéines à motif LA de la sous famille LARP6 sont présentes chez les protistes, les végétaux ainsi que les animaux mais absentes chez les champignons. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe 3 protéines LARP6 dont deux possèdent en position N-terminale un motif PAM2, motif de liaison au domaine MLLE présent sur les PAB. Les données présentées dans ce manuscrit montrent que les gènes codant ces protéines possèdent des profils d'expression opposés que l'on retrouve au niveau protéique. Ainsi la protéine LARP6b est présente dans tous les tissus excepté le pollen alors que LARP6c est uniquement dans le pollen. La construction de lignées exprimant le gène codant la protéine LARP6c sous contrôle d'une région promotrice de 2281pb montre une expression dans le pollen mais aussi dans d'autres tissus de la plante. Ceci indique que l'expression du gène *LARP6c* est, en condition naturelle, sous contrôle d'une région régulatrice répressive bloquant l'expression de ce gène dans les tissus sporophytiques et/ou qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle. Un résultat semblable a aussi été obtenu lors d'une recherche de promoteurs spécifiques du pollen publiée récemment (Muñoz-Strale & León, 2014). Dans cette étude, les régions promotrices des cinq gènes « les plus spécifiques » du pollen ont été étudiées. L'une d'entre elle entraîne l'expression d'un gène rapporteur GUS dans les anthères mais également dans les feuilles, notamment, au niveau des hydathodes (pores de sécrétion présents sur les feuilles), rappelant les résultats obtenus pour *LARP6c*. Les analyses réalisées sur les protéines LARP6b et LARP6c indiquent qu'il n'y a pas, « naturellement », d'interdépendance des profils d'expression de ces protéines. En effet, la délétion de LARP6b n'affecte pas l'expression de LARP6c et inversement ce qui semble indiquer une spécialisation de ces protéines. De plus, ceci montre donc que,

« naturellement », aucune de ces protéines ne peut compléter la fonction de l'autre. Cependant, ceci ne permet pas de dire si ces protéines sont capables de réaliser les mêmes fonctions moléculaires ou non. Au sein du pollen mature, il existe deux protéines de type LARP6 : LARP6c et LARP6a. Des travaux précédents ont permis de montrer que la protéine LARP6a appartient à sa propre sous-famille évolutive et ne possède pas de motif PAM2 (Merret et al., 2013b). L'étude du phénotype de lignées mutantes a permis de montrer que la délétion simultanée de ces deux protéines n'aggrave pas le phénotype observé pour la lignée mutante *larp6c* ; ceci suggère que les protéines LARP6c et LARP6a assurent, au moins, certaines fonctions indépendamment.

## II. Conclusions et discussions autour de la protéine LARP6c

### II.1. LARP6c en tant que protéine de mRNP

La protéine LARP6c possède les caractéristiques des protéines de mRNP avec la présence de motifs d'interaction à l'ARN (motif LA et RRM) et aux protéines (motifs PAM2 et LSA). Ainsi, rapidement, notre hypothèse de travail a été que LARP6c puisse être une protéine de liaison aux ARNm faisant partie d'une ou de plusieurs mRNP. Des expériences ont donc été menées afin de confirmer ou non cette hypothèse.

#### II.1.1 L'interaction de LARP6c avec les ARNm.

Des analyses d'ITC ont permis de valider la capacité du module LA de la protéine LARP6c à interagir avec de l'ARN *in vitro* et montre une préférence de ce module pour les séquences riches en uraciles (Figure 67 et Merret et al., 2013b). La réalisation d'expériences de RIP suivies d'un séquençage des ARNm en pollen a permis d'obtenir une liste de 53 ARNm cibles potentielles de LARP6c. L'observation des séquences de ces cibles potentielles indique la présence, dans leur partie 5' UTR, de deux motifs conservés riches en purines pour l'un et en pyrimidines pour l'autre et présent respectivement sur 57% et 73% des ARNm identifiés (Figure 70). Il faut noter qu'il existe peu de séquences dont le point de départ de la transcription est précisément annoté dans les bases de

données. Ainsi, il est possible que certaines des séquences utilisées soient incomplètes sous-estimant, par conséquent, le pourcentage de séquences présentant les motifs identifiés. Néanmoins, l'identification d'un motif riche en pyrimidines dans les cibles potentielles de RIP est intéressante étant donné l'affinité particulière du module LA , révélée *in vitro*, pour les séquences riches en uracile.

### **II.1.2 L'interaction de LARP6c avec les PAB.**

Le motif PAM2 présent sur la protéine LARP6c est fonctionnel étant donné qu'il est capable *in vitro* (ITC) d'interagir avec le motif MLLE de la protéine PAB2, de plus, les protéines LARP6c et PAB2 d'*Arabidopsis thaliana* interagissent *in vivo* (en système hétérologue, Merret et al., 2013b). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe 8 PAB possédant des profils d'expression différents dont les protéines PAB3 et PAB5 qui sont spécifiques du pollen et semblent être fonctionnelles (complémentation en levure, Belostotsky & Meagher, 1996 ; Chekanova et al., 2001). La capacité de LARP6c à interagir avec les protéines PAB2 (ubiquitaire), PAB3 et PAB5 a été testée mais n'a pas permis de valider une interaction *in vivo* entre ces protéines. Ceci peut s'expliquer par plusieurs hypothèses, en effet, ces analyses ont été réalisées en fleur et non pas en pollen diluant ainsi la quantité de protéines d'intérêt. Il se peut aussi que l'interaction entre LARP6c et PAB soit transitoire ce qui rend plus difficile la mise en évidence de l'interaction. De plus, il s'avère qu'il existe d'autres PAB spécifiques du pollen, PAB6 et PAB7, qui n'avaient pas été choisies pour réaliser les expériences. Il n'est pas exclu que ces deux protéines puissent être les interactants de LARP6c *in vivo*.

### **II.1.3 Le rôle de LARP6c sur les ARNm.**

Le séquençage des ARNm issus de pollen déléétés de la protéine LARP6c montre que la quantité à l'équilibre de nombreux ARNm est affectée par cette mutation, la majorité des ARNm étant sur-accumulés en absence de la protéine. Les ARNm différemment accumulés, dans la condition mutante, codent en grande partie des protéines impliquées dans le transport, tout comme dans le cas de l'analyse de RIP, et plus particulièrement dans le transport vésiculaire. On note aussi une proportion relativement importante de gènes codant des protéines en lien avec la vacuole et/ou la dégradation. Ainsi ces résultats montrent un impact de LARP6c dans la régulation des ARNm codant des protéines

impliquées dans le transport et/ou la dégradation. La protéine LARP6c possède des motifs de liaison à l'ARN mais aussi des motifs de liaison aux protéines ; sa fonction pourrait être, par exemple, de recruter sur l'ARNm des protéines intervenant sur le métabolisme de celui-ci. C'est d'ailleurs ce que mettent en évidence les résultats obtenus sur la protéine LARP6 humaine qui est capable via ses motifs LA, RRM et LSA d'interagir avec de nombreuses protéines déterminant le devenir de l'ARNm ciblé par LARP6 (Stefanovic, 2013). Cependant les analyses réalisées ne permettent pas de déterminer si l'action de LARP6c sur les ARNm se fait de manière directe ou indirecte. Le fait que LARP6c affecte majoritairement des ARNm codant des protéines impliquées dans le transport pourrait s'expliquer par deux hypothèses. La première impliquerait que LARP6c viennent réguler spécifiquement l'ARNm codant une protéine régulatrice du métabolisme des ARNm lié au transport. La deuxième hypothèse impliquerait que LARP6c puisse intervenir de manière spécifique sur un groupe d'ARNm codant des protéines impliquées dans le transport et co-régulés. Ceci pourrait par exemple avoir lieu via la reconnaissance d'une séquence spécifique conservée dans toutes ses cibles ; les motifs identifiés dans les régions 5'-UTR des ARNm pourraient être ces séquences (Figure 70). Comme cela a été montré dans le cas des ARNm 5' TOP par exemple (Meyuhas & Kahan, 2015). Ces ARNm codant des protéines ribosomales sont co-régulés via un motif conservés riche en pyrimidines. La notion d'ARN co-régulés de manière post-transcriptionnelle a été mise en évidence chez les *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* ainsi que chez les mammifères (pour revue Keene, 2007). Cette régulation fait intervenir des protéines de liaison aux ARN qui agissent de manière spécifique sur un groupe d'ARNm. Dans certains cas, des protéines à motif PAM2 (PAN, GW182) ont été proposées comme acteur de cette régulation.

### **II.1.4 Deux étapes potentielles dans la fonction moléculaire de LARP6c**

Les localisations subcellulaires de LARP6c dans les stades du pollen puis dans le tube pollinique sont très différentes et pourraient indiquer plusieurs étapes dans la fonction moléculaire de cette protéine. On constate, notamment, que dans le pollen bicellulaire et tricellulaire la protéine est présente de manière diffuse dans le cytoplasme. Cependant, dès l'étape pollen mature, LARP6c forme des agrégats cytoplasmiques dans la cellule

végétative et adopte une localisation très particulière, autour de l'unité de germination mâle.

Dans le pollen mature, différentes analyses, non présentées ici, ont été réalisées afin de tenter d'identifier ces granules. Or il s'avère que LARP6c étiquetée ne semble co-localiser ni avec un marqueur des granules de stress, ni avec un marqueur des granules de dégradation (P bodies) (PAB2 et DCP1 respectivement, Weber et al., 2008). La seule protéine identifiée co-localisant parfaitement avec LARP6c étiquetée dans les agrégats cytoplasmique est la protéine PAB5 étiquetée, à savoir que la co-localisation avec PAB3 n'a pas été testée. On peut imaginer que cette localisation de LARP6c dans des granules contenant, à priori, la protéine PAB va dans le sens d'une association de la protéine avec les ARNm au sein de mRNP formant ainsi des agrégats cytoplasmiques. Ainsi LARP6c pourrait dans le stade pollen mature stocker au sein d'agrégats cytoplasmiques les ARNm et peut-être les protéines nécessaires à la croissance du tube pollinique. Ceci rappelle les granules observés dans les cellules germinales des animaux (pour revue Voronina et al., 2011). Ces granules cytoplasmiques se forment durant la spermatogenèse et l'oogenèse. Il existe différents types de granules mobiles de compositions et localisations différentes. Des fonctions ont été proposées pour ces granules dans la régulation des ARNm, notamment, au niveau de la traduction, de la stabilité mais également en termes de stockage et de localisation (pour revue Voronina et al., 2011). Cette hypothèse, impliquant LARP6c dans la préparation de la cellule aux prochaines étapes de développement, expliquerait les localisations subcellulaires différentes entre le stade pollen mature et le tube pollinique.

En effet, dans le tube pollinique, LARP6c est présente dans le cytoplasme de manière diffuse. Ceci pourrait s'expliquer, si la fonction de LARP6c dans la régulation des ARNm était dorénavant de leur permettre de réaliser les étapes de leur maturation jusqu'à leur traduction et non plus de les stocker comme précédemment.

### II.2. La fonction physiologique de LARP6c

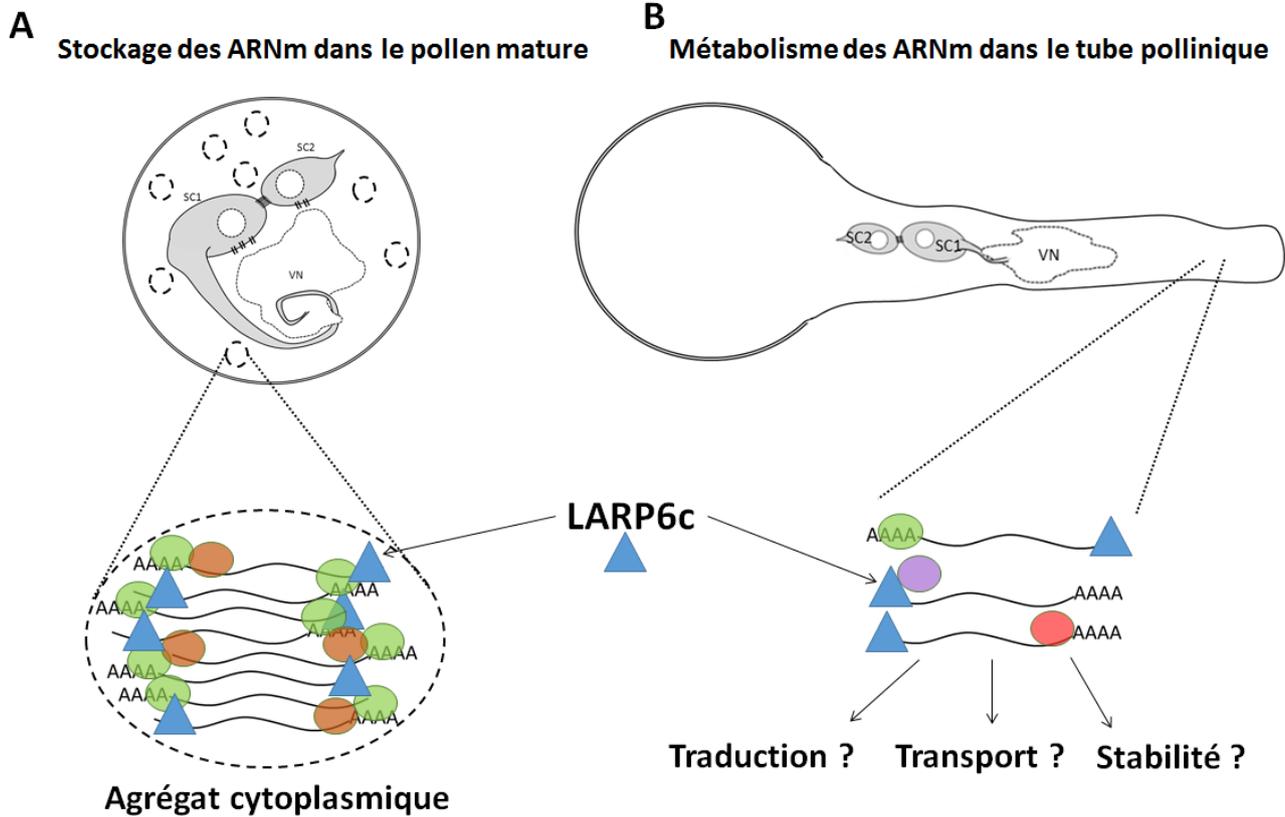
#### II.2.1 Rôle de LARP6c dans les étapes de formation du pollen

La recherche des fonctions physiologiques de LARP6c est passée par l'analyse de lignées délétées de LARP6c. Les résultats ont montré que cette protéine semble intervenir, même de manière relativement faible, sur la formation du pollen. En effet, l'ouverture des sacs polliniques libère du pollen mature. L'observation des grains de pollens issus de la lignée mutante montre une augmentation du taux de grains de pollen restés tricellulaires et n'ayant donc pas réalisé la dernière mitose. Ceci impliquerait donc un rôle de la protéine LARP6c dans une des étapes de formation du pollen entre les stades bicellulaire et tricellulaire. Il est important de prendre en compte le fait que ce phénotype, de faible pénétrance, n'a probablement aucun effet significatif sur la fécondation. En effet, lors de la pollinisation, c'est un excès de pollen qui est déposé sur le pistil. Il existe, donc, à cette étape de la fécondation une forte compétition entre les grains de pollen, suite à laquelle seuls les pollens les plus performants parviendront à féconder les ovules. Ceci signifie qu'un défaut de formation du pollen tel que celui-ci ne peut avoir de répercussion visible sur la descendance que si il atteint de fortes proportions de pollen immature.

#### II.2.2 Rôle de LARP6c dans la fécondation

Une fonction importante de LARP6c constitue son rôle dans la fécondation. En effet, les analyses phénotypiques, par tests de transmission, ont montré (dans deux lignées mutantes indépendantes) que le matériel génétique d'un grain de pollen ne possédant pas la protéine LARP6c est moins apte à être transmis à la descendance. Ceci implique donc un rôle de LARP6c dans la fécondation, cependant sans déterminer à quelle étape intervient sa fonction. D'autres analyses ont permis de montrer que LARP6c n'intervient pas sur la germination du tube pollinique ou sur son élongation. Par contre, cette protéine est impliquée dans la croissance dirigée du tube pollinique en direction de l'ovule (semi *in vivo* et *in vivo*).

Il a été étonnant de constater que le défaut de transmission du mutant *lar6c* visible lors des croisements réalisés, n'était pas visible lors des analyses de ségrégations réalisées en autofécondation. Ceci nous a amené à nous questionner à propos de l'impact du stress sur la fonction de LARP6c. Il semblerait que dans des conditions non optimales (croisement



**Figure 84: Schéma des fonctions moléculaires potentielles de LARP6c**

A : Fonction moléculaire potentielle de LARP6c dans le stockage des ARNm au sein d'agrégats cytoplasmiques dans le pollen mature.

B : Fonction moléculaire potentielle de LARP6c dans le métabolisme des ARNm au sein du tube pollinique.

Les différentes RBP potentielles sont représentées par des ronds colorés. La protéine LARP6c étant représentée en bleu. VN : noyau végétatif, SC : cellule spermatique.

manuel des plantes, conditions de stress, croissance de tubes polliniques *in vitro*) la présence de LARP6c soit plus importante augmentant ainsi la pénétrance du phénotype observé. Ceci suggère qu'il est ainsi possible que le léger défaut de formation du pollen tricellulaire cité précédemment soit lui aussi augmenté en conditions de stress et impacte de manière plus forte le défaut de fertilité mâle des mutants *larp6c*.

Un autre point a attiré notre attention durant les analyses de complémentation des phénotypes observés. En effet, l'utilisation de lignées étiquetées lors des tests de transmission n'a pas permis de compléter, de manière significative, la fonction de LARP6c soulevant ainsi des questions à propos de la capacité des versions étiquetées de LARP6c à assurer la fonction de LARP6c. Ceci pourrait être la conséquence de plusieurs choses : (i) la faible expression de LARP6c-RFP par rapport à la version endogène dans le pollen et/ou (ii) la position de l'étiquette en position C-terminale de la protéine qui pourrait gêner sa fonction. Cependant, les analyses de complémentation du phénotype de guidage du tube pollinique vers l'ovule ont montré que cette même lignée parvient à restaurer un phénotype sauvage, allant ainsi à l'encontre des hypothèses précédentes. Pour expliquer qu'une même construction soit capable de compléter un phénotype mais pas l'autre, il faut considérer le fait que LARP6c puisse être impliquée dans plusieurs étapes de la fécondation.

### **II.3. Lien entre les fonctions moléculaires et physiologiques**

L'ensemble des résultats obtenus, permettent d'envisager un modèle conciliant les différentes fonctions potentielles de LARP6c. Cette protéine serait une RBP intervenant dans la régulation des ARNm codant des protéines impliquées dans le transport vésiculaire et/ou la dégradation. Elle serait, ainsi, capable de prendre en charge un groupe d'ARNm, impliqué dans une fonction spécifique, au sein de mRNP afin de les co-réguler. Cette fonction moléculaire de LARP6c serait potentiellement divisée en deux étapes distinctes, l'une, dans le pollen mature et l'autre, lors de la croissance dirigée du tube pollinique (Figure 84).

Le tube pollinique constitue une expansion du cytoplasme de la cellule végétative du pollen permettant de délivrer les cellules spermatiques au sac embryonnaire. Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, la fécondation nécessite de nombreux

échanges entre mâle et femelle permettant de guider le tube pollinique dans le pistil, le long du style et finalement vers l'ovule. Ces échanges passent par l'émission et la réception de différents signaux tels que des molécules gazeuses, des ions ou encore des peptides par exemple. Ainsi lors de sa croissance, le tube pollinique met en place un système de communication nécessitant l'émission et la réception de ces signaux. Ceci implique l'adressage de récepteurs à la membrane ainsi que l'endocytose de signaux mais aussi l'exocytose de molécules de signalisations. Ainsi le phénotype lié à la délétion de LARP6c serait la conséquence d'un défaut de communication, impliquant LARP6c dans ces échanges entre le tube pollinique et les tissus femelle. Cette hypothèse est cohérente avec la fonction de LARP6c dans la régulation des ARNm codant des protéines impliquées dans le transport vésiculaire. Un rôle de LARP6c est, donc, envisageable dans la communication via la régulation d'ARNm impliqués dans l'exocytose, le transport vésiculaire intracellulaire ou la dégradation vacuolaire de facteurs intervenant dans la communication mâle/femelle lors de la fécondation.

L'effet de conditions non optimales ou de stress sur la fonction de LARP6c pourrait s'expliquer si LARP6c intervenait seulement dans la régulation d'une partie du transport vésiculaire impliqué dans la communication. Ainsi l'absence de LARP6c n'affecterait que faiblement la fécondation car d'autres types de communications prendraient en charge la croissance dirigée du tube pollinique. Dans des conditions où les mécanismes de communications ne sont pas synchronisés (fécondation manuelle), perturbés (stress) ou partiellement absent (croissance *in vitro*) la protéine LARP6c deviendrait plus importante à l'aboutissement de la fécondation.

Dans le pollen mature, LARP6c forme des agrégats cytoplasmiques, co-localisant avec la protéine PAB5. Bien que nous ne disposions, à l'heure actuelle, d'aucune preuve que ces agrégats contiennent des ARN, il est envisageable qu'il s'agisse d'agrégats de mRNP. Ils pourraient être formés en conséquence d'un stockage des ARNm en prévision de l'étape de germination du pollen et pourraient contenir les ARNm codant des protéines de transport. Ce stockage d'un groupe d'ARNm co-régulés, constituerait ainsi la préparation, dans le pollen mature, des étapes suivantes du développement à savoir : la croissance du tube pollinique. En effet, au stade mature, le grain de pollen doit être prêt à germer dès sa réhydratation et la barrière de compatibilité passée. Le fait de stocker les ARNm impliqués dans la croissance du tube pollinique pourrait être un gain de temps important

pour le pollen lors de la fécondation. Cette hypothèse implique que les ARNm liés et/ou régulés par LARP6c dans le pollen mature soient des ARNm exprimés dans le tube pollinique. Les analyses de transcriptomique et de RIP ont été réalisées dans du pollen mature. Cependant, lorsque l'on s'intéresse à la proportion d'ARNm affectés par la mutation LARP6c en pollen mature et s'exprimant dans le tube pollinique (Qin et al., 2009) on met en évidence un enrichissement en ARNm exprimés dans le tube pollinique. Environ 62% des gènes exprimés dans le pollen mature (expérience de transcriptomique présentée dans ce manuscrit) sont également exprimés dans le tube pollinique. Lorsque l'on s'intéresse aux transcrits différentiellement accumulés dans la lignée mutante LARP6c, on constate que c'est près de 77% des ARNm qui sont exprimés dans le tube pollinique indiquant un enrichissement de ce type d'ARNm. De plus, cet enrichissement est aussi constaté lorsque l'on s'intéresse aux ARNm identifiés par RIP comme cibles potentielles de LARP6c. En effet, c'est environ 95% des ARNm identifiés en RIP (50 ARNm sur 53) qui sont également exprimés dans le tube pollinique. Ces informations semblent donc aller dans le sens d'une fonction de LARP6c dans le tube pollinique et ainsi conforte l'hypothèse que le rôle de LARP6c dans le pollen mature puisse être la préparation à l'élongation du tube pollinique.

### **III. Conclusions et discussion autour de la protéine LARP6b**

Les informations concernant la protéine LARP6b sont plus limitées que celles obtenues pour LARP6c. En effet, on sait de LARP6b qu'elle est capable *in vivo* en système hétérologue d'interagir avec PAB2 et ce essentiellement via son motif PAM2 (Merret et al., 2013b). Cependant des problèmes techniques (domaine recombinant insoluble) n'ont pas permis de valider *in vitro* la capacité du module LA de la protéine LARP6b à fixer l'ARN. Ainsi, les expériences ont été plus particulièrement axées sur LARP6c. Cependant, des similitudes entre LARP6b et LARP6c ont pu être mises en évidence en terme de localisation subcellulaire. En effet, l'observation de la localisation subcellulaire de LARP6b en racines et feuilles a permis de montrer que cette protéine est, tout comme LARP6c, une protéine cytoplasmique présente au sein d'agrégats. L'analyse d'une lignée mutante n'a pas permis de mettre en évidence d'impact phénotypique de la mutation sur la plante. Ainsi aux vues du phénotype observé pour LARP6c dans la croissance dirigée du

tube pollinique, le parallèle avec la croissance des poils absorbants au niveau des racines a été proposé, étant donné qu'il s'agit là aussi d'une excroissance cytoplasmique réalisée par une croissance apicale rapide. Cependant là encore, aucun phénotype n'a pu être mis en évidence. Ainsi la fonction physiologique de LARP6b reste inconnue. Les analyses préliminaires de la capacité de LARP6b à interagir avec PAB2 *in vivo* chez *Arabidopsis thaliana* laissent penser que cette interaction pourrait être plus importante en conditions de stress. Ainsi il se pourrait que la fonction physiologique de LARP6b ne se révèle qu'en condition de stress expliquant ainsi pourquoi l'absence de LARP6b n'a aucun impact visible sur la plante en conditions « normales ».

### IV. Perspectives

Les expériences réalisées sur la protéine LARP6c ont permis de révéler des pistes à suivre afin de déterminer précisément ses fonctions physiologiques et moléculaires. En effet, la réalité des interactions protéiques réalisées entre LARP6c et PAB demande à être précisée. Pour cela, il serait intéressant de réaliser des immunoprécipitations avec les protéines PAB6 et PAB7 qui ont été mises de côté jusqu'à présent. Une approche plus large basée sur la purification de complexes protéiques puis l'analyse par LC-MS/MS de leur composition permettrait de déterminer avec quelle(s) PAB LARP6c interagit, mais aussi d'identifier d'autres interactants protéiques. L'identification de co-facteurs de LARP6c pourrait permettre de mieux comprendre ses fonctions moléculaires. D'autre part, les expériences de RIP ont permis de voir qu'à priori LARP6c serait capable d'interagir avec de nombreuses cibles ARNm et principalement des ARNm exprimés dans le tube pollinique et impliqués dans le transport vésiculaire. Des motifs riches en purine pour l'un et en pyrimidine pour l'autre, et présents sur une majorité des ARNm identifiés en RIP ont été identifiés par analyse *in silico*. Actuellement, des expériences sont en cours, en collaboration avec l'équipe de M. Conte à Londres, afin de tester *in vitro* (par ITC et/ou gel retard) l'affinité du module LA pour ces motifs. Il serait intéressant, à plus long terme, de définir plus précisément le rôle de chacun des domaines de la protéine LARP6c. Des constructions respectivement délétées pour chacun des motifs connus de la protéine (module LA, PAM2, LSA) ont, d'ores et déjà, été réalisées. Celles-ci devraient permettre via l'observation des phénotypes et des localisations subcellulaires de déterminer

l'importance de ces motifs sur la/les fonctions de LARP6c, et si ces hypothèses se vérifient, l'importance d'une interaction aux PAB (PAM2), à l'ARN (LAM) ou à d'autres protéines (LSA). Un autre aspect important à documenter concerne l'impact de LARP6c sur ses ARNm cibles. En effet, les données actuelles semblent indiquer que majoritairement l'absence de LARP6c entraîne une accumulation d'ARNm ; il se pourrait donc que LARP6c participe à la dégradation ou bien à l'engagement dans la traduction des ARNm. Mesurer la demi-vie des ARNm cibles, ainsi que leur engagement dans les polysomes pourrait apporter des informations importantes sur la fonction moléculaire de LARP6c. Il serait aussi intéressant d'observer l'effet de l'absence de LARP6c sur la quantité de protéines, afin d'évaluer l'impact d'une régulation des ARNm sur les protéines qu'ils codent ; pour cela des expériences de protéomiques pourraient être envisagées.

En ce qui concerne la fonction physiologique de LARP6c, l'effet sur la croissance dirigée du tube pollinique est clair cependant sans savoir quel aspect de cette croissance dirigée est affecté par la mutation. Seules les données de transcriptomique semblent indiquer que la mutation de LARP6c entraîne une dérégulation de l'accumulation des ARNm codant des protéines impliquées dans le transport vésiculaire. Dans un premier temps, il serait intéressant d'observer si la protéine LARP6c co-localise ou non dans le tube pollinique avec le réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi. Il serait aussi intéressant de tester l'impact de LARP6c sur le transport vésiculaire. Ceci pourrait passer par différentes expériences tel que le suivi de l'endocytose et de l'exocytose de facteurs connus pour être sécrétés par exemple ou encore par l'observation des taux d'endocytose à l'extrémité du tube pollinique via une coloration au FM4-64 (marqueur de la paroi). De manière plus générale, les informations obtenues semblent aller dans le sens d'un rôle de LARP6c dans le tube pollinique or la majorité des expériences réalisées l'ont été dans le pollen mature, il s'agirait donc d'élargir les analyses au tube pollinique afin de mieux appréhender si la ou les fonctions de LARP6c ont lieu dans la formation du pollen, dans le pollen mature en vue de préparer la croissance du tube pollinique et/ou dans le tube pollinique afin de participer activement à la croissance dirigée de celui-ci.

Finalement, un autre point reste à documenter, il s'agit du lien entre LARP6c et le stress. En effet, les résultats ont montré que cette protéine n'est pas indispensable à la croissance dirigée du tube pollinique mais devient importante en conditions de reproduction non optimale. Ainsi cet aspect semble important à considérer et donc à documenter. En ce qui

concerne la fonction de LARP6c dans le pollen mature, il serait important d'identifier les granules dans lesquels se trouve LARP6c afin de comprendre le rôle de notre protéine dans ces agrégats. Pour cela, il s'agirait de réaliser des co-localisations avec des protéines impliquées dans différents métabolismes des ARNm tels que leur dégradation (XRN4, DCP2,...) ou leur traduction par exemple (facteurs eIF4),... . Ceci permettrait, de plus, de déterminer les interactants protéiques potentiels de LARP6c dans le pollen mature.

Pour ce qui est de l'analyse de LARP6b, les résultats obtenus sont très préliminaires ainsi de nombreuses expériences peuvent être réalisées afin d'obtenir d'avantage d'information sur ses fonctions. Tout comme pour LARP6c, il s'agira ici d'identifier les agrégats dans lesquels se trouvent la protéine, ainsi que ses cibles ARNm et ses partenaires protéiques. Un point important permettant de s'approcher de la fonction de LARP6b serait de déterminer le phénotype lié à la délétion de cette protéine. La recherche d'un phénotype dans la lignée délétée pour LARP6b n'a pas permis de déterminer celui-ci, il serait donc peut-être intéressant de réaliser une sur-expression de LARP6b afin de tester l'impact d'un excès de protéine sur la plante. Une autre expérience envisageable afin de déterminer la fonction de la protéine LARP6b serait de tenter de compléter la fonction de LARP6c avec la protéine LARP6b s'exprimant dans le pollen. Ceci nous permettrait de savoir si ces protéines très conservés en terme de séquence protéique possèdent des fonctions moléculaires similaires *in planta*. D'autre part, si la fonction de la protéine LARP6b devient, en conditions de stress, plus importante au développement de la plante, il serait intéressant de documenter l'impact des stress sur les lignées délétées de LARP6b.

---

## **MATERIEL ET METHODES**

---

### MATERIEL ET METHODES

## I. Cultures végétales

### I.1. Conditions de culture

#### I.1.1 Culture *in vitro*

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype *Columbia-0* sont stérilisées par incubation dans une solution d'éthanol 70 %, SDS 0,05% pendant 3 minutes puis rincées deux fois pendant 1 minute dans de l'éthanol 95%. Les graines sont ensuite séchées sur papier stérile Whatman (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Royaume-Uni) sous hotte puis semées sur boîtes contenant du milieu MS/2 sans sucre, avec ou sans antibiotique selon les besoins. Les boîtes sont ensuite scellées avec du ruban adhésif Micropore (3M, Saint Paul, MN, USA) puis placées à 4°C à l'obscurité pour 48h. Les boîtes sont ensuite placées dans des conditions de jour continu, luminosité : 50-60  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , à 20°C.

**MS/2 (Murashige & Skoog) pour 1 litre** : 4,41 g MS (contenant des vitamines B5 M0231, Duchefa, Haarlem, PaysBas), pH ajusté à 5,7, 8 g agar.

#### I.1.2 Culture en chambre

Les graines sont semées sur terreau (Floragard, Oldenbourg, Allemagne) supplémenté de vermiculite (Arterris, Castelnaudary, France) sans stérilisation préalable et sans vernalisation en condition de jour long (16h de jour pour 8h de nuit) avec une intensité lumineuse de 100  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La température est fixée à 20°C et l'hygrométrie fluctue aux alentours de 75%. Les plantules sont ensuite repiquées dans de nouveaux pots de terre afin de permettre leur croissance jusqu'au stade graine. Les plants de tabac (*Nicotiana benthamiana*) sont également mis en culture dans ces conditions.

### I.1.3 Culture en serre

La serre utilisée pour les semis appartenait à l'ISV (Institut des Sciences du Végétal, UPR 2355, INSB, Gif sur Yvette, France). Les graines sont semées sur boîte et mises en culture *in vitro* pour une durée de 15 jours. Les plantules sont ensuite repiquées sur terre traitée avec des nématodes *Steinernema feltiae* (5 000 / litre de terreau, Biobest, Westerlo, Belgique) antagonistes naturels des larves de thrips (*Thysanoptera*). Lors de leur croissance au mois de juillet 2013, les plantes disposaient d'environ 16h de jour pour 8h de nuit et d'une température de 22°C aussi bien le jour que la nuit.

### I.1.4 Culture en enceinte Percival ®

Les graines sont stérilisées (cf. I.1.1 Culture *in vitro*) puis semées directement sur terre. Les plantes poussent en enceinte Percival ® (Perry, IA, USA) en condition de jour long (16h jour / 8h nuit) avec une luminosité de 180  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , à une température de 22°C la journée et 20°C la nuit, pour une hygrométrie de 55% le jour et 60% la nuit. Après germination, les plantules obtenues sont repiquées dans de nouveaux pots afin de permettre leur croissance jusqu'au stade graine.

## I.2. Lignées d'*Arabidopsis thaliana*

La lignée sauvage utilisée correspond à des graines d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia-0. Les lignées mutantes par insertion T-DNA *larp6a-1* (SK39668) (Robinson et al., 2009), *larp6b-3* (Gabi282\_D09) (Kleinboelting et al., 2012), *larp6c-3* (SAIL\_268E02) (McElver et al., 2001; Sessions et al., 2002), *larp6c-4* (WiscDsLox 293 296 inv G4) (Woody et al., 2007), *pab3* (SAIL\_783\_D04) et *pab5* (SALK\_023301) (Alonso et al., 2003) proviennent des centres de stock de graines d'*Arabidopsis*\*.

\*NASC : the Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Loughborough, Royaume-Uni  
ABRC : Arabidopsis Biological Resource Center, Columbus, OH, USA.

### I.3. Transformation de plantes

#### I.3.1 Obtention de lignées stables d'*Arabidopsis thaliana*

##### I.3.1.a Transformation de plantes par *Agrobacterium tumefaciens* : technique de « floral dip »

Les plantes sont transformées par *Agrobacterium tumefaciens* par la technique de « floral dip » c'est-à-dire en trempant les fleurs dans une solution bactérienne (Clough, S.J. and Bent, 1998). Une colonie contenant le vecteur d'intérêt est mise en pré-culture dans 5 ml de milieu YEP (contenant les antibiotiques nécessaires à la sélection des bactéries (Rifampicine et Gentamycine) et du vecteur) pendant une nuit à 28°C sous agitation. Cette pré-culture peut ensuite être ajoutée à 200 ml de milieu YEP (contenant de la gentamycine et l'antibiotique de sélection du vecteur) et mise en culture à 28°C jusqu'à atteindre une densité optique (D.O) comprise entre 1 et 1,6 à 600 nm. A cette densité, les bactéries sont culottées par centrifugation à 3200 g pendant 30 minutes puis reprises dans une solution de resuspension<sup>1</sup>: de 125 ml de solution pour une D.O de 1 à 200 ml pour une D.O de 1,6. Les bouquets floraux d'*Arabidopsis thaliana* dont les siliques ont été au préalable enlevées sont trempés pendant environ 10 secondes dans la solution d'agrobactéries permettant ainsi la transformation des cellules germinales femelles et la transmission à la descendance. Les plantes sont placées dans des conditions de forte humidité pendant 24 heures (dans des sacs plastiques) et à l'obscurité pour environ 12 heures avant de reprendre les conditions de culture classiques.

**Milieu YEP** (pour 1 litre) : extrait de levure 10g et peptone 10g (Duchefa, Haarlem, Pays-Bas), NaCl 4g, pH 7 (ajusté à l'aide de KOH)

**Solution de resuspension<sup>1</sup>** : saccharose 5%, 10 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,01% Silwett L-77 (Lehle seeds, Round Rock, TX, USA) (préparé extemporanément).

### I.3.1.b Etablissement d'une lignée transgénique

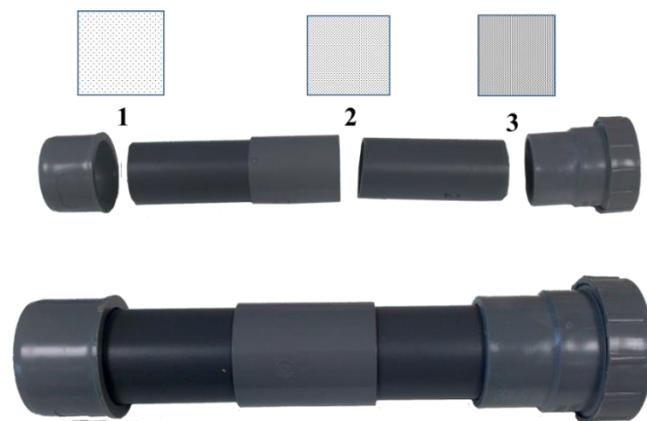
La descendance des plantes transformées par agrobactéries (T1) comprend un mélange de graines non-transformées et transformées qui sont sélectionnées par culture *in vitro* sur milieu MS agar additionné de l'antibiotique adéquat. L'expression de la construction dans la plante (hétérozygote à ce stade) est vérifiée par western blot. Pour chaque plante séparément une analyse de ségrégation est réalisée sur les graines de génération T2 afin de sélectionner les lignées ne possédant qu'une seule insertion. L'analyse de la ségrégation des graines de génération T3 permet de sélectionner les plantes homozygotes.

### I.3.2 Expression transitoire en feuille de tabac (*Nicotiana benthamiana*)

Une colonie d'agrobactérie (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101) est mise en culture pour une nuit dans 10 ml de milieu de culture liquide YEP contenant les antibiotiques nécessaire à la sélection de la bactérie (Rifampicine et Gentamycine) ainsi qu'à la sélection du vecteur. Lorsque le milieu de culture atteint une densité optique à 600 nm d'environ 0,8, 5 ml sont centrifugés à 3000g pendant 15 minutes. Le culot peut ensuite être repris dans 5 ml de solution de resuspension<sup>2</sup>. L'infiltration en tabac se fait ensuite par la face abaxiale de la feuille de tabac à l'aide d'une seringue (1 ml). Il s'agit d'appliquer la seringue contenant la solution de bactéries resuspendues sous la feuille et en venant appuyer la feuille contre son doigt. Ceci va permettre de faire pénétrer la solution dans la feuille. La portion de feuille infiltrée est saturée lorsque des gouttelettes se forment. Plusieurs infiltrations peuvent être réalisées sur chaque feuille. En cas de co-infiltration de deux vecteurs, les solutions de resuspension sont mélangées volume à volume avant l'infiltration. Les feuilles sont ensuite séchées avec du papier absorbant (pour enlever l'excédent de solution) avant de repérer à l'aide d'un marqueur les portions de feuilles infiltrées. Les plants de tabac peuvent reprendre leur croissance en condition normale. Les feuilles infiltrées seront prélevées au bout de 24h et 48h, et congelées dans l'azote liquide pour être stockées à -80°C avant utilisation.

**Milieu YEP** (pour 1 litre) : extrait de levure 10g et peptone 10g (Duchefa, Haarlem, Pays-Bas), NaCl 4g, pH 7 (ajusté à l'aide de KOH)

**Solution de resuspension<sup>2</sup>** : MES 10 mM pH 5,5, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, Acétosyringone (dilution dans EtOH 95°) 100 µM.



**Figure 85: Système de filtres permettant la récolte de pollen**

L'assemblage des morceaux de tuyaux PVC permet de fixer 3 filtres de nylons de 140  $\mu\text{m}$  (1), 60  $\mu\text{m}$  (2) et 10  $\mu\text{m}$  (3) successivement. Le filtre de 10  $\mu\text{m}$  piégeant les grains de pollen.

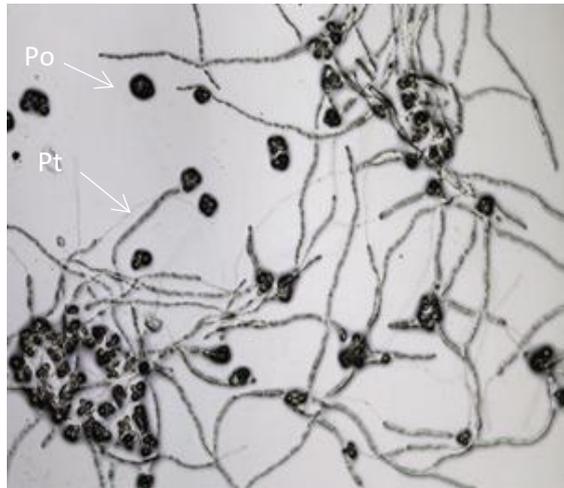
## II. Techniques relatives au pollen

### II.1. Récolte de pollen

Les récoltes de pollen ont été effectuées sur des plantes possédant de nombreuses hampes florales et ayant poussées en chambre de culture ou en serre. Le pollen est aspiré grâce à un aspirateur agrémenté d'un tube PVC comprenant trois filtres successifs (Figure 85) (d'après une méthode publiée, Johnson-Brousseau & McCormick, 2004). Les filtres sont des membranes en nylon de 140  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$  (Merk Millipore, Darmstadt, Allemagne) et 10  $\mu\text{m}$  (ZBF, Rüslikon, Suisse, ce fournisseur n'existe plus depuis 1996). La membrane nylon de 140  $\mu\text{m}$  retient les morceaux de feuilles, de pétales et autres particules arrachées lors de l'aspiration. La membrane de 60  $\mu\text{m}$  retient principalement les pistils. La dernière membrane (10  $\mu\text{m}$ ) permet quant à elle de piéger le pollen. Ce dernier est ensuite prélevé sur la membrane à l'aide d'une lame de scalpel puis déposé dans un tube « Eppendorf » (Hamburg, Allemagne) préalablement pesé. Une fois le pollen déposé, le tube est pesé à nouveau afin d'estimer la quantité de pollen récoltée (quelques milligrammes pour 15 plantes). A noter que le pollen peut être stocké à température ambiante pendant quelques heures. Les tubes sont finalement congelés dans l'azote liquide puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour plusieurs mois.

### II.2. Croissance de tubes polliniques *in vitro*

La croissance de tube pollinique *in vitro* a été réalisée par germination de pollen sur un milieu de croissance spécifique. Le protocole utilisé correspond à une version modifiée d'un protocole publié en 2007 (Boavida & McCormick, 2007). Le milieu de croissance\* préparé extemporanément est chauffé afin d'obtenir un milieu homogène et liquide. Le milieu est déposé sur une lame de microscopie en prenant soin de créer une surface lisse. En refroidissant le milieu solidifie formant le support de croissance des tubes polliniques. Une fleur ouverte est tapotée sur le milieu de culture afin d'y faire tomber des grains de pollen mature. Les lames sont ensuite incubées dans une chambre humide (boîte contenant des feuilles de papier absorbant mouillées) placée à  $20-22^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité pour 8 à 16h.



**Figure 86: Micrographie de tubes polliniques en germination *in vitro***

A : Culture *in vitro* : les grains de pollen (Po) sont déposés sur milieu de culture permettant la croissance des tubes polliniques (Pt).

Réalisé par Saïd Hafidh, (Laboratory of Pollen Biology, République Tchèque).

Les tubes polliniques peuvent ensuite être directement utilisés pour les différentes expériences (comptage, mesure, localisation de protéines étiquetées).

**Milieu de croissance** : 0.01% acide borique, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 10% sucrose, pH 7,5 (KOH) puis ajout de 1,5 % phytigel.

### II.3. Observations phénotypiques

#### II.3.1 Test de croissance du tube pollinique

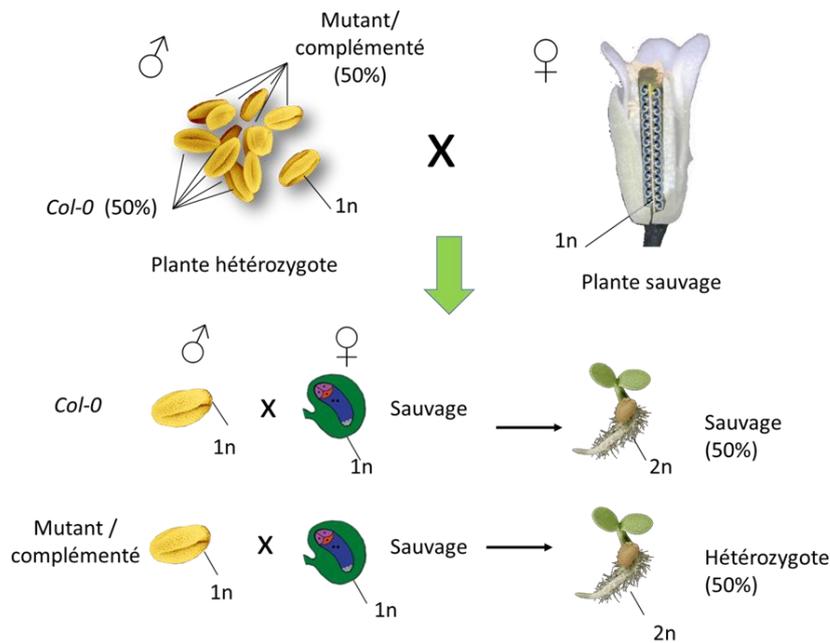
Ces expériences ont été réalisées par Said Hafidh, post-doctorant dans l'équipe de David Honys (Laboratory of Pollen Biology, Institute of Experimental Botany, Prague, République Tchèque).

##### II.3.1.a Analyses *In vitro*

Après germination du pollen et croissance des tubes polliniques *in vitro*, les lames ont été photographiées 8 heures après pollinisation à l'aide d'un appareil photo Hamamatsu (Sunayama-cho, Shizuoka, Japon) (Figure 86). La longueur des tubes polliniques a été mesurée grâce au logiciel NIS-Element (Nikon Instruments, Melville, NY, USA).

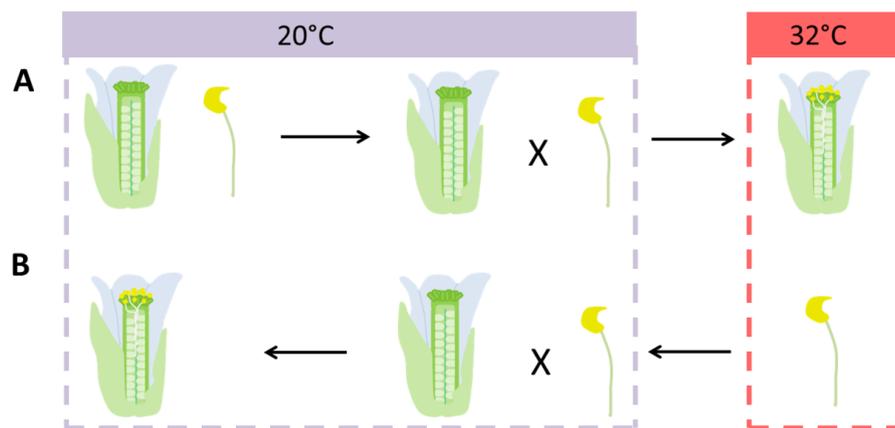
##### II.3.1.b Analyses semi *in vivo*

Les analyses semi *in vivo* de croissance du tube pollinique impliquent de mettre le pollen d'intérêt en présence d'un pistil afin d'observer la germination du pollen sur celui-ci. Le pollen est issu d'une plante homozygote pour la mutation que l'on souhaite analyser. Le pistil quant à lui est issu d'une plante *ms1* (Wilson et al., 2001), ce génotype produit des fleurs ne possédant pas de pollen et donc des pistils matures et non fécondés. Le pistil pollinisé est ensuite placé pendant 16h sur milieu de culture *in vitro* afin de permettre la croissance des tubes polliniques. Les pistils et tubes polliniques sont ensuite directement photographiés; les images sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband, W.S, ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (Abràmoff et al., 2004), le plugin Bio-formats (Open Microscopy Environment) et des plugins d'outils Macros. La longueur ainsi que la densité de tubes polliniques par pistil ont ainsi pu être mesurée.



**Figure 87: Schématisation du principe des tests de transmission**

L'exemple donné ici montre le croisement réalisé lors d'un test de transmission mâle, où 50% du pollen de départ est sauvage contre 50% mutant ou exprimant une construction de LARP6c associé à une étiquette. Lors de la fécondation entre du pollen issu d'une plante hétérozygote et le pistil d'une plante sauvage on attend s'il n'y a pas de défaut de transmission du pollen muté/complémenté à une descendance composée à 50% d'individus sauvages et à 50% d'individus hétérozygotes (plantule: ©Mark Talbot, grain de pollen : ©Jürgen Berger/ Heiko Schoof).



**Figure 88: Principe des stress thermiques réalisés sur des croisements**

A : Schéma de la méthode employée pour tester l'impact d'un stress thermique sur les étapes d'hydratation, croissance du tube pollinique, et fécondation lors d'un croisement.

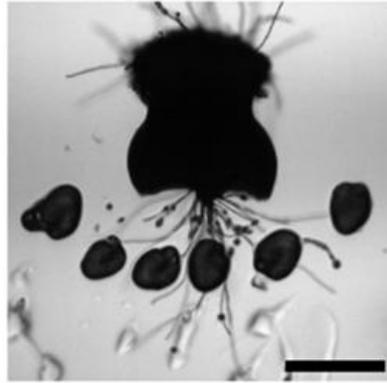
B : Schéma de la méthode employée pour tester l'impact d'un stress thermique sur les étapes de maturation du pollen.

### II.3.2 Test de transmission

Les tests de transmission permettent de mettre en évidence la capacité du pollen et des ovules à réaliser l'étape de fécondation. Les tests de transmissions du mâle permettent de vérifier la capacité du pollen mutant à féconder des ovules femelles sauvages. Pour cela, la transmission du pollen mutant est comparée à la transmission du pollen sauvage lors d'un croisement. Lors du croisement une fleur de plante sauvage est disséquée afin de ne garder que le pistil (partie femelle de la fleur) (Figure 87). D'autre part, le pollen d'une plante hétérozygote pour la mutation (50% de pollen mutant et 50% de pollen sauvage) est utilisé pour féconder le pistil de la fleur sauvage. La proportion d'individus de la descendance portant l'allèle mutant est alors déterminée par sélection sur milieu de culture additionné d'un antibiotique ou par génotypage. Le taux de transmission de l'allèle mutant est ensuite déterminé par la formule suivante :  $R / S \times 100$ , avec R, le nombre de plantules portant l'allèle mutant et S, le nombre de plantules sauvages. A transmission égale des grains de pollen mutants et sauvages, une valeur de 100% est attendue. A l'inverse, une transmission moins efficace du pollen mâle à la descendance se traduira par une valeur inférieure à 100%. Basés sur le même principe, les tests de transmissions femelles permettent de révéler la capacité d'un ovule à être fécondé par du pollen sauvage. Des tests de transmission ont été réalisés en conditions de stress thermique selon deux méthodes (Figure 88). Afin de tester la capacité du pollen à atteindre le stade mature en condition de stress thermique, une plante utilisée pour son pollen est incubée pendant 44h à 32°C. Au terme de cette incubation le pollen est utilisé pour polliniser un pistil sur une plante cultivée à 20°C, température à laquelle se produira la fécondation. Lorsqu'il s'agit de tester la capacité du pollen à réaliser la fécondation en conditions de stress, le croisement est réalisé entre pistil et pollen issus de plantes cultivées à 20°C, la plante « femelle » est immédiatement incubée à 32°C pendant 44h après la pollinisation. Quelque soit la température, toutes les plantes poussent en jour longs (16h de jour pour 8h de nuit) à une hygrométrie de 50% et une intensité lumineuse de  $180 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

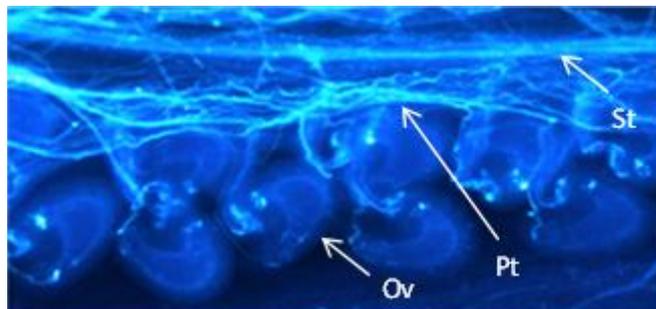
### II.3.3 Test de la capacité du tube pollinique à cibler l'ovule.

Ces expériences ont été réalisées par Saïd Hafidh, post-doctorant dans l'équipe de David Honys (Laboratory of Pollen Biology, Insitute of Experimental Botany, Prague, République Tchèque).



**Figure 89: Micrographie de tubes polliniques en germination semi *in vivo***

B : La partie supérieure du pistil (Pi) préalablement inoculée avec du pollen a été découpée puis placée sur milieu de culture solide. Les ovules (Ov) sont disposés en arc de cercle sous le fragment de pistil afin de stimuler la croissance des tubes polliniques (Pt). Echelle : 30  $\mu$ m. Réalisé par Saïd Hafidh, (Laboratory of Pollen Biology, République Tchèque).



**Figure 90: Micrographie de tubes polliniques marqués au bleu d'aniline en germination *in vivo***

Les grains de pollen déposés sur le pistil émettent leur tube pollinique (Pt) qui longe le style (St) afin d'atteindre les ovules (Ov). Réalisé par Saïd Hafidh, (Laboratory of Pollen Biology, République Tchèque).

### II.3.3.a Analyses semi *in vivo*.

La vérification de la capacité des tubes polliniques mutants à cibler les ovules a été réalisée par pollinisation de pistils *ms1* par du pollen homozygote pour la mutation testée (*larp6c-3* ou *larp6c-4*). Le pollen est laissé pendant 45 minutes sur le pistil afin de permettre sa germination. Le pistil est ensuite coupé en dessous du stigmate et placé sur un milieu solide de germination (cf. II.2. Croissance de tubes polliniques *in vitro*) de pollen. 5 à 7 ovules sauvages sont placés en arc de cercle en dessous du stigmate du pistil (Figure 89). La préparation est ensuite incubée pendant 24h à 22°C à l'obscurité. Le nombre d'ovules ciblés est déterminé par observation microscopique en lumière blanche (Nikon ECLIPSE TE2000, Melville, NY, USA).

### II.3.3.b Analyse *in vivo* : marquage au bleu d'aniline

L'analyse *in vivo* de la capacité des tubes polliniques à cibler les ovules a été réalisée par coloration au bleu d'aniline (Figure 90). Un pistil est pollinisé avec le pollen dont on souhaite tester la capacité à cibler les ovules puis incubé tel quel pendant 10 à 18 heures. Les pistils sont ensuite collectés et fixés dans une solution d'éthanol /acide acétique (9:1) pendant 24 heures. Pour cela, les pistils sont placés dans la solution, le tube est refermé puis le vide est fait à l'aide d'une seringue. Les échantillons sont ensuite réhydratés par incubation dans différents bains d'éthanol du plus concentré au moins concentré permettant la réhydratation progressive des échantillons. Ces derniers subissent ensuite un traitement alcalin par incubation pendant environ 16 heures dans une solution de 1 M NaOH. Les échantillons peuvent ensuite être colorés au bleu d'aniline par incubation pendant 12 heures dans une solution comprenant 0,1% Bleu d'aniline (poids/volume) et 108 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 11.

### III. Techniques de base en biologie moléculaire

#### III.1. Techniques liées à l'ADN

##### III.1.1 Extraction d'ADN

###### III.1.1.a Extraction d'ADN génomique végétal

Trois à quatre feuilles de plantules d'*Arabidopsis thaliana* (environ 3 semaines) sont récoltées et broyées dans l'azote. 500 µl de tampon d'extraction\* sont ajoutés, le mélange est ensuite vortexé pendant 1 minute. Une extraction phénol-chloroforme est ensuite réalisée par l'ajout d'un volume de phénol-chloroforme (1/1), le mélange homogénéisé pendant 1 minute au vortex est ensuite centrifugé à 14 000g pendant 10 minutes. L'ADN est précipité par ajout de 0,7 volume d'isopropanol incubé avec l'extrait pendant 10 minutes à température ambiante puis centrifugé à 14 000g pendant 10 minutes. Le culot ainsi obtenu est lavé à l'éthanol 70% puis resuspendu dans 250 µl de Tris HCl 10 mM pH 8. La solution d'ADN est ensuite traitée à la RNase A (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) 10 µl/ml de solution pendant 25 minutes à 37°C. Une extraction est ensuite réalisée par ajout d'un volume de phénol-chloroforme (1/1) avant d'être précipité par 2 volumes d'éthanol 100% et 1/10 d'acétate de sodium 3M pH 5,2. Le tout est incubé sur la nuit à -20°C. Le culot est ensuite lavé à l'éthanol 70% puis resuspendu dans 100 µl de Tris HCl 10mM pH 8. L'ADN est ensuite dosé au spectrophotomètre Nanodrop™ 2000 de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

**Tampon d'extraction** : 0,3 M NaCl, 0,05 M Tris HCl pH 7,5, 0,02 M EDTA pH 8, 2% Sarkosyl, 0,5% SDS, 5 M urée, 5% phénol.

###### III.1.1.b Préparation d'ADN plasmidique

Selon la quantité et la qualité de l'ADN nécessaire, deux protocoles de préparation d'ADN plasmidique sont utilisés. Afin d'obtenir des grandes quantités d'ADN, le kit commercial PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, WI, USA) est utilisé selon le protocole du fournisseur. Les petites préparations d'ADN nécessitent 2 ml d'une solution bactérienne de 15h environ. Les bactéries sont culotées par centrifugation à 14 000g pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans 250 µl de tampon GTE\* et 0,1 mg/ml de

RNase A (Sigma, Saint-Louis, MO, USA). Après l'ajout de 250 µl de tampon de lyse\* la solution est mélangée pendant au maximum 5 minutes avant d'ajouter 250 µl de tampon High Salt\* et de mélanger immédiatement la solution. L'ADN peut ensuite être extrait par ajout d'un volume (750 µl) de chloroforme isoamyl alcool (24 :1) puis centrifugation (5 minutes). L'ADN présent dans la phase supérieure est mélangé à volume égal avec de l'isopropanol avant d'être centrifugé pendant 15 à 20 minutes. Le culot est alors lavé à l'éthanol 70% puis resuspendu dans de l'eau (25 à 50 µl).

**Tampon GTE** : 50 mM Glucose, 25 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA (à autoclaver et stocker).

**Tampon de lyse** : 0,2 N NaOH, 2% SDS (à réaliser extemporanément).

**Tampon High Salt** : 3M Acétate de potassium, 1,8 M acide formamique.

### III.1.2 Amplification par PCR et électrophorèse sur gel d'agarose

#### III.1.2.a Amplification d'ADN pour le clonage

Les gènes d'intérêts sont amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique à l'aide d'amorces contenant les sites de restrictions nécessaires aux clonages (Annexe 1 et 2 : liste des amorces et des clonages, respectivement). L'amplification est réalisée avec une l'ADN polymerase Phusion High-Fidelity ® de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). 100 ng d'ADN sont ajoutés aux 50 µl de réactifs PCR\*. Le programme utilisé pour amplifier l'ADN comporte deux étapes. Après une dénaturation de l'ADN de 30 secondes à 98°C, la première étape débute par 6 cycles comprenant une dénaturation de 15 secondes à 98°C suivie de l'hybridation pendant 20 secondes à une température adaptée à l'hybridation de l'amorce (sans site de restriction) pour finalement amplifier à 72°C (sachant que la vitesse de l'enzyme est de 30 sec/kb). La deuxième étape comprend 26 cycles où cette fois, la température d'hybridation est calculée avec la séquence comprenant les sites de restrictions additionnels.

**Réactifs PCR** : tampon polymerase Phusion ® 1X, dNTP 200 µM, amorce sens 0,5µM, amorce anti-sens 0,5µM, polymerase Phusion ® 0,02 unités / µl.

#### III.1.2.b Amplification d'ADN pour d'autres applications

L'amplification par PCR est réalisée à partir d'ADN (env. 10 ng), de tissus (feuilles) ou encore de cellules (colonies bactériennes). A cette source d'ADN est ajouté 18 µl de

« mix » PCR\*. Le mélange est ensuite incubé dans un Thermocycleur effectuant un programme comprenant une étape de dénaturation préliminaire de 2 minutes à 95°C, suivi de 25 cycles de dénaturation (95°C, 20 secondes), hybridation (55°C, 30 secondes) et élongation (72°C, 2 min). Dans le cas des cribles de colonies par PCR, quelques colonies sont prélevées à l'aide d'une pointe stérile et mises à pousser sur milieu solide (contenant l'antibiotique adéquat). Le reste des cellules présentes sur la pointe est resuspendu dans 2 µl d'eau afin de réaliser la PCR. Les réactifs de PCR sont ainsi ajoutés aux 2 µl de solution de resuspension pour chaque colonie.

**Réactifs PCR** : Go Taq® G2 Flexi DNA polymerase de Promega (5 unités / µl), Go Taq® Flexi buffer 1X, amorces 1 µM chacune, dNTP 0,2 mM dans un volume de 20 µl final.

### III.1.2.c Electrophorèse et purification d'ADN sur gel d'agarose

Les produits PCR sont ensuite résolus par électrophorèse sur gel agarose\* à côté d'un marqueur de taille (1Kb Plus DNA ladder, Invitrogen™, Life Technologies, Waltham, MA, USA) et visualisé sous UV. Dans le cas des amplifications réalisées pour du clonage, 1/5 de la réaction est chargé sur un gel d'agarose analytique afin d'observer le résultat. Un gel d'agarose de purification est ensuite réalisé, le maximum de produit PCR (minimum 100 µl) est utilisé. La bande correspondant au fragment à purifier est ensuite découpée du gel sur banc UV (300 nm). L'ADN peut ainsi être extrait du gel et purifié sur colonne à l'aide du kit de purification GeneClean® de MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur.

**Gel d'agarose** : TBE 0,5X (PanReac Applichem, Darmstadt, Allemagne), Agarose 0,8 à 1,2 % (Euromedex, Souffelweyersheim, France), Gel red™ 10 000X utilisé au 1/20000 (Interchim, Montluçon, France).

### III.1.3 **Digestion par enzyme de restriction**

Les réactions de digestion par enzyme de restriction (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) sont réalisées à l'aide de 5 unités d'enzyme par µg d'ADN, le tout en présence de tampon de digestion 1X et de BSA 0,1 µg/µl (si nécessaire au fonctionnement de l'enzyme). La digestion est réalisée en deux fois 2 heures d'incubation à 37°C. Durant les 2 premières heures, le mélange contient la moitié de la quantité d'enzyme nécessaire (dans les proportions de tampon et BSA appropriées), le reste d'enzyme est ensuite ajouté au

mix, pour 2 heures supplémentaire d'incubation (en prenant soin de compléter aussi les volumes nécessaire de BSA, de tampon et d'eau). Lorsqu'il s'agit d'un test de digestion et que l'ADN ne doit pas être purifié suite à la digestion, une méthode de digestion plus rapide est réalisée (si compatible avec l'enzyme). Cette méthode de digestion plus rapide, consiste à digérer entre 0,2 à 1 µg d'ADN avec de 2 à 10 unités d'enzyme de restriction en présence de buffer (1X final). Le mélange est ensuite placé au four à micro-ondes à 700 watts pendant 30 secondes.

### III.1.4 Séquençage SANGER

Lors d'un séquençage d'ADN environ 150 ng d'un vecteur à 3 kb sont nécessaires à la réaction en présence de 1 µl d'amorce à 10 µM. Le séquençage est ensuite réalisé au sein de la plateforme du LGDP (Perpignan) qui utilise le séquenceur ABI3130X1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ThermoScientific, Waltham, MA, USA). Les graphiques obtenus sont alors visualisés et analysés avec le logiciel GENEIOUS © Biomatters Ltd (Auckland, Nouvelle-Zélande).

### III.1.5 Clonages

#### III.1.5.a Clonage en vecteur pGEM®-T easy

Ce type de clonage a été réalisé dans le cas de l'insertion d'un fragment d'ADN d'intérêt dans le vecteur pGEM®-T Easy. Il consiste en l'ajout d'adénosine en 3' de la séquence d'ADN à cloner. Pour cela, l'ADN purifié va être incubée pendant 20 minutes à 72°C en présence d'ATP 0,2M, de tampon GoTaq® 1X et d'une unité de Flexi DNA polymérase GoTaq® (Promega, Madison, WI, USA) dans un volume de 50 µl. La ligation de l'insert dans le vecteur est réalisée par incubation à 4°C sur la nuit d'une solution comprenant : 3 unités d'insert pour 1 unité de vecteur (en tenant compte de la taille de l'insert\*) en présence de tampon de ligation 1X et de 3 unités de ligase T4 (Promega, Madison, WI, USA) pour 10 µl de réaction. Cette réaction permet l'insertion de l'ADN polyAdénylé dans le vecteur pGEM®-T Easy.

$$Q_i = \frac{Q_v \times T_i}{T_v} \times R$$

\*Quantité ADN (ng) : Q<sub>v</sub>(vecteur), Q<sub>i</sub> (insert), Taille (kb): T<sub>v</sub> (taille vecteur), T<sub>i</sub> (taille insert), R : proportion insert / vecteur ici : 3 /1.

### III.1.5.b Clonage par restriction / ligation

De 200 à 10000 ng d'ADN sont digérés par des enzymes de restriction (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). En parallèle, les vecteurs sont eux aussi digérés afin de générer des extrémités cohésives et complémentaires à celles de l'insert. Les ADN digérés sont purifiés sur gel d'agarose puis une ligation est réalisée comme indiqué dans la partie précédente.

## III.2. Techniques liées à l'utilisation de bactéries

### III.2.1 Conditions de cultures

#### III.2.1.a *Escherichia Coli* (DB3.1<sup>TM</sup>/ DH5- $\alpha$ <sup>TM</sup>)

Les cultures bactériennes en milieu solide sont réalisées sur du milieu LB agar pH 7,5 (LB agar High Salt à 35g/l, Duchefa, Haarlem, Pays-Bas). Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C sur la nuit. En milieu liquide, une solution de LB liquide à pH 7,5 (LB Broth High Salt à 25g/l, Duchefa, Haarlem, Pays-Bas) est inoculée avec des bactéries issues d'une colonie unique puis incubées sous agitation à 37°C sur la nuit. Les milieux de cultures sont autoclavés avant utilisation. Lors de la mise en culture des antibiotiques sont ajoutés au milieu afin de sélectionner les bactéries d'intérêt.

#### III.2.1.b *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)

Les cultures bactériennes en milieu liquide d'*A. tumefaciens* sont réalisées dans du milieu YEP inoculé avec les bactéries puis incubé à 28°C sous agitation sur la nuit. En milieu solide, les bactéries sont étalées sur un milieu YEP auquel a été ajouté préalablement du Bacto<sup>TM</sup> Agar à 15g/l (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 24 à 48 h.

\***Milieu YEP** (pour 1 litre) : extrait de levure 10g et peptone 10g (Duchefa, Haarlem, Pays-Bas), NaCl 4g, pH 7 (ajusté à l'aide de KOH)

### III.2.2 Transformation de cellules compétentes par choc thermique

Qu'il s'agisse des souches d'*Escherichia coli* ou d'*Agrobacterium tumefaciens*, dans les deux cas, la transformation des bactéries se fait par la réalisation d'un choc thermique.

#### III.2.2.a Préparation de cellules compétentes d'*E. coli*

Le protocole utilisé est tiré et modifié de Inoue et al., 1990. Il consiste à mettre en culture une colonie de bactéries DH5- $\alpha$  dans 5 ml de milieu LB pendant 8 à 12 heures à 37°C sous agitation. 100  $\mu$ l de la pré-culture obtenue sont utilisés pour ensemencer 250 ml de milieu SOB\* (Super Optimal Broth). Le tout est mis en culture à 19°C pendant environ 28h jusqu'à obtention d'une D.O à 600 nm de 0,5. La culture est incubée pendant 10 minutes dans la glace avant d'être centrifugée à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les bactéries culottées sont délicatement resuspendue dans 80 ml de tampon TB\* (Transformation Buffer) froid. Le milieu contenant les bactéries est centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions avant de resuspendre le culot dans 20 ml de tampon TB\* froid supplémenté de 1,4 ml de DMSO. Les aliquots de cette solution sont ensuite congelés dans l'azote puis stockés à -80°C avant utilisation pour des transformations.

**Milieu LB** : LB Broth High Salt à 25g/l à pH 7,5, Duchefa, Haarlem, Pays-Bas

**Milieu SOB** : 0,5% d'extrait de levure, 2% tryptone, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub> dissous dans de l'eau ultra-pure et autoclavé.

**Tampon TB** : 10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl dissous dans de l'eau ultrapure, pH 6,7 (ajusté avec du KOH 1M). 55mM de MnCl<sub>2</sub> sont ajoutés en dernier avant de compléter avec le volume d'eau nécessaire et de stériliser par filtration (filtre 0,45  $\mu$ m). Le tampon est stocké à 4°C.

#### III.2.2.b Transformation des souches d'*E. coli*

Pour la transformation de bactéries ultra compétentes d'*E. coli*, 10  $\mu$ l de produit de ligation sont utilisés pour transformer 100  $\mu$ l de cellules compétentes. Pour cela, le produit de ligation et les cellules compétentes sont mélangés et incubés pendant 20 minutes dans la glace. La solution est placée pendant 40 secondes à 42°C puis incubée dans la glace pour 2 minutes. Les bactéries sont ensuite mises en culture dans 900  $\mu$ l de milieu liquide (LB) à 37°C sous agitation pendant 30 minutes à 1 heure. Le volume de suspension bactérienne est ensuite réduit par centrifugation (2000 rpm pendant 5 minutes), le culot est resuspendu

dans 100 µl de milieu LB. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur une boîte de culture (LB solide + antibiotique) et incubées à 37°C pendant environ 15 heures. Une alternative a été utilisée pour la souche DH5- $\alpha$ , il s'agit de réaliser le choc thermique directement sur la boîte de pétri servant à la culture. Pour cela la solution bactérie / produit de ligation doit être froide (incubation dans la glace pendant 20 minutes) et la boîte de pétri contenant le LB agar doit être chaude (incubation à 37°C pendant 20 minutes). Quelque soit la méthode utilisée, deux quantités de bactéries (1/10<sup>ème</sup> et 9/10<sup>ème</sup>) sont étalées sur le milieu de culture.

### III.2.2.c Préparation de cellules compétentes d'*A. tumefaciens*

Le protocole utilisé est tiré et modifié de (Walkerpeach & Velten, 1994). Il consiste à mettre en culture une colonie de bactéries GV3101 dans 5 ml de milieu YEP\* contenant de la rifampicine 50mg/ml et de la gentamycine 25µg/ml pendant environ 15h sous agitation à 28°C. La moitié de la pré-culture est utilisée pour inoculer 50 ml de YEP (+ antibiotiques). La culture est alors mise à pousser à 28°C sous agitation jusqu'à atteindre une D.O de 0,8 à 600 nm avant d'être centrifugée à 3000 rpm pendant 15 minutes à température ambiante. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 20 mM froid. La solution est aliquotée puis congelée dans l'azote avant d'être stockée à -80°C jusqu'à transformation des bactéries compétentes.

**Milieu YEP** (pour 1 litre) : extrait de levure 10g et peptone 10g (Duchefa, Haarlem, Pays-Bas), NaCl 4g, pH 7 (ajusté à l'aide de KOH)

### III.2.2.d Transformation de bactéries d'*A. tumefaciens*

La transformation des bactéries *A. tumefaciens*, se fait par incubation d'1 µg d'ADN correspondant à la construction sur 100 µl d'agrobactéries. Le choc thermique est réalisé par incubation à 37°C pendant 5 minutes. Les bactéries sont ensuite mises en culture à 28°C dans 1 ml de milieu LB liquide pendant 2h à 4h, ce qui permet l'expression des gènes de résistance. Les bactéries sont ensuite culotées par centrifugation à 3000 rpm pendant 5 minutes. Après resuspension dans 150 µl, les bactéries peuvent être étalées sur boîte de YEP agar contenant les antibiotiques nécessaires à la sélection des bactéries (Gentamycine, Rifampicine) et du vecteur. Les bactéries sont ainsi incubées pendant 2 à 3 jours à 28°C.

### III.3. Techniques liées à l'analyse des ARN

#### III.3.1 Extraction d'ARN total et séparation par électrophorèse

L'extraction d'ARN a été réalisée d'après un protocole adapté de (Logemann et al., 1987). De 0,5 à 3 mg de pollen broyé au Silamat S6 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Principauté du Liechtenstein) sont mélangés à 500 µl de tampon Guanidine. Les extraits sont ensuite vortexés et incubés sur glace pendant 10 minutes. L'extraction se poursuit par l'ajout d'un volume de phénol (24)/chloroforme (24)/ alcool iso-amylque (1) directement sur les extraits obtenus. Le mélange est vortexé pendant 1 minute puis centrifugé à 14 000 g pendant 10 minutes à 16°C. Une deuxième extraction phénol/chloroforme/alcool iso-amylque est ensuite réalisée sur la phase supérieure obtenue après centrifugation. L'extrait est ensuite traité avec 1 volume de chloroforme (24)/alcool iso-amylque (1). L'ARN est alors précipité par l'ajout de 0,7 volume d'isopropanol et 1/20 de volume d'acide acétique 1M. La précipitation se fait à -20°C pendant 20 minutes suivie de 20 minutes de centrifugation à 4°C. Les culots obtenus sont rincés à l'éthanol 90% puis resuspendus dans de l'eau ultrapure (environ 13 µl par mg de pollen). Les ARN appartenant à un même génotype sont groupés et dosés au Nanodrop® 2000 de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Le rendement moyen du pollen est de 5,7 µg d'ARN par mg de pollen. La migration des ARN sur gel MOPS\* nécessite l'ajout de 10 µl de tampon de charge\*. Les extraits sont ensuite chauffés pendant 10 minutes à 65°C puis stockés dans la glace pendant 5 minutes avant la migration sur gel.

**Tampon guanidine (ou guanidium) :** 8M Guanidinehydrochloride, 20 mM MES (4-morpholineéthansulfonic acid), 20 mM EDTA, adjusted to pH 7 (pour que la solution ne cristallise pas, il faut fixer le pH à 6 à 35°C puis laisser refroidir avant d'ajuster le pH à 7), 50 mM β-mercapto-éthanol (extemporanément).

**MOPS 10X :** 0,2M MOPS, 80 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7

**Tampon de charge :** 50% formamide, 6% formaldéhyde, 1X MOPS, 0,025% xylène cyannol, 0,025 % bromophenol bleu, 10% glycérol, 50X gel red

**Gel MOPS :** 1,2 % agarose, 1X MOPS, 5,5% formaldéhyde (ajouté juste avant de couler le gel).

#### III.3.2 Traitement DNase

Les ARN sont incubés avec la Turbo<sup>TM</sup> DNase (Ambion®, ThermoScientific, Waltham, MA, USA) à raison de 2 unités d'enzyme pour 10 µg d'ARN en présence du tampon

recommandé (1X). Le mélange est ensuite placé pendant 1 heure à 37°C en prenant soin d'ajouter, à nouveau, au bout de 30 min d'incubation 2 unités d'enzyme. Les ARN sont ensuite extraits au phénol/chloroforme (1/1) avant d'être précipité à l'aide de glycogène et d'éthanol à -20°C puis resuspendu dans de l'eau après un lavage à l'éthanol 70%.

### III.3.3 Transcription inverse (RT)

Les transcription inverse (RT) sont réalisées sur des ARN ayant préalablement subi un traitement DNase. Aux 500 ng d'ARN sont ajoutés 500 ng d'oligoDT(18) dans un volume final de 10 µl. Le mélange est ensuite incubé pendant 5 minutes à 70°C puis placé pour 5 minutes dans la glace. La solution est ensuite mélangée à 20 µl de « mix » de reverse transcription puis incubées en Thermocycleur 1 heure 20 environ. Après 5 minutes d'hybridation à 25°C, la reverse transcription à lieu pendant 60 minutes à 50°C avant que l'enzyme ne soit inactivée par 15 minutes d'incubation à 70°C. A noter que lors de RT réalisées en vue d'une PCR quantitative, un ARN Alien® (Agilent, Santa Clara, CA, USA) est rajouté au mélange de départ à hauteur de  $5 \times 10^4$  copies en tant que contrôle externe.

**Mix de reverse transcription** : 200 unités SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 0,5 µM dNTP, 1X tampon (fournit dans le kit de RT), 5 mM DTT, 20 unités RNAsin (Promega, Madison, WI, USA).

## III.4. Techniques liées aux protéines

### III.4.1 Western blot

#### III.4.1.a Anticorps

Les anticorps ciblant les protéines LARP6 (a, b et c) ont tous été réalisés par Agro-Bio (La Ferté Saint-Aubin, France). Ces anticorps sont dirigés contre un peptide et ont été produits chez le lapin (anticorps et conditions d'utilisation en Annexe 3A). Des anticorps « commerciaux » ont eux aussi été utilisés et sont listés dans l'annexe 3B.

#### III.4.1.b Préparation d'extraits totaux

L'extraction des protéines passe par une étape de broyage des tissus dans l'azote dans un mortier ou bien au Silamat S6 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Principauté du Liechtenstein).

Cette dernière méthode de broyage passe par l'agitation de billes de verre dans un tube de 1,5 ml. La poudre ainsi obtenue est resuspendue dans une solution de tampon d'extraction Laemmli 4X. La quantité de Laemmli 4X ajoutée varie en fonction des tissus : 3  $\mu$ l/mg de plantule, 300  $\mu$ l/mg de pollen ou 5  $\mu$ l/mg de fleur. Les extraits sont incubés à 95°C pendant 5 minutes puis centrifugés à 14 000g pendant 5 minutes.

### III.4.1.c Migration d'extraits protéiques et analyse par western blot.

Les extraits protéiques totaux sont chargés sur gel polyacrylamide SDS, composé d'une portion supérieure non séparatrice et d'une portion inférieure séparatrice. La concentration en acrylamide dans la partie résolutive du gel est à déterminer selon la taille des protéines que l'on veut séparer sur le gel. Un marqueur de taille est aussi déposé sur chaque gel (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas, Life Technologies, Waltham, MA, USA). La migration des protéines dans le gel s'effectue dans un tampon de migration Laemmli 1X à 100V (gel non résolusif) puis à 150V (gel résolusif). Les protéines séparées seront ensuite transférées sur membrane pvdf (polyfluorure de vinylidène) (Immobilon PVDF 0,45  $\mu$ m Merk Millipore, Darmstadt, Allemagne). Cette membrane est préalablement « activée » par un lavage à l'EtOH 100 % de 15 secondes et ensuite rincée dans l'eau. La membrane et le gel sont ensuite incubés pendant 10-15 minutes dans du tampon de transfert 1X. Le transfert est réalisé en 1h30 à un ampérage constant de 150 mA. A l'issue du transfert, la membrane peut être colorée par une solution de rouge ponceau permettant la visualisation de protéines. La membrane est ensuite bloquée avec une solution de saturation comprenant du lait écrémé en poudre à 5% dans du Tween®-TBS 1X pendant 2 heures avant d'être incubée avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation (liste des anticorps utilisés Annexe 3). Après 3 rinçages de la membrane au Tween®-TBS 1X, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire pendant 30 à 45 minutes à température ambiante. Elle est ensuite rincée au Tween®-TBS 1X (3 fois) puis au TBS 1X avant d'être révélée par le biais d'un kit permettant une réaction de chimiluminescence (Immobilon Cheluminescent HRP substrate, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). Le signal est visualisé sur des films radiographiques (Pierce CL-Xposure™ film, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) révélés par le biais d'une développeuse (Hyperprocessor Amersham pharmacia, GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni). La membrane « active », peut être déshybridée par incubation pendant 15

Interaction	Billes	pH	% détergent	volume d'extrait	rapport billes/ extrait	Input/ NF prélevé	Incubation	Tampon de lavage / d'IP	Eluat prélevé
LARP6c-FLAG-HA-PAB2	Pierce™ anti-HA magnetic beads <sup>1</sup>	9	0,5	350 µl	1/10	30 µl	30 min à RT	IP	50 µl
LARP6c-PAB3-FLAG-HA	anti-FLAG® M2 Magentic beads <sup>2</sup>	9	0,5	400 µl	1/20	60 µl	1 h 4°C	IP	50 µl
LARP6c-PAB5-GFP	µMacs GFP isolation Kits <sup>3</sup>	7,4	1	450 µl	1/9	60 µl	30 min sur glace	IP + lavage*	50 µl*
LARP6b-PAB2-GFP	GFP-Trap® Chromotek <sup>4</sup>	9	0,1	400 µl	1/10	60 µl	1 h 4°C	IP	50 µl

**Tableau 6: Conditions de réalisation des IP**

Les conditions et billes testées lors de la réalisation des IP sont inscrites dans le tableau ci-dessus.

<sup>1</sup> Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

<sup>2</sup> Sigma, Saint-Louis, MO, USA

<sup>3</sup> Miltenyi, Bergisch Gladbach, Allemagne

<sup>4</sup> Chromotek, Planegg-Martinsried, Allemagne

\* solutions issues du Kit

minutes à température ambiante dans une solution de déshybridation (ReBlot Plus Strong, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) afin d'être ensuite ré-hybridée avec un autre anticorps.

**Tampon d'extraction Laemli 4X** : 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 20 % Glycérol, Bromophénol Bleu, 20%  $\beta$ -mercapto-éthanol (extemporanément).

**Gel non séparateur** : 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS (extemporanément), 0,1 % TEMED (extemporanément), 5% Acrylamide-bis-acrylamide 29 :1.

**Gel séparateur** : 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1% APS (extemporanément), 0,1% TEMED (extemporanément), Acrylamide-bis-acrylamide 29 :1 (quantité à ajusté selon les besoins).

**Tampon de migration Laemli 1X** : 25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0,1% SDS.

**Tampon de transfert 1X** : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % EtOH (extemporanément).

**Tween®-TBS 1X** : 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1 % Tween® 20 (extemporanément).

**Rouge ponceau** : 0,1 % rouge ponceau dans de l'acide acétique à 5%.

## IV. Techniques de biochimie

### IV.1. Immunoprécipitation (IP)

#### IV.1.1 Préparation des extraits totaux

Les immunoprécipitation (IP) ont été réalisées à partir d'extraits totaux de lignées exprimant des versions étiquetées des protéines d'intérêt. Les tissus (plantules ou fleurs) stockés à -80°C sont broyés au Silamat S6 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Principauté du Liechtenstein) avant d'être repris dans 5 volumes de tampon d'extraction\* pour plantule ou pour fleur. Selon les billes utilisées et les tests réalisés, le pH et la concentration en détergent varie entre les tampons d'extraction (Tableau 6). Les extraits totaux ainsi obtenus sont ensuite incubés sur glace pendant 25-30 minutes avant d'être centrifugés 15 minutes à 16 000g à 4°C. Le surnageant est ensuite centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions.

**Tampon d'extraction :**

**Pour plantule** : 200 mM Tris pH9, 10% Glycérol, 150 mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP40, PMSF, MG132, 1-2 % cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma, Saint-Louis, MO, USA).

**Pour fleur** : 50 mM Tris pH7,4 à 9, 10% Glycérol, 150mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5-1% NP40, 2 % cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma, Saint-Louis, MO, USA).

### **IV.1.2 Immunoprécipitation**

Durant la centrifugation des extraits natifs, les billes servant à l'immunoprécipitation peuvent être préparées. Pour cela, le volume de bille nécessaire est prélevé puis lavé au moins 2 fois à l'aide du tampon d'extraction utilisé pour préparer les échantillons. Une partie de l'extrait est utilisé pour réaliser une extraction protéique au Laemmli afin de constituer la fraction « Input ». Le reste de l'extrait est ensuite incubé sur les billes (Tableau 6) à 4°C sur roue (10 rpm) pendant 1 heure. A l'issue de l'incubation, une partie du surnageant est conservée afin de constituer la fraction « Non Fixé » de l'analyse. Les billes sont ensuite lavées 3 fois (tampon d'extraction ou de lavage selon les expériences) et placées dans des tubes neuf avant le dernier lavage. Le surnageant du dernier lavage est jeté puis les billes sont reprises dans du tampon Laemmli 4X afin de réaliser l'extraction protéique de la fraction « Eluat ». Les différentes fractions sont analysées par western blot, en chargeant sur gel : Input (env. 19% du volume prélevé), Non Fixé (env. 19% du volume prélevé) et Eluat (40% du volume prélevé).

## **IV.2. Séparation des polysomes sur gradient de sucrose et analyse des fractions.**

### **IV.2.1 Préparation des gradients, séparation des polysomes et collecte des fractions.**

L'extraction des polysomes est réalisée à partir de protocoles publiés (Mustroph et al., 2009). Ici la technique de séparation des polysomes par gradient de sucrose a été réalisée sur des extraits de fleurs *Col-0*. Les gradients de sucrose sont formés par la superposition successive de 4 solutions de sucrose finales\* contenant des pourcentages de sucroses différents (60% (750µl), 45% (1,5ml), 30 % (1,5ml), 15% (750 µl)) pour un volume final de 4,5 ml. Les couches sont déposées de la plus concentrée à la moins concentrée dans un tube d'ultracentrifugation, entre chaque dépôt le tube est incubé pendant 1 heure à -80°C (température de stockage du gradient). Le gradient est décongelé à 4°C 12 heures avant utilisation. L'extrait est préparé à partir de 100 mg de fleur stockée -80°C. Les tissus sont broyés et repris dans 5 volumes de tampon d'extraction\* puis incubés sur glace pendant 10

minutes. La solution est ensuite centrifugée à 4°C, 14 000g pendant 10 minutes avant d'être filtrée sur papier Miracloth (Millipore, Darmstadt, Allemagne). 500 µl de la solution filtrée sont déposés sur le gradient de sucrose, le tout est ensuite centrifugé à 4°C, 50 000 rpm pendant 1h40 dans un rotor préalablement incubé à 4°C (SW55Ti, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Le profil polysomal est ensuite analysé par détection d'absorbance à 254 nm à l'aide d'un détecteur d'absorbance ISCO (Teledyne Technologies, Thousand Oaks, CA, USA), ces valeurs étant enregistrées par le logiciel Peak Track et représentées sous forme graphique via le logiciel Excel (Microsoft, Redmond, WA, États-Unis). Les différentes fractions sont collectées de la plus concentrée en sucrose à la moins concentrée puis séparés en aliquots d'environ 600 µl. Les fractions aliquotées sont ensuite utilisées pour réaliser des extractions d'ARN et de protéines.

**Solutions de sucrose finales** : 1X « Sucrose salts », 5 µg/ml Chloramphénicol, 10 µg/ml Cycloheximide, 1,76M/ 1,1M/ 0,73M /0,44 M Sucrose (respectivement pour les solutions à 60%, 45%, 30%, 15%).

**Solution 10X « Sucrose salts »** : 0,4M Tris-HCl pH 8,4, 0,2 M KCl, 0,1M MgCl<sub>2</sub>.

**Tampon d'extraction** : 200 mM Tris HCl pH 9, 200 mM KCl, 25 mM EGTA, 35 mM MgCl<sub>2</sub>, 1/20 « mix » de détergent, 1% DOC, 2% PTE, 5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 50 µg/ml Chloramphénicol, 100 µg/ml Cycloheximide, 1 mg/ml Héparine, 1/ 1000 MG132, 1/100 Cocktail inhibiteur (Sigma, Saint-Louis, MO, USA).

« Mix » de détergent: 20% Brij-35, 20% Triton X-100, 20% Igepal, 20% Tween 20

### IV.2.2 Analyse des fractions.

A partir des fractions obtenues suite à la séparation des polysomes en gradient de sucrose des extractions ARN sont réalisées afin de vérifier la présence d'ARN ainsi que la qualité et la répartition de celui-ci dans les différentes fractions. Pour cela 300 µl de solution comprenant 5% SDS et 0,2M EDTA sont mélangés à environ 600 µl de fraction aliquotée. L'extraction de l'ARN est réalisée par ajout d'un volume de phénol/chloroforme/alcool iso-amylque (25:25:1) ; le mélange est homogénéisé puis centrifugé à 14 000g pendant 10 minutes. La phase aqueuse est mélangée à 1 ml d'éthanol 100% avant d'être centrifugée pendant 15 minutes à 14 000g. Le culot est ensuite resuspendu directement dans du tampon de charge MOPS et chargé sur gel MOPS. Afin d'étudier la présence de protéines d'intérêt dans les différentes fractions obtenues, des extractions protéiques sont réalisées. Deux volumes d'alcool 100% sont mélangés à environ 600 µl de fraction polysomale. Les protéines sont précipitées à 4°C pendant 6 heures maximum avant d'être centrifugées 15

minutes à 4°C à vitesse maximum. Le culot est resuspendu dans 10 µl de Laemli 4X (100 µl pour l' « Input », ainsi que les deux premières fractions car les proportions de protéines présentes dans ces fractions sont bien supérieures aux autres fractions), 10 µl sont ensuite chargés sur un gel SDS-PAGE et analysé par western blot.

### **IV.3. Isothermal Titration Calorimétrie (ITC)**

Les expériences d'Isothermal Titration Calorimétrie ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de la professeur Maria R. Conte (Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King's College, Londres). La méthode utilisée est adaptée du protocole décrit dans Merret et al. 2013. Celui-ci décrit entre autre la méthode de production des protéines. Deux tampons ont été utilisés pour les analyses d'ITC, le premier identique à celui publié dans l'article ci-dessus (20 mM Tris, 200 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,25) et le deuxième avec 100 mM de KCl. A noter que lors de l'ITC, protéines et ARN doivent être dans le même tampon et sont donc dialysés sur la nuit. Pour chaque titration 20 injections de 2 µl de solution d'ARN de 250 et 400 µM sont ajoutés à la solution protéique (25-45 µM). Les trois séquences ARN de 40 nucléotides purifiés sur HPLC proviennent de IBA (Göttingen, Allemagne) et sont listées ci-après. SEC1B (At4g12120) : UUC GUC GAC GAU UUC ACG CGA UGU CCU UCU CCG AUU CUG G. SEC8 (At3g10380) : AUC GGA GUG AGU UCG CCA GCA UGG GGA UUU UCA AUG GUU U. SEC15A (At3g56640) : GUC UUC CUU CUC UCU AUC GAA UGA UGG AGG CCA AAC CAA A.

## **V. Analyses haut-débit**

### **V.1. Analyses moléculaires**

#### **V.1.1 Transcriptomique**

Le pollen utilisé pour le séquençage d'ARN a été récolté sur des plantes cultivées en serre (cf. I.1.3 Culture en serre). Les plantes Col0 et *larp6c-3* ont été semées en deux lots distincts. Pour chacun des génotypes et réplicats, environ 5 mg de pollen stockés à -80°C

ont été broyés dans de l'azote liquide au Silamat S6 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Principauté du Liechtenstein). L'extraction d'ARN est ensuite réalisée comme indiquée précédemment. Pour chaque échantillon, 1,5 µg des ARN obtenus ont été chargés sur gel MOPS afin d'en vérifier la qualité. Une partie des ARN (10 µg) a été traitée à la DNase (TURBO™ DNase, Ambion ®, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Les échantillons sont incubés comme recommandé pendant 30 minutes à 37°C en présence de 2 unités de TURBO™ DNase, dans le tampon préconisé. Au bout des 30 minutes d'incubation, 2 unités d'enzyme sont ajoutées et l'incubation à 37°C est poursuivie pour 30 minutes supplémentaires. Une extraction au phénol/chloroforme/alcool iso-amylque est alors réalisée pour arrêter la réaction et éliminer l'enzyme. La création des banques ainsi que le séquençage des ARN poly(A)+ a été sous-traité à FASTERIS (Plan-les-Ouates, Suisse). La création des banques a été réalisée avec le kit TruSeq Stranded mRNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Les 4 banques générées ont été multiplexées et séquencées sur la même ligne en « single end » de 101 pb sur HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) donnant de 31 à 60 millions de lectures par banque.

### V.1.2 RNA Immunoprécipitation (RIP)

Le pollen stocké à -80°C est issu de plantes *LARP6c-FLAG-HA* et *Col-0* semées en serre (cf. I.1.3 Culture en serre). Environ 25 mg pour chaque condition sont broyés au Silamat S6 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Principauté du Liechtenstein). L'extrait natif de pollen est réalisé par l'ajout de 250 volumes de tampon d'extraction\*, les tubes sont ensuite vortexés 30 secondes et centrifugés pendant 5-10 minutes à 4°C à 14 000g afin de culoter les débris. 700 µl de cet extrait natif sont utilisés pour réaliser une extraction ARN au guanidium, 40 µl sont utilisés pour réaliser une extraction protéique au Laemmli. Ces extractions représenteront la part « Input » de l'analyse. Le reste de l'extrait natif est utilisé pour réaliser une immunoprécipitation à l'aide de billes magnétiques anti-FLAG® M2 (Sigma, Saint-Louis, MO, USA). 250 µl de billes (pour chaque condition) sont lavées avec du tampon d'extraction puis séparées en 5 tubes contenant chacun 50 µl de billes. 1 ml d'extrait (soit environ 300 µg de protéine) est déposé dans chacun de ces tubes puis incubé pendant 1 heure à 4°C sur roue (10 rpm). La fraction « Non Fixée » est ensuite prélevée, tout comme pour l'extrait natif, des extractions ARN et protéiques sont réalisées à partir de 2x350µl et 60 µl de surnageant respectivement. Après un premier lavage avec du tampon

de lavage\*, les billes d'une même condition sont ensuite regroupées dans un même tube puis lavées encore 2 fois avant d'être séparées en deux fractions inégales. 6% des billes sont utilisés pour l'élution protéique au Laemmli dans 15 µl de Laemmli 4X. Le reste des billes (94%) est incubé dans 400 µl de guanidium pendant 5 minutes à température ambiante et mélangé régulièrement. Les billes sont ensuite retirées avant de procéder à une extraction ARN classique et un dosage au Nanodrop® 2000 de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Afin de s'assurer de l'intégrité des ARN durant l'étape de fixation, les ARN de la fraction « Non Fixé » sont analysés sur gel MOPS (2 µg de l'échantillon et du contrôle). L'efficacité de l'immunoprécipitation est vérifiée par migration sur gel SDS-PAGE des extraits protéiques issus de l'extrait natif (env. 19% du volume prélevé), de la fraction non fixée (env. 19% du volume prélevé) et de l'éluat (env. 50% du volume d'élution protéique). L'hybridation avec un anticorps dirigé contre la protéine *LARP6c* permet de vérifier la fixation de cette protéine sur les billes magnétiques. Les échantillons ont ensuite été envoyés à FASTERIS (Plan-les-Ouates, Suisse) qui a réalisé une purification polyA+ sur les échantillons « Input » alors que les échantillons correspondant aux Eluats ont été séquencés sans purification en raison de la faible quantité d'ARN disponible (<100ng en moyenne). Les banques ont ensuite été séquencées en « single end » de 101 pb (à partir d'une seule amorce) sur HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA). Les bibliothèques générées ont été multiplexées par réplicat ainsi toutes les bibliothèques d'un même réplicat ont été séquencées sur la même ligne. Le séquençage a permis d'obtenir entre 42 et 64 millions de lectures pour les « Input » et de 25 à 40 millions de lectures pour les bibliothèques correspondant aux « Eluats ».

**Tampon d'extraction :** 50 mM Tris HCl pH 7,4, 10% Glycérol, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 unités / ml RNAsin® Plus RNase Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA), 1X Mg132, 1% cocktail inhibiteur protéase pour extrait de plantes (Sigma, Saint-Louis, MO, USA).

**Tampon de lavage :** 50 mM Tris HCl pH 7,4, 10% Glycérol, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 unités / ml RNAsin® Plus RNase Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA), 1X Mg132, 1% cocktail inhibiteur protéase pour extrait de plantes (Sigma, Saint-Louis, MO, USA), 0,1% Triton<sup>TM</sup> (Sigma, Saint-Louis, MO, USA)

### V.1.3 Validation par PCR quantitative (qPCR)

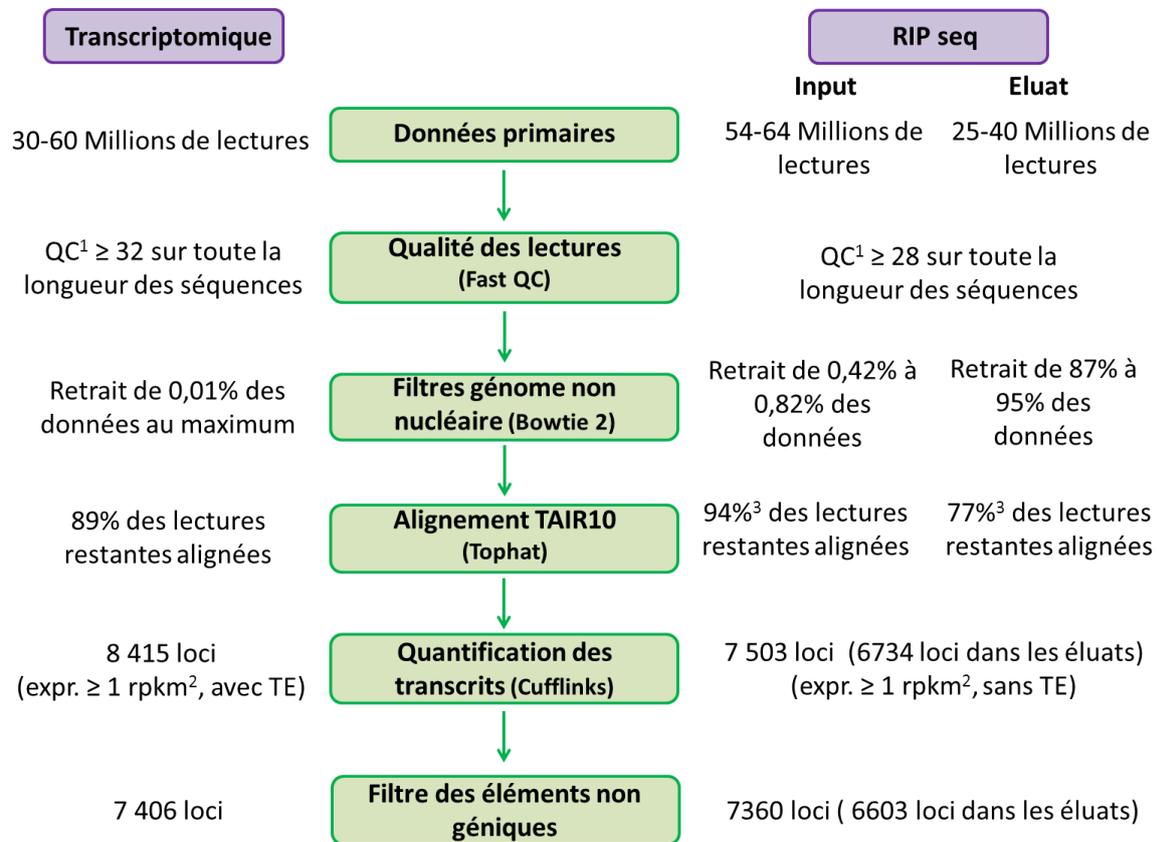
#### V.1.3.a Choix des amorces et des dilutions d'ADNc

Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3\* (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) avec les critères suivants : température d'hybridation entre 59,5°C et 60,5°C, longueur : 20 nucléotides, taille de l'amplicon : 50 à 200 paires de bases. Les couples d'amorces sont ensuite passés dans le logiciel TAIR BLAST 2.2.8 afin de vérifier leur spécificité. Les amorces (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) sont ensuite testées en PCR afin de vérifier leur capacité à amplifier un fragment spécifique de manière efficace. Ce premier test passé, elles sont ensuite testées en PCR quantitative afin de déterminer l'efficacité de chaque couple. Pour cela, une gamme de dilution d'ADNc sert de matrice à chacun des couples. A l'issue de la qPCR l'efficacité de chaque couple est déterminée en réalisant une représentation graphique du logarithme du nombre de copies en fonction du Ct (Cycle threshold, quantité d'ADNc dépassant un certain seuil, exprimé en nombre de cycles), sachant que le nombre de copies est fixé arbitrairement à 1 pour le point de la gamme le moins concentré. Le coefficient directeur (a) de la courbe de tendance linéaire appliquée à ce graphique permet de calculer le pourcentage d'efficacité du couple d'amorce avec la formule suivante :  $(10^a - 1) \times 100$ . Pour que le couple soit utilisé pour la qPCR, cette efficacité doit être comprise entre 95% et 120%. La gamme de dilution d'ADNc permet d'autre part de déterminer la dilution d'ADNc optimale. Il s'agit de sélectionner une dilution qui permet d'utiliser le moins d'ADNc possible tout en conservant des Ct relativement faibles (inférieur à 30-32).

\*<http://primer3.ut.ee/> (24.04.15)

#### V.1.3.b Conditions de PCR quantitative

Les PCR sont réalisées en plaques 384 puits sur un LightCycler® 480 (Roche, Basel, Suisse). Dans chaque puit est disposé un mélange d'un volume total de 9 µl comprenant l'ADNc (concentration déterminée préalablement), 1X tampon (Takyon™ No Rox SYBR® Mastermix blue dTTP, Eurogentec, Liège, Belgique), 11 µM de chacune des amorces. Il faut noter que chacun des points est réalisé en triplicat technique et duplicat biologique. D'autre part, le gène de référence utilisé ici est celui de l'actine 8 (At1g49240).



**Figure 91: Schéma de la méthodologie de l'analyse bio-informatique**

Ce schéma reprend les différentes étapes de l'analyse bio-informatique réalisée sur les données de transcriptomique et de RIP seq (RNA immunoprécipitation sequencing). QC : Quality Control score. Rpkm : read per kilobase per million. TE : éléments transposables. <sup>1</sup> un QC supérieur à 20 indique que les données sont de bonne qualité <sup>2</sup> dans une des conditions au moins. <sup>3</sup> moyenne.

Les plaques sont ensuite centrifugées 1 minute à 1000 g avant d'être placées dans l'appareil. L'amplification des ADNc se fait en 40 cycles (15 secondes à 95°C / 1 minute à 60°C) après une pré-incubation de 5 min à 95°C. La dénaturation/renaturation des ADN générés est ensuite mesurée (melting curve) via le programme suivant : 5 secondes à 95°C, 1 minute à 65°C, augmentation en continue jusqu'à 97°C puis diminution de la température jusqu'à 40°C en 30 secondes. Cette étape permet d'établir la spécificité de l'amplification.

### V.1.3.c Analyse des données

Une fois la qPCR terminée, les Ct obtenus vont être à la base des analyses. Premièrement la répliquabilité technique est vérifiée. Pour cela, la moyenne et l'écart-type est calculée entre les répliquats de chaque point deux à deux. Un écart supérieur à 0,2 n'est pas toléré. Une fois les répliquats validés, l'analyse à proprement parler peut débuter. Pour chaque point la moyenne des Ct des répliquats est calculée. La différence entre la moyenne obtenue et la moyenne du gène de référence est calculée et nommée :  $\Delta Ct^*$ . Pour chaque point, la valeur relative d'expression correspond à  $2^{\Delta Ct}$ . Les valeurs ainsi obtenues pour les différents répliquats biologiques sont ensuite moyennées et les écart-types calculés avant de calculer les rapports entre les valeurs obtenues permettant de déterminer s'il y a une variation d'expression du gène en question.

$$*\Delta Ct = (Ct^{\text{moy gène}} - Ct^{\text{moy réf}})$$

## V.2. Analyse bio-informatique

### V.2.1 Génération des tableaux de comptage

L'intégralité de l'analyse bio-informatique des données de séquençage (transcriptomique et RIP) a été réalisée au sein de la plateforme Bio-informatique du LGDP (Marie-Christine Carpentier et Christel LLauro, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR5096, Perpignan, France). Pour chaque banque séquencée une série d'analyse a été réalisée (Figure 91) afin d'aboutir à la génération d'un tableau de comptage. La qualité des séquences est vérifiée à l'aide du logiciel FastQC\* (Andrews, 2010), un Qscore moyen de 38 est obtenu pour chacune d'entre elles. Une série de filtre a ensuite été utilisée sur les séquences afin de supprimer les lectures chloroplastiques, mitochondriales, ribosomales et

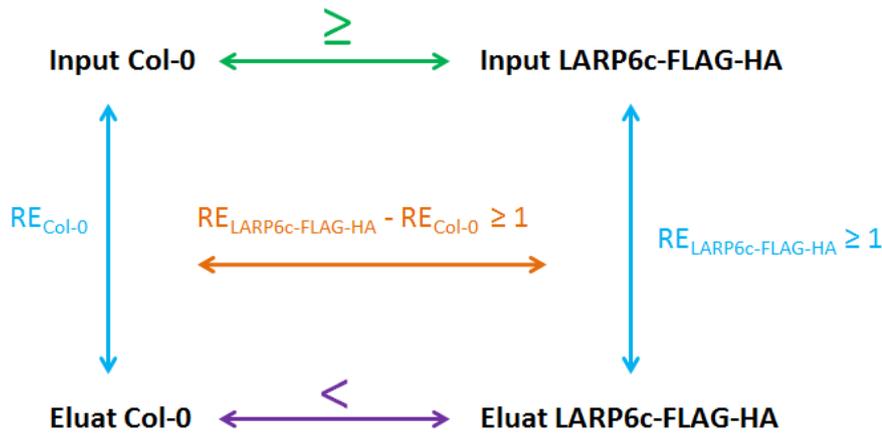
associées aux tRNA. Ceci a été effectué par alignement des données contre les séquences de références issues de TAIR10 via le logiciel Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012). Ces données ainsi filtrées sont ensuite alignées contre le génome de TAIR10 (fichier d'annotation TAIR10\_genes\_transposons.gtf) via le logiciel TopHat2 (Kim et al., 2013). La quantification des lectures associées aux différents gènes ainsi que l'analyse différentielle sont ensuite réalisées à l'aide de la suite de logiciels Cufflinks, Cuffmerge, Cuffdiff (Trapnell et al., 2010). Un seuil a ensuite été appliqué afin de ne conserver que les loci s'exprimant au minimum à 1 rpkm (red per kilobase per million) dans au moins une des banques pour chaque analyse. La réplicabilité a finalement été vérifiée par projection des comptages d'un réplicat sur l'autre pour chaque condition. Dans chaque cas, la droite de régression obtenue par régression orthogonale se confond avec la bissectrice validant ainsi les réplicats. Les données ont ensuite été triées afin de ne conserver que les données les plus significatives.

\*disponible sur : <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

### V.2.2 Analyse différentielle des données de transcriptomique

En ce qui concerne l'analyse de transcriptomique, seuls les gènes s'exprimant à au moins 1 rpkm dans la condition *Col-0* ou la condition *larp6c-3* et présentant une variation d'expression d'au moins 1,5 fois entre les deux échantillons sont conservés. Les gènes ne possédant pas d'annotation dans la base de données TAIR10 sont également retirés de la liste (1116 loci). Les annotations AgriGO\* sont réalisées en comparant les listes de gènes obtenues (total des gènes affectés par la mutation ou gènes affectés positivement par la mutation ou gènes affectés par la mutation et fortement exprimés (supérieur à 600 rpkm)) à la liste des gènes exprimés à au moins 1 rpkm. Au sein des catégories GO significativement enrichies, la liste des gènes a été récupérée afin d'être annotée et analysée. D'autre part, la liste de gènes présentant une expression différentielle significative a été analysée par recherche de membres d'une même famille ou complexe à l'aide des annotations de TAIR10.

\*AgriGO : <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>



**Figure 92: Représentation schématique de filtres appliquée lors de l'analyse fonctionnelle du RIP**

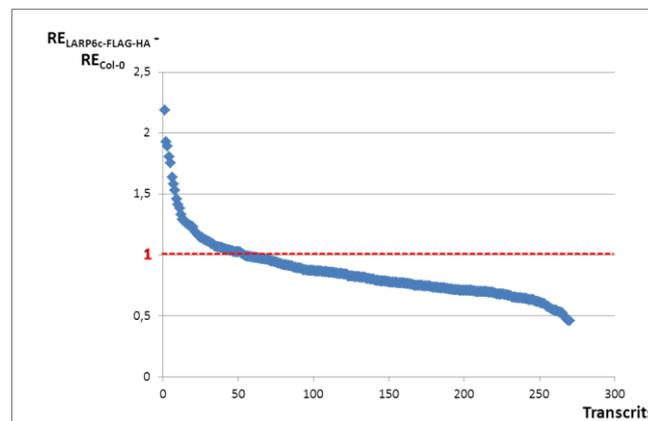
**Filtre 1** : retirer les transcrits ayant une différence significative de lectures dans l'Input en faveur de LARP6c-FLAG-HA (seuil : 1,2 fois le nombre de lecture dans Col-0).

**Filtre 2** : retirer les transcrits n'ayant pas de différence significative de lectures dans l'éluat entre les deux conditions et ceux étant plus accumulés dans l'Eluat Col-0.

**Filtre 3** : retirer les transcrits ayant un rapport Eluat / Input qui n'est pas au moins égal à 1.

**Filtre 4** : retirer les transcrits dont l'enrichissement entre Eluat et Input n'est pas plus important dans la condition LARP6-FLAG-HA que dans la condition sauvage :

$$RE_{LARP6c-FLAG-HA} - RE_{Col-0} \geq 1$$



**Figure 93: Distribution des valeurs  $RE_{LARP6c-FLAG-HA} - RE_{Col-0}$  sur la liste des 270 transcrits**

Pour chaque transcrit la valeur  $RE_{LARP6c-FLAG-HA} - RE_{Col-0}$  est représentée graphiquement. Le seuil arbitrairement placé à 1, permet de ne conserver que les 19,63% de transcrits présentant le plus fort enrichissement dans la condition LARP6c-FLAG-HA par rapport à Col-0.

### V.2.3 Analyse différentielle des données de RIP

Pour ce qui est de l'analyse de RIP, la première étape a consisté à enlever de la liste les gènes possédant des nombres de lectures aberrants (valeurs non disponibles ou infinies). L'ensemble des filtres appliqués ensuite sont schématisés dans la figure 92. Les gènes sont tout d'abord triés en fonction des valeurs dans « l'Input », afin de s'assurer que les deux échantillons (Col-0 et LARP6c-FLAG-HA) soient comparables. Les valeurs présentant une différence statistiquement significative sont retirées, de plus, le rapport  $\text{Input}_{\text{Col-0}} / \text{Input}_{\text{LARP6c-FLAG-HA}}$  est calculé afin d'éliminer tous les gènes présentant un nombre de lecture dans  $\text{Input}_{\text{LARP6c-FLAG-HA}}$  supérieur à 1,2 fois le nombre de lecture dans  $\text{Input}_{\text{Col-0}}$ . La liste de gènes ainsi obtenue (5202 gènes) est ensuite triée en fonction des lectures dans les Eluats. Dans un premier temps, tous les gènes ne présentant pas de différence statistiquement significative (statistiques différentielles basées sur une loi binomiale négative) entre les deux conditions sont éliminés de la liste. Le rapport  $\text{Eluat}_{\text{LARP6c-FLAG-HA}} / \text{Eluat}_{\text{Col-0}}$  est ensuite calculé afin d'éliminer les gènes présentant un enrichissement dans Col-0 et donc un rapport inférieur à 1 (reste : 630 gènes). Afin de ne sélectionner que les transcrits les plus fortement enrichis et donc les cibles les plus probables, les transcrits moins représentés dans l'Eluat par rapport à « l'Input » sont mis de côté. Pour cela, le rapport Eluat/Input (RE) est calculé pour la condition LARP6c-FLAG-HA et un seuil est fixé à 1 (reste : 270 gènes). Finalement, le dernier filtre appliqué concerne la différence d'enrichissement entre la condition Col-0 et la condition LARP6c-FLAG-HA. Ainsi la différence des rapports est calculée ( $\text{RE}_{\text{LARP6c-FLAG-HA}} - \text{RE}_{\text{Col-0}}$ ) et la distribution des valeurs (allant de 0,45 à 2,2) est observée (Figure 93) permettant ainsi de fixer un seuil arbitraire à 1 et de conserver les 19,63% de transcrits les plus enrichis (53 transcrits) (Annexe 4). En effet, ceci permet ainsi de rejeter tous les gènes qui présentent un enrichissement dans LARP6c-FLAG-HA trop proche de celui observé dans la condition Col-0. Les annotations correspondant aux 53 transcrits sont ensuite analysées.

## VI. Techniques d'imagerie

### VI.1. Observation au microscope confocal

Les images de localisation ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal\* (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés sont listées ci-après : DAPI (405 nm / 420-480nm), RFP (555 nm / 600-700 nm), GFP (488 nm / 490-555). Dans la majorité des cas, les tissus sont observés dans une goutte de solution de DAPI déposée entre lame (Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) et lamelle (Marienfel Superior, Lauda-Königshofen, Allemagne). La préparation des échantillons de pollen dépend du stade du pollen que l'on souhaite observer. Dans le cas du pollen mature, les fleurs ouvertes sont prélevées à l'aide d'une pince, puis trempées dans la solution de DAPI libérant ainsi les grains de pollen. L'observation de stades plus précoces du pollen nécessite de disséquer des bourgeons à la loupe binoculaire afin d'en prélever les étamines. Ces dernières sont ensuite placées entre lame et lamelle dans une goutte de solution de DAPI puis « écrasées » légèrement afin de faire sortir le pollen des sacs polliniques. Le pollen désormais en solution peut ainsi être observé. Les localisations en tubes polliniques ont été réalisées sur du pollen mis en culture sur lame (cf. II.2 Croissance de tubes polliniques *in vitro*) et observé directement. Les localisations observées en feuilles et pointe de racines ont été réalisées sur des plantules semées *in vitro* âgées de 5 à 7 jours et de 10 à 15 jours respectivement.

\*Tête confocale LSM700 montée sur un microscope inversé Axio Observer.Z1 avec platine motorisée et pourvu de 4 lasers (405 nm, 488 nm, 555 nm, 639 nm) et de 3 objectifs : 10X (EC "Plan-Neofluar" 10x/0.3), 25X double immersion (LD LCI "Plan-Apochromat" 25x/0.8 DIC) et 63X immersion à huile ("Plan-Apochromat" 63x/1.40 DIC).

**Solution de DAPI** : 1X PBS pH 7, 0,5% Triton™ (Sigma, Saint-Louis, MO, USA), DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 1 µg/ml.

**PBS 10X** : 1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl, 101,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.

### VI.2. Observations à la loupe binoculaire

Les images de coloration à l'aide du rapporteur Gus, ont été obtenues à l'aide d'une loupe binoculaire Leica MZ12 (Wetzlar, Allemagne) agrémentée de deux lampes (KL 2500 LCD, Schott, Elmsford, NY, USA et CLS 100, Leica, Wetzlar, Allemagne). La loupe binoculaire est connectée à un ordinateur disposant du logiciel d'acquisition d'image Leica Application Suite V3.6.

### VI.3. Analyse de l'expression d'un rapport GUS (coloration GUS)

Les tissus (plantules / fleurs) sont prélevés puis fixés dans l'acétone 90% sur glace pendant 20 minutes avant d'être rincés dans du tampon phosphate. Les tissus sont ensuite placés dans la solution de coloration composée de la solution X-glucuronide diluée au 1/80<sup>ème</sup> dans du tampon phosphate. La pénétration de la solution de coloration dans les tissus se fait en plaçant les échantillons sous vide pendant 2 à 3 minutes. Cette étape est répétée 2 à 3 fois. La solution contenant les tissus est ensuite incubée sur la nuit à 37°C. Lorsque la coloration apparaît, les tissus sont lavés dans plusieurs bains d'éthanol 75% afin de retirer l'excès de coloration (environ 12 heures). Les tissus peuvent ensuite être observés à la loupe binoculaire.

**Solution X-glucuronide :** 40 mg/ml dans une solution de diméthylformamide (DMF) (stocker à -20°C à l'obscurité).

**Tampon phosphate :** 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,5 mM ferrocyanide de potassium, 0,5 mM ferricyanide de potassium, Triton<sup>TM</sup> X-100 1/1000, pH 7.

**Solution de lavage :** hydrate de chloral, H<sub>2</sub>O, glycérine (8:3:1,poids/poids).

---

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aalto, M. K., Helenius, E., Kariola, T., Pennanen, V., Heino, P., Hõrak, H., Puzõrjova, I., Kollist, H., & Palva, E. T. 2012. ERD15--an attenuator of plant ABA responses and stomatal aperture. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 182: 19–28.
- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics International*, 11(7): 36–41.
- Aigner, S., Lingner, J., Goodrich, K. J., Grosshans, C. a, Shevchenko, a, Mann, M., & Cech, T. R. 2000. Euplotes telomerase contains an La motif protein produced by apparent translational frameshifting. *The EMBO journal*, 19(22): 6230–6239.
- Aigner, S., Postberg, J., Lipps, H. J., & Cech, T. R. 2003. The Euplotes La motif protein p43 has properties of a telomerase-specific subunit. *Biochemistry*, 42(19): 5736–47.
- Alazami, A. M., Al-Owain, M., Alzahrani, F., Shuaib, T., Al-Shamrani, H., Al-Falki, Y. H., Al-Qahtani, S. M., Alsheddi, T., Colak, D., & Alkuraya, F. S. 2012. Loss of function mutation in LARP7, chaperone of 7SK ncRNA, causes a syndrome of facial dysmorphism, intellectual disability, and primordial dwarfism. *Human Mutation*, 33(10): 1429–1434.
- Albrecht, M., & Lengauer, T. 2004. Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochemical and biophysical research communications*, 316(1): 129–38.
- Allain, F. H., Bouvet, P., Dieckmann, T., & Feigon, J. 2000. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO Journal*, 19(24): 6870–6881.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., et al. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5633): 653–657.
- Alspaugh, M. ., & Tan, E. . 1975. Antibodies to Cellular Antigens in Sjogren’s Syndrome. *Journal of Clinical Inverstigation*, 55: 1067–1073.
- Andrews, S. 2010. FastQC : a quality control tool for high throughpuf sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Aoki, K., Adachi, S., Homoto, M., Kusano, H., Koike, K., & Natsume, T. 2013. LARP1 specifically recognizes the 3’ terminus of poly(A) mRNA. *FEBS Letters*, 587(14): 2173–2178.
- Baboonian, C., Venables, P. J., Booth, J., Williams, D. G., Roffe, L. M., & Maini, R. N. 1989. Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La (SS-B): a possible mechanism for autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*, 78(3): 454–459.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Bai, S. W., Herrera-Abreu, M. T., Rohn, J. L., Racine, V., Tajadura, V., Suryavanshi, N., Bechtel, S., Wiemann, S., Baum, B., & Ridley, A. J. 2011. Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC biology*, 9(1): 54.
- Bailey, T. L., & Elkan, C. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the second international conference on intelligent systems for molecular biology* (pp. 28–36).
- Bayfield, M. a, Kaiser, T. E., Intine, R. V., & Maraia, R. J. 2007. Conservation of a masked nuclear export activity of La proteins and its effects on tRNA maturation. *Molecular and cellular biology*, 27(9): 3303–3312.
- Bayfield, M. a, & Maraia, R. J. 2009. Precursor-product discrimination by La protein during tRNA metabolism. *Nature structural & molecular biology*, 16(4): 430–437.
- Bayfield, M. a, Yang, R., & Maraia, R. J. 2010. Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochimica biophysica acta biophysica acta*, 1799(5-6): 365–378.
- Becker, J. D., Takeda, S., Borges, F., Dolan, L., & Feijó, J. a. 2014. Transcriptional Profiling of Arabidopsis root hairs and pollen defines an apical cell growth signature. *BMC plant biology*, 14(1): 197.
- Belostotsky, D., Meagher, R. 1996. A pollen-, ovule-, and early early embryo- specific poly(A) binding protein from Arabidopsis thaliana complements essential functions in Yeast. *The Plant Cell*, 8 (August) : 1261-1275.
- Bhattacharya, R., Perumal, K., Sinha, K., Maraia, R. J., & Reddy, R. 2002. Methylphosphate cap structure in small RNAs reduces the affinity of RNAs to LA protein. *Gene expression*, 10(5-6): 243–253.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Bayfield, M. a, Maraia, R. J., & Barik, S. 2008. Cellular La protein shields nonsegmented negative-strand RNA viral leader RNA from RIG-I and enhances virus growth by diverse mechanisms. *Journal of virology*, 82(16): 7977–7987.
- Blagden, S. P., Gatt, M. K., Archambault, V., Lada, K., Ichihara, K., Lilley, K. S., Inoue, Y. H., & Glover, D. M. 2009. Drosophila Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. *Developmental Biology*, 334(1): 186–197.
- Boavida, L. C., & McCormick, S. 2007. Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 52(3): 570–582.
- Borg, M., Brownfield, L., & Twell, D. 2009. Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of experimental botany*, 60(5): 1465–78.
- Bornstein, P., McKay, J., Devarayalu, S., & Cook, S. C. 1988. A highly conserved, 5' untranslated, inverted repeat sequence is ineffective in translational control of the al(a) collagen gene. *Nucleic acids research*, 16(20): 9721–9736.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Bousquet-Antonelli, C., & Deragon, J.-M. 2009. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(5): 750–64.
- Bravo, J., Aguilar-Henonin, L., Olmedo, G., & Guzmán, P. 2005. Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of Arabidopsis thaliana Poly(A)-binding proteins. *Molecular genetics and genomics*, 272(6): 651–65.
- Brewbaker, J. L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *American journal of botany*, 54(9): 1069–1083.
- Burrows, C., Abd Latip, N., Lam, S.-J., Carpenter, L., Sawicka, K., Tzolovsky, G., Gabra, H., Bushell, M., Glover, D. M., Willis, A. E., & Blagden, S. P. 2010. The RNA binding protein Larp1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic acids research*, 38(16): 5542–53.
- Cai, L., Fritz, D., Stefanovic, L., & Stefanovic, B. 2010a. Binding of LARP6 to the conserved 5' stem-loop regulates translation of mRNAs encoding type I collagen. *Journal of molecular biology*, 395(2): 309–26.
- Cai, L., Fritz, D., Stefanovic, L., & Stefanovic, B. 2010b. Nonmuscle myosin-dependent synthesis of type I collagen. *Journal of molecular biology*, 401(4): 564–78.
- Cardinali, B., Carissimi, C., Gravina, P., & Pierandrei-Amaldi, P. 2003. La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37): 35145–35151.
- Chakshusmathi, G., Kim, S. Do, Rubinson, D. a., & Wolin, S. L. 2003. A La protein requirement for efficient pre-tRNA folding. *EMBO Journal*, 22(24): 6562–6572.
- Challa, A. a, & Stefanovic, B. 2011. A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs. *Molecular and cellular biology*, 31(18): 3773–89.
- Chambers, J. C., Kenan, D., Martin, B. J., & Keene, J. D. 1988. Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34): 18043–18051.
- Chang, Y. N., Kenan, D. J., Keene, J. D., Gatignol, A., & Jeang, K. T. 1994. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *Journal of virology*, 68(11): 7008–20.
- Charzynska, M., Murgia, M., Milanesi, C., & Cresti, M. 1989. Origin of sperm cell association in the “ male germ unit ” of Brassica pollen. *Protoplasma*, (149): 1–4.
- Chekanova, J. a, Shaw, R. J., & Belostotsky, D. a. 2001. Analysis of an essential requirement for the poly(A) binding protein function using cross-species complementation. *Current biology*, 11(15): 1207–14.
- Chekanova, J. A., & Belostotsky, D. A. 2003. Evidence that poly (A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *RNA*, 9: 1476–1490.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Cheng, Y., Jin, Z., Agarwal, R., Ma, K., Yang, J., Ibrahim, S., Oлару, A. V., David, S., Ashktorab, H., Smoot, D. T., Duncan, M. D., Hutcheon, D. F., Abraham, J. M., Meltzer, S. J., & Mori, Y. 2012. LARP7 is a potential tumor suppressor gene in gastric cancer. *Laboratory Investigation*, 92(7): 1013–1019.
- Cheung, A. Y., Duan, Q., Costa, S. S., de Graaf, B. H. J., Di Stilio, V. S., Feijo, J., & Wu, H.-M. 2008. The dynamic pollen tube cytoskeleton: live cell studies using actin-binding and microtubule-binding reporter proteins. *Molecular plant*, 1(4): 686–702.
- Cheung, A. Y., & Wu, H.-M. 2008. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annual review of plant biology*, 59: 547–72.
- Cléry, A., Blatter, M., & Allain, F. H. T. 2008. RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(3): 290–298.
- Clough, S.J. and Bent, a. F. 1998. Floral dip: a simplified method for Agro- bacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16(June 1998): 735–743.
- Collins, K. 2006. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(7): 484–494.
- Copela, L. a, Chakshusmathi, G., Sherrer, R. L., & Wolin, S. L. 2006. The La protein functions redundantly with tRNA modification enzymes to ensure tRNA structural stability. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(4): 644–654.
- Copela, L. a, Fernandez, C. F., Sherrer, R. L., & Wolin, S. L. 2008. Competition between the Rex1 exonuclease and the La protein affects both Trf4p-mediated RNA quality control and pre-tRNA maturation. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(6): 1214–1227.
- Costa-mattioli, M., Svitkin, Y., & Sonenberg, N. 2004. La Autoantigen Is Necessary for Optimal Function of the Poliovirus and Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site In Vivo and In Vitro La Autoantigen Is Necessary for Optimal Function of the Poliovirus and Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Sit. *Molecular and cellular biology*, 24(15): 6861–6870.
- Cresti, M., Lancelle, S. A., & Hepler, P. K. 1987. Structure of the generative cell wall complex after freeze substitution in pollen tubes of *Nicotiana* and *Impatiens*. *Journal of cell science*, 88: 373–378.
- Cui, Y., Rao, S., Chang, B., Wang, X., Zhang, K., Hou, X., Zhu, X., Wu, H., Tian, Z., Zhao, Z., Yang, C., & Huang, T. 2015. AtLA1 protein initiates IRES-dependent translation of WUSCHEL mRNA and regulates the stem cell homeostasis of *Arabidopsis* in response to environmental hazards. *Plant, Cell & Environment*, doi:10.11.
- Deragon, J.-M., & Bousquet-Antonelli, C. 2015. The role of LARP1 in translation and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*.
- Diribarne, G., & Bensaude, O. 2009. 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA biology*, 6(2): 122–128.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Domitrovich, A. M., Diebel, K. W., Ali, N., Sarker, S., & Siddiqui, A. 2005. Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology*, 335(1): 72–86.
- Dong, G., Chakshusmathi, G., Wolin, S. L., & Reinisch, K. M. 2004. Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *The EMBO journal*, 23(5): 1000–1007.
- Dresselhaus, T., & Franklin-Tong, N. 2013. Male-female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. *Molecular plant*, 6(4): 1018–36.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., & Su, Z. 2010. agriGO: A GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*, 38: 1–7.
- Dufresne, P. J., Ubalijoro, E., Fortin, M. G., & Laliberté, J.-F. 2008. Arabidopsis thaliana class II poly(A)-binding proteins are required for efficient multiplication of turnip mosaic virus. *The Journal of general virology*, 89(Pt 9): 2339–48.
- Dumas, C., Berger, F., Faure, J., & Matthys-Rochon, E. 1998. Gametes, fertilization and early embryogenesis in flowering plants. *Advances in botanical research*, 28: 231–261.
- Dumas, C., Konx, R. B., & Gaude, T. 1985. The spatial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain of Brassica. *Protoplasma*, 124: 168–174.
- EL-Harake, W. a, Furman, M. a, Cook, B., Nair, K. S., Kukowski, J., & Brodsky, I. G. 1998. Measurement of dermal collagen synthesis rate in vivo in humans. *The American journal of physiology*, 274: E586–E591.
- Engel, M. L., Holmes-davis, R., & McCormick, S. 2005. Green Sperm . Identification of Male Gamete Promoters in Arabidopsis. *Plant physiology*, 138(August): 2124–2133.
- Fairley, J. a, Kantidakis, T., Kenneth, N. S., Intine, R. V., Maraia, R. J., & White, R. J. 2005. Human La is found at RNA polymerase III-transcribed genes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51): 18350–18355.
- Faure, J. E., Digonnet, C., & Dumas, C. 1994. An in vitro system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5153): 1598–1600.
- Fleurdépine, S. 2007. *Caractérisation de la fonction “La” chez Arabidopsis thaliana et identification d’une structure conervée pour les ARN non-codants de type SINE*. Université Blaise Pascal.
- Fleurdépine, S., Deragon, J. M., Devic, M., Guilleminot, J., & Bousquet-Antonelli, C. 2007. A bona fide La protein is required for embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*, 35(10): 3306–3321.
- Fok, V., Friend, K., & Steitz, J. a. 2006. Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Cell Biology*, 173(3): 319–325.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Fonseca, B. D., Zakaria, C., Jia, J.-J., Graber, T. E., Svitkin, Y., Tahmasebi, S., Healy, D., Hoang, H.-D., Jensen, J. M., Diao, I. T., Lussier, A., Dajadian, C., Padmanabhan, N., Wang, W., Matta-Camacho, E., Hearnden, J., Smith, E. M., Tsukumo, Y., Yanagiya, A., Morita, M., et al. 2015. La-related protein 1 (LARP1) represses terminal oligopyrimidine (TOP) mRNA translation downstream of mTOR complex 1 (mTORC1). *Journal of Biological Chemistry*.
- Francoeur, M., & Mathews, M. B. 1982. Interaction between VA RNA and the lupus antigen La : Formation of a ribonucleoprotein particle in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(November): 6772–6776.
- Freibaum, B. D., Chitta, R. K., High, A. A., & Taylor, J. P. 2010. Global Analysis of TDP-43 Interacting Proteins Reveals Strong Association with RNA Splicing and Translation Machinery research articles. *Journal of proteome research*, 9: 1104–1120.
- French, S. L., Osheim, Y. N., Schneider, D. a, Sikes, M. L., Fernandez, C. F., Copela, L. a, Misra, V. a, Nomura, M., Wolin, S. L., & Beyer, A. L. 2008. Visual analysis of the yeast 5S rRNA gene transcriptome: regulation and role of La protein. *Molecular and cellular biology*, 28(14): 4576–4587.
- Gandin, V., Senft, D., Topisirovic, I., & Ronai, Z. a. 2013. RACK1 Function in Cell Motility and Protein Synthesis. *Genes & cancer*, 4(9-10): 369–377.
- Garlapati, S., Saraiya, A. a, & Wang, C. C. 2011. A La autoantigen homologue is required for the internal ribosome entry site mediated translation of giardiavirus. *PloS one*, 6(3): e18263.
- Ge, L., Gou, X., Yuan, T., Strout, G. W., Nakashima, J., Blancaflor, E. B., Tian, H. Q., & Russell, S. D. 2011. Migration of sperm cells during pollen tube elongation in *Arabidopsis thaliana*: behavior during transport, maturation and upon dissociation of male germ unit associations. *Planta*, 233(2): 325–32.
- Glenn, H. L., Wang, Z., & Schwartz, L. M. 2010. Acheron, a Lupus antigen family member, regulates integrin expression, adhesion, and motility in differentiating myoblasts. *American journal of physiology. Cell physiology*, 298(1): C46–55.
- Gottlieb, E., & Steitz, J. a. 1989a. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *The EMBO journal*, 8(3): 851–61.
- Gottlieb, E., & Steitz, J. a. 1989b. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *The EMBO journal*, 8(3): 841–50.
- Gruber, A. R., Koper-Emde, D., Marz, M., Tafer, H., Bernhart, S., Obernosterer, G., Mosig, A., Hofacker, I. L., Stadler, P. F., & Benecke, B. J. 2008. Invertebrate 7SK snRNAs. *Journal of Molecular Evolution*, 66(2): 107–115.
- Guan, Y., Guo, J., Li, H., & Yang, Z. 2013. Signaling in pollen tube growth: Crosstalk, feedback, and missing links. *Molecular Plant*, 6(4): 1053–1064.
- Hafidh, S., Potěšil, D., Fila, J., Feciková, J., Čapková, V., Zdráhal, Z., & Honys, D. 2014. In search of ligands and receptors of the pollen tube: the missing link in pollen tube perception. *Biochemical Society transactions*, 42(2): 388–94.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- He, N., Jahchan, N. S., Hong, E., Li, Q., Bayfield, M. a, Maraia, R. J., Luo, K., & Zhou, Q. 2008. A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Molecular cell*, 29(5): 588–99.
- Hecht, V., Stiefel, V., Delseny, M., & Gallois, P. 1997. A new Arabidopsis nucleic-acid-binding protein gene is highly expressed in dividing cells during development. *Plant molecular biology*, 34(1): 119–24.
- Heppler, P. K., & Winship, L. J. 2015. The pollen tube clear zone: Clues to the mechanism of polarized growth. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(1): 79–92.
- Higashiyama, T., & Takeuchi, H. 2015. The Mechanism and Key Molecules Involved in Pollen Tube Guidance. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 393–413.
- Hilton, J. 1998. Review of the fossil evidence for the origin and earliest evolution of the seed-plants. *Acta Botanica Sinica*, 40(11): 981–987.
- Hon, T., Lee, H. C., Hach, a, Johnson, J. L., Craig, E. a, Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Zhang, L. 2001. The Hsp70-Ydj1 molecular chaperone represses the activity of the heme activator protein Hap1 in the absence of heme. *Molecular and cellular biology*, 21(23): 7923–7932.
- Honys, D., & Twell, D. 2004. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. *Genome biology*, 5(11): R85.
- Horke, S., Reumann, K., Schweizer, M., Will, H., & Heise, T. 2004. Nuclear trafficking of la protein depends on a newly identified nucleolar localization signal and the ability to bind RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25): 26563–26570.
- Huang, K.-L., Chadee, a. B., Chen, C.-Y. a., Zhang, Y., & Shyu, A.-B. 2013. Phosphorylation at intrinsically disordered regions of PAM2 motif-containing proteins modulates their interactions with PABPC1 and influences mRNA fate. *RNA*, 19: 295–305.
- Hühn, P., Pruijn, G. J. M., Van Venrooij, W. J., & Bachmann, M. 1997. Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme. *Nucleic Acids Research*, 25(2): 410–416.
- Hussain, R. H., Zawawi, M., & Bayfield, M. a. 2013. Conservation of RNA chaperone activity of the human La-related proteins 4, 6 and 7. *Nucleic acids research*, 41(18): 8715–25.
- Ichihara, K., Shimizu, H., Taguchi, O., Yamaguchi, M., & Inoue, Y. H. 2007. A Drosophila orthologue of larp protein family is required for multiple processes in male meiosis. *Cell structure and function*, 32(2): 89–100.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96: 23–28.
- Intine, R. V, Dundr, M., Vassilev, A., Schwartz, E., Zhao, Y., Zhao, Y., Depamphilis, M. L., & Maraia, R. J. 2004. Nonphosphorylated human La antigen interacts with nucleolin at nucleolar sites involved in rRNA biogenesis. *Molecular and cellular biology*, 24(24): 10894–10904.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Intine, R. V., Tenenbaum, S. a., Sakulich, A. L., Keene, J. D., & Maraia, R. J. 2003. Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Molecular Cell*, 12(5): 1301–1307.
- Jacks, A., Babon, J., Kelly, G., Manolaridis, I., Cary, P. D., Curry, S., & Conte, M. R. 2003. Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure*, 11(7): 833–843.
- Jensen, W. a., & Fisher, D. B. 1970. Cotton embryogenesis: The pollen tube in the stigma and style. *Protoplasma*, 69(2): 215–235.
- Ji, X., Lu, H., Zhou, Q., & Luo, K. 2014. LARP7 suppresses P-TEFb activity to inhibit breast cancer progression and metastasis. *eLife*, 3: e02907.
- Jiang, L., Yang, S.-L., Xie, L.-F., Pua, C. S., Zhang, X.-Q., Yang, W.-C., Sundaresan, V., & Ye, D. 2005. VANGUARD1 encodes a pectin methyltransferase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. *The Plant cell*, 17(February): 584–596.
- Jiang, W.-P., Sima, Z.-H., Wang, H.-C., Zhang, J.-Y., Sun, L.-S., Chen, F., & Li, T.-J. 2014. Identification of the involvement of LOXL4 in generation of keratocystic odontogenic tumors by RNA-Seq analysis. *International journal of oral science*, 6(1): 31–8.
- Jiménez-lópez, D., & Guzmán, P. 2014. Insights into the evolution and domain structure of ataxin-2 proteins across eukaryotes. *BMC Research Notes*, 7(453).
- Jinek, M., Fabian, M. R., Coyle, S. M., Sonenberg, N., & Doudna, J. a. 2010. Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nature structural & molecular biology*, 17(2): 238–240.
- Johnson-Brousseau, S. a., & McCormick, S. 2004. A compendium of methods useful for characterizing Arabidopsis pollen mutants and gametophytically-expressed genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 39(5): 761–75.
- Kagami, M., Toh-e, A., & Matsui, Y. 1997. SR09, a Multicopy Suppressor of the Bud Growth Defect in the Saccharmyces cerevisiae rh3 Deficient Cells, Shows Strong Genetic Interactions With Tropomyosin Genes, Suggesting Its Role in Organization of the Actin Cytoskeleton. *Genetics*, 147: 1003–1016.
- Keene, J. D. 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature reviews. Genetics*, 8(7): 533–543.
- Kershaw, C. J., Costello, J. L., Castelli, L. M., Talavera, D., Rowe, W., Sims, P. F. G., Ashe, M. P., Hubbard, S. J., Pavitt, G. D., & Grant, C. M. 2015. The Yeast La Related Protein Slf1p Is a Key Activator of Translation during the Oxidative Stress Response. *PLoS genetics*, 11(1): e1004903.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology*, 14(4): R36.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Kim, Y. K., Back, S. H., Rho, J., Lee, S. H., & Jang, S. K. 2001. La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic acids research*, 29(24): 5009–5016.
- Kivirikko, K. I. 1998. Coltagen Biosynthesis : A Mini-Review Cluster. *Matrix Biology*, 16: 355–356.
- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., & Weisshaar, B. 2012. GABI-Kat SimpleSearch: New features of the Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research*, 40(D1): 1–5.
- Koressaar, T., & Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10): 1289–1291.
- Kotik-Kogan, O., Valentine, E. R., Sanfelice, D., Conte, M. R., & Curry, S. 2008. Structural Analysis Reveals Conformational Plasticity in the Recognition of RNA 3' Ends by the Human La Protein. *Structure*, 16(6): 852–862.
- Kozlov, G., & Gehring, K. 2010. Molecular basis of eRF3 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *PLoS ONE*, 5(4): 3–8.
- Kozlov, G., Ménade, M., Rosenauer, A., Nguyen, L., & Gehring, K. 2010a. Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *Journal of molecular biology*, 397(2): 397–407.
- Kozlov, G., Safaee, N., Rosenauer, A., & Gehring, K. 2010b. Structural basis of binding of P-body-associated proteins GW182 and ataxin-2 by the Mlle domain of poly(A)-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, 285(18): 13599–606.
- Kozlov, G., Trempe, J. F., Khaleghpour, K., Kahvejian, a, Ekiel, I., & Gehring, K. 2001. Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8): 4409–13.
- Krueger, B. J., Jeronimo, C., Roy, B. B., Bouchard, A., Barrandon, C., Byers, S. a, Searcey, C. E., Cooper, J. J., Bensaude, O., Cohen, E. a, Coulombe, B., & Price, D. H. 2008. LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic acids research*, 36(7): 2219–29.
- Kufel, J., Allmang, C., Chanfreau, G., Petfalski, E., Lafontaine, D. L. J., & Tollervey, D. 2000. Precursors to the U3 Small Nucleolar RNA Lack Small Nucleolar RNP Proteins but Are Stabilized by La Binding. *Molecular and cellular biology*, 20(15): 5415–5424.
- Küspert, M., Murakawa, Y., Schäffler, K., Vanselow, J. T., Wolf, E., Juranek, S., Schlosser, A., Landthaler, M., & Fischer, U. T. Z. 2015. LARP4B is an AU-rich sequence associated factor that promotes mRNA accumulation and translation. *RNA*, 21(7).
- Lahr, R. M., Mack, S. M., Héroux, A., Blagden, S. P., Bousquet-Antonelli, C., Deragon, J.-M., & Berman, A. J. 2015. The La-related protein 1-specific domain repurposes HEAT-like repeats to directly bind a 5'TOP sequence. *Nucleic Acids Research*, doi: 10.1093.
- Lalanne, E., & Twell, D. 2002. Genetic Control of Male Germ Unit Organization in Arabidopsis. *Plant physiology*, 129(June): 865–875.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Lamandé, S. R., & Bateman, J. F. 1999. Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Seminars in cell & developmental biology*, 10(5): 455–464.
- Lan, C., Lee, H. C., Tang, S., & Zhang, L. 2004. A novel mode of chaperone action: Heme activation of Hsp1 by enhanced association of Hsp90 with the repressed Hsp70-Hsp1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26): 27607–27612.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4): 357–359.
- Lerner, M. R., Andrews, N. C., Miller, G., & Steitz, J. a. 1981. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(2): 805–9.
- Lim, N. S., Kozlov, G., Chang, T.-C., Groover, O., Siddiqui, N., Volpon, L., De Crescenzo, G., Shyu, A.-B., & Gehring, K. 2006. Comparative peptide binding studies of the PABC domains from the ubiquitin-protein isopeptide ligase HYD and poly(A)-binding protein. Implications for HYD function. *The Journal of biological chemistry*, 281(20): 14376–82.
- Lingner, J., & Cech, T. R. 1996. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20): 10712–10717.
- Liu, X., Wang, T., Wakita, T., & Yang, W. 2010. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology*, 398(1): 57–67.
- Logemann, J., Schell, J., & Willmitzer, L. 1987. Improved Method for the Isolation of RNA from Plant Tissues Plant Tissue Common RNA Isolation Methods CsCl cushion centrifugation method ( 3 ). Detailed Description of the Modified Method Guanidine hydrochloride extraction . Tis- Techniques Required for C. *Analytical biochemistry*, (163): 16–20.
- Manojlovic, Z., & Stefanovic, B. 2012. A novel role of RNA helicase A in regulation of translation of type I collagen mRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(2): 321–34.
- Maraia, R. J., & Bayfield, M. a. 2006. The La Protein-RNA complex surfaces. *Molecular Cell*, 21(2): 149–152.
- Maris, C., Dominguez, C., & Allain, F. H. T. 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal*, 272(9): 2118–2131.
- Markert, A., Grimm, M., Martinez, J., Wiesner, J., Meyerhans, A., Meyuhass, O., Sickmann, A., & Fischer, U. 2008. The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO reports*, 9(6): 569–75.
- Martínez, P., & Blasco, M. a. 2015. Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends in Biochemical Sciences*, 1–12.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Martino, L., Pennell, S., Kelly, G., Bui, T. T. T., Kotik-Kogan, O., Smerdon, S. J., Drake, A. F., Curry, S., & Conte, M. R. 2012. Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein. *Nucleic Acids Research*, 40(3): 1381–1394.
- Martino, L., Pennell, S., Kelly, G., Busi, B., Brown, P., Atkinson, R. a., Salisbury, N. J. H., Ooi, Z.-H., See, K.-W., Smerdon, S. J., Alfano, C., Bui, T. T. T., & Conte, M. R. 2014. Synergic interplay of the La motif, RRM1 and the interdomain linker of LARP6 in the recognition of collagen mRNA expands the RNA binding repertoire of the La module. *Nucleic Acids Research*, 43(1): 645–660.
- Mattioli, M., & Reichlin, M. 1974. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis and rheumatism*, 17(4): 421–9.
- Mcconchie, C. A., Jobson, S., & Knox, R. B. 1985. Computer-Assisted Reconstruction of the Male Germ Unit in Pollen of *Brassica campestris*. *Protoplasma*, (127): 57–63.
- Mccormick, S. 2004. Control of Male Gametophyte Development. *The Plant Cell*, 16: 142–154.
- McCue, A. D., Cresti, M., Feijó, J. a, & Slotkin, R. K. 2011. Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *Journal of experimental botany*, 62(5): 1621–31.
- McElver, J., Tzafrir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M. a, Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J. Z., Law, M., Meinke, D., & Patton, D. 2001. Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 159(4): 1751–63.
- McLaren, R., Caruccio, N., & Ross, J. 1997. Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Molecular and cellular biology*, 17(6): 3028–3036.
- Meerovitch, K., Svitkin, Y. V, Lee, H. S., Lejbkowitz, F., Kenan, D. J., Chan, E. K., Agol, V. I., Keene, J. D., & Sonenberg, N. 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *Journal of virology*, 67(7): 3798–807.
- Merret, R., Descombin, J., Juan, Y. T., Favory, J. J., Carpentier, M. C., Chaparro, C., Charng, Y. Y., Deragon, J. M., & Bousquet-Antonelli, C. 2013a. XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell Reports*, 5(5): 1279–1293.
- Merret, R., Martino, L., Bousquet-Antonelli, C., Fneich, S., Descombin, J., Billey, E., Conte, M. R., & Deragon, J.-M. 2013b. The association of a La module with the PABP-interacting motif PAM2 is a recurrent evolutionary process that led to the neofunctionalization of La-related proteins. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(1): 36–50.
- Merret, R., Nagarajan, V. K., Carpentier, M.-C., Park, S., Favory, J.-J., Descombin, J., Picart, C., Charng, Y. -y., Green, P. J., Deragon, J.-M., & Bousquet-Antonelli, C. 2015. Heat-induced ribosome pausing triggers mRNA co-translational decay in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 43(8): 4121–4132.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Meyuhas, O., & Kahan, T. 2015. The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7): 801–811.
- Mitchell, S. F., & Parker, R. 2014. Principles and Properties of Eukaryotic mRNPs. *Molecular Cell*, 54(4): 547–588.
- Mori, Y., Sato, F., Selaru, F. M., Oлару, A., Perry, K., Kimos, M. C., Tamura, G., Matsubara, N., Wang, S., Xu, Y., Yin, J., Zou, T., Leggett, B., Young, J., Nukiwa, T., Stine, O. C., Abraham, J. M., Shibata, D., & Meltzer, S. J. 2002. Instability typing Reveals Unique Mutational Spectra in Microsatellite-Unstable Gastric Cancers Advances in Brief Instability typing Reveals Unique Mutational Spectra in Microsatellite-Unstable Gastric Cancers 1. *Cancer research*, 62: 3641–3645.
- Muniz, L., Egloff, S., & Kiss, T. 2013. RNA elements directing in vivo assembly of the 7SK/MePCE/Larp7 transcriptional regulatory snRNP. *Nucleic Acids Research*, 41(8): 4686–4698.
- Muñoz-Strale, D., & León, G. 2014. Identification of two highly specific pollen promoters using transcriptomic data. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83: 292–299.
- Mura, M., Hopkins, T. G., Michael, T., Abd-Latip, N., Weir, J., Aboagye, E., Mauri, F., Jameson, C., Sturge, J., Gabra, H., Bushell, M., Willis, a E., Curry, E., & Blagden, S. P. 2014. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression. *Oncogene*, (April): 1–12.
- Mustroph, A., Juntawong, P., & Bailey-Serres, J. 2009. Isolation of plant polysomal mRNA by differential centrifugation and ribosome immunopurification methods. *Methods Molecular Biology*, 553: 109.126.
- Naeeni, A. R., Conte, M. R., & Bayfield, M. a. 2012. RNA chaperone activity of human la protein is mediated by variant RNA recognition motif. *The Journal of biological chemistry*, 287(8): 5472–82.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T. ., Li, J., & Evans, P. R. 1990. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature*, 348: 515–520.
- Nguyen, D., Krueger, B. J., Sedore, S. C., Brogie, J. E., Rogers, J. T., Rajendra, T. K., Saunders, A., Matera, a. G., Lis, J. T., Uguen, P., & Price, D. H. 2012. The Drosophila 7SK snRNP and the essential role of dHEXIM in development. *Nucleic Acids Research*, 40(12): 5283–5297.
- Nicholls, a C., Osse, G., Schloon, H. G., Lenard, H. G., Deak, S., Myers, J. C., Prockop, D. J., Weigel, W. R., Fryer, P., & Pope, F. M. 1984. The clinical features of homozygous alpha 2(I) collagen deficient osteogenesis imperfecta. *Journal of medical genetics*, 21(4): 257–262.
- Nykamp, K., Lee, M., & Kimble, J. 2008. C. elegans La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *RNA*, (14): 1378–1389.
- Oh, S. A., Pal, M. Das, Park, S. K., Johnson, J. A., & Twell, D. 2010. The tobacco MAP215/Dis1-family protein TMBP200 is required for the functional organization of microtubule arrays during male germline establishment. *Journal of experimental botany*, 61(4): 969–81.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Oubridge, C., Ito, N., Evans, P. R., Teo, C.-H., & Nagai, K. 1994. Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*, 372: 432–438.
- Pace, J. M., Wiese, M., Drenguis, A. S., Kuznetsova, N., Leikin, S., Schwarze, U., Chen, D., Mooney, S. H., Unger, S., & Byers, P. H. 2008. Defective C-propeptides of the pro $\alpha$ 2(I) chain of type I procollagen impede molecular assembly and result in osteogenesis imperfecta. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23): 16061–16067.
- Palevitz, B. A., & Cresti, M. 1988. Microtubule Organization in the Sperm of *Tradescantia virginiana*. *Protoplasma*, (146): 28–34.
- Palevitz, B. A., & Cresti, M. 1989. Cytoskeletal changes during generative cell division and sperm formation in *Tradescantia virginiana*. *Protoplasma*, 150: 54–71.
- Pannone, B. K., Kim, S. D., Noe, D. a., & Wolin, S. L. 2001. Multiple functional interactions between components of the Lsm2-Lsm8 complex, U6 snRNA, and the yeast La protein. *Genetics*, 158(1): 187–96.
- Pannone, B. K., Xue, D., & Wolin, S. L. 1998. A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *The EMBO journal*, 17(24): 7442–53.
- Papic, N., Maxwell, C. I., Delker, D. a., Liu, S., Heale, B. S. E., & Hagedorn, C. H. 2012. RNA-sequencing analysis of 5' capped RNAs identifies many new differentially expressed genes in acute hepatitis C virus infection. *Viruses*, 4(4): 581–612.
- Parsons, C. J., Stefanovic, B., Seki, E., Aoyama, T., Latour, A. M., Marzluff, W. F., Rippe, R. a., & Brenner, D. a. 2011. Mutation of the 5'-untranslated region stem-loop structure inhibits  $\alpha$ 1(I) collagen expression in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 286(10): 8609–19.
- Pina, C., Pinto, F., Feijó, J. a., & Becker, J. D. 2005. Gene family analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant physiology*, 138(June): 744–756.
- Ponting, C. P., Mott, R., Bork, P., & Copley, R. R. 2001. Novel Protein Domains and Repeats in *Drosophila melanogaster*: Insights into Structure, Function, and Evolution. *Genome Research*, 11: 1996–2008.
- Prathapam, R., Witkin, K. L., O'Connor, C. M., & Collins, K. 2005. A telomerase holoenzyme protein enhances telomerase RNA assembly with telomerase reverse transcriptase. *Nature structural & molecular biology*, 12(3): 252–7.
- Qin, Y., Leydon, A. R., Manziello, A., Pandey, R., Mount, D., Denic, S., Vasic, B., Johnson, M. a., & Palanivelu, R. 2009. Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genetics*, 5(8).
- Qu, L.-J., Li, L., Lan, Z., & Dresselhaus, T. 2015. Peptide signalling during the pollen tube journey and double fertilization. *Journal of Experimental Botany*, 66(17): 5139–5150.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Rai, M., Schmidt, E., Hashimoto, S., Cheverud, J., & Sandell, L. 2015. Genetic loci that regulates ectopic calcification in response to knee trauma in LG/J by SM/J advanced intercross mice. *Journal of Orthopaedic research*, doi: 10.1002/jor.22944.
- Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P., & Randsholt, N. B. 2002. Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: A role for the multi sex combs gene. *Genetics*, 162(3): 1259–1274.
- Rice, P. 2000. The European Molecular Biology Open Software Suite EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite. *Elsevier Science*, 16(6): 2–3.
- Rinke, J., & Steitz, J. a. 1982. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell*, 29(1): 149–59.
- Robinson, S. J., Tang, L. H., Mooney, B. A., McKay, S. J., Clarke, W. E., Links, M. G., Karcz, S., Regan, S., Wu, Y.-Y., Gruber, M. Y., Cui, D., Yu, M., & Parkin, I. a P. 2009. An archived activation tagged population of *Arabidopsis thaliana* to facilitate forward genetics approaches. *BMC plant biology*, 9: 101.
- Romero, V., Fellows, E., Jenne, D. E., & Andrade, F. 2009. Cleavage of La protein by granzyme H induces cytoplasmic translocation and interferes with La-mediated HCV-IRES translational activity. *Cell death and differentiation*, 16(2): 340–348.
- Russell, S. D., & Cass, D. D. 1981. Ultrastructure of the Sperms of *Plumbago zeylanica*. *Protoplasma*, 107: 85–107.
- Sáez-Vásquez, J., Gallois, P., & Delseny, M. 2000. Accumulation and nuclear targeting of BnC24, a *Brassica napus* ribosomal protein corresponding to a mRNA accumulating in response to cold treatment. *Plant Science*, 156(1): 35–46.
- Sanfelice, D., Kelly, G., Curry, S., & Conte, M. R. 2008. NMR assignment of the N-terminal region of human La free and in complex with RNA. *Biomolecular NMR Assignments*, 2(2): 107–109.
- Schäffler, K., Schulz, K., Hirmer, A., Wiesner, J., & Grimm, M. 2010. A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation. *RNA*, 16: 1488–1499.
- Schenk, L., Meinel, D. M., Strasser, K., & Gerber, a. P. 2012. La-motif-dependent mRNA association with Slf1 promotes copper detoxification in yeast. *Rna*, 18(3): 449–461.
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., & Lohmann, J. U. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*, 37(5): 501–506.
- Schwartz, E. I., Intine, R. V, & Maraia, R. J. 2004. CK2 is responsible for phosphorylation of human La protein serine-366 and can modulate rpL37 5'-terminal oligopyrimidine mRNA metabolism. *Molecular and cellular biology*, 24(21): 9580–9591.
- Sessions, A., Burke, E., & Presting, G. 2002. High-Throughput *Arabidopsis* Reverse Genetics System. *The Plant cell*, 14(December): 2985–2994.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Shao, R., Scully, S. J., Yan, W., Bentley, B., Mueller, J., Brown, C., Bigelow, C., & Schwartz, L. M. 2012. The novel lupus antigen related protein acheron enhances the development of human breast cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 130(3): 544–54.
- Simons, F. H. M., Rutjes, S. A., Venrooij, W. J. V. A. N., & Pruijn, G. E. R. J. M. 1996. The interactions with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA. *RNA*, 2: 264–273.
- Singh, M., Choi, C. P., & Feigon, J. 2013. xRRM: A new class of RRM found in the telomerase La family protein p65. *RNA biology*, 10(3): 1–7.
- Singh, M., Wang, Z., Koo, B.-K., Patel, A., Cascio, D., Collins, K., & Feigon, J. 2012. Structural basis for telomerase RNA recognition and RNP assembly by the holoenzyme La family protein p65. *Molecular cell*, 47(1): 16–26.
- Slotkin, R. K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurđzić, M., Becker, J. D., Feijó, J. a, & Martienssen, R. a. 2009. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, 136(3): 461–72.
- Smykal, P., Janotová, I., & Pechan, P. 2000. A novel Brassica napus L . pollen-specific gene belongs to a nucleic-acid-binding protein family. *Sex Plant Reprod*, 13: 127–134.
- Sobel, S. G., & Wolin, S. L. 1999. Two yeast La motif-containing proteins are RNA-binding proteins that associate with polyribosomes. *Molecular biology of the cell*, 10(11): 3849–3862.
- Stefano, J. E. 1984. Purified Lupus Antigen La Recognizes an Oligouridylylate Stretch Common to the 3' Termini of RNA Polymerase III Transcripts. *Cell*, 36: 145–154.
- Stefanovic, B. 2013. RNA protein interactions governing expression of the most abundant protein in human body, type I collagen. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 4(5): 535–545.
- Stefanovic, B., Hellerbrand, C., & Brenner, D. a. 1999. Regulatory role of the conserved stem-loop structure at the 5' end of collagen alpha1(I) mRNA. *Molecular and cellular biology*, 19(6): 4334–4342.
- Stefanovic, B., Schnabl, B., & Brenner, D. a. 2002. Inhibition of Collagen  $\alpha$ 1(I) Expression by the 5' Stem-Loop as a Molecular Decoy. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20): 18229–18237.
- Stefanovic, L., Longo, L., Zhang, Y., & Stefanovic, B. 2014. Characterization of binding of LARP6 to the 5' stem-loop of collagen mRNAs: Implications for synthesis of type I collagen. *RNA biology*, 11(11): 1386–1401.
- Stone, M. D., Mihalusova, M., O'connor, C. M., Prathapam, R., Collins, K., & Zhuang, X. 2007. Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase ribonucleoprotein. *Nature*, 446(7134): 458–461.
- Strader, L. C., Culler, A. H., Cohen, J. D., & Bartel, B. 2010. Conversion of endogenous indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid drives cell expansion in Arabidopsis seedlings. *Plant physiology*, 153(4): 1577–86.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Sun, R., Chen, W., Zhao, X., Li, T., & Song, Q. 2011. Acheron regulates vascular endothelial proliferation and angiogenesis together with Id1 during wound healing. *Cell Biochemistry and Function*, 29(8): 636–640.
- Svitkin, Y. V., Pause, a., & Sonenberg, N. 1994. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *Journal of virology*, 68(11): 7001–7007.
- Takane, K., Fujishima, K., Watanabe, Y., Sato, A., Saito, N., Tomita, M., & Kanai, A. 2010. Computational prediction and experimental validation of evolutionarily conserved microRNA target genes in bilaterian animals. *BMC genomics*, 11: 101.
- Tan, Q., Li, X., Sadhale, P. P., Miyao, T., & Woychik, N. A. 2000. Multiple Mechanisms of Suppression Circumvent Transcription Defects in an RNA Polymerase Mutant. *Molecular and cellular biology*.
- Tanabe, K., Ito, N., Wakuri, T., Ozoe, F., Umeda, M., Katayama, S., Tanaka, K., Matsuda, H., & Kawamukai, M. 2003. Sla1, a Schizosaccharomyces pombe Homolog of the Human La Protein, Induces Ectopic Meiosis when Its C Terminus Is Truncated. *Eukaryotic Cell*, 2(6): 1274–1287.
- Tcherkezian, J., Cargnello, M., Romeo, Y., Huttlin, E. L., Lavoie, G., Gygi, S. P., & Roux, P. P. 2014. Supplemental Information Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5' TOP mRNA translation, 357–371.
- Teixeira, M. T., & Gilson, E. 2007. La sets the tone for telomerase. *Nature structural & molecular biology*, 14(4): 261–262.
- Teplova, M., Yuan, Y. R., Phan, A. T., Malinina, L., Ilin, S., Teplov, A., & Patel, D. J. 2006. Structural basis for recognition and sequestration of UUUOH 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Molecular Cell*, 21(1): 75–85.
- Terns, M. P., Lund, E., & Dahlberg, J. E. 1992. 3' -End-Dependent Formation of U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles in Xenopus laevis Oocyte Nuclei. *Molecular and cellular biology*, 12(7): 3032–3040.
- Trapnell, C., Williams, B. a, Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology*, 28(5): 511–515.
- Trotta, R., Vignudelli, T., Candini, O., Intine, R. V., Pecorari, L., Guerzoni, C., Santilli, G., Byrom, M. W., Goldoni, S., Ford, L. P., Caligiuri, M. a., Maraia, R. J., Perrotti, D., & Calabretta, B. 2003. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell*, 3(2): 145–160.
- Twell, D. 1995. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen : vegetative cell ablation blocks generative cell migration. *Protoplasma*, (187): 144–154.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Twell, D. 2006. A blossoming romance: gamete interactions in flowering plants. *Nature cell biology*, 8(1): 14–16.
- Uchikawa, E., Natchiar, K. S., Han, X., Proux, F., Roblin, P., Zhang, E., Durand, a., Klaholz, B. P., & Dock-Bregeon, a.-C. 2015. Structural insight into the mechanism of stabilization of the 7SK small nuclear RNA by LARP7. *Nucleic Acids Research*, 1–16.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15): 1–12.
- Valavanis, C., Wang, Z., Sun, D., Vaine, M., & Schwartz, L. M. 2007. Acheron, a novel member of the Lupus Antigen family, is induced during the programmed cell death of skeletal muscles in the moth *Manduca sexta*. *Gene*, 393(1-2): 101–9.
- Van Horn, D. J., Yoo, C. J., Xue, D., Shi, H., & Wolin, S. L. 1997. The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: a conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *RNA (New York, N.Y.)*, 3(12): 1434–1443.
- Vazquez-Pianzola, P., Urlaub, H., & Rivera-Pomar, R. 2005. Proteomic analysis of reaper 5' untranslated region-interacting factors isolated by tobramycin affinity-selection reveals a role for La antigen in reaper mRNA translation. *Proteomics*, 5(6): 1645–1655.
- Voronina, E., Seydoux, G., Sassone-Corsi, P., & Nagamori, I. 2011. RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12).
- Vukmirovic, M., Manojlovic, Z., & Stefanovic, B. 2013. Serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP) regulates translation of type I collagen mRNAs. *Molecular and cellular biology*, 33(19): 3893–906.
- Walkerpeach, C., & Velten, J. 1994. Agrobacterium-mediated gene transfert to plant cells : cointegrate and binary vector systems. *Plant molecular biology manual*, 1–19.
- Wang, H., & Stefanovic, B. 2014. Role of LARP6 and Nonmuscle Myosin in Partitioning of Collagen mRNAs to the ER Membrane. *PLoS ONE*, 9(10): e108870.
- Wang, Z., Glenn, H., Brown, C., Valavanis, C., Liu, J.-X., Seth, A., Thomas, J. E., Karlstrom, R. O., & Schwartz, L. M. 2009. Regulation of muscle differentiation and survival by Acheron. *Mechanisms of development*, 126(8-9): 700–9.
- Weber, C., Nover, L., & Fauth, M. 2008. Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 56(4): 517–30.
- Webster, G. L., Rupert, E., & Koutnik, D. 1982. Systematic significance of pollen nuclear number in euphorbiaceae, tribe euphorbieae. *American journal of botany*, 69(3): 407–415.
- Weng, H., Kim, C., Valavanis, C., Wang, Z., & Schwartz, L. M. 2009. Acheron, an novel LA antigen family member, binds to CASK and forms a complex with Id transcription factors. *Cellular & molecular biology letters*, 14(2): 273–87.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Westermann, S., & Weber, K. 2000. Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1492(2-3): 483–487.
- Williams, J. H., Taylor, M. L., & O'Meara, B. C. 2014. Repeated evolution of tricellular (and bicellular) pollen. *American Journal of Botany*, 101(4): 559–571.
- Wilson, Z. a., Morroll, S. M., Dawson, J., Swarup, R., & Tighe, P. J. 2001. The Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant Journal*, 28(1): 27–39.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. 2007. An “electronic fluorescent pictograph” Browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, 2(8): 1–12.
- Witkin, K. L., & Collins, K. 2004. Holoenzyme proteins required for the physiological assembly and activity of telomerase. *Genes & development*, 18(10): 1107–18.
- Wolin, S. L., & Cedervall, T. 2002. The La protein. *Annual Review of biochemistry*, 71: 375–403.
- Woody, S. T., Austin-Phillips, S., Amasino, R. M., & Krysan, P. J. 2007. The WiscDsLox T-DNA collection: An arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *Journal of Plant Research*, 120(1): 157–165.
- Xie, J., Kozlov, G., & Gehring, K. 2014. The “tale” of poly(A) binding protein: the MLLE domain and PAM2-containing proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1839(11): 1–7.
- Xue, D., Rubinson, D. a, Pannone, B. K., Yoo, C. J., & Wolin, S. L. 2000. U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *The EMBO journal*, 19(7): 1650–60.
- Yamada, Y., Mudryj, M., & de Crombrughe, B. 1983. A uniquely conserved regulatory signal is found around the translation initiation site in three different collagen genes. *Journal of Biological Chemistry*, 258(24): 14914–14919.
- Yamamoto, Y., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., & Noguchi, T. 2003. Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, 44(11): 1192–201.
- Yang, R., Gaidamakov, S. a, Xie, J., Lee, J., Martino, L., Kozlov, G., Crawford, A. K., Russo, A. N., Conte, M. R., Gehring, K., & Marais, R. J. 2011. La-related protein 4 binds poly(A), interacts with the poly(A)-binding protein MLLE domain via a variant PAM2w motif, and can promote mRNA stability. *Molecular and cellular biology*, 31(3): 542–56.
- Yoo, C. J., & Wolin, S. L. 1994. La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Molecular and cellular biology*, 14(8): 5412–5424.
- Yoo, C. J., & Wolin, S. L. 1997. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell*, 89(3): 393–402.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Yu, H., Hu, S., & Russell, S. D. 1992. Sperm cells in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L.: three-dimensional reconstruction, cytoplasmic diminution, and quantitative cytology. *Protoplasma*, (168): 172–183.
- Zanin, E., Pacquelet, A., Scheckel, C., Ciosk, R., & Gotta, M. 2010. LARP-1 promotes oogenesis by repressing *fem-3* in the *C. elegans* germline. *Journal of cell science*, 123(16): 2717–2724.
- Zárský, V., Kulich, I., Fendrych, M., & Pečenková, T. 2013. Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways. *Current opinion in plant biology*, 16(6): 726–33.
- Zhang, B., Jia, J., Yang, M., Yan, C., & Han, Y. 2012. Overexpression of a LAM domain containing RNA-binding protein LARP1c induces precocious leaf senescence in *Arabidopsis*. *Molecules and cells*, 34(4): 367–74.
- Zhang, Y., Peng, L., Hu, T., Wan, Y., Ren, Y., Zhang, J., Wang, X., Zhou, Y., Yuan, W., Wang, Q., Cheng, T., & Zhu, X. 2014. La-related protein 4B maintains murine MLL-AF9 leukemia stem cell self-renewal by regulating cell cycle progression. *Experimental hematology*, 43(4): 309–318.
- Zhou, Q., Li, T., & Price, D. H. 2012. RNA polymerase II elongation control. *Annual Review of biochemistry*, 81: 119–143.
- Zhou, X., Xue, L., Hao, L., Liu, S., Zhou, F., Xiong, H., Qi, X., Lin, D., & Shao, S. 2013. Proteomics-based identification of tumor relevant proteins in lung adenocarcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 67(7): 621–7.
- Zonia, L., & Munnik, T. 2008. Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. *Journal of experimental botany*, 59(4): 861–73.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3406–3415.

---

# ANNEXES

---

<b>Annexe 1 : Liste des amorces utilisées.....</b>	<b>175</b>
<b>Annexe 2 : Constructions réalisées par clonage. ....</b>	<b>177</b>
<b>Annexe 3 : Liste des anticorps à façon et commerciaux utilisés .....</b>	<b>179</b>
<b>Annexe 4 : Liste des gènes codant les 53 ARNm identifiés par RIP. ....</b>	<b>180</b>

## A Annexe 1 : Liste des amorces utilisées.

Gène	ATG	Séquence	Nom/numéro	Tm	Orientation	Site de restriction	Utilisation
Actine 2	AT3G18780	GCTGTTGACTACGAGCAGGAGA	671	56,19	Sens	-	RT
		CCCAGAGAGTTTGTACACAC	693	53,02	Anti-sens	-	RT
Actine 8	AT1G49240	TGCATTTCCCGCGATAAGA	ebq33	59,5 < x < 60,5	Sens	-	RT
		CATCGGCCATGGTCTACGAT	ebq34	59,5 < x < 60,5	Anti-sens	-	RT
LARP6a	At5g46250	CCCCCGTACCTGGTGGAGGACCAATGTGGACCA	959	70,29	Sens	KpnI	Clonage
		CCCCCGAGCTCTCAGTGAGCGTCGACAACCTTCATGACTGGTTGAGTAGATGTGGG	960	71,89	Anti-sens	SacI	Clonage
		GACGCTTTGAGACCTCAACAG	476	53,51	Anti-sens	-	RT
		GCCTGATGAGAAGAAGTGAA	550	55,11	Sens	-	RT
LARP6b	At2g43970	CCCCGAGCTCTGTGGTTGATATTTCTGCCCTCAT	972	67,7	Sens	SacI	Clonage
		CCCCCGGTACCGATGATGACGATTAAGAGGATGATAGATG	973	66,43	Anti-sens	KpnI	Clonage
		CCCCCGTACCTGTGGTTGATATTTCTGCCCTCAT	541	67,54	Sens	KpnI	Clonage
		CCCCACTAGTCTCTGCCCTGAACCATAACCGGCT	542	66,61	Anti-sens	SpeI	Clonage
		CGGATGTTGTAGCATCATCTTCCTCA	503	56,86	Anti-sens	-	RT
		CTCAGCTTGCCGAGTGTCTACA	556	59,74	Sens	-	RT
LARP6c	At3g19090	CCCCCGTACCGTCTTCTGATTTAAGAGAGGCCAAAGGA	543	65,54	Sens	KpnI	Clonage
		CCCCGCTAGCGAGATTGTTAGGTGAGAGTGAGATGGAA	544	65,69	Anti-sens	NheI	Clonage
		CCCCGAGCTCGTCTTCTGATTTAAGAGAGGCCAAAGGA	974	65,54	Sens	SacI	Clonage
		CCCCCGTACCTTCTCTCACTACTCTGAAAAATCTCTAAC	975	65,02	Anti-sens	KpnI	Clonage
		CCCCACTAGTATGGCGAGATGCAGCGAGAAG	976	67,73	Sens	SpeI	Clonage
		CCCCGATATCTTAGAGATTGTTAGGTGAGAGTGAGATGG	977	64,38	Anti-sens	EcoRV	Clonage
		CCCCGTACCGTCTTCTGATTTAAGAGAGGCCAAAGGA	543	57,67	Sens	KpnI	Clonage
		CCCCGCTAGCGAGATTGTTAGGTGAGAGTGAGATGGAA	544	56,08	Anti-sens	NheI	Clonage
		TATCGATAAGCTTGATATCGA	1200	45,82	Anti-sens	EcoRV	Clonage
		GCTCTAGAATGGCGCAGAT	1201	51,69	Sens	XbaI	Clonage
		CCCCGATATCTTATCTCGTGTGACCCAGGCTGG	1195	65,77	Anti-sens	EcoRV	Clonage
		CCGCTCTAGAATGGCGCAGA	1196	56,59	Sens	XbaI	Clonage
		TATCGATAAGCTTGATATCGA	1200	45,82	Anti-sens	EcoRV	Clonage
		GCTCTAGAATGGCGCAGAT	1201	51,69	Sens	XbaI	Clonage
		TTTCTTGCCGCTCTCACTCAC	489	53,04	Anti-sens	-	RT
		GGCGCAGATGCAGCGAGAAG	eb12	58,77	Sens	-	RT
PAB3	At1g22760	CCCCGTACCTGATCACACATGTCGAAGCATATTAGTGTAT	eb1	55,2	Sens	KpnI	Clonage
		CCCCGGATCCGTCGGTGGTAGAGAAACCAAGATCATGATC	eb2	58,95	Anti-Sens	BamHI	Clonage
PAB5	At1g71770	CCCCCTAGACTCGAGCTAGAAAGAGAACCAGGGACTTCT	eb3	60,65	Sens	XbaI	Clonage
		CCCCGGATCCCTCGGATGAGGATAGAGCAAACCTGGTCATC	eb4	60,22	Anti-sens	BamHI	Clonage
Exo70C1	At5g13150	TGAACGGGAAGGTGTGCAAG	ebq27	59,5 < x < 60,5	Sens	-	qPCR
		ACACCCTTAGCTCCGATTGC	ebq28	59,5 < x < 60,5	Anti-Sens	-	qPCR
Sec10	At5g12370	TTCGAAAAGACGCACAAGG	ebq7	59,5 < x < 60,5	Sens	-	qPCR
		GGCACTGACTGACTGGTTCA	ebq8	59,5 < x < 60,5	Anti-Sens	-	qPCR
Sec15a	At3g56640	TGTTGTCGAGTAGCCAACCC	ebq19	59,5 < x < 60,5	Sens	-	qPCR
		CCAGGCTTCCGAATATCCCG	ebq20	59,5 < x < 60,5	Anti-Sens	-	qPCR
Sec1b	At4g12120	AGGACGAGCATCTAGTGGGT	ebq57	59,5 < x < 60,5	Sens	-	qPCR
		GGGATCAAGGAAGCTGGAGG	ebq58	59,5 < x < 60,5	Anti-Sens	-	qPCR
Keule	At1g12360	GACCCAAGCCAAAGTTTCCA	ebq53	59,5 < x < 60,5	Sens	-	qPCR
		CTGATCTAGTCGCTCCACCG	ebq54	59,5 < x < 60,5	Anti-Sens	-	qPCR
Golgi SNARE 11	At1g15880	CAGCTCAGATGGACGGTGTG	ebq39	59,5 < x < 60,5	Sens	-	qPCR
		ATACAGCCGCAACGAGTGAA	ebq40	59,5 < x < 60,5	Anti-Sens	-	qPCR
VAP	At3g60600	CCCCGAGGCTACTTTGCGAAG	ebq41	59,5 < x < 60,5	Sens	-	qPCR
		ACTTCTTGGCTGTGACACC	ebq42	59,5 < x < 60,5	Anti-Sens	-	qPCR
Actine 8	At1g49240	TTCCGGTTACAGCGTTTGGGA	ebq35	59,5 < x < 60,5	Sens	-	qPCR
		AAACGCGGATTAGTGCTCA	ebq36	59,5 < x < 60,5	Anti-Sens	-	qPCR

## B

Lignée	Nom	Séquence	Tm	Position	Orientation	Site vide		Site plein	
						Couple	Taille amplicon (pb)	Couple	Taille amplicon (pb)
<i>larp6a-1</i>	475	AAGCTGGAAGGTAGGCTATGG	53,28	gène	Sens	475-476	1130	474-475	400
	476	GACGCTTTGAGACCTCAACAG	53,51	gène	Anti-sens				
	474	ATACGACGGATCGTAATTTGTCG	53,32	T-DNA	Saskatoon-3				
<i>larp6b-3</i>	481	TTGTTGCTGAGAATCTCCCTG	52,08	gène	Sens	481-482	1092	482-305	env. 1500
	482	TTGTTCTGGTTTTGGTCTGG	51,01	gène	Anti-sens				
	305	GGGCTACACTGAATTGGTAGCTC	55,11	T-DNA	GABI-LB				
<i>larp6c-3</i>	488	GAAGTAGAGTCCGTCACGACG	54,58	gène	Sens	488-489	1000	489-490	500
	489	TTTCTTGCCGCTTCACTCAC	53,04	gène	Anti-sens				
	490	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	55,65	T-DNA	SAIL-LB2				
<i>pab3</i>	687	ATAGCCGCAAATTTGCTCTG	52,10	gène	Sens	687-688	1237	687-490	env. 900
	688	TCGCACAGGAACATGATACTG	52,34	gène	Anti-sens				
	490	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	55,65	T-DNA	SAIL-LB2				
<i>pab5</i>	eb60	GCAGACTTAACAGATTCATTCGG	52,10	gène	Sens	eb60-eb61	801	eb61-253	env. 500
	eb61	GAGTCAGATCACGACAAACCC	52,94	gène	Anti-sens				
	253	ATTTTGCCGATTCGGAAC	49,07	T-DNA	SAIL-LBb1-3				

**Annexe 1 : Liste des amorces utilisées.**

Les tableaux ci-dessus reprennent les caractéristiques des amorces utilisées pour les Reverse Transcription, clonages, PCR quantitative (A) et le géotypage de lignées mutantes (B).

## Annexe 2 : Constructions réalisées par clonage.

A

Gène					Plasmide d'insertion					Plasmide créé par ligation				
Nom	N° du gène	Position début de la séquence promotrice (pb)	Source ADN	Sites de restrictions 5' / 3'	Nom	Etiquette	Position de l'étiquette	Sites de restrictions 5' / 3'	Nom	Construction	Taille (Kb)	Résistance bactérienne / plante		
<b>Vecteurs finaux</b>														
AtLARP6a	At5g46250	-1498	p786	KpnI	SacI <sup>1</sup>	CTL579	-	-	KpnI	SacI	p792	LARP6a:LARP6a	13,35	Kana /Hygro
			p786	KpnI	Sall	CTL579	GFP	3'	KpnI	Sall	p791	LARP6a:LARP6a-GFP	14,09	Kana /Hygro
AtLARP6b	At 2g43970	-2000	pEB21	KpnI	SpeI	CTL579	GFP	3'	KpnI	SpeI	pEB22	LARP6b:LARP6b-GFP	14,42	Kana /Hygro
			pEB21	KpnI	SpeI	p608	Flag(2)-HA(2)	3'	KpnI	SpeI	pEB23	LARP6b:LARP6b-Flag-HA	13,81	Kana /Hygro
			pEB21	KpnI	SpeI	p622	Histidine(6)-C-myc(4)	3'	KpnI	SpeI	pEB24	LARP6b:LARP6b-His-myc	13,93	Kana /Hygro
AtLARP6c	At3g19090	-1181	pEB1	KpnI	NheI	CTL587	RFP	3'	KpnI	XbaI	pEB16	LARP6c:LARP6c-RFP	13,34	Kana /Hygro
			pEB1	KpnI	NheI	p608	Flag(2)-HA(2)	3'	KpnI	XbaI	pEB13	LARP6c:LARP6c-Flag-HA	12,74	Kana /Hygro
			pEB1	KpnI	NheI	p622	Histidine(6)-C-myc(4)	3'	KpnI	XbaI	pEB11	LARP6c:LARP6c-His-myc	12,85	Kana /Hygro
AtPAB3	At1g22760	-1884	pEB2	KpnI	BamHI	CTL579	GFP	3'	KpnI	BamHI	pEB17	PAB3 : PAB3-GFP	14,99	Kana /Hygro
			pEB2	KpnI	BamHI	CTL587	RFP	3'	KpnI	BamHI	pEB18	PAB3 : PAB3-RFP	14,98	Kana /Hygro
			pEB2	KpnI	BamHI	p608	Flag(2)-HA(2)	3'	KpnI	BamHI	pEB4	PAB3 : PAB3-Flag-HA	14,38	Kana /Hygro
AtPAB5	At1g71770	-1966	pEB3	XbaI	BamHI	CTL579	GFP	3'	XbaI	BamHI	pEB19	PAB5 : PAB5-GFP	14,61	Kana /Hygro
			pEB3	XbaI	BamHI	CTL587	RFP	3'	XbaI	BamHI	pEB20	PAB5 : PAB5-RFP	14,59	Kana /Hygro
			pEB3	XbaI	BamHI	p608	Flag(2)-HA(2)	3'	XbaI	BamHI	pEB6	PAB5 : PAB5-Flag-HA	13,99	Kana /Hygro

B

<b>Vecteurs intermédiaires</b>														
AtLARP6a	At5g46250	-1498	PCR (959-960)	-	-	p-GEM-T easy	-	-	-	-	p786	LARP6a: LARP6a	7,2	Ampi / -
AtLARP6b	At 2g43970	-2000	PCR (541-542)	-	-	p-GEM-T easy	-	-	-	-	pEB21	LARP6b:LARP6b	7,53	Ampi / -
			PCR (972-973)	-	-	p-GEM-T easy	-	-	-	-	p771	proLARP6b	5,03	Ampi / -
			p771	KpnI	SacI	p770 <sup>2</sup>	-	-	KpnI	SacI	p787	proLARP6b (destination)	12,67	Chlor et Spect / -
AtLARP6c	At3g19090	-1181	PCR (543-544)	-	-	p-GEM-T easy	-	-	-	-	pEB1	LARP6c:LARP6c	6,45	Ampi / -
			PCR (974-975)	-	-	p-GEM-T easy	-	-	-	-	p772	proLARP6c	4,21	Ampi / -
			PCR (976-977)	EcoRV	SpeI	p686 -donneur <sup>6</sup>	YFP	5'	EcoRV	SpeI	p793	YFP-LARP6c	6,36	Chlor / -
			PCR (976-977)	EcoRV	SpeI	p326 -donneur <sup>4</sup>	-	-	EcoRV	SpeI	p794	LARP6c	5,59	Chlor / -
			p772	KpnI	SacI	p770 <sup>2</sup>	-	-	KpnI	SacI	p788	proLARP6c (destination)	11,85	Chlor et Spect / -
			p724 <sup>5</sup>	XbaI	EcoRV	p686 -donneur <sup>6</sup>	YFP	5'	SpeI	EcoRV	p839	YFP-LARP6cΔPAM2	5,45	Chlor / -
			PCR (1195-1196)	XbaI	EcoRV	p686 -donneur <sup>6</sup>	YFP	5'	SpeI	EcoRV	p841	YFP-LARP6cΔLSA	5,38	Chlor / -
PCR (1200-1201) <sup>7</sup>	XbaI	EcoRV	p686 -donneur <sup>6</sup>	YFP	5'	SpeI	EcoRV	p843	YFP-LARP6cΔLAM	5,22	Chlor / -			
AtPAB3	At1g22760	-1884	PCR (eb1- eb2)	-	-	p-GEM-T easy	-	-	-	pEB2	PAB3 :PAB3	8,11	Ampi / -	
AtPAB5	At1g71770	-1966	PCR (eb3 - eb4)	-	-	p-GEM-T easy	-	-	-	pEB3	PAB5 : PAB5	7,71	Ampi / -	
Marqueur RE	-	-	PCR sur ER-yk <sup>8,9</sup>	XbaI	HindIII	p326 -donneur <sup>4</sup>	-	-	XbaI	HindIII	p850	marqueurRE-YFP	4,17	Chlor / -
			PCR sur ER-rk <sup>8,9</sup>	XbaI	HindIII	p326 -donneur <sup>4</sup>	-	-	XbaI	HindIII	p851	marqueurRE-mCherry	4,16	Chlor / -
Marqueur Golgi	-	-	PCR sur G-yk <sup>8,9</sup>	XbaI	HindIII	p326 -donneur <sup>4</sup>	-	-	XbaI	HindIII	p852	marqueurGolgi-YFP	4,25	Chlor / -
			PCR sur G-rk <sup>8,9</sup>	XbaI	HindIII	p326 -donneur <sup>4</sup>	-	-	XbaI	HindIII	p853	marqueurGolgi-mCherry	4,24	Chlor / -

C

			Vecteur obtenu par réaction Gateway®			
Gène	Vecteur Donneur	Vecteur Destination	Nom	Construction	Taille (Kb)	Résistance bactérie / plante
LARP6b	pENTR™-GUS <sup>3</sup>	p787	p789	proLARP6b : GUS	12,85	Spect / Genta
LARP6c	p793	P788	P795	LARP6c : YFP-LARP6c	13,3	Spect / Genta
	p794	p788	p796	LARP6c : Ø - LARP6c	12,52	Spect / Genta
	pENTR™-GUS <sup>3</sup>	p788	p790	proLARP6c : GUS	12,03	Spect / Genta
	p839	p788	p840	LARP6c : YFP-LARP6cΔPAM2	12,39	Spect / Genta
	p841	p788	p842	LARP6c : YFP-LARP6cΔLSA	12,31	Spect / Genta
	p843	p788	p844	LARP6c : YFP-LARP6cΔLAM	12,16	Spect / Genta
Marqueur RE	p850	p788	p854	LARP6c : marqueur ER-YFP	11,11	Spect / Genta
	p851	p788	p855	LARP6c : marqueur ER-mCherry	11,1	Spect / Genta
Marqueur Golgi	p852	p788	p856	LARP6c : marqueur Golgi-YFP	11,18	Spect / Genta
	p853	p788	p857	LARP6c : marqueur Golgi-mCherry	11,17	Spect / Genta

## Annexe 2 : Constructions réalisées par clonage.

Les tableaux ci-dessus reprennent le détail des constructions réalisées : les vecteurs finaux obtenus par clonage classique (A), ou réaction de Gateway® (C) ainsi que les vecteurs intermédiaires nécessaires à l'obtention des constructions finales (B).

<sup>1</sup> la digestion par cette enzyme de restriction élimine la séquence GFP

<sup>2</sup> obtenu par modification des vecteurs pB2GW7 et pCW92 (Thermo Fisher Scientific (Life Technologies), Waltham, MA, USA).

<sup>3</sup> Thermo Fisher Scientific (Life Technologies), Waltham, MA, USA

<sup>4</sup> vecteur donneur Gateway® fabriqué dans l'équipe de Jean-Marc Deragon, LGDP, Perpignan, France à partir d'un vecteur de base pBlueScript dans lequel a été inséré une résistance au Chloramphénicol.

<sup>5</sup> Vecteur p326 contenant la séquence LARP6cΔPAM2

<sup>6</sup> ce vecteur correspond au vecteur p326 dans lequel a été rajoutée une étiquette YFP

<sup>7</sup> L'amplification de cette séquence a nécessité 3 étapes de PCR : amplifications autour du motif LAM (1197-1198 séquence amont, amplification 1199-1200 séquence aval) et amplification 1200 -1201 de l'ensemble de la séquence sans le motif LAM.

<sup>8</sup> Amplification à partir des vecteurs CD3-958 (ER-yk) ou CD3-960 (ER-rk) (amorces eb79-eb80) / CD3-966 (G-yk) ou CD3-968 (G-rk) (amorces eb81-eb82). Vecteurs fournis par Arabidopsis biological resource center (ABRC), Columbus, OH, USA

<sup>9</sup> Ces vecteurs permettent l'expression sous promoteur 35S de marqueurs subcellulaires et confèrent une résistance à la Kanamycine. Nebenführ et al. 2007. <http://www.bio.utk.edu/cellbiol/markers/>

Abbréviations : Kana : Kanamycine, Hygro : Hygromycine, Ampi : Ampicilline, Chlor : Chloramphenicol, Spect : Spectinomycine, RE : réticulum endoplasmique, Golgi : Appareil de Golgi.

## A

Protéine ciblée	ATG du gène correspondant	Peptide	Position du peptide		Organisme	Concentration d'utilisation		Taille théorique
			en acide aminé	par rapport aux domaines		Primaire	Secondaire	
LARP6a	AT5g46250	EESEKGGKKNFIRTR(C)	231-246	dans le RRM-L 3a	lapin	1/5 000	1/10 000	46,8 kDa
LARP6b	At2g43970	(C)LVSKKNDRRDHSKRES	154-169	23 AA avant le LAM	lapin	1/10 000	1/10 000	60,6 kDa
LARP6c	At3g19090	KRTSQFTDRDREELQG	220-235	entre LAM et RRM (chevauche de 2 AA le LAM)	lapin	1/1000	1/10 000	49 kDa
PAB2, PAB4, PAB8	At4g34110, At2g23350, At1g49760	Dufresne et al. 2008			lapin	1/7 500	1/10 000	68,67; 71,65; 72,78 kDa
RPL13 ( <i>Brassica napus</i> )	Numéro d'accès EMBL : Z22618	Saez-Vasquez et al. 2000			lapin	1/100 000	1/7 500	66 kDa

## B

Anticorps	Concentration d'utilisation		Fournisseur
	Primaire	Secondaire	
anti-actine	1/15 000	1/5 000 (souris)	Affinity Bio Reagents <sup>1</sup>
HA (HRP)	1/10 000	-	Sigma <sup>2</sup>
anti-GFP (monoclonal)	1/2 000	1/10 000 (souris)	Santa Cruz Biotechnology <sup>3</sup>
secondaire anti souris	-	1/5 000 - 1/10 000	Bio-Rad <sup>4</sup>
secondaire anti lapin	-	1/10 000	Bio-Rad <sup>4</sup>

## Annexe 3 : Liste des anticorps à façon et commerciaux utilisés

Liste des anticorps utilisés. A : anticorps à façon ainsi que leurs conditions d'utilisation et taille théorique attendus B : anticorps commerciaux et leurs conditions d'utilisation.

<sup>1</sup> Golden, CO, USA

<sup>2</sup> Saint-Louis, MO, USA

<sup>3</sup> Dallas, TX, USA

<sup>4</sup> Hercules, CA, USA

## Annexe 4 : Liste des gènes codant les 53 ARNm identifiés par RIP.

	gene_id	Input_Col	Input_Flag	logFC_Input _ColvsFlag	Eluat_Flag	Eluat_Col	logFC_Eluat _ColvsFlag	R_Eluat	REL/IN COL	Rel/in flag	CBI	DE	Annot
1	AT4G34920	24,1951	20,143	-0,264439	50,7896	8,1045	2,64774	6,26683941	0,33496452	2,52145162	2,1864871	oui (-)	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
2	AT5G04180	8923,91	9567	0,10039	20792,1	2179,09	3,25423	9,54164353	0,24418556	2,17331452	1,92912895	non	alpha carbonic anhydrase 3
3	AT4G35830	3,10975	3,13637	0,0123003	7,72357	1,77677	2,12001	4,34697231	0,57135461	2,46258254	1,89122793	non	aconitase 1
4	AT3G09530	940,641	1081,68	0,201562	2322,93	323,912	2,84227	7,17148485	0,34435242	2,14752052	1,80316811	non	exocyst subunit exo70 family protein H3
5	AT5G18910	865,044	923,337	0,0940832	2026,55	384,024	2,39976	5,27714414	0,4439358	2,19481078	1,75087498	non	Protein kinase superfamily protein
6	AT3G04740	2,62815	3,0334	0,206885	8,46972	3,03231	1,4819	2,79315769	1,15378118	2,79215402	1,63837284	oui (+)	RNA polymerase II transcription mediators
7	AT2G23900	1522,62	1801,47	0,24262	3593,93	635,707	2,49913	5,65343783	0,41750864	1,99499853	1,57748989	non	Pectin lyase-like superfamily protein
8	AT2G21480	45,2963	48,2546	0,0912729	151,578	73,0933	1,05225	2,07376052	1,61367043	3,14121348	1,52754305	non	Malectin/receptor-like protein kinase family protein
9	AT1G73460	2,59582	2,86075	0,140204	6,2095	1,84771	1,74874	3,36064642	0,71180205	2,17058464	1,45878259	oui (+)	Protein kinase superfamily protein
10	AT2G41860	262,229	263,948	0,00942715	490,174	116,933	2,06761	4,19192187	0,44591941	1,85708549	1,41116608	non	calcium-dependent protein kinase 14
11	AT2G43230	930,866	1020,73	0,132958	1710,53	274,033	2,64202	6,24205844	0,29438501	1,67579086	1,38140584	non	Protein kinase superfamily protein
12	AT5G61680	207,829	197,201	-0,0757342	326,958	68,0326	2,26481	4,80590188	0,32734893	1,65799362	1,33064469	oui (-)	Pectin lyase-like superfamily protein
13	AT2G44730	10,0206	10,4533	0,0609902	17,4661	3,80518	2,19852	4,59008509	0,37973574	1,67086949	1,29113374	non	Alcohol dehydrogenase transcription factor Myb/SANT-like family protein
14	AT1G15020	11,9273	11,3413	-0,0726752	17,1472	2,72286	2,65478	6,29749602	0,22828805	1,51192544	1,2836374	non	quiescin-sulfhydryl oxidase 1
15	AT4G36630	3,40852	3,87418	0,184742	7,04043	1,88985	1,8974	3,7253909	0,55444885	1,81726972	1,26282087	oui (+)	Vacuolar sorting protein 39
16	AT2G29980	11,2051	12,5162	0,159651	24,1631	7,60948	1,66693	3,17539438	0,67910862	1,93054601	1,25143739	oui (+)	fatty acid desaturase 3
17	AT2G45670	13,0875	13,7864	0,0750558	21,4529	4,07641	2,39581	5,26269438	0,31147354	1,55609151	1,24461797	non	calcineurin B subunit-related
18	AT1G03370	7,53118	8,65602	0,200829	15,467	4,14741	1,89891	3,7293154	0,55069856	1,78684892	1,23615036	oui (+)	C2 calcium/lipid-binding and GRAM domain containing protein
19	AT5G41920	7,66619	8,55337	0,157983	13,3869	2,53784	2,39915	5,27491883	0,33104319	1,56510241	1,23405922	oui (-)	GRAS family transcription factor
20	AT2G41980	28,7156	33,8175	0,235938	57,872	13,8126	2,06688	4,18979772	0,4810138	1,71130332	1,23028951	non	Protein with RING/U-box and TRAF-like domains
21	AT2G16500	37,9261	44,2311	0,221871	87,2678	29,5861	1,56053	2,94962161	0,78009867	1,97299638	1,19289771	non	arginine decarboxylase 1
22	AT5G64500	6,10688	6,42419	0,0730791	8,62325	0,988601	3,12477	8,72267983	0,16188315	1,3423093	1,18042615	non	Major facilitator superfamily protein
23	AT5G66020	6,34612	6,88145	0,116837	12,2563	3,9239	1,64317	3,12349958	0,61831481	1,78106358	1,16274877	non	Phosphoinositide phosphatase family protein
24	AT2G41880	28,5957	28,6308	0,00176743	46,7348	13,7739	1,76256	3,3929969	0,48167732	1,63232603	1,15064871	non	guanylate kinase 1
25	AT2G18470	295,295	335,004	0,182021	675,232	257,73	1,38952	2,61992007	0,87278823	2,01559384	1,14280561	non	rolin-rich extensin-like receptor kinase 4
26	AT3G57330	8,94914	9,8021	0,131342	18,9427	7,09351	1,41707	2,67042691	0,79264711	1,93251446	1,13986735	non	autoinhibited Ca2+-ATPase 11
27	AT4G20070	13,8688	15,4863	0,159146	28,2408	9,65158	1,54894	2,92602869	0,69592034	1,82359892	1,12767858	non	allantoate amidohydrolase
28	AT4G35010	2044,68	2328,11	0,187285	3965,08	1192,31	1,73359	3,32554453	0,58312792	1,70313258	1,12000466	non	beta-galactosidase 11
29	AT4G34640	9,42184	7,66763	-0,297229	10,2391	2,04459	2,3242	5,00789889	0,21700538	1,33536699	1,11836161	non	squalene synthase 1
30	AT2G02970	169,819	195,546	0,203506	332,343	99,8161	1,73533	3,32955305	0,58777934	1,6995643	1,11178496	non	GDA1/CD39 nucleoside phosphatase family protein
31	AT1G29310	21,6568	20,1091	-0,106966	27,6805	5,89579	2,23111	4,6949603	0,27223736	1,3765161	1,10427875	non	SecY protein transport family protein
32	AT5G03760	185,226	180,476	-0,037476	289,935	95,2719	1,60561	3,0432373	0,5143549	1,6065017	1,0921468	non	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein
33	AT5G53360	90,3273	94,0775	0,0586876	133,868	30,1232	2,15187	4,44401657	0,33348943	1,42295448	1,08946505	non	TRAF-like superfamily protein
34	AT2G33420	180,611	204,617	0,180037	375,205	136,981	1,45371	2,7391025	0,7584311	1,83369417	1,07526307	non	Protein of unknown function (DUF810)
35	AT5G20350	22,8717	23,2745	0,0251849	33,6499	8,55931	1,97504	3,93137998	0,37423147	1,44578401	1,07155254	non	Ankyrin repeat family protein with DHC zinc finger domain
36	AT2G47600	26,0105	26,1917	0,0100129	38,4617	10,4462	1,88044	3,68188432	0,40161473	1,46846902	1,06685429	non	magnesium/proton exchanger
37	AT5G35390	45,9474	54,8204	0,25473	89,7629	26,3868	1,7663	3,40181075	0,57428277	1,63739958	1,06311681	non	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
38	AT2G01140	9,0946	8,85488	-0,0385382	12,0615	2,75078	2,13249	4,38475632	0,302463	1,36213026	1,05966726	non	Aldolase superfamily protein
39	AT1G05790	20,466	21,6638	0,0820549	32,48	9,01203	1,84963	3,60407145	0,44034154	1,49927529	1,05893375	non	lipase class 3 family protein
40	AT2G01450	775,159	876,408	0,17711	1172,63	220,993	2,40768	5,30618617	0,28509377	1,33799555	1,05290178	non	MAP kinase 17

	gene_id	Input_Col	Input_Flag	logFC_Input_ColvsFlag	Eluat_Flag	Eluat_Col	logFC_Eluat_ColvsFlag	R_Eluat	R EL/IN COL	R el/in flag	CBI	DE	Annot
41	AT5G04040	3,44784	3,76218	0,125874	5,73912	1,64933	1,79895	3,4796675	0,47836617	1,52547725	1,04711108	non	Patatin-like phospholipase family protein
42	AT2G32900	8,05239	9,3167	0,210402	14,3026	3,93294	1,8626	3,6366179	0,48841897	1,5351573	1,04673833	non	centromere/kinetochore protein, putative (ZW10)
43	AT1G76490	173,247	205,86	0,248831	318,528	88,1267	1,85377	3,6144324	0,50867663	1,54730399	1,03862736	non	hydroxy methylglutaryl CoA reductase 1
44	AT3G17510	89,1675	77,6076	-0,20032	103,341	26,2185	1,97876	3,94152984	0,2940365	1,3315835	1,037547	non	CBL-interacting protein kinase 1
45	AT1G80280	51,8003	52,1284	0,00911107	83,1301	28,958	1,52141	2,87071276	0,55903151	1,59471804	1,03568653	oui (-)	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
46	AT5G13430	74,694	84,2248	0,173253	129,478	37,754	1,77801	3,4295174	0,5054489	1,53729068	1,03184178	oui (+)	Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit
47	AT1G02000	429,77	452,519	0,0744158	706,131	229,721	1,62005	3,07386351	0,53452079	1,56044498	1,02592419	non	UDP-D-glucuronate 4-epimerase 2
48	AT5G22740	7,85376	9,06716	0,207267	14,0494	4,11726	1,77075	3,4123179	0,52424062	1,54948187	1,02524125	non	cellulose synthase-like A02
49	AT1G05960	114,981	133,217	0,212375	222,362	74,2383	1,58268	2,99524639	0,64565711	1,66917135	1,02351424	non	ARM repeat superfamily protein
50	AT3G47730	19,4302	23,0452	0,246164	36,2406	10,672	1,76377	3,39585832	0,54924808	1,57258778	1,02333971	non	ATP-binding cassette A2
51	AT5G01820	163,135	188,78	0,210638	288,887	82,8257	1,80235	3,48789084	0,50771263	1,53028393	1,0225713	non	serine/threonine protein kinase 1
52	AT3G51840	20,0766	16,9746	-0,242133	23,0223	6,91272	1,73571	3,33042565	0,34431726	1,35627938	1,01196212	non	acyl-CoA oxidase 4
53	AT5G05750	27,297	26,7082	-0,0314569	33,353	6,68297	2,31925	4,99074513	0,24482434	1,24879251	1,00396817	non	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein

#### Annexe 4 : Liste des gènes codant les 53 ARNm identifiés par RIP.

gene\_id : identifiant du gène

Input\_Col : moyenne des lectures dans les deux réplicats de l'échantillon "d'Input" pour la condition Col-0

Input\_Flag : moyenne des lectures dans les deux réplicats de l'échantillon "d'Input" pour la condition LARP6c-FLAG-HA

logFC\_Input\_ColvsFlag : logarithme en base 2 du rapport InputLARP6c-FLAG-HA/Input-Col-0

Eluat\_Flag : moyenne des lectures dans les deux réplicats de l'échantillon Eluat pour la condition LARP6c-FLAG-HA

Eluat\_Col : moyenne des lectures dans les deux réplicats de l'échantillon Eluat pour la condition Col-0

logFC\_Eluat\_ColvsFlag : logarithme en base 2 du rapport EluatLARP6c-FLAG-HA/Eluat-Col-0

R\_EL/IN\_Col : rapport des lectures dans l'Eluat sur les lectures dans "l'Input" pour Col-0 (RE)

R\_EL/IN\_Flag : rapport des lectures dans l'Eluat sur les lectures dans "l'Input" pour Flag (RE)

CBI : différence entre les rapports Eluat / Input (RELARP6c-FLAG-HA -RECol-0)

DE : gènes différentiellement exprimés ou non dans l'analyse de transcriptomique (oui/non); transcrit sur-accumulé dans le mutant (+), sous-accumulé dans le mutant (-)

Annot : Annotation des gènes selon TAIR10

Je soussignée, Elodie Billey, certifie être l'auteur de cette thèse de 181 pages, avoir moi-même effectué les recherches qui la sous-tendent, et atteste que cette thèse n'a pas déjà été soutenue dans le cadre d'une autre École doctorale. Toute phrase ou paragraphe empruntés au travail d'un autre (avec ou sans changements mineurs) et cités dans cette thèse apparaissent entre guillemets, et cet emprunt est reconnu précisément par une référence à l'auteur, à l'ouvrage et à la page cités.

Je suis consciente que le plagiat –l'emploi de tel ou tel écrit sans le reconnaître- peut se traduire par l'interdiction de soutenir la thèse ou son invalidation et des sanctions pénales. J'affirme également qu'à l'exception des emprunts dûment reconnus, cette thèse constitue un travail personnel.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Billey', with a large, sweeping flourish underneath.

## Résumé

Chez les eucaryotes, les RNA Binding Proteins (RBP) s'associent aux transcrits pour former des Particules Ribo-Nucléoprotéiques (mRNP) dynamiques, dont la localisation et la composition sont déterminantes pour la maturation, l'export, la stabilité et la traduction des ARNm. Les protéines à motif LA sont des protéines de liaison à l'ARN, présentes chez plusieurs centaines d'espèces eucaryotes, qui se répartissent en 5 sous-familles : LA authentiques, LARP1, 4, 6 et 7. Les membres de ces sous-familles partagent des caractéristiques évolutives, des domaines additionnels et des fonctions conservés. Mes travaux de thèse ont contribué à l'étude fonctionnelle de protéines LARP6 chez *Arabidopsis thaliana*. On sait, à l'heure actuelle, que chez *Manduca sexta* et plusieurs espèces de vertébrés, LARP6 est impliquée dans la régulation de la différenciation cellulaire. Chez l'Homme, elle agit en tant que RBP pour coordonner la traduction des ARNm codant les sous-unités du collagène de type I. Les plantes vasculaires ont la particularité de contenir plusieurs protéines LARP6, classées en trois groupes évolutifs. Chez *A. thaliana*, l'unique représentant de chaque sous-famille semble s'être spécialisé. D'ailleurs, les protéines LARP6b et c ont des profils d'expression mutuellement exclusifs, où LARP6c est présente dans le pollen et LARP6b est ubiquitaire mais absente du gamétophyte mâle. Nous avons axé notre travail sur la protéine LARP6c et démontré qu'elle est cytoplasmique et impliquée, dans le pollen, dans le contrôle de la quantité d'ARNm codant des acteurs du transport vésiculaire. Les ARNm identifiés comme cibles potentielles de LARP6c codent, eux aussi, des facteurs impliqués dans le transport ; et possèdent dans leur 5'-UTR deux motifs qui pourraient permettre leur co-régulation par fixation de RBP. La délétion de LARP6c, affecte la capacité du tube pollinique à se diriger vers l'ovule suggérant un défaut de communication; ce qui est cohérent avec la dérégulation des ARNm codant des acteurs de la sécrétion/réception de signaux extracellulaires. Nous proposons que LARP6c intervient, dans le pollen, en tant que protéine de mRNP et co-régule la traduction et/ou la stabilité de transcrits codant des acteurs des voies de communications dépendantes de la sécrétion et de l'endocytose, et intervenant dans les échanges mâle/femelle.

**Mots clés :** LARP6, RBP, mRNP, transport vésiculaire, croissance dirigée du tube pollinique.

## Abstract

In eucaryotes, RNA Binding Proteins (RBP) associate with transcripts to form dynamic Ribo-Nucleoprotein Particles (mRNP), whose localization and composition are determinant for mRNA maturation, export, stability and translation. LA motif proteins are RNA binding proteins, found in several hundred eucaryotic species, which fall in 5 sub-families: genuine LA, LARP1, 4, 6 and 7. Members of these subfamilies share conserved evolutionary history, additional motifs and functions. My thesis work contributed to deciphering the functional properties of the *Arabidopsis thaliana* LARP6 proteins. Currently, we know that in *Manduca sexta* and many vertebrates species LARP6 is implicated in the regulation of cellular differentiation. In humans, it acts as an RBP to coordinate the translation of mRNA coding for type I collagen subunits. Vascular plants differ in possessing many LARP6 proteins classified in three evolutionary groups. In *A. thaliana*, the unique member of each subfamily seems to be specialized. LARP6b and c proteins present mutually exclusive expression profiles, with LARP6c only present in pollen and LARP6b ubiquitously expressed except in the male gametophyte. We mostly focused our work on LARP6c and showed it to be cytoplasmic and implicated in controlling the level of mRNAs encoding vesicular transport actors in pollen tubes. Putative identified LARP6c mRNA baits also encode proteins involved in transport and share two motifs in their 5'-UTR that could allow their co-regulation via RBP binding. LARP6c deletion induces deficiencies in pollen tube guidance towards the ovule, suggesting a communication default. This is consistent with the deregulation of mRNA coding for extra-cellular signal secretion/reception actors. We propose that LARP6c acts as an mRNP protein in pollen and co-regulates translation and/or stability of mRNA coding for actors of communication pathways depending on secretion and endocytosis; hence acting on male/female exchanges.

**Keywords:** LARP6, RBP, mRNP, vesicular transport, pollen tube guidance.