



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

Mémoire présenté à  
l'Institut Armand-Frappier  
comme exigence partielle  
de la Maîtrise en Virologie et Immunologie

par

PAUL DALLAIRE

EFFET DE LA SÉQUENCE 5' NON TRADUITE DU VIRUS DE LA  
MOSAÏQUE DU NAVET SUR LA TRADUCTION.

SEPTEMBRE 1994

*Au futur des navets*

Je tiens à adresser mes remerciements les plus chaleureux aux personnes suivantes:

À ma mère Gabrielle pour son inestimable soutien;

À mon directeur de recherche, M. Laliberté, pour m'avoir fait entrevoir la recherche d'un oeil tout neuf;

À Yvonne Devantier et tout le laboratoire de M. Charest où j'ai effectué les transferts biolistiques;

À Johanne Roger qui m'a permis de me concentrer sur mon travail en accomplissant les travaux de séquençage;

Au laboratoire de M. Shareck dont le service de synthèse d'oligonucléotides a permis la réalisation de ce projet, et;

Au personnel et aux étudiants du laboratoire pour leurs encouragements et leurs conseils judicieux.

## Résumé

Le génome du virus de la mosaïque du navet (TuMV) induit une traduction très efficace puisque l'infection conduit rapidement à l'accumulation de grandes quantités de protéines virales dans la cellule. Afin de déterminer les causes de ce phénomène, nous avons exploré le rôle de la région 5' non traduite (5'NTR) sur la traduction.

La région 5' non traduite (5'NTR) du virus de la mosaïque du navet (TuMV) a été fusionnée à des gènes rapporteurs (capside du TuMV et  $\beta$ -glucuronidase). Des transcrits synthétiques ont été produits avec la polymérase du phage T7 en présence ou en absence d'analogie de coiffe. La traduction *in vitro* de ces transcrits a démontré l'indépendance face à la coiffe. Les gènes de fusion, sous contrôle d'un promoteur de plante, ont été introduits dans des suspensions de cellules de tabac par transfert biolistique et le taux de synthèse protéique mesuré. Le 5'NTR du TuMV augmente la traduction de la  $\beta$ -glucuronidase de 7 ( $\pm 4$ ) fois. La séquence complémentaire au 5'NTR du TuMV a été synthétisée et fusionnée au gène de la  $\beta$ -glucuronidase. L'augmentation de traduction est similaire à celle obtenue avec la séquence virale, indiquant qu'aucune séquence spécifique n'est responsable de l'effet sur la traduction. Une séquence formant une structure stable a été introduite en amont du 5'NTR viral; l'analyse des cellules bombardées indique la présence d'entrée directe du ribosome sur le 5'NTR du TuMV. De plus l'absence de structure secondaire de ce 5'NTR faciliterait aussi l'initiation de la traduction telle que décrite par le modèle classique du balayage.

## Table des matières

Remerciements.....	ii
Résumé .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
1. Introduction.....	1
2. Revue bibliographique.....	3
2.1. Les <i>potyviridae</i> .....	3
2.2. Importance du TuMV .....	4
2.3. Organisation microscopique du TuMV.....	5
2.3.1. Morphologie du virion.....	5
2.3.2. Structures cellulaires dues à l'infection.....	6
2.4. Organisation moléculaire du TuMV .....	7
2.4.1. Le génome et la stratégie d'expression du TuMV .....	7
2.4.2. Les protéines du TuMV.....	8
2.5. Le super groupe des «picorna-like».....	12
2.6. La régulation post-transcriptionnelle eucaryote.....	13
2.6.1. Vue d'ensemble .....	13
2.6.2. Le mécanisme d'initiation de la traduction .....	14
2.7. Régulation de l'initiation.....	17
2.7.1. Modulation globale de l'initiation.....	17

2.7.2. Compétition des ARN messagers.....	17
2.7.2.1. La reconnaissance de l'ARN messenger.....	20
2.7.2.2. Localisation du codon d'initiation.....	21
2.8. Les picornavirus.....	22
2.9. L'interférence.....	23
2.10. L'entrée directe.....	23
2.11. Élévation de la traduction.....	25
2.12. Structure primaire et traduction.....	26
2.13. Structure secondaire et traduction.....	27
3. Objet de la recherche.....	30
3.1. Hypothèses.....	30
3.2. Objectifs spécifiques.....	31
3.3. Approche expérimentale.....	31
3.3.1. Coiffe indépendance.....	32
3.3.2. Élévation de la traduction.....	32
3.3.3. Rôle de la séquence <i>Per se</i> .....	32
3.3.4. Mode d'initiation.....	33
4. Matériel et Méthodes.....	36
4.1. Manipulation de l'ADN.....	36
4.2. Souches bactériennes.....	39
4.3. Constructions.....	39
4.4. Manipulation de l'ARN.....	46
4.5. Traduction <i>in vitro</i> .....	50
4.6. Culture de cellules de tabac.....	52
4.7. Transfert biolistique de l'ADN.....	54

4.7.1. Introduction .....	54
4.7.2. Le bombardement.....	57
4.7.3. Paramètres.....	59
4.8. Dosage de l'activité GUS.....	61
5. Résultats .....	62
5.1. Coiffe indépendance .....	62
5.2. Élévation de la synthèse protéique chez le tabac.....	67
5.3. Effet de la séquence primaire.....	71
5.4. Le mode d'initiation de la traduction. ....	76
6. Discussion.....	80
7. Conclusion.....	89
Bibliographie .....	90
Annexe .....	101

## Liste des figures

2.1. Génome et protéines du TuMV.....	9
2.2. Initiation de la traduction eucaryote.....	15
2.3. Reconnaissance de l'ARN messager.....	18
3.1. Structures secondaires du 5'NTR et de FLIP.....	34
4.1. Constructions plasmidiques.....	41
4.2. Les séquences des 5'NTR utilisées.....	43
4.3. Clonage d'ÉPINGLE.....	47
4.4. Appareillage à bombardement.....	55
5.1. Coiffe indépendance.....	65
5.2. Stimulation de la traduction.....	69
5.3. FLIP élève la traduction.....	74
5.4. Traduction en présence de structure secondaire stable.....	78

## Liste des abréviations

- 5' NTR.....Région 5' non traduite.
- 6k1, 6k2 .....Deux fragments protéiques dérivés de la polyprotéine du TuMV.
- 35S.....Promoteur de transcription de l'ARN majeur (35 svedberg) du virus de la mosaïque du chou-fleur.
- 40S.....Petite sous-unité du ribosome eucaryote.
- 43S.....Complexe de pré-initiation de la traduction eucaryote dépourvu d'ARN messenger.
- 48S.....Complexe de pré-initiation de la traduction chargé d'un ARN messenger.
- 60S .....Grande sous-unité du ribosome eucaryote.
- 80S .....Ribosome eucaryote.
- 
- A .....Adénine.
- ADN.....Acide désoxyribonucléique.
- ADNc.....ADN complémentaire, synthétisé à partir d'un ou de plusieurs ARN.
- AIMV.....Virus de la mosaïque de la luzerne (Alfalfa mosaic virus).
- +ARN.....ARN simple brin, codant.
- ARN.....Acide ribonucléique.

b.....nombre de base d'acide nucléique.

ca.....Approximativement.

CBP .....Protéine liant la coiffe, (cap binding protein).

CI.....Protéine qui forme les corps d'inclusions  
cylindriques, (cylindrical inclusion).

CP.....Protéine d'enveloppe, (coat protein).

Da .....Dalton.

DEPC.....Diéthyle pyrocarbonate.

EDTA.....Acide d'éthylène diamine tétra-acétique.

eIF.....Facteur d'initiation de la traduction eucaryote,  
(eukaryotic initiation factor).

G.....Guanine.

GDP .....Guanosine di-phosphate.

GTP .....Guanosine tri-phosphate.

GUS ..... $\beta$ -glucuronidase.

HC.....Facteur d'aide, (helper component).

$\Delta H_f$ .....Enthalpie de fusion.

met-tRNA<sub>i</sub>.....ARN de transfert initiateur chargé.

m<sup>7</sup>G.....7-méthyle guanosine.

4-MU.....4-méthyle umbellyférone.

MUG.....Méthyle umbellyféryl-glucuronide.

Nla.....Inclusion nucléaire a.

Nost .....Termineur de la transcription de la nopaline  
synthase.

NPT II.....Néomycine phosphotransférase II.

NS3 .....Protéine non-structurale 3 des flavivirus.

NTP .....Nucléotide tri-phosphate.

P1 .....Protéine #1 du TuMV.

P3.....Protéine #3 du TuMV.

PCR .....Amplification élective *in vitro*.

PPV.....Plum Pox Virus (un potyvirus).

PRO .....Protéase majeure du TuMV.

Psi.....Livre au pouce carré.

PVY.....Virus Y de la pomme de terre (un potyvirus).

Rep.....Réplicase du TuMV.

TEV .....Virus de la gravure du tabac (un potyvirus).

TMV.....Virus de la mosaïque du tabac (un tobamovirus).

TPM.....Tours par minutes.

TuMV .....Virus de la mosaïque du navet (un potyvirus).

U.....Uracile.

VPg.....Protéine virale liée au génome.

## Introduction

Bien que les modèles de l'initiation de la traduction procaryote et eucaryote soient assez bien établis (Kozak, 1992a; Merrick, 1992; Gallie, 1993) il existe un certain nombre d'exceptions trouvées principalement chez les virus ARN positifs (Sonenberg et Meerovitch, 1990; Kozak, 1986; 1992b) mais également chez des ARN messagers cellulaires (Macejak et Sarnow, 1991) pour lesquels le modèle désormais classique du balayage (ou *scanning*) apparaît insuffisant. Des séquences qui servent littéralement de *pistes d'atterissage* au ribosome sont identifiées, dont l'existence était prédite par le nouveau modèle d'entrée directe du ribosome sur la région non traduite de ces ARN messagers, en amont du codon d'initiation.

Le TuMV possède un génome d'ARN et plusieurs évidences indiquent une relation évolutive étroite avec les picornavirus (les premiers virus où l'entrée directe a été identifiée). Les régions 5' non traduites (5'NTR) des virus de plantes élèvent la traduction dans plusieurs cas (Gallie, 1993) et certains permettent l'entrée directe du ribosome. Le 5'NTR du TEV augmente la traduction des gènes rapporteurs et lève la dépendance face à la coiffe.

Dans ce travail, nous avons vérifié la capacité du 5'NTR du TuMV à augmenter la traduction de gènes rapporteurs et, le cas échéant, à comprendre la façon par laquelle cet effet prend lieu.

Quel est le besoin de la présence de la coiffe sur l'ARN messager? Une séquence précise, contenue dans le 5'NTR est-elle essentielle aux effets sur la dépendance face à la coiffe et sur l'élévation de la traduction (s'il en est)? Et finalement, la traduction est-elle compatible avec le modèle du balayage ou avec celui de l'entrée directe?

Dans la revue bibliographique, nous verrons rapidement la taxonomie des *potyviridae* qui ont récemment été homologués au statut de famille; la biologie du TuMV; les homologues avec les picornavirus; avant de considérer le contrôle de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes tel que vu par les virus.

## 2. Revue bibliographique

### **2.1. Les *potyviridae***

Les virus de plantes sont identifiés grâce aux relations qu'ils entretiennent avec leurs hôtes: les espèces infectées, le type de symptômes qu'ils y produisent et le mode de transmission utilisé. Chez les potyvirus cependant, les infections mixtes sont fréquentes. Encore récemment, une «souche pure» du virus de la mosaïque de la canne à sucre (Shukla et coll., 1992a; Jensen, 1992) de même que deux sérotypes du virus de la mosaïque du haricot (Ventten et coll., 1992) ont été séparés en six espèces différentes. Aussi, la notion de souche pure est utilisée avec prudence (Ohki, 1992). D'autre part, à cause du manque de spécificité des sérums disponibles de même que de la complexité et de l'incohérence des relations sérologiques entre les potyvirus (Shukla, 1992b) le classement des *potyviridae* a été retardé.

La classification précise des potyvirus est encore compliquée par leur variabilité biologique: la sévérité des symptômes varie souvent de souche en souche, la capacité à être transmis par un vecteur peut être acquise ou perdue et les corps d'inclusions cytoplasmiques sont variables chez un même virus (Lecoq et Purcifull, 1992). L'infection potyvirale produit des cylindres concentriques incomplets et torsadés dans le cytoplasme (Matthews, 1991; Edwarson, 1992). On distingue

quatre types de ces inclusions cytoplasmiques et, bien que cette classification soit utile au diagnostic, elle n'est pas utilisée en systématique à cause d'une certaine variabilité. Le virus Y de la pomme de terre (PVY) par exemple, produit tantôt l'un et tantôt un autre des types d'inclusion cylindrique (Edwardson, 1992). Quant au TuMV, il est de type 3 ou 4 selon la souche (Edwardson et Christie, 1986).

Néanmoins, les potyviridae forment la famille la plus importante des virus de plantes (Goldbach, 1992) avec 180 membres répertoriés à ce jour (Ward et Shukla, 1991). Quatre genres sont définis selon leurs vecteurs de transmission: les bymovirus sont transmis par les champignons, les ipovirus sont transmis par les mouches blanches, les rymovirus sont transmis par les mites et les potyvirus sont transmis par des aphidiens (des pucerons) (Barnett, 1992). Les groupes de virus difficilement distingués par la morphologie ou la sérotypie constituent un sérogroupe. Le genre potyvirus comprend quatre sérogroupe dont celui qui comprend le TuMV et le PVY. Le PVY est le membre type des *Potyviridae*.

## 2.2. Importance du TuMV

Décrit en 1921 pour la première fois (Shultz, 1921), le TuMV est le plus important des potyvirus puisqu'il infecte au

moins 299 espèces de 147 genres et 39 familles végétales. 89 espèces d'aphidiens sont rapportées capables de transmettre l'infection (Edwardson et Christie, 1986). 23 espèces de *Nicotiana* sont susceptibles à l'infection de même que *Chenopodium amaranticolor* et *C. quinoa* qui sont d'excellentes espèces témoins (Edwardson et Christie, 1986). De même, *Arabidopsis thaliana* subit un important retard de croissance lors de l'infection par le TuMV rendant possible la recherche d'un gène de résistance au TuMV (M. Fortin, communication personnelle). Le TuMV infecte également la fleur de giroflée où elle produit de très jolis patrons de dépigmentation (Matthews, 1991).

## 2.3. Organisation microscopique du TuMV

### 2.3.1. Morphologie du virion

Les potyvirus sont des filaments flexibles monopartites constitués d'un ARN simple brin d'environ 3,5 MDa, équivalent à 5% de la masse du virion. L'ARN est lié en 5' à une protéine virale (la VPg) et enveloppé d'environ 2000 copies de la protéine de capsid (Matthews, 1991). La longueur rapportée du filament varie de 680nm à 900nm (Barnett, O.W., 1991) et son diamètre est d'environ 11nm. Le virion est de symétrie hélicoïdale avec un pas de vis de 3,4 nm. La variation dans la taille rapportée est

probablement due au bris des particules lors de l'extraction et de la purification du virus.

### 2.3.2. Structures cellulaires dues à l'infection

En plus des corps cylindriques caractéristiques de l'infection par les *potyviridae* on retrouve des corps d'inclusions amorphes qui sont soit cytoplasmiques ou nucléaires. Notamment, le TuMV provoque l'apparition d'agrégats laminaires dans la cellule. Bien que ces agrégats ne soient pas visibles en microscopie optique, on peut les distinguer en microscopie électronique (Edwardson et Christie, 1986).

Une protéine virale impliquée dans la transmission par les aphides (Riechmann et coll., 1992), le facteur d'aide (HC), a été identifiée en association à des corps amorphes d'inclusions cytoplasmiques. Ces corps d'inclusions sont retrouvés suite à l'infection par des virus du genre potyvirus comprenant les souches produisant les inclusions cylindriques du type 4 de TuMV et de PVY. Contrairement aux corps d'inclusion cylindriques cytoplasmiques, ces inclusions amorphes sont colorées par l'Azure A, indiquant la présence d'acides nucléiques (Edwardson, 1992).

## **2.4. Organisation moléculaire du TuMV**

### **2.4.1 Le génome et la stratégie d'expression du TuMV**

Le génome des potyvirus consiste en un brin d'ARN d'environ 10kb, porteur d'une VPg en 5' et polyadénylé en 3' (Dougherty et Carrington, 1988; van Vloten-Doting et Neeleman, 1982). Six potyvirus ont été séquencés à date, dont le TuMV (Nicolas et Laliberté, 1992). Aucune évidence d'ARN sous-génomique n'a été rapportée (Shields et Wilson, 1987). Le génome des potyvirus comprend un cadre de lecture unique (van Vloten-Doting et Neeleman, 1982) lequel est traduit en polyprotéine (Shields et Wilson, 1987) qui subit l'autoprotéolyse (Riechmann et coll., 1992) selon un modèle analogue à celui des picornavirus (Matthews, 1991; Goldbach, 1992).

Le cadre de lecture du TuMV occupe la majorité des 9831 nucléotides qui le constituent. Les 129 premiers nucléotides constituent la région 5' non-traduite (5'NTR) et la région 3' non-traduite mesure 213 nucléotides plus la queue de polyA (Nicolas et Laliberté, 1992).

Considérant la stratégie monocistronique des potyvirus, les protéines sont vraisemblablement toutes synthétisées en quantités égales lors de l'infection conduisant à l'accumulation de certaines protéines dans la cellule infectée (i.e.: il faut 2000 copies de CP et une seule copie de VPg par virion). Par exemple, la

protéine NIa produit une inclusion amorphe (Matthews, 1991) mais n'est en fait qu'un produit immature comprenant un site de clivage peu utilisé et les protéines matures sont la VPg et la protéase majeure (Dougherty et Parks, 1991; Laliberté et coll., 1992) lesquelles ne sont nécessaires qu'en faibles quantités. Chez les potyvirus, la traduction de la polyprotéine complète doit suffire à la production des protéines nécessaires en grandes quantités. Le problème se pose dans les mêmes termes chez tous les virus à ARN positif (+ARN) monopartites à maturation de polyprotéines, notamment les *picornaviridae*. D'autres virus +ARN utilisent des stratégies complémentaires: le virus de la mosaïque jaune de l'orge du genre bymovirus des *potyviridae* de même que les comovirus et les nepovirus sont bipartites et la traduction séparée des brins introduit un niveau de régulation de synthèse protéique supplémentaire.

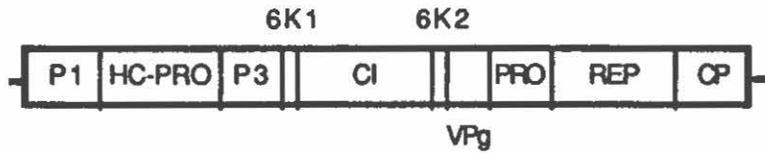
#### 2.4.2. Les protéines du TuMV

Le génome du TuMV code pour au moins dix protéines matures lesquelles sont présentées à la figure 2.1 de même que les rôles associés à ces protéines chez les potyvirus.

## **figure 2.1.: Génome et protéines du TuMV**

**P1: protéine No1; HC-PRO : facteur d'aide-protéase (helper-component); P3 : protéine No3; 6k1 : protéine de 6kDa No1; CI : inclusion cylindrique; 6k2: protéine de 6kDa No2; VPg: protéine virale liée au génome (viral protein genome linked); PRO: protéase majeure; REP: ARN polymérase-ARN dépendante; CP: protéine de capsid.**

Schémas modifiés à partir de Nicolas et Laliberté, 1992 et de Riechmann et coll., 1992. Information sur la P1 tirée de Soumounou et Laliberté, 1994.



PROTÉINE	PARTICULARITÉS	FONCTIONS
P1	Lie les acides nucléiques.	Mouvement cellule - cellule ?
HC-PRO	Région riche en cystéine. Acides aminés typiques des protéases à cystéine.	Transmission par les aphides et protéase.
P3	Similitudes avec la 32K du CPMV.	Pas de rôle connu.
6K1	Suite d'acides aminés hydrophobes.	Réplication ?
CI	Membre de la famille DEAD. Similitudes avec des hélicases.	Réplication ? Hélicase ARN dépendante.
6K2	Suite d'acides aminés hydrophobes.	Réplication ?
VPg	Protéine liée au génome.	Rôle structural, Réplication ?
PRO	Acides aminés typiques des protéases à sérine.	Maturation de polyprotéine.
REP	Patrons des ARN polymérase- ARN dépendantes.	Réplication ?
OP	Présence du bloc (I/V)DAG.	Encapsidation.

Le génome +ARN des potyvirus est utilisé pour la traduction mais sert également de gabarit à la synthèse de nouveaux brins par l'intermédiaire d'une copie en négatif. Cette réplication est accomplie par la réplicase (REP) qui est une ARN polymérase-ARN dépendante.

La réplicase des potyvirus introduit probablement des erreurs dans les nouveaux brins d'ARN, produisant des populations hétérogènes dans les plantes infectées (Steinhauer et Holland, 1987). La possibilité que ce peu de fidélité dans la réplication soit à l'origine de la variabilité biologique observée chez de nombreux *potyviridae* a été soulevée (Lecoq et Purcifull, 1992). Ce manque de fidélité dans la réplication est critique pour l'initiation de la traduction dans la mesure où celle-ci dépend de la séquence précise du 5'NTR, point que nous aborderons bientôt.

Le motif DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) a récemment été identifié comme point commun entre quelques protéines, munies d'activité NTPasique, isolées chez des virus, des bactéries et même chez l'humain (Linder et coll., 1989). On trouve parmi ces protéines le facteur d'initiation eucaryote de la traduction eIF-4A (Pause et Sonenberg, 1992), plusieurs protéines impliquées dans l'épissage (Company et coll., 1991; Wassarmann et Steitz, 1991) et des protéines virales: la protéine 2C du poliovirus (Teterina et coll., 1992; Mirzayan et Wimmer, 1992), la protéine NS3 des flavivirus et la protéine CI des potyvirus (Lain et coll.,

des potyvirus (Lain et coll., 1989; Lain et coll., 1990). On associe à ces protéines un rôle d'hélicase en vue de leurs affinités pour les acides nucléiques, de leurs activités NTPase-ARN dépendantes (Koonin, 1991) et de leur importance *in vivo* dans la réplication du poliovirus (Teterina et coll., 1992).

Puisque la CI partage des homologies fonctionnelles et probablement évolutives avec l'eIF-4A, il est possible qu'elle soit impliquée dans l'initiation de la traduction des potyvirus.

## 2.5. Le super groupe des «picorna-like»

Les homologies que partagent les *potyviridae* aux *picornaviridae* sont nombreuses et s'étendent aussi aux nepovirus et comovirus. Les principaux points d'homologie sont (Goldbach, 1992): un +ARN muni d'une VPg et d'une queue polyadénylée où l'on ne trouve qu'un seul cadre de lecture et dont la polyprotéine s'autoprotéolyse; des homologies de protéines non-structurales, la hélicase (motif DEAD), la polymérase (Rep chez certains potyvirus) et la protéase majeure (protéase à cystéine) dont les motifs sont partagés entre les virus du super groupe; et l'ordre dans lequel ces protéines sont trouvées sur le génome: 5'-hélicase-VPg-protéase-polymérase-3'. L'organisation de cette classe de virus laisse percevoir une évolution par cassette avec mutations rapides indépendantes subséquentes et témoigne d'une

proximité évolutive entre ces groupes de virus (Strauss et Strauss, 1988) laquelle se reflète possiblement dans le mode d'initiation de la traduction.

## 2.6. La régulation post-transcriptionnelle eucaryote

### 2.6.1. Vue d'ensemble

Après les systèmes d'activation/répression des gènes et l'épissage des ARN messagers, la régulation génique repose sur le contrôle de la traduction. L'homéostasie cellulaire dépend de la gestion serrée des priorités entre les ARN messagers et de l'ajustement fin de l'appareil de traduction (taux de traduction global et taux spécifique à l'ARN messenger).

La traduction est divisée en trois étapes: initiation, élongation et terminaison. Un certain contrôle de la synthèse se produit à l'élongation, laquelle dépend de la disponibilité des ARN de transfert chargés, de la longueur et de la structure secondaire de l'ARN messenger et de la présence de sites de pause du ribosome (Kim et Hollingsworth, 1992). L'initiation reste pourtant l'étape critique du contrôle de la traduction et l'élongation peut être considérée comme une suite de réactions irréversibles (Godefroy-Colburn et Thach, 1981). L'efficacité de traduction est donc proportionnelle à la fréquence d'initiation.

La régulation post-transcriptionnelle dépasse le cadre de ce travail et le lecteur intéressé à d'autres aspects peut se référer à des articles de revues, notamment: Kozak, 1992a; Merrick, 1992; Gallie, 1993. De même, la durée de vie des molécules impliquées, leurs activation/inhibition et autres modifications post-traductionnelles concernent d'autres sphères de la biochimie et ne retiendront pas notre attention ici.

### 2.6.2. Le mécanisme d'initiation de la traduction

Le mécanisme d'initiation de la traduction eucaryote est présenté à la figure 2.2.

Le complexe de pré-initiation (43S) reconnaît l'ARN messenger lorsqu'il est complexé aux facteurs eIF-4F et eIF-4B puis il localise le codon d'initiation avant de libérer les facteurs d'initiation et de s'associer à la grande sous-unité du ribosome, produisant le complexe d'initiation propice à l'élongation.

**figure 2.2. : Initiation de la traduction eucaryote  
(Merrick, 1990)**

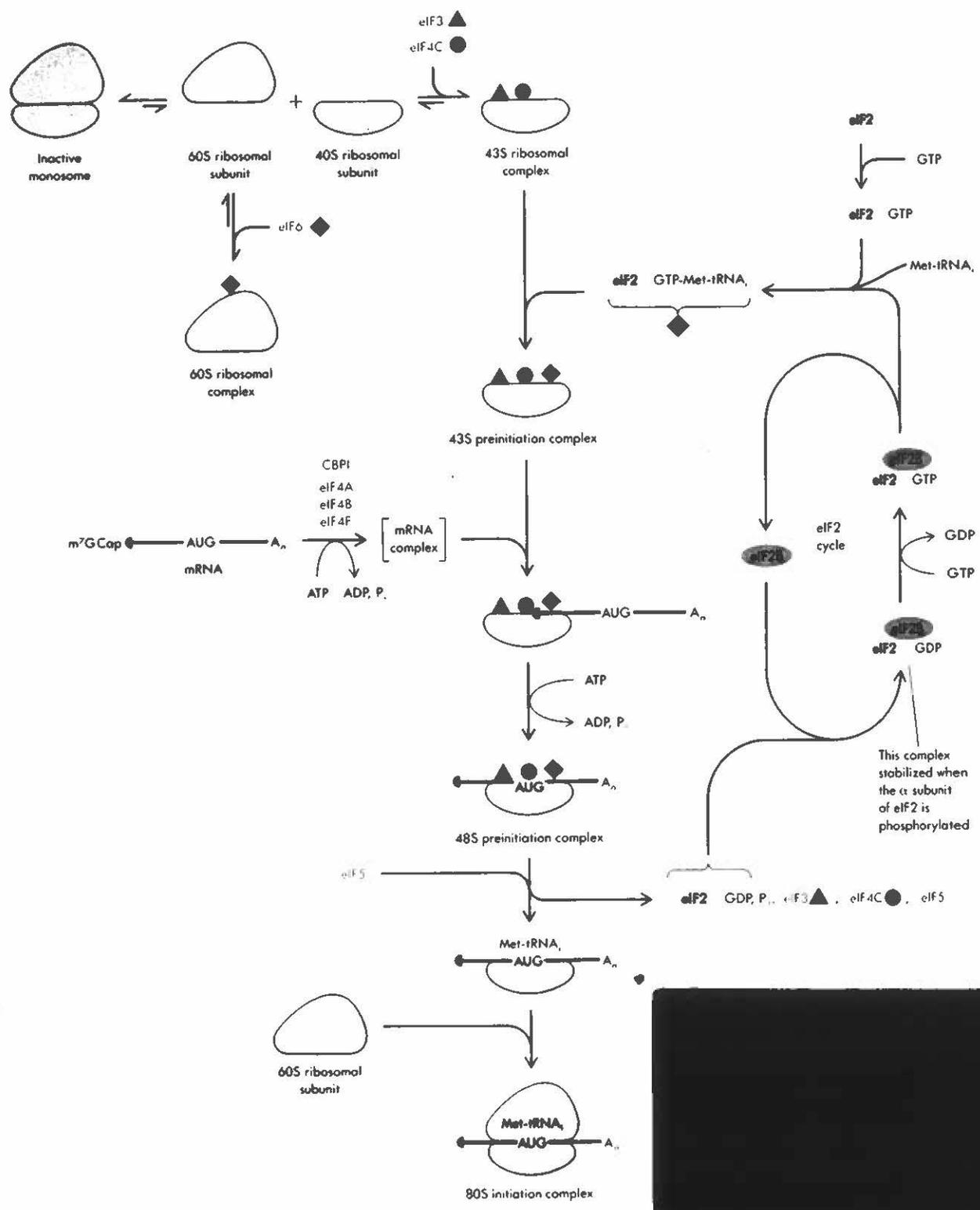
**eIF : facteur d'initiation eucaryote.**

**40S : petite sous-unité du ribosome.**

**60S : grande sous-unité du ribosome.**

**m<sup>7</sup>G : coiffe des ARN messagers.**

**met-tRNA<sub>i</sub> : ARN de transfert initiateur chargé.**



## **2.7. Régulation de l'initiation**

### **2.7.1. Modulation globale de l'initiation**

La cellule exerce un contrôle global sur la traduction en modifiant trois facteurs: la quantité de ribosomes actifs, la disponibilité des ARN de transfert initiateurs chargés et l'état de phosphorylation des facteurs d'initiation (voir Kozak, 1992a pour une liste des facteurs phosphorylés) dont l'eIF-2 est un cas fameux. De plus, la traduction est sensible à la balance énergétique; le facteur eIF-2B, par exemple, a 100 fois plus d'affinité pour le GDP que pour le GTP (Merrick, 1990; 1992).

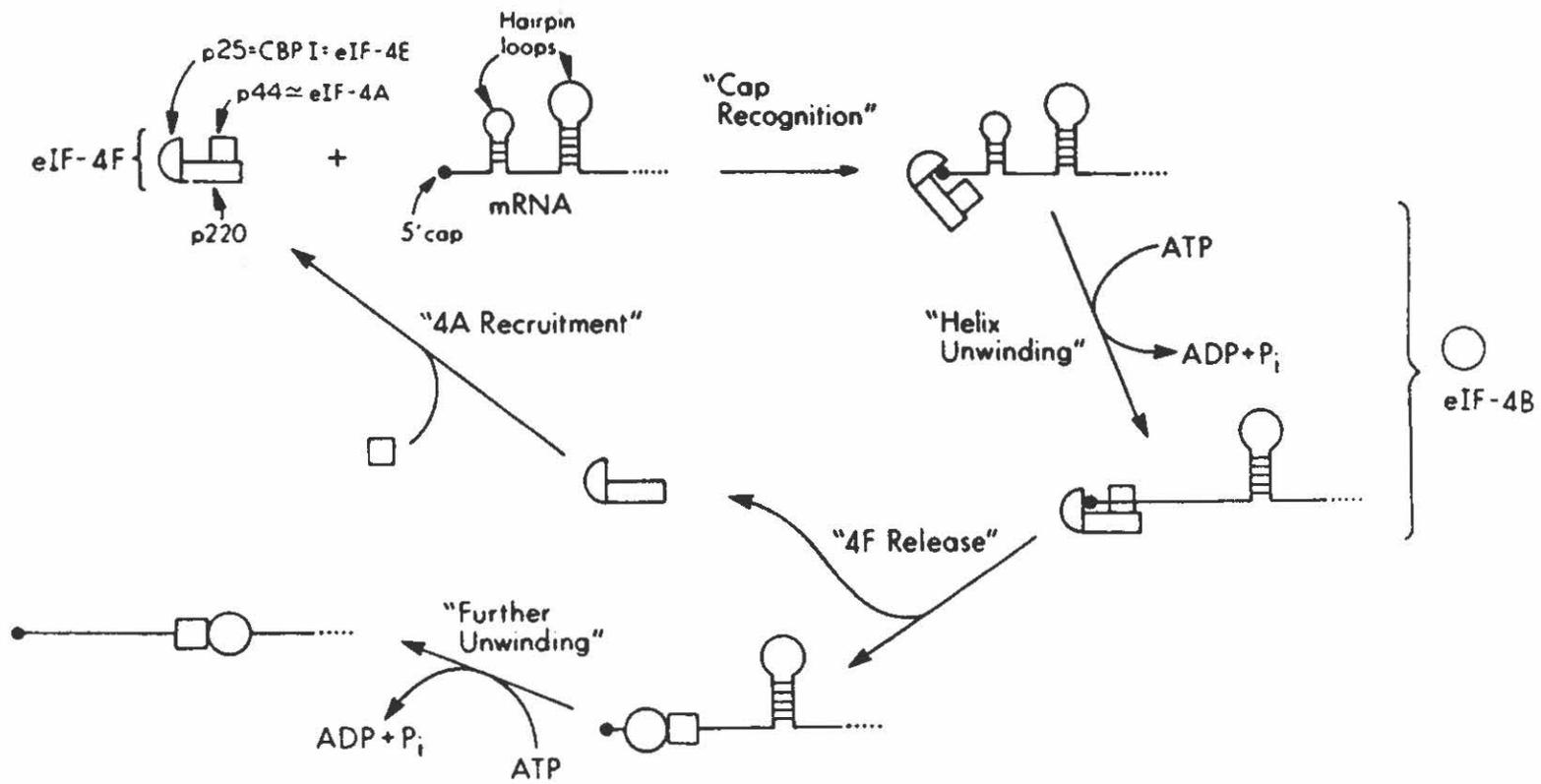
### **2.7.2. Compétition des ARN messagers**

La régulation de l'expression individuelle des protéines se fait à deux niveaux: la reconnaissance de l'ARN messager et la localisation du codon d'initiation.

En vue des exceptions répertoriées, ces deux points font l'objet de controverses. Voyons d'abord les modèles actuels.

**figure 2.3. : Reconnaissance de l'ARN messenger**

Tiré de Thach, 1992.



### 2.7.2.1. La reconnaissance de l'ARN messenger.

La figure 2.3 schématise la reconnaissance coiffe-dépendante de l'ARN messenger.

L'affinité différentielle des facteurs eIF-4F et eIF-4B pour les ARN messagers et la quantité limitante de ces facteurs imposent une compétition entre les ARN messagers (Godefroy-Colburn et Thach, 1981; Thach, 1992).

Le facteur eIF-4F est composé de trois sous-unités:

- eIF-4E: 24kDa. Également nommée CBP pour Cap Binding Protein (ou protéine liant la coiffe). Purifiée grâce à son affinité pour la coiffe et associée au eIF-4F (Voir Merrick, 1992) on la croit responsable du premier contact avec l'ARN messenger.
- eIF-4A: 50kDa. Une hélicase ATP-dépendante, de la famille des protéines DEAD. Elle sert probablement à déstructurer le bout 5' des ARN messagers reconnus par eIF-4E (Blum et coll., 1992).
- p220: 220kDa. Impliquée dans l'initiation de la traduction et trouvée en association avec eIF-4F (Etchison et coll., 1982), cette protéine y tient possiblement un rôle structural.

Le facteur eIF-4B a été séquencé (Milburn et coll., 1990) et assiste probablement eIF-4A dans la déstructuration (unwinding) de l'ARN messager (Koonin, 1991; Thach, 1992). Le complexe eIF-4F/eIF-4B (ou eIF-4A/eIF-4B) associé à l'ARN messager déstructuré est capable de lier le complexe 43S de pré-initiation (Voir figure 2.2.).

#### 2.7.2.2. Localisation du codon d'initiation

À partir du bout 5' de l'ARN messager, le complexe de pré-initiation 48S avance progressivement, d'une manière ATP-dépendante, jusqu'à ce qu'il soit positionné au premier codon d'initiation. L'assemblage final du ribosome prend lieu et l'élongation débute. Ceci constitue le modèle du balayage (*scanning*) de Marilyn Kozak. Trois observations critiques sont à la base du modèle: 1°) Tous les ARN messagers cellulaires sont monocistroniques; 2°) Le codon d'initiation le plus près du bout 5' est généralement utilisé; et 3°) Il y a consommation d'ATP. (Kozak, 1978).

Bien que l'efficacité de traduction ne semble pas liée à la longueur de la région 5' non-traduite, la structure secondaire de cette région, si elle est importante, diminue la traduction (Kozak, 1992a). Il est bien connu également que le contexte du codon d'initiation (les trois bases précédant et la base suivant le

codon d'initiation) contrôle l'efficacité de l'initiation (Kozak, 1978; 1986; Lütcke et coll., 1987) les ARN messagers sont donc discriminés à ce niveau également.

## 2.8. Les picornavirus

La VPg des picornavirus est clivée de l'ARN viral (qui sert également d'ARN messager) lors de la décapsidation, par un enzyme cellulaire (Ambros et coll., 1978). Ni cet ARN, ni les nouveaux brins d'ARN ne sont coiffés (Sonenberg et Meeroovitch, 1990). Bien que les ARN messagers non coiffés soient capables d'une certaine traduction (Kozak, 1986), quelques particularités de la traduction des picornavirus remettent en cause le modèle du balayage, principalement le haut niveau de synthèse de protéines virales lors de l'infection qui n'est pas compatible avec la traduction plus faible prédite par le modèle du balayage.

Les 5'NTR des picornavirus sont longs (600 à 1300 nucléotides), comprennent de multiples codons d'initiation non utilisés et sont capables de former des structures secondaires complexes (Dildine et Semler, 1992). Le balayage par le ribosome serait ralenti ou même bloqué par chacune de ces trois particularités. Le 5'NTR des picornavirus est capable de lier des protéines cellulaires (Del Angel et coll., 1989; Luz et Beck, 1991; Dildine et Semler, 1992) qui pourraient être impliquées dans un mécanisme de localisation du codon d'initiation différent du balayage.

## 2.9. L'interférence

Le phénomène d'interférence de la traduction chez l'hôte (connu sous le nom de *host shutoff*) qui apparaît lors de l'infection par des picornavirus consiste en l'arrêt de la traduction de la majorité des ARN messagers cellulaires pendant que l'ARN viral continue de subir la traduction (pour une revue récente voir Sonenberg et Meervitch, 1990). Chez les poliovirus, ce phénomène est le résultat de l'attaque protéolytique de la p220 par la protéase virale 2A (Wyckoff et coll., 1990) produisant l'arrêt de la traduction coiffe-dépendante par inactivation de l'eIF-4F (Etchison et coll., 1982; Thomas et coll., 1992).

## 2.10. L'entrée directe

Chez les procaryotes, le ribosome en solution se paire à la séquence de Shine-Dalgarno présente à proximité du codon initiateur sur l'ARN messager. Il n'y a pas reconnaissance de structure chimique particulière sur l'ARN ni dépense d'énergie. Cet «atterrissage» du ribosome sur l'ARN messager est nommé entrée directe. Ce mode d'initiation expliquerait la traduction coiffe-indépendante et efficace observée chez les picornavirus puisque la coiffe n'est plus nécessaire à la reconnaissance de

l'ARN messenger et la complexité du 5'NTR devient fortuite. Le modèle proposé par Jackson et coll. en 1990 implique la présence de séquences (ou de structures secondaires) particulières dans le 5'NTR de l'ARN messenger nommée site d'entrée directe laquelle constitue le coussin d'atterrissage du ribosome (ribosome landing pad). Suite à cet «atterrissage du ribosome» le balayage procède normalement pour localiser le codon initiateur. Le modèle est certes incomplet, notamment en ce qui concerne le réassemblage du ribosome avec les facteurs nécessaires au balayage lors de l'association avec l'ARN.

La reconnaissance de l'ARN messenger se fait via le bout 5' chez les eucaryotes (Kozak, 1979; Konarska et coll., 1981). Néanmoins, des entrées directes du ribosome sur des 5'NTR ont été rapportés chez des picornavirus (Jang et coll., 1988; Meerovitch et coll., 1991; Pilipenko et coll., 1992), chez le virus de l'hépatite C (Wang et coll., 1993), chez un comovirus (Thomas et coll., 1991; Verver et coll., 1991), chez un luteovirus (Tacke et coll., 1990) de même que chez l'ARN messenger d'un chaperon cellulaire (Macejak et Sarnow, 1991) et la liste est loin d'être exhaustive. Or, bien que certains chercheurs remettent en cause la validité des protocoles expérimentaux utilisés (essentiellement les ARN bicistroniques en traduction *in vitro*) et les conclusions d'entrée directe (Kozak, 1986; 1992a; 1992b) le phénomène est de mieux en mieux documenté.

## 2.11. Élévation de la traduction

L'augmentation de la traduction de gènes rapporteurs suite au remplacement du 5'NTR de leurs ARN messagers par des 5'NTR de virus de plantes a été signalé souvent. Le cas le plus connu est certainement celui du virus de la mosaïque du tabac (TMV) qui a été rapporté comme capable de remplacer la séquence de Shine-Dalgarno chez les bactéries et capable d'augmenter la traduction *in vitro* et *in vivo* dans un ensemble de systèmes procaryotes et eucaryotes (Gallie et coll., 1987a; 1987b; Sleat et coll., 1987; 1988; Gallie et Kado, 1989). Une augmentation de traduction jusqu'à 35 fois a été rapportée *in vitro*, dans des lysats de réticulocytes de lapin et dans des extraits de germe de blé pour le 5'NTR de l'ARN 4 du virus de la mosaïque de la luzerne (AIMV) (Jobling et Gehrke, 1987). Curieusement, ni le 5'NTR du TMV ni celui de l'AIMV n'agit chez la levure (van den Heuvel et Raué, 1992). Le 5'NTR d'un potexvirus (Zelenina et coll., 1992) et ceux de deux potyvirus (Carrington et Freed, 1990; Nicolaisen et coll., 1992) augmentent la traduction *in vitro* et dans des protoplastes.

Deux ensembles de virus se distinguent ici: les virus coiffés (TMV, AIMV et potexvirus) et les virus porteurs d'une VPg (potyvirus, comovirus et luteovirus.) Parmi les virus à VPg, la traduction des potyvirus est coiffe-indépendante (Carrington et Freed, 1990) et celles des deux autres groupes supportent

l'entrée directe (section 2.10). Les potyvirus et les comovirus font partie du super-groupe des *picorna-like* alors que les luteovirus leur sont très semblables. Bien que le phénomène d'interférence (*host shutoff*) n'ait jamais été rapporté chez les virus de plantes et que les mécanismes d'augmentation de la traduction soient mal compris, il est probable qu'une stratégie d'expression commune aux virus à VPg émerge sous peu.

## 2.12. Structure primaire et traduction

Il est bien connu que l'initiation de la traduction chez les procaryotes dépend de la présence de la séquence de Shine-Dalgarno et de son positionnement correct sur l'ARN messager. Cependant, aucune telle séquence n'a été identifiée chez les eucaryotes. L'analyse comparative d'un grand nombre de séquences environnant immédiatement le codon d'initiation a dégagé une séquence consensus (Kozak, 1978) laquelle est légèrement différente chez les plantes et chez les mammifères (Lütcke et coll., 1987). Ces séquences étant ubiquitaires n'expliquent pas les effets de potentialisation de la traduction par les 5'NTR viraux.

Il a été suggéré qu'une séquence répétée  $(CAA)_n$  soit impliquée dans l'augmentation de traduction par le 5'NTR du TMV (Gallie et Walbot, 1992). Ces travaux n'ont toutefois pas été reconfirmés pour le TMV ni pour d'autres virus. Il avait déjà été

démontré que des changements mineurs dans la séquence du TMV modulent le taux de la traduction dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* sans pour autant modifier l'effet dans les protoplastes de mésophylle de tabac (Gallie et coll., 1988). Il est possible qu'aucune séquence précise ne soit responsable de cette augmentation de la traduction par les 5'NTR viraux.

### 2.13. Structure secondaire et traduction

L'augmentation de la structure secondaire des 5'NTR d'ARN messagers, par mutagénèse, réduit proportionnellement l'efficacité de traduction de cet ARN messager (Pelletier et Sonenberg, 1985a). On connaît également des ARN messagers dont la traduction est naturellement limitée par des structures secondaires élevées dans leurs 5'NTR; le cas de l'ornithine décarboxylase du rat est bien documenté (van Steeg et coll., 1990). Depuis peu, le gène de l'eIF-4E (la protéine liant la coiffe) est disponible et la sur-expression de cette protéine permet d'augmenter la traduction d'ARN messagers malgré la structure élevée de leurs 5'NTR (Koromilas et coll., 1992).

À l'inverse des 5'NTR des picornavirus et des comovirus qui sont longs et capables de former des structures secondaires complexes, les 5'NTR de virus de plantes sont généralement courts et probablement très peu structurés. La digestion à la

ribonucléase T<sub>1</sub> (qui reconnaît les résidus de G) du génome du TMV génère un fragment de 68 nucléotides qui est nommé  $\Omega$  à cause de sa position sur le chromatogramme des produits de séquençage (Mandelis, 1968). Ce fragment est le 5'NTR du TMV, lequel est riche en A+U, ce qui est indicateur d'absence de structure secondaire. Le 5'NTR de l'AIMV est également dépourvu de structure secondaire avec un contenu de A+U de 78% et ne mesure que 36 nucléotides (Jobling et Gehrke, 1987). Quant aux 5'NTR des potyvirus séquencés à date, leurs tailles sont comprises entre 129 (TuMV) et 205 nucléotides (Tobacco Vein Mottling Virus) et la stabilité de la structure secondaire qu'ils peuvent former est faible (Nicolas et Laliberté, 1992; Riechmann et coll., 1992). Ces 5'NTR ont des similitudes avec la séquence consensus des 5'NTR d'ARN messagers de protozoaires en termes de composition et de taille. Cette séquence est 100% A+U et mesure 20 nucléotides (Yamaushi, 1991). Il est possible qu'un mécanisme commun d'initiation de la traduction soit utilisé dans ces systèmes.

La structure secondaire du 5'NTR module l'accessibilité de l'ARN messager au facteur d'initiation eIF-4E (Pelletier et Sonenberg, 1985b; Carberry et coll., 1992) et les structures secondaires élevées imposent une dépendance sur l'activité hélicasique de l'eIF-4A et de l'eIF-4B. Il a été postulé que l'absence de structure secondaire dans le 5'NTR de l'AIMV abaisse la dépendance sur l'eIF-4E (Gehrke et coll., 1983) et permette

**l'entrée facilitée de l'ARN messenger sur le complexe de pré-initiation. L'absence de structure secondaire des 5'NTR viraux doit être considérée comme un facteur important de la potentialisation de l'initiation de la traduction.**

### 3. Objet de la recherche

Ce travail vise à identifier le rôle du 5'NTR du TuMV dans la traduction.

#### 3.1. Hypothèses

Nous pensons que le 5'NTR du TuMV, à l'instar de ceux d'autres potyvirus, est capable de stimuler en *cis* la traduction d'un ARN messager et que cette traduction est coiffe indépendante.

Nous pensons, de plus, que cet effet sur la traduction ne dépend pas de séquences particulières contenues dans le 5'NTR mais de la faible stabilité des structures secondaires potentielles.

D'autre part, principalement parce qu'il est porteur d'une VPg, nous pensons que le 5'NTR du TuMV supporte l'entrée directe. Et ce malgré qu'un nombre de ses caractéristiques le distingue d'autres membres du super groupe des *picorna-like* (absence de codons d'initiation non utilisés dans la séquence non traduite, petite taille et faible structure secondaire du 5'NTR).

### **3.2. Objectifs spécifiques**

- 1°) Nous vérifierons si le 5'NTR du TuMV initie la traduction de manière coiffe-indépendante, comme le prédit le fait que cet ARN n'est porteur d'une coiffe à aucun moment.
- 2°) Nous vérifierons si cette séquence élève la traduction comme il a déjà été démontré pour deux autres potyvirus.
- 3°) Nous déterminerons à laquelle de la séquence primaire ou secondaire sont attribuables ces effets.
- 4°) Nous chercherons à savoir si le ribosome est capable d'entrée directe sur le 5'NTR du TuMV ou s'il localise le codon d'initiation par balayage.

### **3.3. Approche expérimentale**

Des gènes rapporteurs sont équipés du 5'NTR du TuMV et le niveau de traduction (la vitesse d'accumulation des protéines) est suivie.

### 3.3.1. Coiffe indépendance

Des transcrits synthétiques d'ARN, munis ou non de la coiffe, sont traduits *in vitro*. La dépendance face à la coiffe est évaluée par comparaison des taux de traduction de l'ARN coiffé versus celui de l'ARN non coiffé. Le système est validé par l'utilisation d'ARN dont le 5'NTR est coiffe dépendant.

### 3.3.2. Élévation de la traduction

Le gène de fusion et le gène rapporteur dans le 5'NTR viral sont mis sous contrôle d'un promoteur efficace chez les plantes et les constructions sont introduites dans des cellules de plantes. Le niveau d'expression de chaque construction est mesuré et l'augmentation déduite.

### 3.3.3. Rôle de la séquence *Per se*

Le complément inverse de la séquence du 5'NTR du TuMV (FLIP) est introduit en amont du gène rapporteur et son expression dans les cellules de plantes est mesurée.

La séquence FLIP possède les mêmes caractéristiques de structure que le 5'NTR du TuMV (voir figure 3.1.) mais sa séquence est complètement différente. Si FLIP conduit à l'expression du gène rapporteur au même niveau que celui atteint avec le 5'NTR du TuMV, alors l'effet est indépendant de la séquence primaire.

#### 3.3.4. Mode d'initiation

Une séquence (ÉPINGLE) capable de former une boucle très stable est introduite en amont ou en aval du 5'NTR du TuMV mais toujours du côté 5' du codon d'initiation. La traduction de la construction où ÉPINGLE est en amont du 5'NTR du TuMV bloque la traduction et sert à valider l'expérience. Si la traduction de la construction où ÉPINGLE est localisé en amont du 5'NTR du TuMV est capable de traduction, alors, il y a forcément entrée directe. Autrement, il y a balayage selon le modèle établi.

**figure 3.1: Structures secondaires du 5'NTR et de FLIP**

Ces structures sont schématisées à partir des prédictions obtenues avec le logiciel PC-FOLD (Zuker et Stiegler, 1981).



## 4. Matériel et Méthodes

### 4.1. Manipulation de l'ADN

#### *Purification de plasmides*

Les préparations à petite (minipreps) et moyenne (midipreps) échelles ont été faites par la méthode de la lyse alcaline tel que décrite (Sambrook et coll., 1989) ou avec un ensemble commercial (basé sur l'affinité de l'ADN plasmidique pour des matrices de silice) le *Magic Minipreps™* (Promega LKB Biotechnologies™, Madison, WI., É.-U. : distribué par Fisher scientific).

#### *Digestions, ligations et modifications d'ADN*

Les réactions de digestions, de ligations et de modifications des ADN ont été assemblées et conduites selon les indications des fournisseurs d'enzymes (Pharmacia™ ou Gibco BRL™), avec les tampons accompagnant les enzymes ou avec le tampon KGB (Hanish et McClelland, 1988).

#### *Quantification de l'ADN*

L'ADN a été quantifié par la mesure de densité optique dans l'ultraviolet à 280nm (Sambrook et coll., 1989).

### *Électrophorèse d'ADN*

Les gels d'électrophorèse d'ADN (agarose/TAE et polyacrylamide/TAE) ont été accomplis tel que décrits (Sambrook et coll., 1989).

### *Élution de fragments*

La purification de fragments d'ADN à partir de bandes séparées par électrophorèse dans l'agarose a été accomplie grâce à l'ensemble commercial *Gene Clean II™* (Bio 101 inc., La Jolla, CA. É.-U. : distribué par Bio/Can) pour les fragments de tailles supérieures à 200pb et l'ensemble *Mermaid™* (Bio 101 inc. : distribué par Bio/Can) pour les fragments de tailles inférieures, selon les instructions du fabricant.

### *Amplification élective in vitro (PCR)*

L'amplification par PCR a été accomplie tel que décrite (Nicolas et Laliberté, 1991). Les fragments ont ensuite été purifiés par deux extractions au chloroforme suivies d'une précipitation à l'éthanol-NaCl avant les digestions. Puis les fragments ont été purifiés sur gel d'agarose avant les ligations.

### *Séquençage*

Le séquençage a été accompli par la méthode de la terminaison de chaînes (Sanger et coll., 1977) et autoradiographie ou avec une méthode modifiée avec des

analogues de bases fluorescentes et détecteur de fluorescence. Tout le séquençage a été accompli par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier.

#### *Synthèse d'oligonucléotides*

Tous les oligonucléotides ont été synthétisés avec le *Gene Assembler™* (Pharmacia™) au service de synthèse d'oligonucléotides de M. Shareck à l'Institut Armand-Frappier.

#### *Transformation de bactéries*

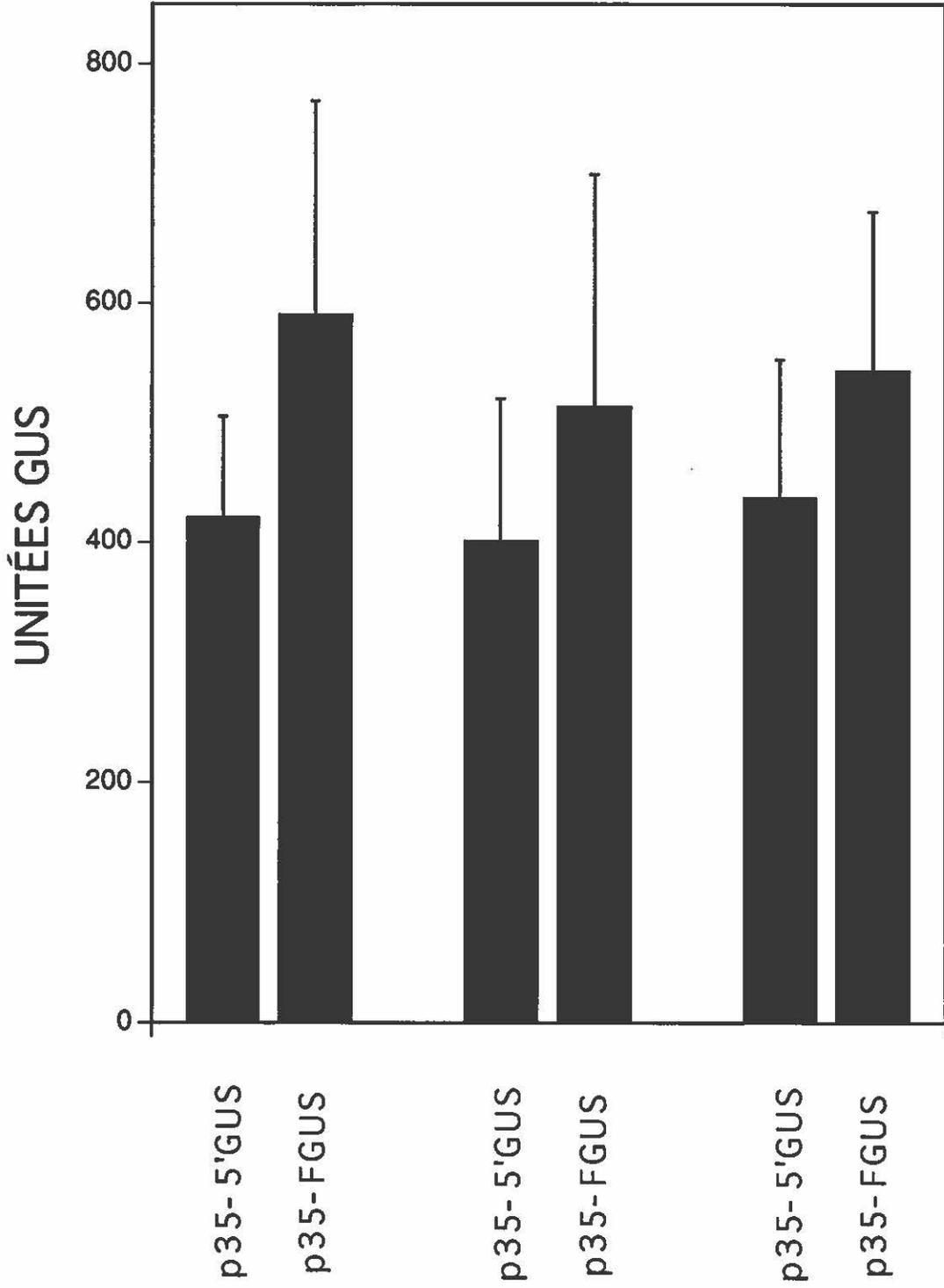
Les bactéries ont été transformées avec la méthode du choc thermique au dichlorure de calcium tel que décrite (Sambrook et coll., 1989).

#### *Sélection des clones transformés*

Après la transformation des bactéries, la sélection des transformants a été faite en soumettant les bactéries à des antibiotiques (ampicilline, kanamycine, etc.) selon les méthodes usuelles (Sambrook et coll., 1989).

#### *Sélection des plasmides recombinants*

Les plasmides recombinants ont été identifiés par purifications des plasmides (minipreps), digestions appropriées et électrophorèses.



#### 5.4. Le mode d'initiation de la traduction.

Dans le but de vérifier l'impact de structures secondaires dans le 5'NTR du TuMV sur la traduction, un oligonucléotide synthétique capable de former une boucle très stable a été fusionné au 5'NTR viral et l'impact de cette modification sur l'expression protéique a été mesuré. De plus, en modifiant la position de cette séquence relativement au 5'NTR du TuMV nous avons testé directement le modèle d'entrée directe en ce qui a trait au 5'NTR du TuMV.

Nous avons introduit l'oligonucléotide synthétique ÉPINGLE devant le cadre de lecture de GUS en absence (p35-EGUS), en aval (p35-5'EGUS) et en amont (p35-E5'GUS) du 5'NTR viral. Les détails de ces constructions sont présentés à la figure 4.3. Les niveaux d'expression de ces trois constructions après transfert biolistique sont représentés à la figure 5.4. Craignant une éventuelle instabilité de nos plasmides dans les bactéries à cause de la région répétée que constitue l'oligonucléotide ÉPINGLE, nous avons effectués les bombardements avec les mêmes préparations plasmidiques que nous avons préalablement utilisés pour établir les cartes de restriction de ces constructions.

L'expression du témoin négatif (p35-EGUS) est nulle et indique que la structure secondaire d'ÉPINGLE est suffisante pour bloquer le balayage du ribosome.

Le niveau d'expression obtenu lorsque ÉPINGLE est situé en aval du 5'NTR de TuMV est négligeable. Le ribosome peut entrer directement sur le 5'NTR (le cas échéant) ou reconnaître la coiffe mais sa progression est bloquée par la structure stable et la localisation du codon d'initiation par le ribosome est très peu fréquente.

L'expression de la troisième construction est plus difficile à interpréter à cause de la variabilité évidente (voir figure 5.4). Suivant le modèle du balayage, le ribosome reconnaît le bout 5' coiffé de l'ARN messager puis balaye celui-ci. Cependant, dans cette construction, le balayage par le ribosome est bloqué par la structure secondaire que constitue ÉPINGLE. Par contre, un ribosome qui entrerait directement en un site localisé en aval de la région hautement structurée serait capable d'initier la traduction de GUS. D'après nos résultats, il faut conclure que le 5'NTR du TuMV est capable de soutenir l'entrée directe.

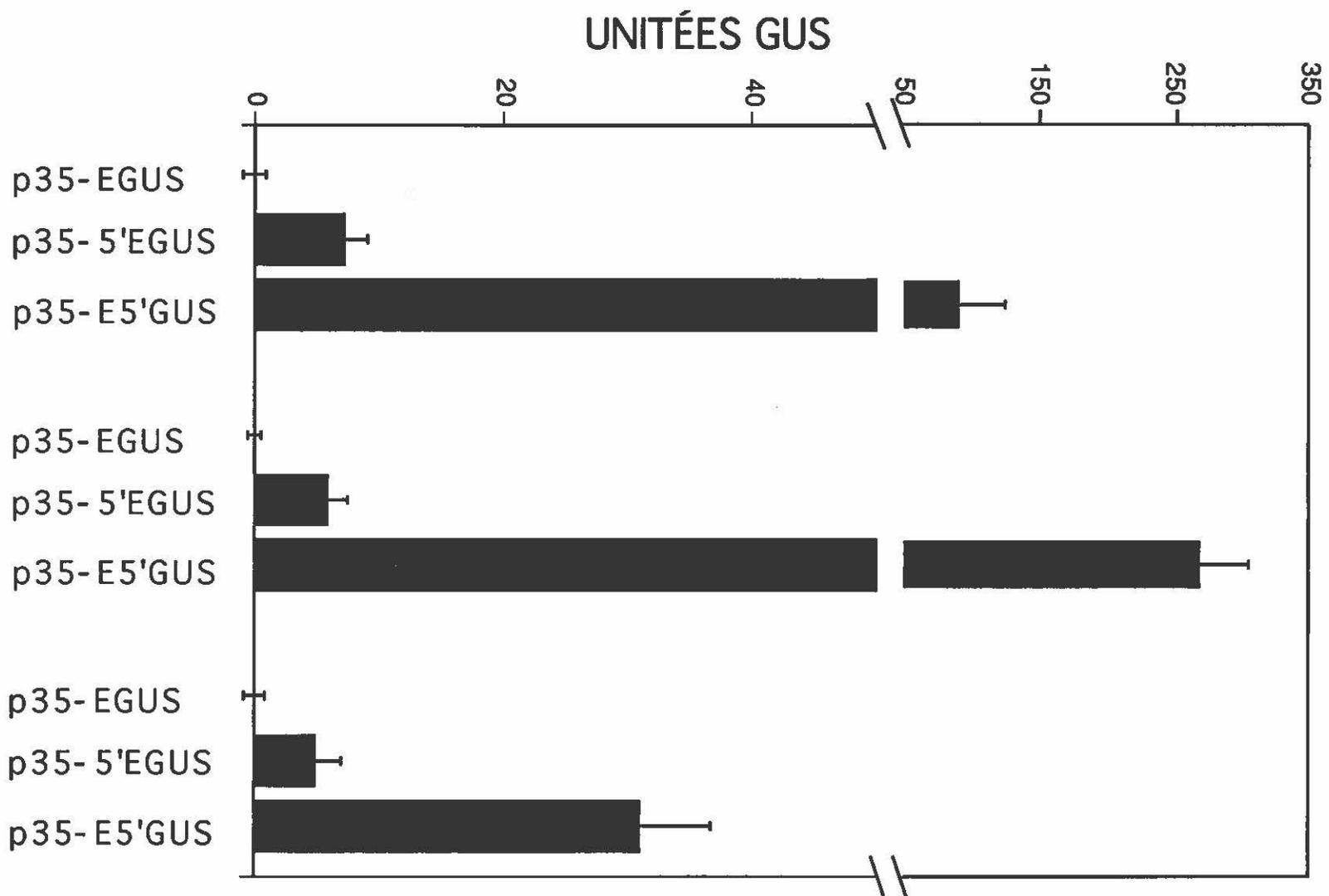
**figure 5.4.: Traduction en présence de structure secondaire stable**

L'expression transitoire, 24 heures après transfert biolistique des plasmides chez *N. tabacum* SR1.

Les plasmides p35-EGUS, p35-5'EGUS et p35-E5'GUS ont été utilisés pour les bombardements.

Trois expériences sont montrées.

Chaque valeur est la moyenne de cinq bombardements et la barre représente l'erreur standard.



## 6. Discussion

Pour qu'un ARN messenger soit traduit, il faut d'abord que cette molécule soit reconnue par les facteurs d'initiation et la théorie actuelle explique que la reconnaissance de la coiffe au bout 5' de l'ARN constitue la première étape du processus (Kozak, 1978; Merrick, 1992). Nous avons vu au chapitre 2 que les facteurs d'initiation impliqués dans ce mécanisme ont des affinités distinctes pour différentes molécules d'ARN et que ceci impose une compétition entre les ARN pour la machinerie de traduction (Godefroy-Colburn et Thach, 1981; Thach, 1992). En vue de l'abondance des messagers cellulaires, certains virus ont développé des mécanismes qui favorisent la traduction de leurs propres messagers. En fait, un certain nombre de virus des plantes et des animaux possèdent des séquences non-traduites qui augmentent le niveau de traduction de leurs ARN (Gallie et Kado, 1989; Jobling et Gehrke, 1987; Zelenina et coll., 1992; Nicolaisen et coll., 1992). En modifiant les interactions entre l'ARN messenger et les facteurs d'initiation les 5'NTR de certains ARN viraux lèvent le besoin de la présence d'une coiffe pour la traduction (Carrington et Freed, 1990; Wang et coll., 1993).

Nos travaux ont portés sur quatre points: 1°) Le 5'NTR du TuMV lève-t'il la nécessité d'une coiffe pour qu'un ARNm soit traduit? 2°) Augmente-t'il la traduction des ARNm? 3°) La

séquence de cette région est-elle la caractéristique qui est responsable de ces effets? 4°) Cette traduction est-elle soumise au balayage ou à l'entrée directe?

### coiffe indépendance

L'ARN du TuMV est porteur d'une protéine virale en 5' et n'est donc pas coiffé (Riechmann et coll., 1992). Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si la séquence 5' non-traduite du TuMV élimine le besoin d'une coiffe pour la traduction de l'ARN duquel il est flanqué en aval. Pour ce faire, le 5'NTR a été fusionné à un gène du même virus (le gène de la capsid) par clonage et des ARN messagers ont été synthétisés puis traduits *in vitro*. Des ARNm coiffés et d'autres non coiffés ont été préparés et leurs niveaux de traduction ont été mesurés. Nos résultats démontrent (figure 5.1) que les ARN porteurs du 5'NTR du TuMV ne sont pas influencés par la présence ou l'absence de coiffe alors que la traduction de l'ARN témoin repose sur sa présence pour traduire efficacement. D'autres travaux ont abouti aux mêmes conclusions pour d'autres 5'NTR et, dans certains cas, la traduction en absence de l'eIF-4F a été démontrée (Carrington et Freed, 1990; Jobling et Gehrke, 1987; Jackson et coll., 1990; Macejak et Sarnow, 1991).

Les travaux *in vitro* démontrent clairement l'impact de la séquence 5'NTR du TuMV sur la traduction d'un ARN. La levée de la dépendance de la traduction sur la présence de la coiffe implique que l'initiation de la traduction chez le TuMV procède par une voie alterne. Cependant notre expérience a été accomplie avec un gène du TuMV ainsi qu'une partie de la queue 3' non traduite (le génome du TuMV est représenté à la figure 2.1) et il est concevable que des interactions entre la séquence 5'NTR et d'autres séquences du virus soient impliquées dans cet effet. Aussi, des travaux ultérieurs ont été conduits dans notre laboratoire (Basso et coll., sous presse : document annexé) où le 5'NTR du TuMV est fusionné à un autre gène rapporteur, la  $\beta$ -glucuronidase. Ces résultats démontrent que la coiffe indépendance est conférée à l'ARN messenger par la seule présence du 5'NTR viral et confirment les résultats présentés ici.

Une élévation de synthèse protéique est observée (figure 5.1), cependant, cette élévation n'est pas apparente dans les travaux effectués avec la séquence de GUS (voir l'annexe) et cette différence peut refléter soit des effets intramoléculaires (comme il vient d'être fait mention) ou encore des différences dans les méthodes de purification des ARN synthétiques. En effet, divers sels transportés avec les ARN dans les réactions de traduction peuvent modifier le rendement des traduction (Thomas et coll., 1991). Si l'élévation de synthèse est apparente dans un ensemble de conditions, elle peut disparaître dans un autre.

D'autre part, les séquences elles-mêmes peuvent introduire des variations dans la demi-vie des molécules d'ARN.

### **Augmentation de la traduction**

Bien que l'élévation de la traduction ne soit pas évidente dans les systèmes *in vitro*, les expériences *in planta* démontrent une élévation significative de la traduction. À la figure 5.2, des cellules ont été dosées pour l'activité GUS après transfert biolistique d'ADN plasmidique comprenant la séquence de la  $\beta$ -glucuronidase (pBI 121) ou la séquence de l'enzyme flanquée en 5' de la séquence 5'NTR virale (pBI 5'GUS). Une élévation similaire de la traduction a été observée pour un certain nombre de séquences virales dont les 5'NTR de deux autres potyvirus (Carrington et Freed, 1990; Nicolaisen et coll., 1992).

### **Structure primaire et traduction**

L'importante variabilité biologique des potyvirus (Lecoq et Purcifull, 1992) est possiblement causée par l'introduction de nombreuses erreurs dans leurs génomes par leurs réplicases (Steinhauer et Holland, 1987) et la séquence 5'NTR est appelée à muter considérablement ou à causer une forte pression évolutive sur les potyvirus. En effet, si l'élévation de la traduction et la coiffe indépendance sont causées par des séquences précises,

alors la pression évolutive de cette séquence est proportionnelle à l'importance de ces effets sur la traduction. Cependant cette pression est moins importante si l'élévation de traduction est relativement indépendante de séquences données. L'augmentation de la traduction causée par la séquence inverse complémentaire (FLIP: figure 5.3) est très révélatrice puisqu'elle nous indique que l'augmentation de la traduction n'est pas le fait de séquences spécifiques contenues dans le 5'NTR du TuMV mais bien un effet provoqué par une séquence ayant les caractéristiques du 5'NTR. Parmi ces caractéristiques, on peut suspecter l'énergie libre (l'enthalpie de fusion pour le 5'NTR -22,5 kcal/mol et de -20,4 kcal/mol pour FLIP), la forme de cette structure (figure 3.1), la longueur (5'NTR = 129nt, FLIP = 101nt) et la richesse en A + U (environ 4/5 de la séquence). Il serait intéressant d'aller de l'avant et de modifier la séquence native pour l'empêcher de former une boucle.

La séquence consensus 5' non traduite identifiée chez les protozoaires est uniquement constituée de résidus d'uracile et d'adénine (Yamaushi, 1991) et une séquence répétée (CAA)<sub>n</sub> a été suggérée en tant que responsable de l'élévation de la traduction provoquée par le 5'NTR du TMV (Gallie et Walbot, 1992). On trouve également une séquence répétée (CAA)<sub>n</sub> chez le TuMV mais cette séquence devient (UUG)<sub>n</sub> dans FLIP. Il est probable, par contre, que la composition élevée en A et U soit importante pour l'élévation de la traduction.

Ces conclusions ont été explorées plus à fond au laboratoire et la séquence de GUS fusionnée à FLIP a été traduite dans le système *in vitro* démontrant que cette séquence est également capable de lever la dépendance sur la coiffe (Basso et coll., sous presse; annexé). Mentionnons également que le 5'NTR de même que FLIP sont capables d'inhiber la traduction lorsque ajoutés à des systèmes de traduction *in vitro* indiquant que ces molécules sont capables de s'associer aux facteurs de traduction.

### **L'entrée directe**

L'utilisation d'ARN bicistroniques dans la recherche sur l'entrée directe a été critiquée (Kozak, 1992b) à cause de certaines faiblesses du système expérimental. Principalement les bris inévitables dans la molécule (à cause de sa longueur); l'impossibilité d'obtenir un témoin négatif valable; la possibilité de *leaky scanning* (où le premier codon d'initiation n'est pas utilisé par le ribosome); et à cause de la ré-initiation (où contrairement à la normale, le ribosome reprend la traduction sans quitter l'ARN malgré l'atteinte du codon de terminaison). Notre modèle expérimental résout ces problèmes et nous démontre que le faible taux d'expression enregistré est en fait le produit de l'entrée directe.

Les travaux accomplis avec l'oligonucléotide ÉPINGLE (EPA: figure 5.4) sont certainement les plus difficiles à interpréter. D'une façon générale, les taux d'expression sont plus faibles que ceux présentés aux figures 5.2 et 5.3. Pourtant, ces résultats sont reproductibles et démontrent la capacité du 5'NTR du TuMV à soutenir l'entrée directe. De même, en vue du faible niveau d'expression obtenu, cette expérience a été reprise en ajoutant une seconde cassette transcriptionnelle (exprimant le gène de la NPT II, servant de contrôle interne) sur les plasmides mêmes utilisés lors du bombardement et des résultats similaires à ceux présentés ici ont été obtenus (Basso et coll., sous presse; annexé). La construction où la structure secondaire stable est introduite en amont du 5'NTR viral (E5'GUS) conduit à une expression enzymatique bien supérieure à celles observées chez ses contreparties. Ce comportement n'est explicable que si on accepte l'existence d'un site d'entrée directe.

Soulignons que les structures secondaires élevées n'influencent pas le niveau de transcription tel que démontré par Pelletier et Sonenberg (1985) et que les quantités d'ARNm produits par nos constructions sont vraisemblablement similaires les unes avec les autres. Notons également que certains ARN messagers possèdent naturellement des régions 5' non traduites qui bloquent la progression des ribosomes et la surexpression de l'eIF-4E élève leur traduction (Koromilas et coll., 1992). Ainsi, la structure secondaire élevée de ces ARN ne

nuit pas à la transcription mais la traduction en est limitée par les facteurs d'initiation.

Dans une autre expérience menée au laboratoire, des transcrits synthétiques ont été produits à partir des trois constructions munies de l'oligonucléotide épingle sous-clonées dans pTZ19 et ces ARN messagers coiffés ou non ont été traduits *in vitro*. Les résultats obtenus sont très semblables à ceux présentés à la figure 5.4 (Voir l'article annexé) indiquant une certaine traduction coiffe indépendante pour E5'GUS.

Lors de l'infection de la cellule par le TuMV, le génome d'ARN doit être traduit afin de synthétiser la réplicase laquelle n'est pas localisée dans le virion (Riechmann et coll., 1992). Or le génome est alors porteur d'une VPg et l'extrémité 5' est bloquée. L'existence d'un site d'entrée directe même à faible incidence permettrait la traduction du génome viral. Ainsi, l'existence d'un site d'entrée directe n'implique pas que ce site soit responsable de l'élévation de la traduction que nous avons observée.

Un faible niveau d'expression dirigée par le 5'NTR du plum pox virus (PPV, un potyvirus) a été enregistré grâce à l'utilisation d'un ARN bicistronique dont la région intergénique était constituée du 5'NTR du PPV et les conclusions des

expérimentateurs étaient contraires aux nôtres (Riechmann et coll., 1991).

L'approche du clonage d'un oligonucléotide synthétique conférant une structure secondaire stable pour bloquer la progression du ribosome pendant le balayage est très intéressante. Il serait instructif d'utiliser ce système pour vérifier si l'entrée directe est médiée par d'autres 5'NTR viraux (notamment le PPV) ou par la séquence FLIP.

## 7. Conclusion

Nos travaux nous amènent à conclure que le 5'NTR du TuMV provoque l'augmentation coiffe-indépendante de la traduction selon un mécanisme qui ne dépend pas de sa séquence précise mais de ses autres caractéristiques (structure secondaire, richesse en A+U, taille, etc).

Nous avons également montré des évidences indiquant que le 5'NTR du TuMV est capable de soutenir l'initiation de la traduction par l'entrée directe.

Il est probable que le complexe eIF-4F soit limitant dans la cellule et impose une compétition entre les ARN messagers (section 2.7.2.1.) pour l'initiation de la traduction. Nous croyons que les caractéristiques de la séquence du 5'NTR du TuMV lui confèrent certains avantages à ce niveau, conduisant à la stimulation observée de la traduction.

## Bibliographie

Ambros, V., Petterson, R.F. et Baltimore, D. (1978) An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell*. **15**: 1429-1446.

Barnett, O.W. (1991) Potyvirus. *dans* Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol.* [supplement 2]: 351-356.

Barnett, O.W. (1992) A summary of potyvirus taxonomy and definitions. *Arch. Virol.* [supplément 5]: 435-444.

Basso, J., Dallaire, P., Charest, P.J., Devantier, Y. et Laliberté, J.-F. (1994) Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *J. Gen. Virol.* Sous presse.

Blum, S., Schmid, D.R., Pause, A., Buser, P., Linder, P., Sonenberg, N. et Trachsel, H. (1992) ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 7664-7668.

Carberry, S.E., Friedland, D.E., Rhoads, R.E. et Gross, D.J. (1992) Binding of protein synthesis initiation factor 4E to oligoribonucleotides: effects of cap accessibility and secondary structure. *Biochemistry*. **31**: 1427-1432.

Carrington, J.C. et Freed, D.D. (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' untranslated region. *J. Virol.* **64**: 1590-1597.

Company, M., Arenas, J. et Abelson, J. (1991) Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature* **349**: 487-493.

Del Angel, R.M., Papavassiliou, A.G., Fernandez, T., Silverstein, S.J. et Racaniello, V.R. (1989) Cell proteins bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 8299-8303.

Devantier, Y. (1992) Microprojectile mediated DNA delivery to the Salicaceae family. Mémoire de maîtrise, Université de Waterloo.

Dildine, S.L. et Semler, B.L. (1992) Conservation of RNA-protein interactions among picornaviruses. *J. Virol.* **66**: 4364-4376.

Dougherty, W.G. et Carrington, J.C. (1988) Expression and function of potyviral gene products. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**: 123-142.

Dougherty, W.G. et Parks, T.D. (1991) Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology.* **183**: 449-456.

Edwardson, J.R. et Christie, R.G. (1986) Viruses infecting forage legumes. Université de Floride, éditeur. Gainesville, Floride, É.-U.

Edwardson, J.R. (1992) Inclusion bodies. *Arch. Virol.* [supplément 5]: 25-30.

Etchison, D., Milburn, S.C., Edery, I., Sonenberg, N. et Hershey, J.W.B. (1982) Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000 dalton polypeptide associated with eukaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* **257**: 14806-14810.

Gallie, D.R. (1993) Post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 77-105.

Gallie, D.R. et Kado, C.I. (1989) A translational enhancer derived from tobacco mosaic virus is functionally equivalent to a Shine-Dalgarno sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 129-132.

Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C. et Wilson, T.M.A. (1987a) The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* **15**: 3257-3273.

Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C. et Wilson, T.M.A. (1987b) A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as

enhancers of mRNA expression *in vivo*. Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711.

Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C. et Wilson, T.M.A. (1988) Mutational analysis of the tobacco mosaic virus 5'-leader for altered ability to enhance translation. Nucl. Acids Res. 16: 883-893.

Gallie, D.R. et Walbot, V. (1992) Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. Nucl. Acids Res. 20: 4631-4638.

Gehrke, L., Auron, P.E., Quigley, G.J., Rich, A. et Sonenberg, N. (1983) 5'-conformation of capped alfalfa mosaic virus ribonucleic acid 4 may reflect its independence of the cap structure or of cap binding protein for efficient translation. Biochemistry. 22: 5157-5164.

Godefroy-Colburn, T. et Thach, R.E. (1981) The role of mRNA competition in regulating translation. IV. Kinetic model. J. Biol. Chem. 256: 11762-11773.

Goldbach, R. (1992) The recombinative nature of potyviruses: implications for setting a true phylogenetic taxonomy. Arch. Virol. [supplément 5]: 299-304.

Hanish, J. et McClelland, M. (1988) Activity of DNA modification and restriction enzymes in KGB, a potassium glutamate buffer. Gene Anal. Techn. 5: 105-107.

Jackson, R.J., Howell, M.T. et Kaminski, A. (1990) The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. Trends Biochem. Sci. 15: 477-483.

Jang, S.K., Kräusslich, H.-G., Nicklin, M.J.H., Duke, G.M., Palmenberg, A.C. et Wimmer, E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. J. Virol. 62: 2636-2643.

Jensen, S.G. (1992) A viewpoint on the taxonomy of potyviruses infecting sugarcane, maize and sorghum. Arch. Virol. [supplément 5]: 349-351.

Jobling, S.A. et Gehrke, L. (1987) Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature*. **325**: 622-625.

Kim, J.-K. et Hollingsworth, M.J. (1992) Localisation of *in vivo* ribosome pause sites. *Anal. Biochem*. **206**: 183-188.

Konarska, M., Filipowicz, W., Domdey, H. et Gross, H.J. (1981) Binding of ribosomes to linear and circular forms of the 5'-terminal leader fragment of tobacco mosaic virus RNA. *Eur. J. Biochem*. **114**: 221-227.

Koonin, E.V. (1991) Similarities in RNA helicases. *Nature*. **352**: 290.

Koromilas, A.E., Lazaris-Karatzas, A. et Sonenberg, N. (1992) mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J*. **11**: 4153-4158.

Kozak, M. (1978) How do eukaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*. **15**: 1109-1123.

Kozak, M. (1979) Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes. *Nature*. **280**: 82-85.

Kozak, M. (1986) Regulation of protein synthesis in virus infected animal cells. *Adv. Virus Res*. **31**: 229-292.

Kozak, M. (1989) Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Mol. Cell. Biol*. **9**: 5134-5142.

Kozak, M. (1992a) Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu. Rev. Cell Biol*. **8**: 197-225.

Kozak, M. (1992b) A consideration of alternative models for the initiation of translation in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **27**: 385-402.

Lain, S., Riechmann, J.L. et Garcia, J.A. (1990) RNA helicase: A novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucl. Acids Res*. **18**: 7003-7006.

Lain, S., Riechmann, J.L., Martin, M.T. et Garcia, J.A. (1989) Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene*. **82**: 357-362.

Laliberté, J.-F., Nicolas, O., Chatel, H., Lazure, C. et Morosoli, R. (1992) Release of a 22-kDa protein derived from the amino-terminal domain of the 49-kDa NIa of turnip mosaic potyvirus in *Escherichia coli*. *Virology*. **190**: 510-514.

Lecoq, H. et Purcifull, D.E. (1992) Biological variability of potyviruses, an example: zucchini yellow mosaic virus. *Arch. Virol.* [supplément 5]: 229-234.

Linder, P., Lasko, P.F., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J. et Slonimski, P.P. (1989) Birth of the DEAD box. *Nature*. **337**: 121-122.

Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, J.F. et Scheele, G.A. (1987) Selection of AUG codons differs in plants and animals. *EMBO J.* **6**: 43-48.

Luz, N. et Beck, E. (1991) Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **65**: 6486-6494.

Macejak, D.G. et Sarnow, P. (1991) Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature*. **353**: 90-94.

Mandelis, S. (1968) Location of unique sequences in tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **243**: 3671-3674.

Matthews, R.E.F. (1991) *Plant virology*. 3<sup>ième</sup> édition, Academic Press inc., éditeurs. San Diego, É.-U.

Meerovitch, K., Nicholson, R. et Sonenberg, N. (1991) *In vitro* mutational analysis of cis-acting RNA transcriptional elements within the poliovirus type 2 5' untranslated region. *J. Virol.* **65**: 5895-5901.

Merrick, W.C. (1990) Overview: Mechanism of translation initiation in eukaryotes. *Enzyme*. **44**: 7-16.

Merrick, W.C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.* **56**: 291-315.

Milburn, S.C., Hershey, J.W.B., Davies, M.V., Kelleher, K. et Kaufman, R.J. (1990) Cloning and expression of eukaryotic initiation factor 4B cDNA: sequence determination identifies a common RNA recognition motif. *EMBO J.* **9**: 2783-2790.

Mirzayan, C. et Wimmer, E. (1992) Genetic analysis of an NTP-binding motif in poliovirus polypeptide 2C. *Virology.* **189**: 547-555.

Nicolaisen, M., Johansen, E., Poulsen, G.B. et Borkhardt, B. (1992) The 5' untranslated region from pea seedborne mosaic potyvirus RNA as a translational enhancer in pea and tobacco protoplasts. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters.* **303**: 169-172.

Nicolas, O. et Laliberté, J.-F. (1991) The use of PCR for the cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. *J. Virol. Meth.* **32**: 57-66.

Nicolas, O. et Laliberté, J.-F. (1992) The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *J. Gen. Virol.* **73**: 2785-2793.

Ohki, S.T. (1992) A potyvirus in nature: indistinct populations. *Arch. Virol.* [supplément 5]: 217-219.

Pause, A. et Sonenberg, N. (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* **11**: 2643-2654.

Pelletier, J. et Sonenberg, N. (1985a) Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell.* **40**: 515-526.

Pelletier, J. et Sonenberg, N. (1985b) Photochemical cross-linking of cap binding proteins to eukaryotic mRNAs: effect of mRNA 5' secondary structure. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3222-3230.

Pilipenko, E.V., Gmyl, A.P., Maslova, S.V., Suitkin, Y.V., Sinyakov, A.N. et Agol, V.I. (1992) Prokaryotic-like cis elements in the cap-

independant internal initiation of translation on picornavirus RNA. *Cell*. **68**: 119-131.

Riechmann, J.L., Lain, S. et Garcia, J.A. (1991) Identification of the initiation codon of plum pox potyvirus genomic RNA. *Virology*. **185**: 544-552.

Riechmann, J.L., Lain, S. et Garcia, J.A. (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* **73**: 1-16.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2ième édition. Les éditions Cold Spring. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, N.-Y.,É.-U.

Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. et Allen, N. (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardement process. *J. Part. Sci. Technol.* **5**: 27-37.

Sanger, F. Nicklen, S. et Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.

Schultz, E.S. (1921) A transmissible mosaic disease of chinese cabbage, mustard and turnip. *J. Agric. Res.* **22**: 173-178.

Shields, S.A. et Wilson, T.M.A. (1987) Cell-free translation of turnip mosaic virus RNA. *J. Gen. Virol.* **68**: 169-180.

Shukla, D.D., Frenkel, M.J., McKern, N.W., Ward, C.W., Jilka, J., Tasic, M. et Ford, R.E. (1992a) Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. *Arch. Virol.* [supplément 5]: 363-373.

Shukla, D.D., Lauricella, R. et Ward, C.W. (1992b) Serology of potyviruses: current problems and some solutions. *Arch. Virol.* [supplément 5]: 57-69.

Sleat, D.E., Gallie, D.R., Jefferson, R.A., Bevan, M.W., Turner, P.C. et Wilson, T.M.A. (1987) Characterisation of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation *in vitro*. *Gene*. **217**: 217-225.

Sleat, D.E., Jull, R., Turner, P.C. et Wilson, T.M.A. (1988) Studies of the mechanism of translational enhancement by the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Eur. J. Biochem.* 175: 75-86.

Soumounou, Y. et Laliberté, J.-F. (1994) Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* 75: sous presse.

Sonenberg, N. et Meerovitch, K. (1990) Translation of poliovirus mRNA. *Enzyme.* 44: 278-291.

Steinhauer, D.A. et Holland, J.J. (1987) Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 409-433.

Strauss, J.H. et Strauss, E.G. (1988) Evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 657-683.

Tacke, E., Prufer, D., Salamini, F. et Rohde, W. (1990) Characterisation of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA: differential expression by internal translation initiation and AUG suppression. *J. Gen. Virol.* 71: 2265-2272.

Teterina, N.L., Kean, K.M., Gorbalenya, A.E., Agol, V.I. et Girard, M. (1992) Analysis of the functional significance of amino acid residues in the putative NTP-binding pattern of the poliovirus 2C protein. *J. Gen. Virol.* 73: 1977-1986.

Thach, R.E. (1992) Cap Recap: The involvement of eIF-4F in regulating gene expression. *Cell.* 68: 177-180.

Thomas, A.A.M., Haar, E.T., Wellink, J. et Voorna, H.O. (1991) Cowpea mosaic virus middle component RNA contains a sequence that allows internal binding of ribosomes and that requires eukaryotic initiation factor 4F for optimal translation. *J. Virol.* 65: 2953-2959.

Thomas, A.A.M., Scheper, G.C. et Voorma, H.O. (1992) Hypothesis: is the eukaryotic initiation factor 2 the scanning factor? *The New Biologist.* 4: 404-407.

van den Heuvel, J.J. et Raué, H.A. (1992) Translational efficiency of mRNA in yeast cells is not increased by plant viral leader sequences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 84-87.

van Steeg, H., van Ostrom, C.T.M., Hodemackers, H.M. et van Kreyl, C.F. (1990) Cloning and functional analysis of the rat ornithine decarboxylase-encoding gene. *Gene.* **93**: 249-256.

van Vloten-Doting, L. et Neeleman, L. (1982) Translation of plant virus RNA's. Dans: *Nucleic Acids and proteins in plants II: Structure, biochemistry and physiology of nucleic acids*. Parthier, B. et Boulter, D., éditeurs. Springer-Verlag. New-York, N.-Y., É.-U.

Ventten, H.J., Lesemann, D.-E. et Maiss, E. (1992) Serotype A and B strains of bean common mosaic virus are two distinct potyviruses. *Arch. Virol.* [supplément 5]: 415-431.

Verver, J., Le Gall, O., van Kammen, A. et Wellink, J. (1991) The sequence between nucleotides 161 and 512 of cowpea mosaic virus M RNA is able to support internal initiation of translation *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **72**: 2339-2345.

Wang, C., Sarnow, P. et Siddiqui, A. (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* **67**: 3338-3344.

Ward, C.W. et Shukla, D.D. (1991) Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology.* **32**: 269-296.

Wassarman, D.A. et Steitz, J.A. (1991) Alive with DEAD proteins. *Nature.* **349**: 463-464.

Wyckoff, E.E., Hershey, J.W.B. et Ehrenfeld, E. (1990) eIF-3 is required for poliovirus 2A protease-induced cleavage of the p220 component of eIF-4F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 9529-9533.

Yamauchi, K. (1991) The sequence flanking translational initiation site in protozoa. *Nucl. Acids Res.* **19**: 2715-2720.

Zelenina, D.A., Kulaeva, O.I., Smirnyagina, E.V., Solovyev, A.G., Miroshnichenko, N.A., Fedorkin, O.N., Roionova, N.P., Morozov, S.Y. et Atabekov, J.G. (1992) Translation enhancing properties of the

5'-leader of potato virus X genomic RNA. Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters. **296**: 267-270.

Zuker, M. et Stiegler, P. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. Nucl. Acids Res. **9**: 133-148.

## Annexe

Document soumis et accepté pour publication:

Basso, J., Dallaire, P., Charest, P.J., Devantier, Y. et Laliberté, J.-F.  
(1994) Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. J. Gen. Virol.