

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Présence de facteurs de traduction dans le noyau et les vésicules du complexe de
réPLICATION DES CELLULES INFECTÉES AU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU NAVET

Par
Chantal Beauchemin

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinatrice interne	Angela Pearson
Examinatrice interne	Veronika vonMessling
Examinateurs externes	Guy Lemay (Université de Montréal) Jacques Archambault (IRCM)
Directeur de recherche	Jean-François Laliberté

Février 2008

RÉSUMÉ

Le génome de ~10 kb du virus de la mosaïque du navet (TuMV) code pour une polyprotéine qui est clivée en dix protéines matures. L'ARN est polyadénylé et lié de façon covalente à son extrémité 5' à une protéine virale, la VPg. De plus en plus d'études pointent sur une implication de la VPg et ses précurseurs dans la traduction des potyvirus. Il a été montré qu'ils interagissent avec le facteur eucaryote d'initiation de la traduction (iso) 4E [eIF(iso)4E] et la protéine de liaison à la queue de poly (A) 2 (PABP2). Notre hypothèse est que la VPg et ses précurseurs sont un point d'ancrage pour la formation de complexes multiprotéiques traductionnels et répliquatifs. Dans ce projet, nous avons cherché à déterminer le rôle des interactions de VPg-Pro et 6K-VPg-Pro avec eIF(iso)4E et PABP2.

D'abord, les différentes protéines ont été fusionnées avec des protéines fluorescentes et leur expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana* a été évaluée par microscopie confocale. Dans les cellules saines, nous avons observé que eIF(iso)4E est principalement associée aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) tandis que PABP2 est une protéine cytoplasmique. Dans un contexte non-infectieux, la VPg-Pro est localisée dans le nucléole et la 6K-VPg-Pro induit la formation de vésicules qui bourgeonnent des membranes du réticulum endoplasmique. Ces vésicules sont d'ailleurs connues pour contenir les complexes de réPLICATION dans les cellules infectées.

Ensuite, le site d'interaction entre les précurseurs de la VPg et les facteurs de traduction a été étudié. La méthode de la complémentation par fluorescence bimoléculaire (BiFC) a été utilisée pour observer la localisation cellulaire de l'interaction entre les précurseurs de VPg et eIF(iso)4E. La reconstitution de la fluorescence verte a été observée dans le noyau avec une accumulation préférentielle dans le nucléole lorsque les fragments scindés de la GFP ont été fusionnés à la VPg-Pro et à eIF(iso)4E. Les expériences de BiFC entre eIF(iso)4E et 6K-VPg-Pro ont montré que ces deux protéines interagissent dans les mêmes vésicules induites par 6K-VPg-Pro. Aussi, la distribution de

PABP2 a été observée par co-expression de PABP2-mCherry avec les précurseurs de la VPg liés à la GFP complète. La fluorescence rouge émise par PABP2 co-localise avec la VPg-Pro et la 6K-VPg-Pro dans le nucléole et les vésicules respectivement.

La distribution de PABP2 a finalement été étudiée dans des plants de *Brassica perviridis* infectés au TuMV. Le fractionnement cellulaire, les essais de flottaison de membranes et de gradient de saccharose ont montré que la PABP2 est redistribuée dans les mêmes membranes que 6K-VPg-Pro, associées au RE. De plus, la purification des précurseurs de la VPg par chromatographie d'affinité par chélation de métaux des fractions membranaires indique que le facteur de traduction fait partie des complexes membranaires. En dernier lieu, un traitement alcalin des vésicules associées au réticulum endoplasmique (RE) montre que la PABP et le complexe de réPLICATION sont localisés dans la lumière du réticulum endoplasmique.

Ces résultats suggèrent que l'association de la VPg avec des facteurs de traduction est nécessaire pour deux fonctions différentes, selon le précurseur impliqué. L'interaction de VPg-Pro avec eIF(iso)4E et PABP2 pourrait être impliquée dans la déstabilisation des fonctions normales cellulaires tandis que l'interaction des facteurs de traduction avec 6K-VPg-Pro serait nécessaire pour la traduction et/ou la réPLICATION de l'ARN viral.

Chantal Beauchemin
Chantal Beauchemin

Jean-François Laliberté
Jean-François Laliberté,
directeur de recherche

Remerciements

Plusieurs personnes ont été d'une aide inestimable pendant cette longue aventure qu'a été mon doctorat. J'aimerais commencer en premier lieu par mon directeur, Jean-François Laliberté, qui m'a fait confiance une deuxième fois. Il est pour moi une source infinie de patience et d'imagination. Sa philosophie décontractée de la science était reflétée par des expressions sages telles « garbage in, garbage out » ou encore « lentement mais sûrement ». J'aimerais aussi remercier les étudiants, collègues et amis qui ont été de passage dans le laboratoire et à l'IAF en général. Leur support technique et psychologique a été grandement apprécié. Un merci particulier à Marcel Desrosiers qui m'a enseigné les secrets de la microscopie confocale. Sans lui, ce projet n'aurait jamais été aussi complet.

Je remercie aussi ma famille, qui a été d'une aide sans borne, principalement mes parents, ma marraine Lise ainsi que ma sœur et sa petite famille. Ils m'ont accueillie un jour ou l'autre dans leur demeure, m'ont épaulée durant les moments difficiles autant que dans les moments de réjouissances. Leur dévouement est grandement apprécié. L'arrivée au monde il y a deux ans et demi de ma filleule, Émilie, a aussi été une source d'ensoleillement. Cette petite boule de bonheur m'a apporté que sourires et joie.

Finalement, je tiens à remercier l'être cher qui a partagé ma vie durant ces longues années de mes études graduées, Jonathan Alix. Il a réussi à m'encourager et à ne pas me laisser abattre malgré les difficultés et la distance qui nous a séparés pendant trois ans. Il m'a soutenue financièrement et m'a poussée à réalisé le rêve ultime : faire un stage post-doctoral à Harvard University de Boston. Le destin nous a malheureusement divisés mais j'espère tout de même que l'avenir me réserve de belles surprises.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
TABLE DES MATIERES	V
TABLE DES ILLUSTRATIONS	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	VIII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. Les potyvirus	2
1.1 Caractéristiques des protéines.....	3
1.2 VPg et ses précurseurs.....	7
2. Le facteur eucaryote d'initiation de la traduction 4E (eIF4E)	10
2.1 Traduction.....	10
2.2 Structure de eIF4E.....	14
2.3 Contrôle de l'activité de eIF4E.....	14
2.4 eIF4E et le noyau.....	17
2.5 eIF4E chez les végétaux.....	18
2.6 Interaction entre eIF4E et les virus	19
2.6.1 Les calicivirus	20
2.6.2 Les picornavirus.....	21
3. La protéine de liaison à la queue de poly(A) (PABP)	23
3.1 Structure de la PABP	23
3.2 PABP cytoplasmique.....	26
3.3 PABP nucléaire.....	29
3.4 Contrôle de l'activité de PABP.....	30
3.5 Interaction entre PABP et les virus	31
3.5.1 Les picornavirus.....	31
3.5.2 Les rotavirus.....	32
4. Hypothèse et objectifs de travail.....	35
CHAPITRE 2 : PUBLICATIONS.....	37
Publication no.1	38

<i>Visualisation of the interaction between the precursors of the viral protein linked to the genome (VPg) of Turnip mosaic virus and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta.....</i>	38
Contexte	39
Résumé.....	40
Summary	41
Introduction.....	42
Materials and Methods.....	45
Results and Discussion	49
Acknowledgement	63
Reference List.....	63
Publication no.2	69
<i>The poly(A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during Turnip mosaic virus infection</i>	69
Contexte	70
Résumé.....	72
Summary	73
Introduction.....	74
Materials and Methods.....	77
Results.....	82
Discussion	98
Acknowledgements.....	101
References.....	101
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	108
CONCLUSION	121
BIBLIOGRAPHIE.....	123
ANNEXE II : CONTRIBUTIONS SUPPLEMENTAIRES.....	141
Interaction de la VPg-Pro du virus de la mosaïque du navet avec le facteur d'initiation de la traduction 4E et la protéine de liaison aux poly(A) <i>in planta</i>.....	142
Résumé.....	143

TABLE DES ILLUSTRATIONS

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Figure 1 : Stratégie d'expression des protéines des potyvirus.	4
Figure 2 : Initiation de la traduction des ARNm selon le modèle circulaire	11
Figure 3 : Structure tridimensionnelle de eIF4E	14
Figure 4 : Structure des protéines de liaison aux poly(A).	25
Figure 5 : Rôles possibles de GSPT/eRF3 dans le système de traduction eucaryote	28

CHAPITRE II : PUBLICATIONS

Publication no 1

Figure 1 : Immunoblot analysis of soluble and membrane-associated proteins from healthy or TuMV-infected plants.	51
Figure 2 : Expression of GFP fusions in <i>N. benthamiana</i> .	52
Figure 3 : Subcellular localizations of eIF(iso)4E and VPg precursors.	53
Figure 4 : Subcellular localizations of the interaction between eIF(iso)4E and VPg precursors.	57
Figure 5 : Immunoblot analysis of nuclear and postnuclear fraction proteins from healthy or TuMV-infected plants.	58

Publication no 2

Figure 1 : Immunoblot analysis of soluble, membrane-associated and nuclear proteins from healthy or TuMV-infected plants.	83
Figure 2 : Subcellular localizations of PABP2, eIF(iso)4E and VPg-Pro.	85
Figure 3 : VPg-Pro interaction with PABP2 and eIF(iso)4E of <i>A. thaliana</i> as demonstrated by ELISA-based binding assay.	88
Figure 4 : Subcellular localization of eIF(iso)4E, PABP2 and 6K-VPg-Pro.	90
Figure 5 : Membrane flotation assays.	92
Figure 6 : Detection of proteins in membrane fractions following centrifugation in sucrose gradient.	93
Figure 7 : Co-purification of 6K-VPg-Pro/VPg-Pro and PABP2 by metal chelation chromatography.	96
Figure 8 : Biochemical treatments of membrane-enriched fractions derived from TuMV-infected <i>B. perviridis</i> .	97

CHAPITRE III : DISCUSSION

Figure 6 : Modèle de formation des vésicules dans une cellule infectée au TuMV	120
--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 4E-BP : protéine de liaison à eIF4E
AiV : Aichi virus
ARNm : ARN messager
ARNr : ARN ribosomal
ARNt : ARN de transfert
ARN_i : ARN de transfert initiateur
A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*
BiFC : complémentation par fluorescence bimoléculaire
B. perviridis : *Brassica perviridis*
CI : protéine d'inclusion cytoplasmique
CIYYV : Clover yellow vein virus; virus de veines jaunes du trèfle
CMV : Virus de la mosaïque du concombre
CP : protéine de la capside
CPSF : facteur de spécificité de clivage et de polyadénylation
CTC : domaine conservé C-terminal
C-terminal : carboxy-terminal
E : glutamate
eIF : facteur d'initiation eucaryote
eEF : facteur d'elongation eucaryote
ELISA : enzyme-linked immunosorbant assay
EMCV : Virus de l'encéphalomyocardite
eRF : facteur de relâche eucaryote
FCV : Calicivirus félin
FMDV : Foot-and-mouth disease virus
GFP : protéine de fluorescence verte
GRV : Virus de la rosette de l'arachide
GSPT : facteur GTP-dépendant de la relâche de la polyprotéine
HAV : Virus de l'hépatite A
HCPro : Helper-Component proteinase

HCV : Virus de l'hépatite C
IRES : site interne d'entrée des ribosomes
LDV : Virus de Lordsdale
LMV : Virus de la mosaïque de la laitue
MNV : Norovirus murin
Nla : inclusion nucléaire a
Nlb : inclusion nucléaire b
NLS : signal de localisation nucléaire
NoLS : signal de localisation nucléolaire
NPC : complexe du pore nucléaire
N. benthamiana : *Nicotiana tabaccum*
N-terminal : amino-terminal
NTR : région non-traduite
ODC : ornithine décarboxylase
ORF : cadre de lecture
PABP : protéine de liaison aux poly(A)
PABPC : PABP cytoplasmique
PABPCP : PABP cytoplasmique pseudogène
PABPN : PABP nucléaire
PAP : poly(A) polymerase
PCBP : protéine de liaison aux poly(C)
Pi : phosphate inorganique
PPV : Plum pox virus
PSbMV : Pea seed-borne mosaic virus
PTGS : gene silencing post-transcriptionnel
PTV : Porcine teschovirus 1
PVY : Virus de la patate Y
R : arginine
RE : réticulum endoplasmique
RER : réticulum endoplasmique rugueux
RHDV : Virus de la maladie hémorragique du lapin

RNP : ribonucléoprotéique

RdRp : ARN polymérase dépendante d'ARN

RRM : motif de reconnaissance d'ARN

RRV : Rhesus rotavirus

Sam-68 : Src-associated in mitosis, 68 kDa

Ser : sérine

siARN : small interfering ARN

TEV : Tobacco etch virus

Trp : tryptophane

TuMV : Virus de la mosaïque du navet

VPg : Protéine virale liée au génome

VSV : Virus de la stomatite vésiculeuse

W : tryptophane

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La majorité des ARN messagers (ARNm) cellulaires sont traduits d'une façon coiffe- et poly(A)-dépendante. Ceci implique la reconnaissance de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm par le facteur d'initiation de la traduction eIF4F ainsi que de l'extrémité 3' polyadénylée par la PABP. Par contre, les virus n'utilisent pas tous ce mécanisme pour la traduction de leurs ARN. Les virus à ARN ont élaboré différents mécanismes pour la main-mise de la machinerie de traduction de la cellule hôte pour leur utilisation personnelle (Bushell et Sarnow, 2002). Dans la plupart des cas, ceci résulte en une traduction préférentielle des ARN viraux. Les potyvirus font partie de cette catégorie de virus qui diffère de la stratégie habituelle de traduction des ARNm.

1. Les potyvirus

Les potyvirus font partie de la famille des *Potyviridae* (Lopez-Moya *et al.*, 2000). Cette famille regroupe aussi les genres Ipomovirus (Sweet potato mild mottle virus), Macluravirus (Maclura mosaic virus), Rymovirus (Ryegrass mosaic virus), Tritimovirus (Wheat streak mosaic virus) et bymovirus (Barley yellow mosaic virus) (Hull, 2002). Le genre potyvirus contient le plus grand nombre de virus de plantes (30 % de tous les virus de plantes connus) et cause les plus grandes pertes économiques en agriculture et horticulture (Riechmann *et al.*, 1992; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Ces virus infectent un large spectre d'hôtes dans toutes les régions climatiques du globe, que ce soit chez les monocotylédones ou les dicotylédones. Ils sont les plus répandus dans les crucifères tels le chou de Bruxelles, le canola et le chou-fleur. Parmi les potyvirus, le virus de la Sharka (vérole en bulgar) nommé aussi plum pox virus (PPV), est considéré comme la maladie la plus dévastatrice des fruits à noyau (Lopez-Moya *et al.*, 2000); le virus de la mosaïque du navet (TuMV) fait aussi partie des potyvirus.

Les potyvirus sont transmis principalement par les pucerons mais les mites et les mouches blanches sont aussi des vecteurs potentiels (Riechmann *et al.*, 1992). Les virions sont de longues particules non-enveloppées flexibles et filamenteuses de 680-900 nm de long et 11-15 nm de large. L'induction de corps d'inclusion de forme cylindrique est un

effet cytoplasmique caractéristique des potyvirus. Des corps nucléaires sont aussi observés pour certaines souches.

Le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 10 kb et l'organisation génomique des potyvirus est semblable à celle retrouvée chez les picornavirus (Figure 1). L'extrémité 5' est liée de façon covalente à la protéine virale VPg alors que l'extrémité 3' est polyadénylée. L'ARN viral ne possède qu'un cadre de lecture (ORF) qui est traduit en une seule polyprotéine de plus de 3000 acides aminés (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). La polyprotéine est co- et post-traductionnellement hydrolysée en au moins dix protéines par trois protéinases virales. Les protéines résultantes sont multifonctionnelles, incluant les protéinases qui possèdent d'autres fonctions nécessaires à la virulence. Aussi, toutes les protéines virales sont impliquées à divers degrés dans la réPLICATION et la propagation du génome.

1.1 Caractéristiques des protéines

P1 se trouve à l'extrémité amino-terminale de la polyprotéine. Elle possède une activité autoprotéolytique en *cis* à un site spécifique entre elle-même et la protéine suivante, HCPro. Ce clivage est exécuté par un domaine de type sérine protéinase situé dans la région C-terminale de la protéine (Moreno *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 1999; Rajamaki *et al.*, 2005; Verchot et Carrington, 1995). La fonction de P1 n'est pas encore élucidée mais il a été mentionné qu'elle lie l'ARN de façon non-spécifique et serait impliquée dans l'amplification génique par sa liaison à HCPro (Kasschau et Carrington, 1998; Klein *et al.*, 1994; Pruss *et al.*, 1997; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Verchot et Carrington, 1995).

Tout comme P1, la protéinase HCPro (Helper-Component proteinase) clive la polyprotéine en *cis* à son extrémité carboxy-terminale, entre elle-même et P3. Le domaine actif de protéolyse est localisé dans la moitié C-terminale de la protéine et ressemble à la famille des cystéine protéases (Oh et Carrington, 1989). HCPro est aussi impliquée dans

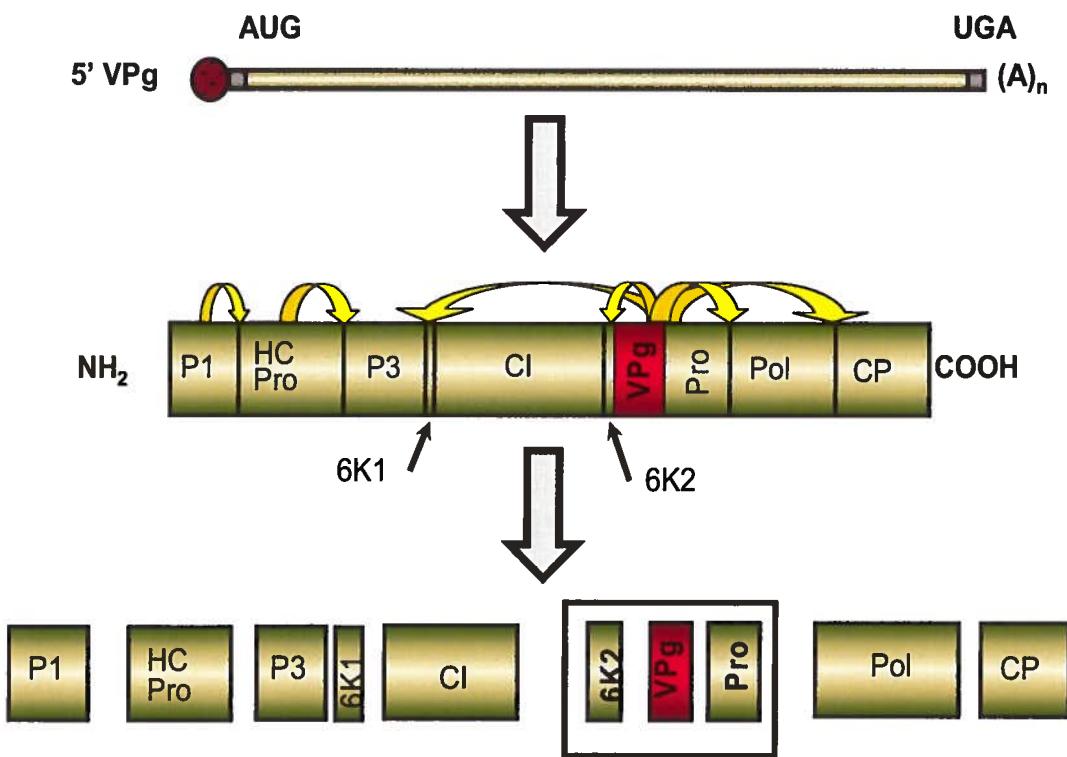


Figure 1 : Stratégie d’expression des protéines des potyvirus.

L’ARN de polarité positive est lié à son extrémité 5’ à la protéine virale VPg. L’extrémité 3’ est polyadénylée. Cet ARN est traduit en une seule polyprotéine qui est autoclavée en dix protéines matures par trois protéinases virales : P1, HCPro et VPg-Pro. Les flèches jaunes représentent les sites de protéolyse par leur protéinase respective. VPg existe aussi sous la forme de précurseurs VPg-Pro et 6K-VPg-Pro (encadré).

la transmission virale intercellulaire et de longue distance. Il a été proposé que cette protéine soit responsable de l'augmentation de la limite d'exclusion des plasmodesmes (Rojas *et al.*, 1997) ainsi que de l'entrée et la sortie du virion du système vasculaire de la plante hôte (Saenz *et al.*, 2002). De plus, le maintien et l'amplification de la réPLICATION virale (Kasschau *et Carrington*, 2001; Kasschau *et al.*, 1997), la transmission par les pucerons (Govier *et al.*, 1977), la suppression du mécanisme de résistance naturelle des plantes contre les virus (« gene silencing ») (Llave *et al.*, 2000), le synergisme de virulence lors de co-infection et le développement des symptômes (Redondo *et al.*, 2001) sont d'autres fonctions importantes attribuées à HCPro.

P3 et son précurseur P3-6K1 sont libérés de la polyprotéine par l'activité protéolytique de HCPro et de VPg-Pro (Riechmann *et al.*, 1992). P3 est la protéine la plus variable à travers les potyvirus (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Il a été proposé qu'elle soit impliquée dans la réPLICATION virale (Merits *et al.*, 1999), l'accumulation (Klein *et al.*, 1994), la symptomatologie (Chu *et al.*, 1997; Saenz *et al.*, 2000), la transmission cellule-cellule (Johansen *et al.*, 2001), l'infection systémique et le spectre d'hôte (Suehiro *et al.*, 2004). P3 et 6K1 ne lient pas l'ARN directement mais participent à la réPLICATION en interagissant vraisemblablement avec l'hélicase virale (CI) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Il n'est pas certain si P3 et 6K1 sont actives sous leur forme mature ou de précurseur.

La CI (protéine d'inclusion cytoplasmique) s'accumule dans le cytoplasme en structures coniques où plusieurs répliques de l'ARN viral y sont associées (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). La CI possède un motif de liaison aux nucléotides ainsi qu'une activité hélicase et participe activement à la réPLICATION en se liant à l'ARN viral pour le dérouler. La CI est également présente à l'entrée des plasmodesmes et contribuerait à la transmission cellule-cellule.

La VPg (protéine virale liée au génome) est la protéine qui est liée de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ARN viral (Figure 1). Elle a un poids moléculaire

d'environ 22 kDa (Laliberté *et al.*, 1992). Cette protéine existe aussi sous forme de précurseurs, VPg-Pro (49 kDa) et 6K2-VPg-Pro (55 kDa). VPg et ses précurseurs sont impliqués dans la plupart des processus essentiels, de la réPLICATION à la transmission virale. La protéine 6K2 possède un domaine hydrophobe central flanqué de résidus chargés (Schaad *et al.*, 1997a). Ceci fait d'elle une protéine intégrale des membranes dérivées du réticulum endoplasmique (RE) où elle provoque la formation de vésicules. La VPg-Pro est responsable de la maturation en *cis* et en *trans* du deux-tiers carboxy-terminal de la polyprotéine incluant un site interne sous-optimal qui sépare lentement la protéine en ses domaines VPg et Pro (Laliberté *et al.*, 1992; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Ce processus de clivage est promu par le domaine C-terminal Pro qui contient un motif 3C-like de picornavirus. L'activité protéolytique est très contrôlée afin d'obtenir des produits intermédiaires et matures qui possèdent des fonctions bien définies. Par contre, la VPg-Pro est aussi accumulée au noyau où elle forme des corps d'inclusion pour certains virus, excluant le TuMV (Hajimorad *et al.*, 1996; Restrepo-Hartwig et Carrington, 1992; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Cette caractéristique lui a valu le nom de Nla pour « Nuclear Inclusion a ». Le signal de localisation nucléaire (NLS) a été décrit dans le domaine VPg (Schaad *et al.*, 1996). Le rôle essentiel de la VPg-Pro dans le noyau n'est pas défini mais il a été suggéré qu'elle y dégrade l'ADN nucléaire, ayant une activité déoxyNUcléase non-spécifique (Anindya et Savithri, 2004). La VPg-Pro confère également une fonction de propagation longue-distance génotype-spécifique (Schaad *et al.*, 2000). La VPg et ses précurseurs interagissent avec plusieurs protéines virales et cellulaires. Le rôle de ces interactions sera détaillé dans la section suivante dédiée à la VPg et ses précurseurs.

La polymérase virale possède le motif conservé GDD caractéristique des ARN polymérases dépendantes d'ARN (RdRp) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Elle est donc responsable de la synthèse des brins négatifs et positifs du génome viral. Elle a aussi une activité de nucléotidylation nécessaire pour la réPLICATION génomique. La RdRp interagit entre autre avec VPg et Pro (Fellers *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997) ainsi qu'avec la protéine de liaison à la queue de poly(A) (PABP) de la cellule hôte (Wang *et al.*, 2000). À l'instar de la VPg-Pro, la polymérase des potyvirus est aussi nommée Nlb car elle s'accumule

dans le noyau des cellules infectées grâce à son signal de localisation nucléaire où elle y forme des corps d'inclusion nucléaire pour certaines souches, excluant le TuMV. La fonction de la polymérase dans le noyau n'est pas définie.

La protéine de la capsidé (CP) est la protéine structurale. Autour de 2000 unités sont assemblées pour protéger l'ARN viral. Elle est aussi impliquée dans la transmission par les pucerons, le transport cellule-cellule et systémique ainsi qu'à la régulation de l'amplification de l'ARN viral (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

1.2 VPg et ses précurseurs

La VPg et ses précurseurs occupent des fonctions essentielles dans plusieurs étapes du cycle de réPLICATION des potyvirus. En fait, la VPg et ses précurseurs semblent être au cœur des réactions catalytiques puisqu'ils interagissent avec la plupart des protéines virales. Il est donc nécessaire de s'attarder sur les fonctions qui lui ont été attribuées.

Il a été montré par le système de double-hybridation dans la levure que la VPg interagit avec la capsidé et elle-même (Guo *et al.*, 2001). Chez le virus de la veine jaune du trèfle (*Clover yellow vein virus*; CIYYV), la VPg interagit aussi avec HCPro par son domaine central (Yambao *et al.*, 2003). Ce domaine central de la VPg est également impliqué dans la transmission d'autres potyvirus, tel le tobacco etch virus (TEV). Cette association suggère donc une coopération entre HCPro et VPg pour le transport cellule-cellule et longue-distance de l'ARN viral ou des virions.

Une autre interaction importante est celle entre VPg-Pro et RdRp. Selon les études, seulement le domaine Pro (Li *et al.*, 1997) ou les deux domaines VPg et Pro (Fellers *et al.*, 1998) sont en cause. Du côté de la RdRp, la région près du domaine de polymérase GDD semble être impliquée. L'interaction entre 6K-VPg-Pro et RdRp permet entre autre l'ancrage du complexe de réPLICATION avec les membranes dérivées du réticulum endoplasmique. Exprimée seule, la RdRp est dirigée principalement vers le

noyau cellulaire. Une population de la polymérase doit alors être retenue dans les membranes où se trouvent les protéines virales et le complexe de réPLICATION. Cette immobilisation de la RdRp est réalisée par des interactions protéines-protéines, impliquant vraisemblablement l'activité de liaison aux membranes de 6K2 dans le contexte du précurseur 6K-VPg-Pro (Li *et al.*, 1997). Dans le complexe de réPLICATION, la RdRp a aussi une activité de nucléotidylation, où elle ajoute des résidus uracyl sur une tyrosine de la VPg. La VPg uridylylée sert vraisemblablement d'amorce pour la synthèse de l'ARN (Anindya *et al.*, 2005; Puustinen et Makinen, 2004), ce qui fait d'elle une protéine clé dans la réPLICATION des potyvirus.

VPg et ses précurseurs interagissent également avec des protéines cellulaires. L'une des plus documentée est le facteur eucaryote d'initiation de traduction 4E (eIF4E), la protéine de liaison à la coiffe des ARNm. L'interaction, d'abord identifiée par le système de double-hybride de la levure (Wittmann *et al.*, 1997), se fait entre la région centrale de VPg et l'un ou l'autre des deux isomères, eIF4E ou eIF(iso)4E, selon la souche virale. Cette interaction a un rôle important dans l'infectivité des potyvirus. Notamment, des lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana* pour le gène *eIF(iso)4E* sont résistantes aux infections par plusieurs potyvirus incluant le TuMV, le virus de la mosaïque de la laitue (LMV) et le TEV (Duprat *et al.*, 2002; Lellis *et al.*, 2002). Il a aussi été démontré que des mutants KO pour *eIF4E* préviennent la réPLICATION du CIYVV, indiquant que les potyvirus sélectionnent l'isoforme de eIF4E (Sato *et al.*, 2005).

Les isomères eIF4E et eIF(iso)4E ont récemment été associés à certains gènes récessifs connus de résistances naturels aux potyvirus. Ce sont par des études de cartographie que *mol¹* et *mol²* de la laitue (Nicaise *et al.*, 2003), *pvr2* et *pvr6* du poivron (Kang *et al.*, 2005; Ruffel *et al.*, 2002; Ruffel *et al.*, 2006), *sbm-1* du pois (Gao *et al.*, 2004) ainsi que *pot-1* de la tomate (Ruffel *et al.*, 2005) ont été identifiés comme étant différents allèles de eIF(iso)4E ou eIF4E. Par ailleurs, la VPg est le déterminant de virulence envers ces résistances naturelles. L'abolition de la liaison de VPg avec eIF4E par une ou quelques substitutions d'acides aminés dans la région centrale du domaine VPg inhibe complètement la production virale (Léonard *et al.*, 2000; Moury *et al.*, 2004).

Il a également été montré que la VPg compétitionne avec les ARNm cellulaires pour la liaison à eIF4E (Michon *et al.*, 2006) et que l’interaction VPg/eIF4E diminue ainsi la synthèse des protéines cellulaires (Grzela *et al.*, 2006). Puisque le domaine d’interaction de VPg sur eIF4E se situe près ou dans la poche de liaison à la coiffe (Nicaise *et al.*, 2003), la VPg agit potentiellement comme une coiffe dans la traduction des ARN viraux.

L’interaction de la VPg-Pro des potyvirus avec la PABP est peu documentée. En fait, ce complexe a été mis au jour par notre laboratoire en collaboration avec le laboratoire du Dr Marc G. Fortin de l’Université McGill. Des résultats préliminaires effectués avec un lysat de PABP de blé ont montré que la protéine cellulaire lie directement la VPg-Pro *in vitro*, possiblement par le domaine Pro (thèse de Simon Léonard, 2003), ce qui suggère que la PABP soit impliquée dans la traduction des ARN viraux. Cependant, elle ne semble pas indispensable puisque des plants KO de PABP2 d’*A. thaliana* sont sensibles à l’infection aux TuMV (Communication personnelle de Philippe Dufresne du laboratoire du Dr Marc G. Fortin).

2. Le facteur eucaryote d'initiation de la traduction 4E (eIF4E)

Tous les ARNm cellulaires, à l'exception de ceux provenant des mitochondries et des chloroplastes, ont une coiffe à leur extrémité 5'. Cette coiffe apparaît après la synthèse d'une trentaine de nucléotides de la molécule d'ARNm. Elle est formée d'un résidu guanosine méthylé en position 7 (m^7 GpppN où N est n'importe quel nucléotide) condensé avec le premier nucléotide initialement transcrit (Buchanan *et al.*, 2000). La coiffe est non seulement importante dans l'initiation de la traduction mais aurait aussi un rôle dans l'épissage des pré-ARNm, le transport nucléocytoplasmique et la stabilité des ARNm.

2.1 Traduction

L'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes requiert au moins douze protéines, désignées eIF (*eukaryotic initiation factors*; facteurs d'initiation eucaryote) (Figure 2) (Cooper et Hausman, 2007). Il est considéré que la reconnaissance de la coiffe des ARNm par le complexe eIF4F est la première étape de l'initiation de la traduction. Ce complexe regroupe trois facteurs : eIF4E, eIF4G et, selon les organismes, eIF4A. eIF4E reconnaît et lie spécifiquement la coiffe à l'extrémité 5' des ARNm. eIF4A a une activité ARN hélicase et ATPase ARN dépendante qui permet vraisemblablement de dérouler les structures secondaires de la région 5' non-traduite (5'NTR) de l'ARNm. L'activité hélicase de eIF4A permet la recherche du codon d'initiation par la sous-unité ribosomale 40S (Gallie, 1998). eIF4G est la protéine centrale qui fait le lien entre eIF4E et eIF4A et qui sert de plate-forme pour l'interaction avec d'autres facteurs d'initiation à la traduction, tels PABP (protéine de liaison de la queue polyadénylée), eIF3 et eIF4B (facteur de stimulation de eIF4A) (Gingras *et al.*, 1999; Imataka et Sonenberg, 1997; Lamphear *et al.*, 1995; Le *et al.*, 1997; Metz et Browning, 1996; Tarun et Sachs, 1996; von der Haar *et al.*, 2004). Une fois associé à l'ARNm, le complexe eIF4F recrute la petite sous-unité ribosomale.

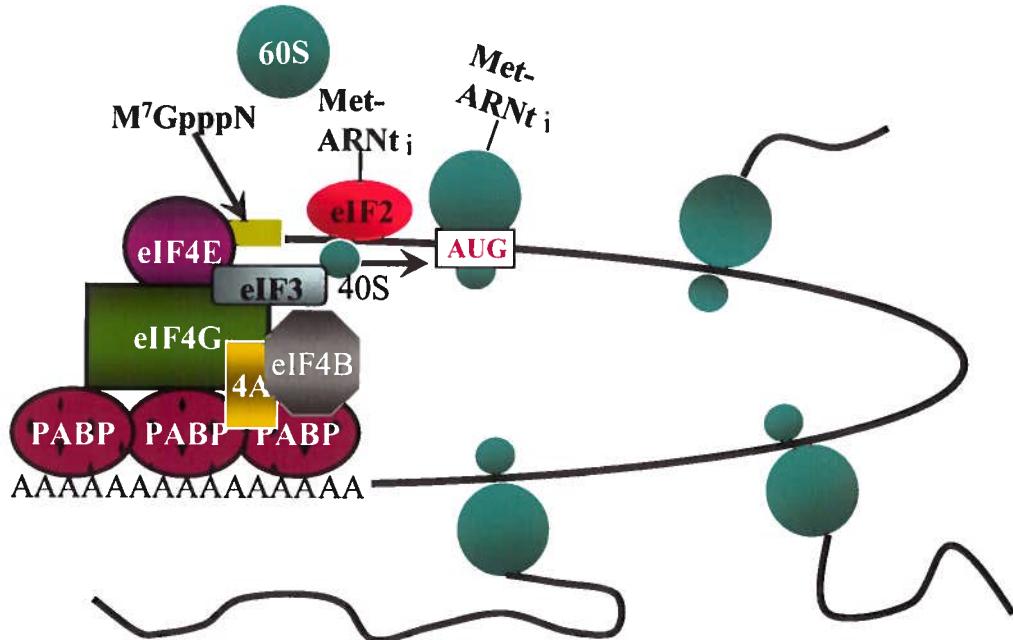


Figure 2 : Initiation de la traduction des ARNm selon le modèle circulaire

Les ARNm coiffés sont recrutés par le complexe eIF4F qui est composé de trois sous-unités, eIF4E, eIF4G et eIF4A. eIF4E est la protéine de liaison à la coiffe et lie la structure M⁷G à l'extrémité 5' des ARNm. eIF4A possède une activité hélicase pour dérouler les structures secondaires. eIF4G est la protéine plate-forme et interagit avec plusieurs facteurs d'initiation, tels la PABP, eIF3 et eIF4B (co-facteur de eIF4A). Dans ce modèle d'initiation de la synthèse protéique, la sous-unité ribosomale 40S, associée au complexe eIF2-Met-ARNt_i, balaie l'ARNm jusqu'au codon d'initiation qui se trouve dans un contexte favorable. À ce moment, la sous-unité 60S ribosomale s'y associe pour former le ribosome 80S fonctionnel (Robaglia et Caranta, 2006).

La traduction des ARNm se fait selon un modèle circulaire, c'est-à-dire que les deux extrémités de l'ARNm sont à proximité l'une de l'autre (Figure 2). Ainsi, eIF4G possède un site conservé de liaison à eIF4E. Une autre région de eIF4G, à proximité du domaine de liaison à eIF4E, interagit avec la PABP. Liée à l'extrémité 3' polyadénylée de l'ARNm, la PABP permet ainsi la circularisation de la molécule d'ARNm (Kessler et Sachs, 1998; Le *et al.*, 1997; Tarun et Sachs, 1996; Wells *et al.*, 1998). Il a été suggéré que l'habileté de PABP de s'associer avec eIF4G est un pré-requis pour la stimulation de la traduction de manière synergique (Kessler et Sachs, 1998; Le *et al.*, 1997). L'interaction coopérative eIF4E\|eIF4G\|PABP augmente l'affinité de eIF4E pour la coiffe de l'ARNm en diminuant son taux de dissociation (Borman *et al.*, 2000; Haghigat et Sonenberg, 1997; Luo et Goss, 2001; Mangus *et al.*, 2003; Ptushkina *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1998), en stimulant l'activité de liaison de la PABP à l'ARNm (Le *et al.*, 1997) et en augmentant les activités ARN hélicase et ATPase de eIF4A et eIF4B (Bi et Goss, 2000).

Pour s'associer au complexe d'initiation de la traduction, la petite sous-unité ribosomale 40S doit former le complexe 43S qui contient eIF1A, eIF1, eIF3, eIF5 et le complexe ternaire eIF2/GTP/Met-ARN_t_i (Reibarkh *et al.*, 2007). eIF3 promouvoit l'association du complexe 43S avec le complexe eIF4F lié en 5' de l'ARNm via eIF4G. Le complexe 48S ainsi formé débute alors le balayage de la séquence 5'NTR de l'ARNm. Dans le complexe 48S, le GTP lié à eIF2 est hydrolysé en GDP et phosphate inorganique (Pi) par eIF5, une protéine d'activation de GTPase (Algire *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2001; Passmore *et al.*, 2007; Paulin *et al.*, 2001; Reibarkh *et al.*, 2007). Lorsque l'anticodon Met-ARN_t_i s'aparie avec le codon de départ, le Pi résultant de l'hydrolyse de la GTP est relâché. eIF2 lié à la GDP est ensuite recyclé en eIF2/GTP par l'action du facteur d'échange de nucléotide guanine eIF2B.

L'appariement de l'anticodon du Met-ARN_t_i avec le codon AUG de départ, implique les facteurs eIF1, eIF1a et eIF4F (Cheung *et al.*, 2007). eIF1 et eIF1A sont de petites molécules qui lient de façon coopérative la sous-unité 40S avec haute affinité (Maag et Lorsch, 2003; Passmore *et al.*, 2007). Elles sont hautement conservées dans les eucaryotes et sont requises pour la formation d'un complexe de pré-initiation compétant.

Ces facteurs d'initiation de la traduction s'assurent de la fidélité de l'initiation de la traduction. En effet, elles déstabilisent les complexes ribosomaux des codons de départ hors-contexte ou non-apparentés (Pestova et Kolupaeva, 2002; Reibarkh *et al.*, 2007). Elles agissent également sur l'activité eIF5 afin de retarder l'activation de son activité GTPasique et le relâchement de Pi jusqu'à l'appariement de l'anticodon ARNt_i à l'AUG de départ (Algire *et al.*, 2005; Valasek *et al.*, 2004).

Finalement, les facteurs d'initiation de la traduction sont dissociés par l'action de eIF5B. Cette dernière protéine est aussi responsable de la formation du complexe d'initiation 80S où la large sous-unité ribosomale 60S joint la petite sous-unité ribosomale 40S sur le codon de départ de l'ARNm pour débuter l'étape suivante, l'elongation de la synthèse protéique. Suite à l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction et l'appariement du Met-ARNt_i avec le codon de départ, la traduction procède à l'elongation de la chaîne polypeptidique (Cooper et Hausman, 2007). Les aminoacyl ARNt sont escortés au ribosome par le facteur d'elongation 1α (eEF1α) complexé à la GTP. Le choix des aminoacyl ARNt à être incorporé dans la chaîne polypeptidique se fait par appariement de l'anticodon de l'ARNt et le codon de l'ARNm. De plus, la petite sous-unité ribosomale comprend un « centre de décodage », basé sur l'activité des ARNr plutôt que des protéines, qui reconnaît l'appariement adéquat codon-anticodon et distingue les disparités. L'insertion appropriée de l'ARNt aminoacyl dans le ribosome déclenche un changement conformationnel qui induit l'hydrolyse de la GTP liée à eEF1α. Cette action libère le facteur d'elongation ainsi que la GDP du complexe. Ensuite, la large sous-unité ribosomale forme un lien peptidique entre l'aminoacyl ARNt et le l'aminoacyl ARNt précédent. Cette réaction est catalysée par la peptidyl transférase, un ribozyme. Finalement, la GDP liée à eEF1α est convertie en GTP par le facteur d'elongation eEF1βγ.

L'elongation de la chaîne polypeptidique continue jusqu'à la rencontre du codon d'arrêt (UAA, UAG ou UGA). Ce signal est reconnu par le facteur de relâchement eRF1 qui reconnaît les trois codons d'arrêt puisqu'aucun anticodon d'ARNt n'est complémentaire à cette séquence (Cooper et Hausman, 2007). Le facteur eRF3 agit de

concert avec eRF1. L'hydrolyse du lien entre l'ARNt et la chaîne polypeptidique est stimulée par les facteurs de relâchement. Le polypeptide est alors dissocié du ribosome. La terminaison de la traduction provoque aussi la dissociation des sous-unités ribosomales de la matrice d'ARNm.

2.2 Structure de eIF4E

eIF4E est une protéine d'environ 24 kDa dont la structure tridimensionnelle, similaire dans tous les organismes étudiés, ressemble à un gant de baseball (Gingras *et al.*, 1999; von der Haar *et al.*, 2004) (Figure 3A-C). Le site de liaison à la coiffe se fait dans la cavité concave de la protéine. Deux résidus tryptophane (W) sont situés près des bordures supérieures et inférieures de la cavité. Lorsque l'analogue de la coiffe m⁷GDP est lié à eIF4E, la partie guanosine est emboîtée entre les deux tryptophanes et tient en place grâce à cette interaction (Figure 3B). Pour sa part, la charge positive du groupe méthyl contribue à la stabilisation du complexe par le contact avec un troisième tryptophane à l'intérieur de la poche. Directement en arrière de la cavité d'interaction avec la coiffe, sur la partie convexe dorsale de eIF4E, se trouve le site de liaison à eIF4G (Figure 3D). Un résidu tryptophane (Trp73) est aussi impliqué dans cette interaction (Gingras *et al.*, 1999; von der Haar *et al.*, 2004).

2.3 Contrôle de l'activité de eIF4E

eIF4E semble jouer un rôle actif dans le processus de régulation du taux de synthèse des protéines (Pause *et al.*, 1994). En effet, une surexpression de eIF4E mène à la transformation cellulaire. Ce phénomène est probablement dû à la traduction anarchique de plusieurs ARNm proto-oncogènes. Normalement, ces ARNm, caractérisés par la présence de structures secondaires importantes dans leur 5'NTR, sont faiblement traduits en présence d'une concentration normale de eIF4E (Koromilas *et al.*, 1992). Il est donc impératif que l'activité des facteurs d'initiation de traduction, incluant eIF4E, soit contrôlée selon les conditions de croissance de la cellule.

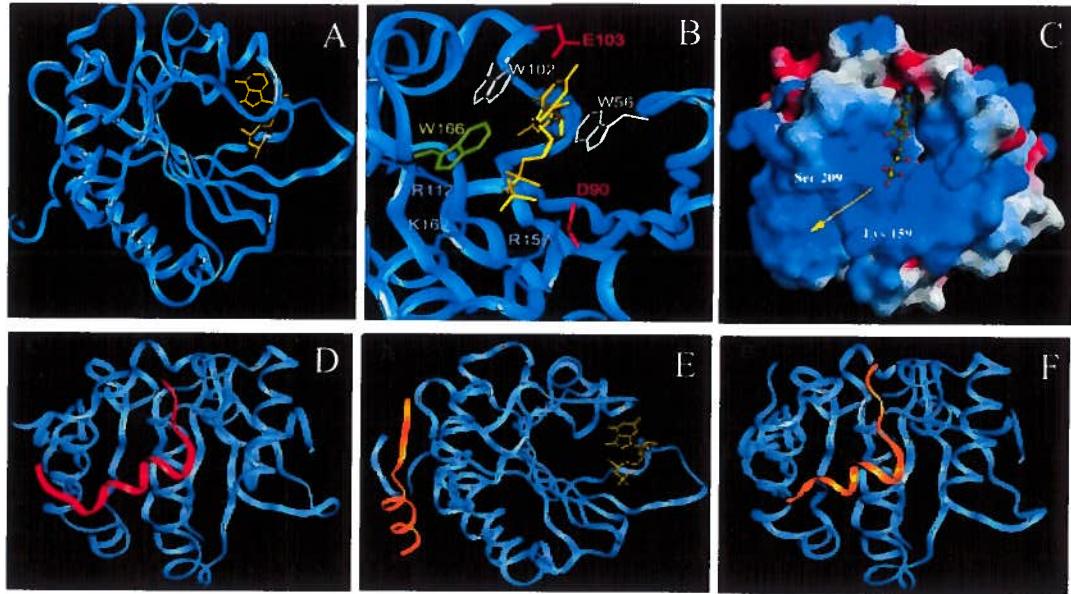


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de eIF4E

A) Diagramme de la structure de eIF4E de souris (bleu) lié à un analogue de coiffe (*jaune*) déterminée par cristallographie par rayons-X. B) Vue agrandie du site de liaison à la coiffe de eIF4E. Les acides aminés impliqués dans l’interaction sont indiqués. C) Le modèle de la surface de eIF4E. La surface de eIF4E est colorée selon le code des charges des résidus d’acide aminés (*bleu = basique; rouge = acide*). Le m^7GDP est lié dans une mince cavité entre les Trp56 et Trp102. Une trajectoire possible pour l’ARNm est indiquée par une flèche jaune. Dans ce modèle, l’ARNm passe vraisemblablement entre les Ser209 et Lys159; suite à la phosphorylation de Ser209, un pont ionique avec Lys159 peut être généré pour enserrer l’ARNm. D) Le peptide eIF4GII (*rouge*) adopte une conformation étendue en forme de L. E) Le peptide 4E-BP1 humain (*orange*) et l’analogue de coiffe m^7GDP (*vert*) liés aux régions opposées de eIF4E; F) le peptide 4E-BP1 adopte aussi une conformation étendue en forme de L quand il lie la surface dorsale de eIF4E (Tiré de Gingras et al., 1999).

Le niveau de phosphorylation de eIF4E dans les cellules animales corrèle fortement avec le taux de synthèse protéique. La phosphorylation de eIF4E est favorisée par des stimuli extracellulaires tels les hormones, les facteurs de croissance (Donaldson *et al.*, 1991) ou des mitogènes (Brown et Schreiber, 1996; Rhoads *et al.*, 1993). La phosphorylation de eIF4E a pour effet d'augmenter la traduction des ARNm. Au contraire, la déphosphorylation est stimulée par certaines infections virales (Feigenblum et Schneider, 1993; Kleijn *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994), un choc thermique sévère (Duncan et Hershey, 1989) ou la mitose (Bonneau et Sonenberg, 1987). Ces données sont en accord avec le patron de phosphorylation de eIF4E observé durant le cycle cellulaire : la phosphorylation de eIF4E est faible en phase de quiescence (G_0), augmente durant les phases de croissance (G_1) et de réplication de l'ADN (S) et diminue dramatiquement à la phase de ségrégation des chromosomes et de division cellulaire (M) (Gingras *et al.*, 1999).

Le site majeur de phosphorylation de eIF4E se situe dans sa région C-terminale, sur la sérine209 des eIF4E humains et de souris (Fig. 3C) (Gingras *et al.*, 1999). Ce résidu est situé sous la cavité de liaison à la coiffe sur la trajectoire possible de la chaîne d'ARNm. La phosphorylation de la Ser209 provoque potentiellement la formation d'un pont ionique entre le résidu lysine 159 et l'ARNm. Ce pont ionique accroît vraisemblablement la liaison de eIF4E aux ARNm coiffés.

Une autre façon de contrôler la disponibilité de eIF4E est par son association aux protéines de liaison à eIF4E, 4E-BP (Fig. 3E et F). Les 4E-BP (4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3) sont de petites protéines d'environ 12 kDa qui ne présentent pas de structure évidente en solution mais qui forment un repliement transitoire quand elles se trouvent près du site de liaison à eIF4E (von der Haar *et al.*, 2004). Ces protéines modulent l'association de eIF4E avec eIF4G (Lin *et al.*, 1994; Pause *et al.*, 1994) et inhibent la traduction coiffe-dépendante (Gingras *et al.*, 1999). La liaison de 4E-BP avec eIF4E se fait par une région autour du résidu tryptophane 73, qui est aussi requis pour la liaison à eIF4G (von der Haar *et al.*, 2004). La liaison de 4E-BP à eIF4E ne semble pas altérer

l'affinité de eIF4E à la coiffe mais empêche plutôt la formation du complexe eIF4F en compétitionnant pour le site de liaison à eIF4G.

Le contrôle de la liaison de 4E-BP à eIF4E se fait par la phosphorylation. L'association de eIF4E avec 4E-BP est possible lorsque cette dernière est hypophosphorylée. Par exemple, les stress environnementaux, nutritionnels et certains virus provoquent l'hypophosphorylation de 4E-BP, ce qui mène à une forte interaction avec eIF4E et donc à la dissociation de ce dernier du complexe eIF4F. D'un autre côté, des facteurs de croissance, des hormones ou encore des cytokines provoquent la phosphorylation de 4E-BP, ce qui abolie son interaction avec eIF4E et favorise la traduction coiffe-dépendante (Gingras *et al.*, 1999; Gingras *et al.*, 2001).

2.4 eIF4E et le noyau

De récentes études montrent que plusieurs composantes de la machinerie traductionnelle classique sont aussi retrouvées dans le noyau, incluant les sous-unités du complexe eIF4F. eIF4E endogène est présent dans des corps nucléaires en quantité substantielle (12 à 68% selon les études) de cellules animales (Iborra *et al.*, 2001; Lejbkowicz *et al.*, 1992), de levure (Lang *et al.*, 1994), de *Drosophila melanogaster* (Cohen *et al.*, 2001) et *Xenopus laevis* (Strudwick et Borden, 2002). Dix à vingt corps nucléaires, d'une taille entre 0.1 et 1 µm, ont ainsi été observés (Cohen *et al.*, 2001; Dostie *et al.*, 2000b; Lai et Borden, 2000; Lejbkowicz *et al.*, 1992).

L'importation nucléaire de eIF4E est un processus actif (Dostie *et al.*, 2000a). Son transporteur, 4E-T, utilise la voie de l'importine αβ pour transloquer eIF4E dans le noyau. Une fois dans le noyau, le facteur de traduction est distribué dans le nucléoplasme mais est principalement concentré dans des corps nucléaires (« speckles ») qui co-localisent avec des facteurs d'épissage des ARNm tels Sm et U1snRNP (Dostie *et al.*, 2000b). Tout comme il le fait dans le cytoplasme, eIF4E lie la coiffe des ARNm. Cependant, la rétention de eIF4E dans le noyau serait due à des interactions avec des protéines nucléaires. La localisation de eIF4E dans des corps nucléaires aurait un rôle dans le processus de maturation des ARNm, potentiellement dans la machinerie d'épissage.

Une autre fonction de eIF4E dans les corps nucléaires serait de contrôler l'expression de certaines protéines stimulatrices de croissance en régulant l'export nucléaire de certains ARNm. Au moins deux ARNm connus sont ainsi exportés dans le cytoplasme de façon eIF4E-dépendante : la cycline D1 et l'ornithine décarboxylase (ODC) (Culjkovic *et al.*, 2005). La quantité d'ARNm de la cycline D1 dans le cytoplasme est régulée par le transport nucléocytoplasmique impliquant eIF4E. La surexpression de eIF4E ne modifie pas la quantité totale de l'ARNm de la cycline D1 mais résulte plutôt en une diminution des ARNm nucléaires, une augmentation de la quantité des ARNm cytoplasmiques et conséquemment une augmentation du niveau de la protéine cycline D1. Ces observations montrent que le facteur d'initiation de la traduction fait une discrimination fonctionnelle entre les ARNm de la cycline D1 et de ODC par rapport aux autres ARNm cellulaires, tels ceux de la GAPDH ou de l'actine. Les corps d'inclusion de eIF4E auraient donc également la fonction de contrôler le transport nucléocytoplasmique d'ARNm spécifiques par un complexe de liaison à leur coiffe m⁷G.

2.5 eIF4E chez les végétaux

La plus grande différence entre le processus de traduction des plantes et des autres eucaryotes réside dans la structure et la fonction du complexe eIF4F. Les plantes supérieures possèdent une seconde forme de eIF4F, nommée eIF(iso)4F (Browning, 1996; Browning *et al.*, 1992). Ce deuxième isoforme est composé d'une petite sous-unité de liaison à la coiffe eIF(iso)4E et d'une grande sous-unité eIF(iso)4G (Bokros *et al.*, 1995; Hugdahl *et al.*, 1995). Les deux sous-unités de liaison à la coiffe, eIF4E et eIF(iso)4E, ont une similarité de 50% dans leur séquence d'acide aminés et leur masse moléculaire est autour de 24 kDa. La structure des deux isoformes de eIF4E est similaire à celle observée chez les autres eucaryotes et la position des résidus tryptophanes impliqués dans la liaison à la coiffe sont conservés. Cependant, eIF4G et eIF(iso)4G ont un plus grand écart. L'extrémité N-terminale de eIF4G est plus longue que celle de son isomère, ce qui fait en sorte que la masse moléculaire de eIF(iso)4G est d'environ 86 kDa

tandis que celle de eIF4G est de 180 kDa. Cette variation suggère que le rôle et/ou la régulation des deux complexes est probablement différent (Browning, 2004).

La fonction exacte de chaque isoforme n'a pas encore été élucidée. eIF(iso)4F semble avoir une plus forte affinité pour les coiffes hyperméthylées ($m^{2,7}\text{GpppG}$) et préférer les ARNm dont le 5'NTR est linéaire. D'un autre côté, eIF4F préfère les coiffe $m^7\text{G}$ et les ARNm dont le 5'NTR contient des boucles en épingle à cheveux (Carberry *et al.*, 1991; Carberry et Goss, 1991). Quoique l'expression de eIF4E et eIF(iso)4E soit détectée dans les graines, les racines, les feuilles, les sépales et les pétales de *Nicotiana tabacum* avec un ratio à peu près équimolaire, eIF4E est surexprimé par rapport à eIF(iso)4E dans les anthères et le pollen (Combe *et al.*, 2005). De plus, aucun effet phénotypique n'est observé suite à l'abolition (Duprat *et al.*, 2002) ou la diminution (Combe *et al.*, 2005) de l'expression de eIF(iso)4E. Par contre, l'expression de eIF4E est augmentée dans ces mutants jusqu'à 200% du type sauvage. Dans la situation inverse où l'expression de eIF4E est réduite, le phénotype est similaire au type sauvage quoique la croissance est légèrement ralentie. Cependant, l'expression de eIF(iso)4E n'est pas modifiée (Combe *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent que les complexes eIF4F et eIF(iso)4F ont une activité discriminatoire pour la reconnaissance des ARNm.

L'activité de eIF(iso)4E est vraisemblablement contrôlée par la phosphorylation, quoique la Ser209 de eIF4E animal soit remplacée par la Ser207 (Khan et Goss, 2004). Cependant, il n'est pas clair si les deux isoformes subissent la phosphorylation et quelles sont les conséquences exactes de cette modification. Des homologues de la 4E-BP ont été trouvés chez la drosophile et la levure mais aucune évidence de cette protéine n'a encore été détectée dans les végétaux.

2.6 Interaction entre eIF4E et les virus

Plusieurs virus à ARN positif, incluant les coronaviruses, les arterivirus, les flavivirus et les togavirus, ont une coiffe similaire à celle retrouvée chez les ARNm cellulaires. D'autres virus animaux (picornavirus et calicivirus) et végétaux (potyvirus,

comovirus, tombusvirus et luteovirus) ont développés des stratégies pour contourner l'utilisation de la coiffe afin de recruter les ribosomes (Daughenbaugh *et al.*, 2003). Les stratégies des calicivirus et des picornavirus sont détaillés dans cette section.

2.6.1 Les calicivirus

Selon la classification ICTV, la famille des *Caliciviridae* comprend quatre genres : *Vesivirus* (calicivirus félin, FCV), *Lagovirus* (virus de la maladie hémorragique du lapin, RHDV), *Norovirus* (virus de Norwalk et virus de Lordsdale, LDV) et *Sapovirus* (Sapporovirus). Les caliciviruses ont une grande variété d'hôtes et causent des maladies diverses. Les calicivirus humains (norovirus et sapovirus) sont responsables de la majorité des irruptions de gastro-entérite non-bactérienne provenant de la nourriture et de l'eau chez les adultes du monde entier (Goodfellow *et al.*, 2005). Chez les animaux, les calicivirus sont responsables d'un spectre plus large de symptômes et peuvent causer des maladies respiratoires, hémorragiques et vésiculaires.

La capsid des calicivirus est icosaédrique, non-enveloppée et d'apparence sphérique. Elle a un diamètre entre 27 et 40 nm et plusieurs souches ont 32 dépressions en forme de coupe (latin *calyx* = coupe). Le génome est constitué d'un seul brin positif d'ARN d'une longueur de 7-8 kb qui contient deux (Lagovirus et Sapovirus) ou trois (Norovirus et Vesivirus) cadres de lecture majeurs. L'extrémité 5' des ARN génomiques et sous-génomiques est liée à une protéine virale, la VPg (protéine virale liée au génome) d'environ 13 kDa. L'extrémité 3' est polyadénylée (Clarke et Lambden, 2000).

Les calicivirus utilisent vraisemblablement un mécanisme d'initiation de traduction qui implique l'attachement des facteurs d'initiation de traduction cellulaire à la protéine virale VPg (Daughenbaugh *et al.*, 2003; Goodfellow *et al.*, 2005). Il a été démontré que la VPg du FCV et du LDV interagit directement avec eIF4E (Goodfellow *et al.*, 2005). De plus, la liaison eIF4E-eIF4G semble essentielle pour la traduction du FCV. Ce mécanisme où la VPg agirait comme un substitut de la coiffe n'a été démontré dans aucun autre virus animal à ARN mais partagerait quelques similitudes avec les membres

des genres potyvirus et des nepovirus (Goodfellow *et al.*, 2005; Léonard *et al.*, 2002; Léonard *et al.*, 2000; Wittmann *et al.*, 1997). Tandis que tous les facteurs du complexe eIF4F sont nécessaires pour la traduction du FCV, seulement eIF4A semble avoir un rôle clé dans la traduction des ARNm du norovirus murin (MNV) (Chaudhry *et al.*, 2006). La VPg lie également directement un autre facteur de traduction, eIF3. Il a été proposé que l’interaction avec eIF3 participerait entre autre à l’inhibition de la synthèse des protéines cellulaires par sa séquestration dans les complexes de traduction viral (Daughenbaugh *et al.*, 2003).

2.6.2 Les picornavirus

La famille des *Picornaviridae* comprend plusieurs pathogènes humains et animaux importants. Selon la classification ICTV, elle contient neuf genres qui infectent les vertébrés : aphthovirus (foot-and-mouth disease virus, FMDV), cardiovirus (virus de l’encéphalomyocardite, EMCV), enterovirus (poliovirus, coxsackievirus), hepatovirus (virus de l’hépatite A, HAV), parechovirus (parechovirus humain), rhinovirus (rhinovirus humain A), erbovirus (Equine rhinitis B virus), Kobuvirus (Aichi virus, AiV) et Teschovirus (Porcine teschovirus 1, PTV). Quelques picornavirus infectent aussi les invertébrés (virus de la paralysie du cricket et virus de la drosophile C) mais n’ont pas été classifiés dans un genre (Knipe *et al.*, 2007).

La capsidé non-enveloppée des picornavirus est sphérique d’un diamètre d’environ 30 nm (Knipe *et al.*, 2007). Elle contient un ARN simple-brin de polarité positive d’une longueur d’environ 7,5 kb. Similairement aux potyvirus, cet ARN génomique n’est pas coiffé mais est lié de façon covalente à son extrémité 5’ à une petite VPg, nommé aussi 3B, qui est composée de seulement 22 résidus. L’extrémité 3’ de l’ARN est polyadénylée. Le génome viral n’a qu’un seul cadre de lecture et la polyprotéine est clivée co-traductionnellement par les protéinases virales 2A^{pro} et 3C^{pro}/3CD^{pro}. Onze à douze protéines matures sont ainsi obtenues et plusieurs précurseurs ont des fonctions définies.

Contrairement aux calicivirus, la VPg des picornavirus est utilisée seulement comme amorce pour la réPLICATION de l'ARN génomique (Golini *et al.*, 1980; Molla *et al.*, 1991; Nomoto *et al.*, 1977; Pettersson *et al.*, 1977; Villa-Komaroff *et al.*, 1975). Une stratégie différente est utilisée pour la traduction des ARN viraux. L'extrémité 5'NTR, longue et hautement structurée, contient un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) qui ne requiert pas de complexe eIF4F intact (Pelletier et Sonenberg, 1988). En fait, à l'exception du virus de l'hépatite A, les ARNm des picornavirus n'utilisent pas eIF4E. Dans ce mécanisme de traduction coiffe-indépendante, eIF4G lie directement l'IRES et y recrute la petite sous-unité ribosomale 40S via l'interaction avec eIF3 (Svitkin *et al.*, 2005).

L'infection par les picornavirus est accompagnée par une inhibition de la synthèse protéique cellulaire (Svitkin *et al.*, 2005). La protéase 2A^{pro} des entérovirus et des rhinovirus clivent les isoformes eIF4GI et eIF4GII. Cette action est réalisée par la protéase L^{pro} des aphtovirus (Etchison *et al.*, 1982; Svitkin *et al.*, 2005). Le fragment C-terminal de eIF4G supporte efficacement la traduction IRES-dépendante puisqu'il est le site de liaison à eIF4A et eIF3. Le site de liaison à eIF4E se trouvant dans la portion N-terminale, le complexe eIF4F est ainsi détruit. En plus d'inhiber la synthèse des protéines cellulaires, cette stratégie favorise la traduction des ARN viraux.

Le cardiovirus EMCV utilise un mécanisme différent d'inhibition de la traduction de l'hôte qui est moins rapide que pour les enterovirus et les aphtovirus (Jen *et al.*, 1980). Dans ce cas, le patron de phosphorylation de 4E-BP1 est modifié suite à une infection au EMCV. La protéine 2A, qui n'est pas une protéase chez les cardiovirus, favorise la déphosphorylation de 4E-BP1 (Gingras *et al.*, 1996). L'hypophosphorylation de 4E-BP1 mène à son association avec eIF4E et à une diminution de la traduction des ARNm cellulaires coiffe-dépendante. Puisque la synthèse de la polyprotéine virale est coiffe-indépendante, sa traduction est alors favorisée.

3. La protéine de liaison à la queue de poly(A) (PABP)

La PABP est une protéine abondante majoritairement cytoplasmique qui est trouvée dans tous les eucaryotes examinés (Bernstein *et al.*, 1989). Les PABP sont impliquées dans plusieurs voies menant à la synthèse protéique incluant la biogénèse des ARNm, la régulation du roulement (« turnover ») des ARNm, l'initiation et la terminaison de la synthèse des protéines (Kuhn et Wahle, 2004). Les PABP recouvrent entièrement l'extrémité 3' polyadénylée des ARNm. Une molécule de PABP est liée à tous les 25 résidus d'adénosine même si 12 nucléotides sont suffisants pour l'attachement (Baer et Kornberg, 1980; Baer et Kornberg, 1983; Sachs *et al.*, 1986).

Deux types de PABP ont été décrits en détail. La PABP cytoplasmique (PABPC) a été découverte en 1973 (Kuhn et Wahle, 2004). Elle est présente dans tous les eucaryotes et joue un rôle important dans au moins deux processus : la traduction et la dégradation des ARNm. La PABP nucléaire (PABPN) est aussi ubiquitaire mais sa présence dans les levures et les plantes n'est pas certaine. La PABP nucléaire a une fonction dans la polyadénylation des pré-ARNm.

3.1 Structure de la PABP

Les PABP cytoplasmiques (PABPC) typiques ont une masse moléculaire d'environ 70 kDa. Les analyses de séquences révèlent que les PABPC ont une structure primaire similaire, comprenant quatre motifs de reconnaissance d'ARN (RRM) localisés dans la région N-terminale, connectés à un domaine conservé C-terminal nommé PABC ou CTC (Mangus *et al.*, 2003) (Figure 4A).

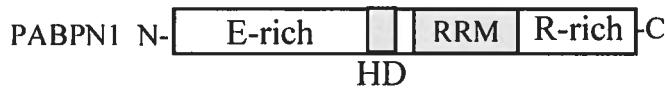
D'une longueur de 90 à 100 acides aminés chacun, les RRM sont connectés entre eux par de courtes séquences de liaison (Kessler et Sachs, 1998). Ces motifs sont très conservés à travers les espèces et sont composés chacun de quatre feuillets-β anti-parallèles sous deux hélices-α (Figure 4B) (Kuhn et Wahle, 2004). Les RRM sont requis pour la liaison coopérative des molécules de PABP aux résidus de la queue polyadénylée.

Le contact protéine-ARN implique des interactions électrostatiques avec les phosphates, des liens hydrogènes avec les riboses et une interaction d'emboîtement entre sept bases d'adénine et la chaîne peptidique. Il a été montré que les deux premiers RRM de la PABP ont l'affinité la plus élevée pour les séquences de poly(A) et sont les contributeurs majoritaires dans l'activité de liaison (Burd *et al.*, 1991; Nagy et Maquat, 1998). De plus, la surface d'interaction de PABPC avec eIF4G a été située sur le RRM2 et est conservée chez les plantes (Le *et al.*, 1997), Xenopus (Cao et Richter, 2002; Fraser *et al.*, 1999; Wakiyama *et al.*, 2000) et les humains (Imataka *et al.*, 1998; Piron *et al.*, 1998).

Le domaine CTC est une région indépendante d'environ 75 acides aminés qui est reliée aux domaines RRM par un lien riche en proline et en glutamine (Figure 4A). Le CTC consiste en quatre ou cinq hélices- α et orchestre les interactions avec les protéines qui contiennent le « motif d'interaction à la PABP », incluant la Paip1, Paip2 et eRF3 (Kuhn et Pieler, 1996). Ce domaine serait aussi le site d'interaction avec des facteurs de régulation impliqués dans la déadenylation (Mangus *et al.*, 2003). La séquence de liaison entre le CTC et les RRM est pour sa part impliquée dans l'activité d'homodimérisation de la PABP, via son interaction avec les RRM3 et 4 (Kuhn et Pieler, 1996). Cette dimérisation organise la PABP en des espacements réguliers sur le substrat de poly(A).

La structure de la PABP nucléaire (PABPN) n'a pas été aussi bien décrite que son homologue cytoplasmiques. Typiquement, la PABP nucléaire a une extrémité N-terminale acide riche en glutamate suivie par une trentaine d'acide aminés formant une hélice- α en aval d'un seul RRM et d'un domaine carboxy-terminal riche en arginine (Figure 4A). Le RRM n'a que de petites similitudes de séquences avec les RRM des PABPC connus. La reconnaissance de l'ARN et la stimulation de la poly(A) polymérase requièrent la participation du RRM et du domaine C-terminal riche en arginine (Kuhn et Wahle, 2004; Mangus *et al.*, 2003; Wahle et Ruegsegger, 1999).

A



B

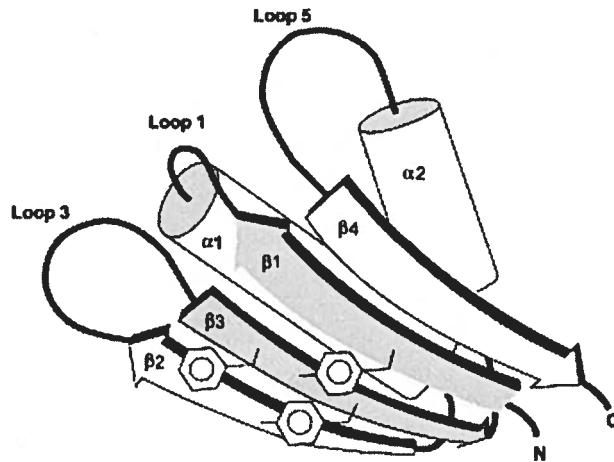


Figure 4 : Structure des protéines de liaison aux poly(A).

A) Les membres de la famille des PABPC contiennent quatre domaines RRM. La plupart ont aussi un domaine conservé C-terminal (CTC) contenant cinq hélices- α . PABPN1 contient un seul domaine RRM. Le domaine C-terminal est riche en arginine (R) et un domaine en hélice (HD) sépare l'extrémité amine riche en glutamate (E) du RRM. B) Le repliement d'un RRM. L'ARN est lié sur la surface des feuillets- β par les résidus aromatiques. (Tiré de Kuhn et Wahle, 2004)

3.2 PABP cytoplasmique

Tandis que la levure ne semble contenir qu'un seul gène pour la PABP cytoplasmique (*pab1*), la plupart des eucaryotes supérieurs en contiennent plusieurs (Kuhn et Wahle, 2004). Chez l'humain, neuf séquences ont été reliées aux PABP en comparaison avec la PABPC1. Cette dernière est une PABP cytoplasmique classique exprimée dans la plupart des cellules. PABP3 et 4 ont aussi une organisation typique des PABPC mais ne sont pas ubiquitaires. PABPC3 est une protéine spécifique aux testicules et est encodée par un gène sans intron tandis que PABPC4 est exprimée pendant l'activation des cellules T. Par contre, PABPC5 est encodée par le chromosome X et contient les RRM mais pas de CTC. PABPCP 1 à 4 sont des pseudogènes. Finalement C20 ou f119 sont des cadres de lecture qui ont une similarité de séquence avec PABPC1 mais qui sont peu caractérisés.

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient huit gènes encodant des PABP cytoplasmiques qui sont tous exprimés. Tandis que toutes les formes de PABP contiennent les quatre domaines typiques de liaison à l'ARN, deux n'ont pas le domaine C-terminal conservé, soit PABP1 et 6 (Belostotsky, 2003; Kuhn et Wahle, 2004). Les huit gènes sont groupés dans quatre classes, basés sur l'analyse phylogénétique et leur expression. La classe I inclue PABP3 et PABP5 qui sont trouvées principalement dans les tissus reproductifs; PABP5 est exprimée principalement dans le pollen et l'ovule durant le développement précoce de l'embryon (Belostotsky et Meagher, 1996). Il a été proposé que ces deux produits de gènes soient des facteurs de régulation durant la gamétogenèse et/ou le développement précoce. La classe II est composée de PABP2, PABP4 et PABP8; ces gènes sont ubiquitaires et fortement exprimés (Belostotsky, 2003; Hilson *et al.*, 1993; Palanivelu *et al.*, 2000). La classe III inclue les gènes codant pour PABP6 et PABP7. Ces protéines ont une expression faible et restreinte. La classe IV contient seulement PABP1 qui est exprimée faiblement dans les racines (Belostotsky, 2003; Belostotsky et Meagher, 1993). Bien que les PABP de *A. thaliana* semblent être cytoplasmiques, (Mangus *et al.*, 2003) il est possible que quelques-unes soient transportées du cytoplasme au noyau (Chekanova et Belostotsky, 2003).

Même si la PABP et la queue de poly(A) ne sont pas des éléments obligatoires pour la traduction des ARNm, elles semblent occuper une place importante dans la stimulation de la synthèse protéique. Comme décrit dans la section 2.1 sur la traduction, la PABP interagit avec eIF4G et permet ainsi une proximité entre les extrémités 5' et 3' de l'ARNm. Outre la stabilisation et le synergisme du complexe ARNm/eIF4F/PABP, cette circularisation de l'ARNm aurait un rôle dans la dernière étape de la traduction : le recyclage des ribosomes. La proximité physique des extrémités de l'ARNm faciliterait la ré-initiation des ribosomes (Uchida *et al.*, 2002). Ce mécanisme se ferait de concert avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF3 (nommé aussi GSPT, facteur GTP-dépendant de relâche de la polyprotéine du ribosome) et eRF1. Dans ce modèle, eRF3 fait un lien entre eRF1 et eIF4G via son association avec PABP (Figure 5). Ce pont protéique résulterait en la proximité du codon d'arrêt et de la coiffe en contournant l'extrémité 3'NTR par la formation d'une boucle.

De plus, il est suggéré que la PABPC favorise l'association de la grande sous-unité ribosomale 60S à l'extrémité 5'NTR de l'ARNm (Kuhn et Wahle, 2004). Dans la levure, la PABP aurait une action stimulatrice sur les facteurs de traduction eIF5 et eIF5B qui sont requis pour le recrutement de la sous-unité 60S au codon de départ (Searfoss *et al.*, 2001).

Puisque la dégradation des ARNm débute par la déadénylation, la présence de PABPC sur la queue polyadénylée et la formation d'un complexe circulaire d'initiation de traduction des ARNm serait une façon de vérifier de l'intégrité des ARNm avant d'initier la traduction (Gallie, 1998). La nécessité de la participation de la PABP comme un pré-requis pour l'initiation de la traduction préviendrait le recrutement d'ARNm dont l'intégrité est compromise par la réaction exo- ou endoribonucléolytique des régions 5' et 3'. Cette étape limiterait donc la production de protéines tronquées inactives. Dans le même ordre d'idées, la PABPC serait vraisemblablement impliquée dans le roulement (« turnover ») des ARNm. En premier lieu, la PABPC protégerait la queue polyadénylée des ARNm des nucléases cellulaires (Korner et Wahle, 1997). Dans la levure, la déadénylation est catalysée par la CCR4 déadénylase (Yao *et al.*, 2007). Son action

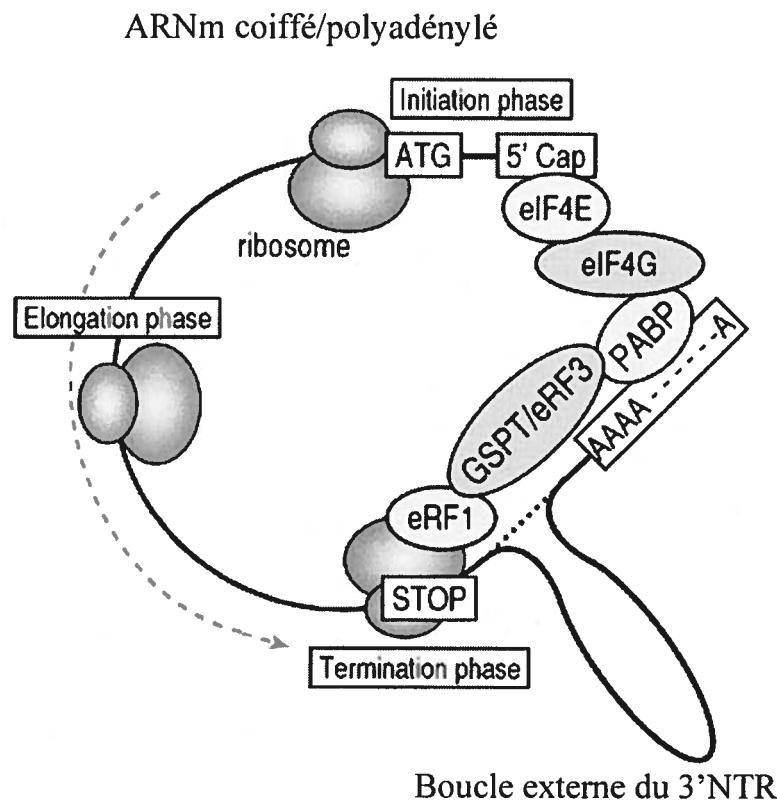


Figure 5 : Rôles possibles de GSPT/eRF3 dans le système de traduction eucaryote

Le complexe eRF1-GSPT/eRF3-PABP-eIF4F permettrait la formation d'un pont protéique entre le codon d'arrêt (« stop »), la queue de poly(A) et la coiffe (« cap ») des ARNm. Ainsi, la région 3'NTR localisée entre le codon d'arrêt et la queue de poly(A) peut être contournée et le ribosome peut continuer à la structure coiffée à l'extrémité 5' sans la formation du complexe 80S *de novo* (Tiré de Uchida *et al.*, 2002).

semble être en partie contrôlée par la vitesse de retrait des PABP de la queue polyadénylée. Ce processus hautement régulé de roulement des ARNm est nécessaire pour répondre rapidement aux conditions de croissance cellulaire et semble impliquer la participation de la PABP (Kuhn et Wahle, 2004).

3.3 *PABP nucléaire*

Le rôle majeur de la PABP nucléaire (PABPN) est dans la polyadénylation des pré-ARNm cellulaires. La polyadénylation de l'extrémité 3' des pré-ARNm est conduite par la poly(A) polymérase (PAP). Cependant, son activité et son affinité pour l'ARN est faible. La PAP nécessite l'aide du facteur de spécificité de clivage et de polyadénylation (CPSF). Ce facteur reconnaît le signal de polyadénylation, AAUAAA, et stimule l'activité de la PAP en lui fournissant de la spécificité pour l'ARN. Le rôle de la PABPN est de stimuler l'extension et de contrôler la longueur de la queue polyadénylée. Dans les cellules de mammifères, PABPN lie la queue naissante de onze à quatorze résidus adénylate synthétisée par la PAP. Alors, le CPSF et la PABPN semblent attacher la PAP à l'ARN, ce qui a pour conséquence d'augmenter la « processivité » de la polyadénylation, c'est-à-dire de catalyser la réaction à haute vitesse et en continue (Bienroth *et al.*, 1993; Kuhn et Wahle, 2004; Mangus *et al.*, 2003; Wahle, 1991; Wahle, 1995). Les monomères de PABPN continuent de lier les résidus adénosines disponibles jusqu'à l'obtention de la pleine longueur de la queue de poly(A) d'environ 250 nucléotides. Alors, la PAP revient à son mode « distributif », c'est-à-dire que l'enzyme tombe après la synthèse de quelques nucléotides (Keller *et al.*, 2000).

La PABPN1 possède un signal de localisation nucléaire dans son domaine C-terminal et utilise probablement le récepteur d'importation transportine (Hector *et al.*, 2002; Kuhn et Wahle, 2004). Il a été suggéré que ce facteur de traduction agisse comme une protéine navette. Par contre, il n'est toujours pas clair laquelle des PABP, cytoplasmique ou nucléaire, a la fonction du transport nucléocytoplasmatique des ARNm. Le mécanisme d'export nucléaire des ARNm et la fonction de la PABP dans ce processus n'est pas encore élucidé.

Un rôle possible de Pab1 dans le noyau de levure est controversé. Mais récemment, une nouvelle protéine, Nab2p, a été trouvée dans le noyau des levures et lie la queue de poly(A). Nab2p est considérée comme le régulateur principal de la longueur de la queue polyadénylée (Hector *et al.*, 2002; Kuhn *et Wahle*, 2004). Nab2p est une protéine navette qui a une localisation nucléaire et se lie étroitement aux poly(A). Liée à l'extrémité 3' polyadénylée des ARNm, Nab2p interagit avec certaines protéines d'export nucléaire (Allen *et al.*, 2001; Hammell *et al.*, 2002; Uetz *et al.*, 2000) et faciliterait l'export des ARNm. Cependant, Nab2p n'est pas l'homologue fonctionnel de PABPN puisqu'elle ne semble pas avoir un effet de stimulation sur la polyadénylation.

3.4 Contrôle de l'activité de PABP

Dans les cellules de mammifères, l'activité de PABPC est régulée par deux « protéines d'interaction avec PABP », Paip1 et Paip2. Paip1 est une protéine de 479 acides aminés qui présente plusieurs homologies avec le domaine central de eIF4G (acides aminés 420 à 890 chez l'humain). Ce segment de eIF4G contient un site de liaison à eIF4A et stimule la traduction (Roy *et al.*, 2002). Paip1 interagit aussi avec le CTC de la PABPC et avec les RRM 1 et 2 avec une stœchiométrie de 1 : 1. D'autre part, Paip2 est une protéine de 127 acides aminés qui inhibe la traduction en bloquant la liaison entre la PABPC et la queue de poly(A). Paip2 interagit avec les RRM 2 et 3 ainsi qu'avec le CTC de PABPC avec une stœchiométrie de 2 : 1. Cependant, seulement le domaine d'interaction avec la région RRM inhibe l'association de la PABPC avec la poly(A). Paip1 et Paip2 compétitionnent pour la liaison avec PABPC (Khaleghpour *et al.*, 2001).

La fonction de la PABPC peut aussi être régulée indirectement par des changements dans la longueur de la queue de poly(A) des ARNm (Kuhn et Wahle, 2004). En conséquence, le nombre de molécules de PABPC lié à l'ARNm est diminué. De longues queues de poly(A) mènent à une traduction plus efficace que les courtes extrémités polyadénylées.

3.5 Interaction entre PABP et les virus

Le lien entre les extrémités 5' et 3' est non-seulement essentiel pour les ARNm cellulaires mais semble l'être aussi pour les virus à ARN. À l'exception des flavivirus et de certains virus de plantes (tombusvirus, closterovirus et luteovirus), la plupart des virus à ARN positifs possèdent une queue polyadénylée. Cette séquence de poly(A) est non seulement utilisée dans la traduction mais également lors de la réPLICATION. Par ailleurs, elle est aussi une cible qui mène à l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires. Deux stratégies différentes sont décrites dans cette section : les picornavirus et les rotavirus.

3.5.1 Les picornavirus

L'extrémité polyadénylée des picornavirus occupe des fonctions primordiales dans l'amplification de la traduction et de la réPLICATION des ARN viraux. Il a été suggéré que l'interaction IRES-eIF4G-PABP-poly(A) stabilise l'association de eIF4G avec l'ARN (Svitkin *et al.*, 2001). Cependant, cette stimulation de la traduction par la queue de poly(A) est abrogée sévèrement suite au clivage de eIF4G par la 2A^{PRO}. En effet, le site de liaison à la PABP se situe sur la portion N-terminale de eIF4G et seule la portion C-terminale est utilisée pour la traduction IRES-dépendante (Michel *et al.*, 2001). La PABP serait donc nécessaire seulement dans la traduction précoce des ARN viraux.

PABP et l'extrémité polyadénylée de l'ARN viral sont essentiels pour l'initiation de la synthèse du brin négatif par 3D^{pol} (Herold et Andino, 2001). D'ailleurs, il y a un lien étroit entre la longueur de la queue de poly(A) à l'extrémité 3', la réPLICATION et l'infectivité de poliovirus (Silvestri *et al.*, 2006). À l'autre extrémité, la région 5' non-traduite des picornavirus contient une courte région en aval de l'IRES, l'ARN en feuille de trèfle (cloverleaf RNA), aussi impliquée dans la réPLICATION de l'ARN. Cette structure tréflée forme un complexe ternaire ribonucléoprotéique (RNP) avec deux protéines : le précurseur 3CD^{PRO} et la protéine de liaison aux poly(rC) (PCBP) (Barton *et al.*, 2001; Herold et Andino, 2001). PCBP est une protéine de l'hôte qui contrôle la stabilité et l'expression de plusieurs ARNm cellulaires. Elle interagit avec d'autres protéines de

liaison à l'ARN, incluant la PABP. Il est suggéré que l'association PCBP-PABP favorise la traduction tandis que l'association 3CD^{pro}-PABP promouvoit la synthèse du brin négatif de l'ARN viral. La portion C-terminale de la PABP est le site présumé d'interaction avec PCBP et 3CD^{pro}.

PABP est aussi la cible des protéases 2A^{pro} et 3C^{pro}, du moins pour le poliovirus. Ce clivage contribue à l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires. Puisque la PABP est nécessaire dans la réPLICATION de son ARN, le clivage du facteur de traduction n'apparaît que tardivement dans le cycle de réPLICATION des picornavirus (Herold et Andino, 2001).

3.5.2 Les rotavirus

Les rotavirus appartiennent à la famille des *Reoviridae* (Respiratory enteric orphan virus). Selon la classification ICTV, la famille des *Reoviridae* contient présentement douze genres qui peuvent infecter toute sorte d'organismes, des mammifères aux plantes : Orthoreovirus (mammifères, oiseaux et reptiles; *Mammalian orthoreovirus*), Aquareovirus (poissons et mollusques; *Aquareovirus A*), Cypovirus (insectes; *Cypovirus1*), Fijivirus (plantes et insectes; *Fiji disease virus*), Rotavirus (mammifères et oiseaux; *Rotavirus A*), Orbivirus (mammifères, oiseaux et arthropodes; *Bluetongue virus*), Coltivirus (mammifères et arthropodes; *Colorado tick fever virus*), Phytoreovirus (plantes et insectes; *Rice dwarf virus*), Seadornavirus (mammifères et insectes; *Kadipiro virus*), Idnoreovirus (Insectes; *Hypsotera exiguae reovirus*) et Oryzavirus (Plantes et plus particulièrement le riz; *Rice ragged stunt virus*). Les rotavirus comprennent sept groupes distincts (A à G) qui sont la cause majeure de diarrhée chez les enfants à travers le monde (Knipe *et al.*, 2007).

Les particules virales matures des rotavirus sont icosaédriques, non-enveloppées et ont un diamètre autour de 70 nm. Elles possèdent une capsidé à trois couches icosaédriques composée de la couche externe, la couche intermédiaire et le cœur interne (core). La surface externe est prolongée de 60 spicules, ce qui lui donne l'aspect d'une

roue (Latin, *rota* = roue). Le cœur des particules virales contient onze segments d'ARN double-brin ainsi que les enzymes nécessaires pour la synthèse d'ARNm coiffés, incluant la transcriptase (RdRp). Les membres de la famille des *Reoviridae* ont la caractéristique particulière de ne pas se décapsider entièrement durant le processus de réPLICATION. Dans le cas des rotavirus, la transcription a lieu dans des particules à double couches (Knipe *et al.*, 2007).

L'ARN polymérase virale synthétise les ARNm à partir des brins négatifs des ARN double-brin. Ces ARNm viraux servent à la fois pour la synthèse des protéines et pour la réPLICATION de son génome. Les ARNm des rotavirus sont coiffés mais non-polyadénylés (Patton et Spencer, 2000). À la place de la queue polyadénylée, ils possèdent la séquence consensus UGACC à leur extrémité 3'NTR qui est conservée sur tous les segments du génome viral (Montero *et al.*, 2006). La protéine non-structurale 3 (NSP3) présente plusieurs similarités avec la PABP et lie spécifiquement cette séquence consensus par son extrémité amino-terminale (Piron *et al.*, 1998; Vende *et al.*, 2000). Le domaine carboxy-terminal de NSP3 possède un site d'interaction à eIF4G, le même utilisé pour la liaison à la PABP. Il était alors largement accepté que le complexe coiffe/eIF4F/NSP3/3'NTR permette la circularisation de l'ARNm viral pendant la traduction (Bushell et Sarnow, 2002; Montero *et al.*, 2006; Schneider et Mohr, 2003). De plus, il a été proposé que l'interaction NSP3/eIF4G aurait pour conséquence d'évincer la PABP de eIF4G et de déranger la traduction des ARNm polyadénylés cellulaires (Vende *et al.*, 2000). Il a d'ailleurs été montré que NSP3 réduit la traduction *in vitro* d'ARNm polyadénylés par sa liaison à eIF4G mais augmente la traduction d'un gène rapporteur portant la séquence consensus dans son 3'NTR.

Récemment, il a cependant été montré que NSP3 n'est pas requise pour la traduction des ARNm viraux (Montero *et al.*, 2006). En fait, l'inhibition de l'expression de la protéine virale par un siARN (small interfering RNA) spécifique à NSP3 dans des cellules infectées avec un rotavirus (Rhesus rotavirus, RRV) ne diminue pas la traduction virale. Cependant, l'absence de NSP3 favorise la synthèse de l'ARN viral et la formation de virions. Ceci suggère que la liaison de NSP3 au 3'NTR et à eIF4G est le résultat de

deux fonctions indépendantes de NSP3. Il est donc proposé que l'association de la protéine virale à la séquence 3'NTR soit nécessaire pour protéger l'extrémité 3'NTR de la dégradation ou encore conserver une population d'ARNm viraux disponible à la traduction. D'un autre côté, NSP3 séquestrerait eIF4G en l'empêchant de lier PABP. Cette action aurait pour conséquence de diminuer considérablement la traduction des ARNm cellulaires polyadénylés.

4. Hypothèse et objectifs de travail

Actuellement, une multitude de fonctions différentes sont attribuées à VPg et ses précurseurs mais le rôle spécifique de chacun est vague. De plus, l'importance de leur interaction avec eIF4E et PABP n'est pas bien comprise chez les potyvirus. Par exemple, la VPg seule est suffisante pour lier eIF(iso)4E. Il est suggéré que cette interaction soit impliquée dans la traduction. Cependant, les précurseurs de VPg semblent aussi interagir avec le facteur de traduction et la signification de ces associations reste à déterminer. L'interaction entre VPg-Pro et PABP était encore méconnue au début de mon projet de doctorat. À l'époque, il était suggéré que PABP ait un rôle dans la réPLICATION étant donné son interaction avec la RdRp. Par ailleurs, il n'est pas clair si les facteurs d'initiation de la traduction sont nécessaires pour la traduction, la réPLICATION ou encore la transmission des virions.

Notre hypothèse est que la VPg et ses précurseurs soient un point d'ancrage pour la formation de complexes multiprotéiques traductionnels et réPLICATIFS. Pour prouver cette hypothèse, nos études se sont tournées vers les différences d'interactions des précurseurs VPg-Pro et 6K-VPg-Pro par rapport aux deux facteurs de traduction eIF(iso)4E et PABP2. Ainsi, nos objectifs sont de préciser le site d'interaction des facteurs de traduction eIF(iso)4E et PABP2 avec chacun des précurseurs de la VPg. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes méthodes *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons d'abord déterminé la distribution des protéines à l'étude dans des feuilles de *Brassica perviridis* infectées au TuMV. Des feuilles de plantes saines ont été utilisées comme témoin. Les fractions cellulaires soluble, membranaire et nucléaire ont donc été séparées et la présence de eIF(iso)4E, PABP2 et des précurseurs de VPg a été analysée dans chacune des fractions.

Nous avons aussi exprimé séPARÉMENT de façon transitoire dans *Nicotiana benthamiana* chacune des protéines fusionnées à une molécule fluorescente (GFP ou

DsRed) pour vérifier leur localisation cellulaire. De plus, nous avons vérifié l'influence de 6K-VPg-Pro et de VPg-Pro sur la localisation cellulaire de eIF(iso)4E et PABP2. Pour déterminer le site d'interaction entre 6K-VPg-Pro ou VPg-Pro et eIF(iso)4E, le système de la fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC) a été utilisé. Ainsi, la portion N-terminale de la GFP est fusionnée à eIF(iso)4E et la portion C-terminale de la GFP est fusionnée à 6K-VPg-Pro ou VPg-Pro. Pour déterminer si PABP2 co-localise avec les sites d'interactions 6K-VPg-Pro/eIF(iso)4E et VPg-Pro/eIF(iso)4E, nous avons co-exprimé le système de BiFC avec PABP-mCherry. L'interaction entre les facteurs de traduction et les précurseurs de VPg ont aussi été confirmé *in vitro* par la méthode de l'ELISA.

Finalement, les membranes du réticulum endoplasmique qui contiennent les complexes de réPLICATION ont été analysées dans des feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV. Nous avons vérifié si PABP2 est localisée dans le même type membranaire que 6K-VPg-Pro dans des plantes infectées par des expériences de flottaison de membrane et de gradient de saccharose. La présence du complexe de réPLICATION, représenté par la RdRp, a aussi été considérée. De plus, l'association *in planta* de la PABP2 au complexe de réPLICATION/traduction formé par 6K-VPg-Pro/VPg-Pro a été examinée par la copurification de la VPg par chromatographie. Enfin, la nature de l'association de PABP2 avec les membranes du réticulum endoplasmique a été inspectée par des traitements au sel et pH alcalin.

CHAPITRE 2

PUBLICATIONS

Publication no.1

Visualisation of the interaction between the precursors of the viral protein linked to the genome (VPg) of Turnip mosaic virus and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta

Journal of Virology
Janvier 2007, p. 775-782

Running title: Sub-cellular site for VPg interaction with eIF(iso)4E

Chantal Beauchemin, Nathalie Boutet and Jean-François Laliberté*

* Corresponding author

Jean-François Laliberté

Institut Armand-Frappier

Institut national de la recherche scientifique

531 boulevard des Prairies

Laval, Québec

Canada H7V 1B7

1-450-687-5010 ext 4445 (office)

1-450-686-5501 (fax)

jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca

Contexte

Ma première publication est une suite des travaux de Simon Léonard et de Catherine Viel (Léonard *et al.*, 2004), deux anciens étudiants de doctorat et maîtrise de notre laboratoire. Leurs résultats montrent entre autre que eIF(iso)4E se trouve dans les mêmes membranes que 6K-VPg-Pro dans des feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV. Ces membranes sont associées au réticulum endoplasmique. Le facteur de traduction est aussi co-purifié avec 6K-VPg-Pro/VPg-Pro par chromatographie d'affinité par chélation de métaux. Ces résultats suggèrent que eIF(iso)4E fait partie du complexe de réPLICATION du TuMV (voir l'annexe II : contribution supplémentaire).

Puisque les membranes du réticulum endoplasmique contiennent les deux formes précurseur de VPg, 6K-VPg-Pro et VPg-Pro, ces résultats nous ont amenés à mieux définir le rôle de chacun des précurseurs. Plusieurs expériences ont été tentées pour caractériser les complexes de réPLICATION, incluant entre autre la spectrométrie de masse. Cependant, la plus prometteuse a été la localisation cellulaire des protéines VPg-Pro, 6K-VPg-Pro et eIF(iso)4E. La microscopie confocale s'est avérée un outil indispensable dans ce projet. Nous avons aussi tiré profit d'un nouveau système d'observation par microscopie confocale de sites d'interaction protéine-protéine : la fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC) (Bracha-Drori *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004). Cette méthode à l'avantage de visualiser la localisation de l'interaction *in planta*.

Afin de mener à terme cette publication, j'ai réalisé la majorité des expériences, à l'exception du clonage de pGreen/GFP et pGreen/eIF(iso)4E-GFP fournis par Nathalie Boutet.

Résumé

Le génome d'ARN du virus de la mosaïque du navet est lié de façon covalente à son extrémité 5' à la protéine virale nommée VPg. Cette protéine lie le facteur eucaryote d'initiation de traduction iso 4E [eIF(iso)4E]. Il a été montré que cette interaction est importante pour l'infection virale, même si les fonctions biologiques exactes ne sont pas élucidées. Dans cette étude, nous avons examiné le site cellulaire d'interaction entre VPg et eIF(iso)4E en utilisant la fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC). En premier lieu, eIF(iso)4E, 6K-VPg-Pro et VPg-Pro ont été exprimés en fusion avec la protéine de fluorescence verte (GFP) complète dans *Nicotiana benthamiana* et leur localisation cellulaire a été visualisée par microscopie confocale. eIF(iso)4E est associée principalement avec le réticulum endoplasmique (RE), VPg-Pro a été observée dans le noyau et possiblement dans le nucléole tandis que 6K-VPg-Pro-GFP induit la formation de vésicules cytoplasmiques qui bourgeonnent du RE. Lors de l'expérience en BiFC, la fluorescence verte reconstituée a été observée dans le noyau, avec une accumulation préférentielle dans des structures nucléaires, quand les portions de la GFP ont été fusionnées à VPg-Pro et eIF(iso)4E. D'un autre côté, l'interaction de 6K-VPg-Pro avec eIF(iso)4E est observée dans des vésicules cytoplasmiques enchâssées dans le réticulum endoplasmique. Ces données suggèrent que l'association de VPg avec le facteur de traduction doit être nécessaire pour deux fonctions différentes, dépendamment du précurseur de la VPg impliquée dans l'interaction. L'interaction de VPg-Pro avec eIF(iso)4E peut être impliquée dans la perturbation des fonctions cellulaires normales tandis que l'interaction avec 6K-VPg-Pro peut être nécessaire pour la traduction de l'ARN viral et/ou sa réPLICATION.

Summary

The RNA genome of *Turnip mosaic virus* is covalently linked at its 5' end to a viral protein known as VPg. This protein binds to the translation eukaryotic initiation factor iso 4E [eIF(iso)4E]. This interaction has been shown to be important for virus infection although its exact biological function(s) has not been elucidated. In this study, we investigated the sub-cellular site of the VPg-eIF(iso)4E interaction using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). As a first step, eIF(iso)4E, 6K-VPg-Pro and VPg-Pro were expressed as full-length green fluorescent protein (GFP) fusions in *Nicotiana benthamiana* and their sub-cellular localisation was visualised by confocal microscopy. eIF(iso)4E was predominantly associated with the endoplasmic reticulum (ER), VPg-Pro was observed in the nucleus and possibly the nucleolus while 6K-VPg-Pro-GFP induced the formation of cytoplasmic vesicles budding from the ER. In BiFC experiments, reconstituted green fluorescence was observed throughout the nucleus with a preferential accumulation in sub-nuclear structures when the GFP split fragments were fused to VPg-Pro and eIF(iso)4E. On the other hand, the interaction of 6K-VPg-Pro with eIF(iso)4E was observed in cytoplasmic vesicles embedded in the ER. These data suggest that the association of VPg with the translation factor might be needed for two different functions, depending of the VPg precursor involved in the interaction. VPg-Pro interaction with eIF(iso)4E may be involved in perturbing normal cellular functions, while 6K-VPg-Pro interaction with the translation factor may be needed for viral RNA translation and/or replication.

Introduction

One of the initial steps in protein synthesis is the recruitment of mRNAs by the translation eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) complex (Gingras *et al.*, 1999). In plants, this complex is composed of two proteins, eIF4E and eIF4G (Browning, 1996). eIF4E is the cap-binding protein while eIF4G is a large polypeptide containing binding sites for eIF4E, eIF4A, eIF3 and the polyA binding protein (PABP). eIF4F simultaneously interacts with the cap structure of mRNA (through eIF4E) and the ribosome-associated eIF3 (through eIF4G). Thus, eIF4F executes the pivotal function of bridging mRNAs with ribosomes. Another cap-binding complex, eIF(iso)4F, has been identified in plants (Browning *et al.*, 1992) and is composed of a smaller eIF(iso)4E subunit and a larger eIF(iso)4G subunit relative to eIF4F subunits. Those two complexes perform essentially the same task in translation, but have different affinities for certain classes of mRNA substrates and may be involved in different cellular events (Gallie *et al.*, 2001).

Potyviruses have a positive-strand RNA genome of approximately 10 kb (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). The genome codes for a single long polyprotein that is processed by viral proteinases into ten mature proteins. The viral RNA is polyadenylated at its 3' end and has a covalently linked virus-encoded protein (VPg) instead of a cap structure at the 5' end. Being derived from a polyprotein, VPg exists under various forms (i.e. VPg, VPg-Pro, 6K-VPg-Pro) that fulfil specific functions. For instance, VPg-Pro is one of the three proteinases responsible for maturation of the polyprotein (Carrington *et al.*, 1993). 6K-containing forms (e.g. 6K-VPg-Pro) induce the formation of cytoplasmic vesicles necessary for replication complex formation (Schaad *et al.*, 1997a). VPg is uridylated by the virus RNA dependent RNA polymerase (RdRP), which may then act as a primer for negative-strand RNA synthesis (Puustinen et al., 2004). VPg and its precursor forms thus play a central role in the viral replication cycle. Another function has recently emerged. A yeast two-hybrid screen has shown that eIF(iso)4E of *Arabidopsis thaliana* interacts with the VPg of *Turnip mosaic virus* (TuMV) (Wittmann

et al., 1997). This interaction (Léonard *et al.*, 2000) has also been reported to take place in infected cells (Léonard *et al.*, 2004). Similar interactions are taking place between the VPg of other potyviruses and either eIF(iso)4E or eIF4E (Grzela *et al.*, 2006; Schaad *et al.*, 2000). The cap analogue m7GDP and VPg bound to eIF4E or eIF(iso)4E at two distinct sites, although binding of one ligand to the translation factor reduced its affinity for the other ligand (Léonard *et al.*, 2000; Michon *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2006). This suggests that the potyviral VPg interferes with the formation of a translational initiation complex on cellular mRNAs by sequestering the translation factor. A similar interaction with eIF(iso)4E has also been shown for the proteinase of the nepovirus *Tomato ringspot virus* (Léonard *et al.*, 2002). The interaction of a VPg and eIF4E is not limited to plant viruses: direct interaction of murine, feline and human calicivirus VPgs with eIF4E was recently demonstrated (Goodfellow *et al.*, 2005). Several lines of evidence suggest that eIF4E and/or eIF(iso)4E play an important role in potyvirus replication. First, knock-out *A. thaliana* plants for *eIF(iso)4E* were phenotypically indistinguishable from wild type plants but were resistant to several potyviruses (Lellis *et al.*, 2002). In lettuce, *mol¹* and *mol²* are recessive resistance genes toward common isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) and code for different alleles of eIF4E (Nicaise *et al.*, 2003). It was also shown that resistance to potyviruses attributed to the alleles at the *pvr2* locus in *Capsicum annuum* (Ruffel *et al.*, 2002) and *pot-1* locus in *Lycopersicon esculentum* (Ruffel *et al.*, 2005) resulted from mutations in eIF4E. Complementing those experiments was the demonstration that the virulence determinant toward these recessive resistances was VPg (Moury *et al.*, 2004) and failure of eIF4E alleles to bind VPg correlated with resistance in most cases (Kang *et al.*, 2005). Although, these experiments clearly indicate that the interaction between potyvirus VPg and either eIF4E or eIF(iso)4E is important for virus infection, the aim or consequence of the interaction has not yet been deciphered. Involvement in viral RNA translation is likely, but the interaction might also result in perturbation of some host functions, or even be required for cell-to-cell trafficking (Gao *et al.*, 2004).

Although the interaction domain has been mapped to the VPg, it is not known if precursor forms of VPg are capable of interacting with the factor in plants, and in what

sub-cellular compartment the interaction is taking place. To further investigate the cellular localisation of this interaction, eIF(iso)4E along with 6K-VPg-Pro and VPg-Pro were expressed as GFP fusions in *Nicotiana benthamiana* and their localisation was visualised by confocal microscopy. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments showed that the interaction of eIF(iso)4E with VPg-Pro took place in the nucleus, while the interaction with 6K-VPg-Pro in cytoplasmic vesicles. The sub-cellular interaction sites may then reflect the role of the interaction in the virus replication cycle.

Materials and Methods

Plasmid constructions.

Plasmids for co-localisation were constructed as follows: EGFP and DsRed2 (Clontech) genes were amplified by PCR with primers EGFP-F/EGFP-R and DsR-F/DsR-R (Table I) respectively. Amplified fragments were inserted into the BamHI/EcoRI sites located in the multiple cloning site downstream of the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter in the pGreen 0029 vector (Hellens *et al.*, 2000), resulting in plasmids pGreenGFP and pGreenDsRed, respectively. The cDNA for eIF(iso)4E was obtained from an *A. thaliana* mRNA extract with eIF(iso)4E-F and eIF(iso)4E-R primers (Table I) and inserted into the XbaI/BamHI site of the same vector. The resulting plasmids were identified as pGreen/eIF(iso)4E-GFP. 6K-VPg-Pro and VPg-Pro were amplified with 6KF/Pro-R and VPg-F/Pro-R primers (Table I) respectively from pET/6K2-Nla Quebec isolate of TuMV, which has been modified at the junction of 6K2 and VPg and at the active site of Pro to prevent Pro-mediated proteolysis (Laliberté *et al.*, 1992). 6K-VPg-Pro and VPg-Pro cDNA fragments were inserted into HindIII/BamHI sites of pGreenDsRed (for VPg-Pro only) and pGreenGFP vectors. The resulting plasmids were identified as pGreen/6K-VPg-Pro-GFP and pGreen/VPg-Pro-GFP and pGreen/VPg-Pro-DsRed. Plasmids for complementation were obtained as follows: ntGFP and ctGFP were amplified from pBin-mGFP5-ER plasmid by NT-F/NT-R and CT-F/CT-R primers (Table I) respectively and inserted into BamHI/EcoRI sites of pGreen0029. pGreen/ntGFP-eIF(iso)4E was obtained by amplification of eIF(iso)4E from pGreen/eIF(iso)4E-GFP plasmid with NTEIF(iso)4E-F and NTEIF(iso)4E-R primers (Table I) and inserted into the EcoRI site in pGreen/ntGFP. pGreen/VPg-Pro-ctGFP was obtained by transferring the HindIII/BamHI VPg-Pro fragment from pGreen/VPg-ProGFP into the corresponding sites of pGreen/ctGFP. pGreen/K2-VPg-Pro-ctGFP was derived from pGreen/6K-VPg-Pro-GFP in a similar manner.

Table 1: Primers for vector construction

Name	Sequence 5' → 3'	Comments
EGFP-F	TCTAGAGGATCCCCATGGTGAGCAAGGGCGAG	5' EGFP + BamHI + NcoI
EGFP-R	<u>GAATT</u> CAGCTCCCCCTGTACAGCTCGTCCAT	3' EGFP + EcoRI
DsRed-F	TCTAGAGGATCCCCATGCCCTCCGAGAAC	5' DsRed + BamHI
DsRed-R	TAATTAAAG <u>G</u> AA <u>T</u> TTACAGGAACAGGTGGTGGCGGCCA	3' DsRed + EcoRI
eIF(iso)4E-F	GCTT <u>T</u> CTAGAGGATCGAGTAATTAGCTCACT	5' eIF(iso)4E + XbaI
eIF(iso)4E-R	TCACC <u>A</u> TGGGG <u>G</u> ATCCGACAGTGAACCGGTTCT	3' eIF(iso)4E + BamHI
6K-F	ATGGAGGCAG <u>T</u> A <u>A</u> G <u>C</u> TTATGAGCACCAACGAA	5' 6K-VPg-Pro + HindIII
Pro-R	AGGCCATGGGG <u>A</u> T <u>C</u> CTTGCGTAGACTGCCGT	3' 6K-VPg-Pro + BamHI
VPg-F	TCTGAACCG <u>T</u> A <u>A</u> G <u>C</u> TTATGGCAAAAGGCAAGA	5' VPg-Pro + HindIII
NT-F	CTATCATT <u>A</u> CC <u>G</u> AT <u>C</u> CAAATGAGTAAGGAGAA	5' NTGFP + BamHI
NT-R	TT <u>C</u> AGCGTACCG <u>G</u> AA <u>T</u> CT <u>C</u> TTGCTTGCGCCATGAT	3' NTGFP + EcoRI
CT-F	ATTTGGAGAGGACAG <u>CCC</u> GG <u>G</u> AT <u>C</u> CAAGAACGGCATCAAAGCC	5' CTGFP + BamHI
CT-R	TTTCAGCGTACCG <u>G</u> AA <u>T</u> CT <u>C</u> TTGTATAGTTCATCCAT	3' CTGFP + EcoRI
NTeIF(iso)4E-F	AACTCAACT <u>G</u> CG <u>G</u> AA <u>T</u> C <u>T</u> ATGGCGACCGAT	5' eIF(iso)4E + EcoRI
NTeIF(iso)4E-R	GTGATT <u>T</u> CAGCG <u>G</u> AA <u>T</u> CT <u>C</u> AGACAGTGAACCGGCT	3' eIF(iso)4E + EcoRI

Protein expression in plants.

Vectors containing genes for fluorescent and fusion proteins were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 by electroporation. Transformed cells were selected on kanamycin-ampicillin plates. Cultures of the bacterium containing both plasmids were prepared overnight, culture media was removed and cells were resuspended in water supplemented with 10 mM MgCl₂ and 150 µM acetosyringone. The resulting preparation was used to agroinfiltrate leaves from three-week old *N. benthamiana* plants, along with *Agrobacterium* containing plasmids allowing the expression of suppressors of silencing P19 or HcPro prepared the same way. Plants were then kept for four days in a growth chamber before observation.

Confocal microscopy.

Sections from agroinfiltrated leaves were cut out and placed in immersion oil on a microscope coverslide. The coverslide was then inverted over a microscope slide presenting a depression above which was placed the leaf section. Individual cells were observed using a 40X oil immersion objective on a Radiance 2000 confocal microscope from BioRad. Fluorescent proteins were excited using an Argon-Krypton laser. The data for green and red channels were collected simultaneously. Images were collected using a CCD camera and treated using Adobe Photoshop or Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) software.

Cellular fractionation.

Sub-cellular fractionation from plants was carried out according to Davis et Abe (1995). *Brassica perviridis* plants (three-leaf stage) were infected with TuMV or mock-inoculated with PBS. At 12 days post-inoculation, leaves that developed next to the inoculated leaves were harvested. Leaf tissue (0.5 g) was minced in 5 volumes (2.5 ml) of buffer A (200 mM Tris/HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂). Nuclei, chloroplasts, cell wall, and debris were removed by centrifugation at 3 700 x g at 4°C for 10 min. The supernatant (S3) was centrifuged at 27 000 x g at 4°C for 10 min, resulting in soluble (S30) and crude membrane (P30) fractions. The pellet containing membranes was resuspended in the same volume as the supernatant in buffer A with 40 mM octyl-B-D-

Glucopyranoside (Bioshop). Twenty μ L of total, soluble and membrane fractions were collected, diluted 1:5 in protein dissociation buffer and subjected to immunoblot analysis following SDS-PAGE. Immunoreactions were detected using the ECL-based secondary-antibody system (Amersham).

Nuclei isolation.

Nuclei isolation from plants was carried out according to (Gaudino et Pikaard, 1997). *Brassica perviridis* plants (three-leaf stage) were infected with TuMV or mock-inoculated with PBS. At 12 days post-inoculation, leaves that developed next to the inoculated leaves were harvested. Leaf tissue (5 g) was cut in pieces with a blade and minced in 3 volumes (15 mL) of nuclei isolation buffer (NIB) (50 mM Tris/HCl pH 7.2, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 M sucrose, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.2 mM PMSF). The homogenate was filtered through nylon membranes (160 μ m and 41 μ m) and subjected to centrifugation at 14 000 \times g for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in 1 volume (5 mL) of NIB and homogenised. Seven mL of nuclei in Percoll 5% was layered on to a step gradient of Percoll with 5 mL layers of 15%, 30%, 45% and 60% and subjected to centrifugation at 530 \times g for 10 min and at 8 500 \times g for 20 min at 4°C. Nuclei accumulated between the 60%/45% Percoll layers and 30%/45% Percoll layers. Nuclei were diluted in 5 volumes NIB, mixed gently by inversion and subjected to centrifugation at 1 500 \times g for 10 min. Nuclei were gently resuspended in 25 volumes of NIB and centrifuged again. Nuclei were resuspended in 100 μ L of storage buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.3 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 5 μ M β -mercaptoethanol). Proteins from S14 and nuclei preparation were diluted 1:5 in loading SDS-buffer, separated by SDS-PAGE and detected by immunoblot analysis using the ECL-based secondary-antibody system (Amersham).

Results and Discussion

Distribution of VPg precursors and eIF4E isomers among soluble and membrane-enriched fractions in TuMV infected cells

Brassica perviridis plants were infected with TuMV or mock-inoculated and leaves that developed next to the inoculated ones were harvested 12 days post-infection (dpi). Leaves were homogenised and nuclei, chloroplasts, cell wall and debris were removed by centrifugation at 3 700 x g. Soluble proteins were then separated from membrane-associated proteins by centrifugation at 27 000 x g. To allow a quantitative evaluation of the distribution of the proteins among the two fractions, the pellet containing the membrane-associated proteins was re-suspended in the same volume as that of the supernatant. Total, soluble and membrane-associated proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis using a rabbit serum raised against a recombinant form of eIF(iso)4E from *A. thaliana*. This antibody also cross-reacts with eIF4E (Léonard *et al.*, 2004). eIF4E and eIF(iso)4E of *A. thaliana* have a calculated size of 26.5 and 22.5 kDa, respectively (Nicaise *et al.*, 2003). Although the exact size for the *B. perviridis* isomers is not known, it is expected to be very similar, since both plants belong to the same family. Figure 1A shows that in the total protein fraction of mock-inoculated plants, only eIF(iso)4E was detected, while both eIF4E and eIF(iso)4E were observed in TuMV-infected leaves, although the eIF(iso)4E signal was stronger than the eIF4E one. The anti-eIF(iso)4E serum recognised with equal intensity the recombinant forms of the two isomers (Léonard *et al.*, 2004), suggesting that the signal intensity reflected the amount of the proteins in infected cells. After cellular fractionation, eIF(iso)4E was predominantly found in the membrane-enriched fraction for both mock- and TuMV-infected leaves. In contrast, eIF4E was generally found in the soluble fraction. Because eIF4E isomers are associated with ribosomal complexes (Hiremath *et al.*, 1989), the results of the sub-cellular fractionation experiment suggests that eIF(iso)4E is mainly associated with the rough endoplasmic reticulum, and that eIF4E is associated with free ribosomes in TuMV-infected cells. eIF4F functionally differs from eIF(iso)4F in promoting internal initiation, cap-independent translation and translation of structured

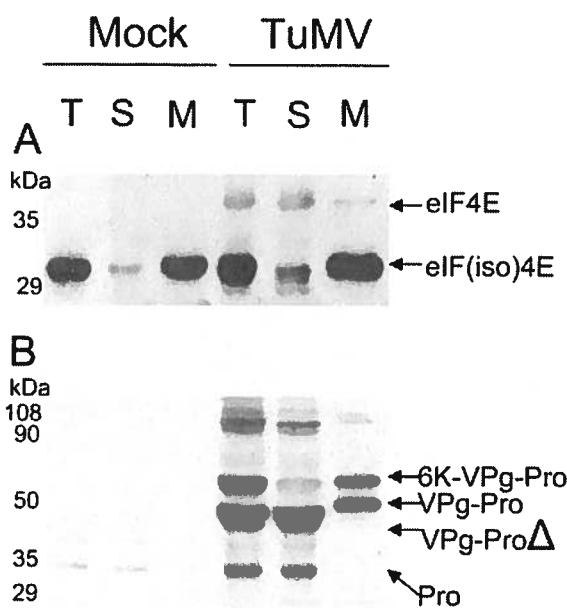


Figure 1 : Immunoblot analysis of soluble and membrane-associated proteins from healthy or TuMV-infected plants.

B. perviridis plants were mock inoculated or infected with TuMV. Twelve days later, total proteins (T) were extracted and soluble proteins (S) were separated from membrane-associated proteins (M) by centrifugation at 27,000 x g. Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using a rabbit serum against eIF(iso)4E (A) or VPgPro (B). The text on the right shows the electrophoretic migration positions of the indicated proteins.

mRNAs (Gallie et Browning, 2001); this differential activity may be reflected in their uneven distribution to free or membrane-bound ribosomes.

The sub-cellular fractions were also analysed using a rabbit serum raised against the TuMV VPg-Pro (Fig 1B). Bands corresponding to the 6K-VPg-Pro, VPg-Pro, the C-terminal deleted form of VPg-Pro, and Pro were detected in the total protein fraction of infected leaves. In addition, several bands of approximately 100 kDa were detected. The exact nature of these bands is not known; they may correspond to large polyprotein precursors or to dimeric forms of 6K-VPg-Pro, VPg-Pro and Pro. No polypeptide corresponding to the mature VPg was detected. A fraction of VPg-Pro, the C-terminal deleted form of VPg-Pro, and Pro were detected in the soluble fraction. On the other hand, 6K-VPg-Pro and the remaining population of VPg-Pro were found in the membrane fraction. The association of 6K-VPg-Pro with membranes is explained by the presence of the 6K domain, which contains a stretch of hydrophobic amino acids. This protein was previously shown to be an integral membrane protein (Schaad *et al.*, 1997). The presence of a substantial quantity of VPg-Pro in the membrane associated fraction is likely the result of its interaction with 6K-VPg-Pro (Kang *et al.*, 2004).

Cellular localisation of GFP fusions of eIF(iso)4E, VPg-Pro and 6K-VPg-Pro

To further refine their cellular localisation, eIF(iso)4E, VPg-Pro and 6K-VPg-Pro were fused to the green fluorescent protein (GFP). In order to prevent proteolysis by Pro at the 6K-VPg and VPg-Pro junctions, the glutamic acid residue preceding the cleavage bond was modified to histidine. These modifications were shown to prevent processing at the cleavage sites (Laliberté *et al.*, 1992). Transient expression of VPg precursors was performed by agroinfiltration in *N. benthamiana*, which is a host for TuMV. HCPro or P19 were used as suppressors of gene silencing; no difference in VPg-Pro expression or localisation (see below) was noticed with either suppressor. Expression of the GFP fusions was assessed by immunoblot analyses using a rabbit serum raised against VPg-Pro. In each case, a signal corresponding to the expected molecular mass of the analysed protein was observed, indicating that no degradation or Pro-mediated processing of the proteins had taken place (Fig. 2).

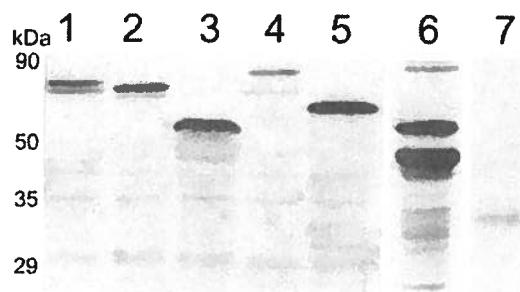


Figure 2 : Expression of GFP fusions in *N. benthamiana*.

Leaves were infiltrated with *A. tumefaciens*; 4 days later, total proteins were extracted, separated by SDS-PAGE, and analyzed by Western blotting using a rabbit serum against VPgPro. *A. tumefaciens* suspensions contained binary Ti plasmids encoding VPg-Pro-GFP (lane 1), VPg-Pro-DsRed2 (lane 2), VPg-Pro-ctGFP (lane 3), 6K-VPg-Pro-GFP (lane 4), 6K-VPg-Pro-ctGFP (lane 5), and GFP (lane 7). Proteins from TuMVinfected *B. perviridis* were loaded in lane 6.

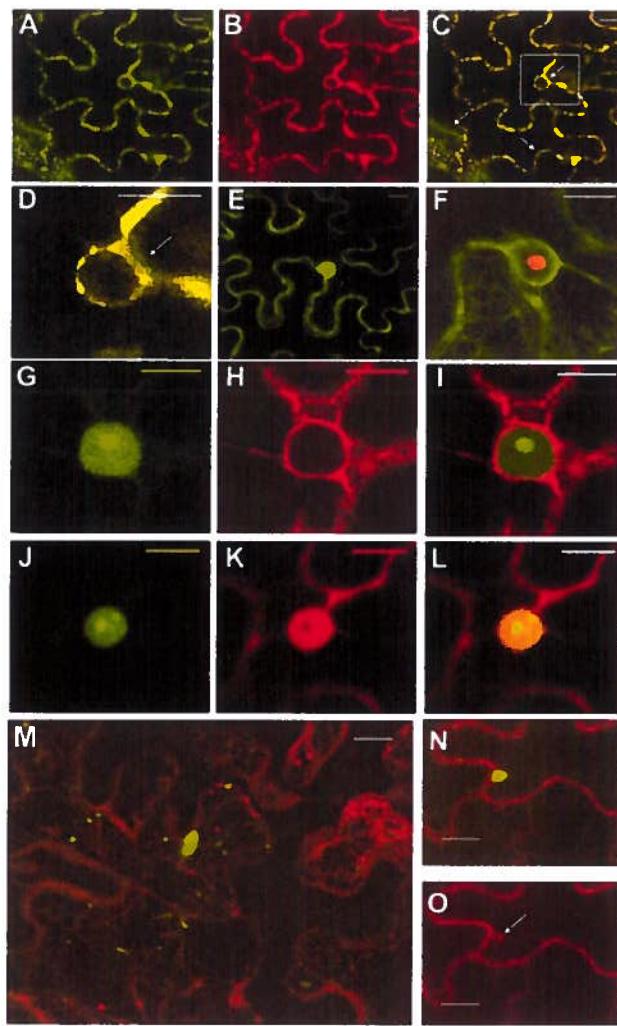


Figure 3 : Subcellular localizations of eIF(iso)4E and VPg precursors.

N. benthamiana leaves were infiltrated with *A. tumefaciens*, and expression of fluorescent proteins was visualized by confocal microscopy 4 days later. *A. tumefaciens* suspensions contained binary Ti plasmids encoding eIF(iso)4E-GFP and ER-DsRed2 (A to D), GFP (E), VPg-Pro-DsRed2 and GFP-ER (F), VPg-Pro-GFP and ER-DsRed2 (G to I), VPg-Pro-GFP and DsRed2 (J to L), and 6K-VPg-Pro-GFP and ER-DsRed2 (M to O). Panel M is a “maximum-intensity Z projection” of 50 1- μm slices stacked on top of each other. Panels A, E, G, and J show fluorescence emitted by the green channel only; panels B, H, K, and O show fluorescence emitted by the red channel only. Panel D is a close-up view of the rectangle depicted in panel C. The arrow in panel O shows an outgrowth of ER. Bar, 15 μm .

GFP fluorescence was visualised between two and four days post-infiltration by confocal microscopy. No notable differences in cellular localisation was observed during this time period. Fluorescence was generally observed in 30 to 50% of the cells in the infiltrated area. To facilitate the identification of membrane structures, the red fluorescent protein containing ER targeting and retention signals (ER-DsRed2) (Zhang *et al.*, 2005) was co-expressed along with the GFP fusions. In the case of ER-DsRed2, red fluorescence was not detected before three days post-infiltration. In order to ascertain that the green fluorescence that was observed was not emitted by the DsRed2 protein, control experiments were conducted with the GFP fusions only. In every case, the pattern of green fluorescence was similar, whether ER-DsRed2 was co-expressed or not.

Fluorescence associated with eIF(iso)4E-GFP was concentrated around the nucleus or in the cytoplasm (Fig. 3A). A similar distribution was observed with the fluorescence emitted by ER-DsRed2 (Fig. 3B). Merging of the fluorescence observed for eIF(iso)4E-GFP and ER-DsRed2 showed that most of eIF(iso)4E was associated with the ER, although some green emission was observed in the merged fluorescence (Fig. 3C and D). A similar pattern was observed when eIF(iso)4E was fused to DsRed2 and co-expressed with GFP targeted to the ER (data not shown). Fluorescence associated with free GFP was distributed throughout the cytoplasm and the nucleus, to the exclusion of the nucleolus (Fig. 3E). This indicates that localisation of eIF(iso)4E-GFP to the ER was due to the translation factor, and not the fluorescent protein. This result is in accordance with the cellular fractionation data, in which eIF(iso)4E was detected mostly in the membrane-enriched fraction.

Although some fluorescence was observed in the cytoplasm, VPg-Pro-GFP was observed principally in the nucleus (Fig. 3G), which was made evident by the accumulation of ER-DsRed2 in the perinuclear ER membranes (Fig. 3H and I). The same distribution with VPg-Pro-DsRed2 was observed (Fig. 3F), indicating that nuclear accumulation was not dependent on the fluorescent protein. Nuclear localisation is not unexpected, as it was shown to be the case for the VPg-Pro of at least two other potyviruses (Schaad *et al.*, 1996). Nuclear distribution is possibly the consequence of an

active process, since a putative nuclear localisation signal similar to the one identified with the VPg-Pro of tobacco etch virus (Restrepo *et al.*, 1990) was found within the TuMV protein (data not shown). VPg-Pro not only localised to the nucleus, it accumulated preferentially to a sub-nuclear structure, possibly the nucleolus. To confirm that VPg-Pro is effectively distributed in the nucleolus, VPg-Pro-GFP was expressed (Fig. 3J) along with the soluble form of DsRed2 (Fig. 3K). Red fluorescence was distributed in the cytoplasm and the nucleoplasm, to the exclusion of the nucleolus. The presence of free DsRed2 (and free GFP) in the nucleus has been documented previously and is the result of passive diffusion through the nucleus pore (Goodin *et al.*, 2002). Fluorescence observed from VPg-Pro-GFP co-localised with that of DsRed in the nucleus, except for a brighter area exactly where no red fluorescence was observed (Fig. 3L). Similar data was obtained with the co-expression of VPg-Pro-DsRed2 with GFP (data not shown). VPg-Pro-DsRed2 was also co-expressed with fibrillarin1 from *A. thaliana* fused to GFP, which is a nucleolar protein (Barneche *et al.*, 2000). Green and red fluorescence were found to colocalise (data not shown). These experiments then indicate that the TuMV VPg-Pro accumulated in the nucleus and preferentially in the nucleolus when synthesised independently of other viral proteins. Nucleolar localisation was also noticed for the TEV homologue (Schaad *et al.*, 1996).

The fluorescence emitted by 6K-VPg-Pro-GFP was associated with cytoplasmic vesicles distributed throughout the cortical ER membrane system (Fig. 3M) and very often were also associated with the perinuclear ER (not shown). On average, there were one to three vesicles of 10 µm in diameter per cell, although several smaller fluorescing structures were also observed. These vesicles were clearly seen budding from ER membranes (Fig. 3N and O). This ER association of 6K-VPg-Pro agrees with our previous observation using sucrose gradient fractionation of plant cell extracts (Léonard *et al.*, 2004). The membranous vesicles are reminiscent of those induced by the TEV 6K protein (Schaad *et al.*, 1997a). In the case of TEV, it was suggested that these vesicles correspond to the replication complexes.

Nuclear localisation of the interaction of VPg-Pro with eIF(iso)4E

BiFC (Bracha-Drori *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004) was used to determine the sub-cellular localisation of the interaction between VPg precursors and eIF(iso)4E. In this assay the GFP is split into two nonoverlapping fragments, ntGFP and ctGFP. The ntGFP fragment is fused to the N-terminal end of one binding protein, while the ctGFP fragment is fused to the C-terminal end of the corresponding partner. Reconstitution of a fluorescing GFP chromophore takes place upon interaction of the two partner proteins. Consequently, eIF(iso)4E was fused to the N-terminal portion whereas the VPg precursors were fused to the C-terminal portion of GFP. Transient expression was achieved by agroinfiltration in *N. benthamiana* leaves along with ER-DsRed2. Fluorescence was observed after 3 or 4 days post-infiltration by confocal microscopy. The 1-day delay in fluorescence observation may be explained by the fact that intact (full-size) GFP requires several hours to mature in the cell (Tsien, 1998), and it is conceivable that the intermolecular reconstitution of a split fluorophore may take longer. Immunoblot analysis with the anti-VPg-Pro rabbit serum showed that no degradation or Pro-mediated proteolysis took place for the VPg precursors (Fig. 2).

Green fluorescence was observed throughout the nucleus, with a preferential accumulation in subnuclear structures when VPg-Pro-ctGFP was coexpressed with ntGFP-eIF(iso)4E (Fig. 4A to D). The subnuclear structures were of the same size as those observed for the localisation of VPg-Pro-GFP. Thus, the cellular localisation of VPg-Pro coincides with that for the interaction with the translation factor. No fluorescence was observed for the following combinations: ntGFP-eIF(iso)4E with ctGFP (Fig. 4E) or VPg-Pro-ctGFP with ntGFP (data not shown). Nuclear import of mammalian eIF4E is an active process mediated by the eIF4E transporter (Dostie *et al.*, 2000a). Since eIF(iso)4E-GFP was not observed in the nucleus when expressed alone, it maybe because the *N. benthamiana* transporter complex does not recognise the fusion protein or is not expressed when agroinoculation is applied. eIF(iso)4E nuclear interaction with VPg-Pro suggests, however, that the viral protein may act as a transporter protein. This was confirmed by the fusion of eIF(iso)4E with Ds-Red2 and VPg-Pro with GFP. eIF(iso)4E-

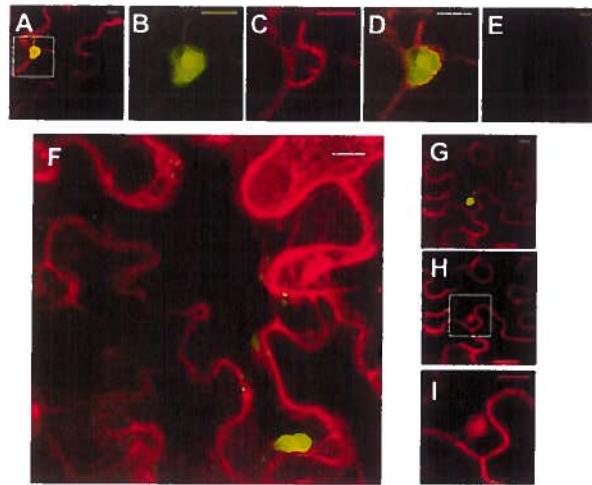


Figure 4 : Subcellular localizations of the interaction between eIF(iso)4E and VPg precursors.

N. benthamiana leaves were infiltrated with *A. tumefaciens*, and expression of fluorescent proteins was visualized by confocal microscopy 4 days later. *A. tumefaciens* suspensions contained binary Ti plasmids encoding VPg-Pro-ctGFP, ntGFPeIF(iso)4E, and ER-DsRed2 (A to D); ctGFP and ntGFPeIF(iso)4E (E); or 6K-VPg-Pro-ctGFP, ntGFPeIF(iso)4E, and ER-DsRed2 (F to I). Panel F is a “maximum-intensity Z projection” of 13 1- μ m slices stacked on top of each other. Panels B to D and I are close-up views of the rectangles depicted in panels A and H, respectively. Panel B shows fluorescence emitted by the green channel only; panels C, H, and I show fluorescence emitted by the red channel only. Bar, 15 μ m.

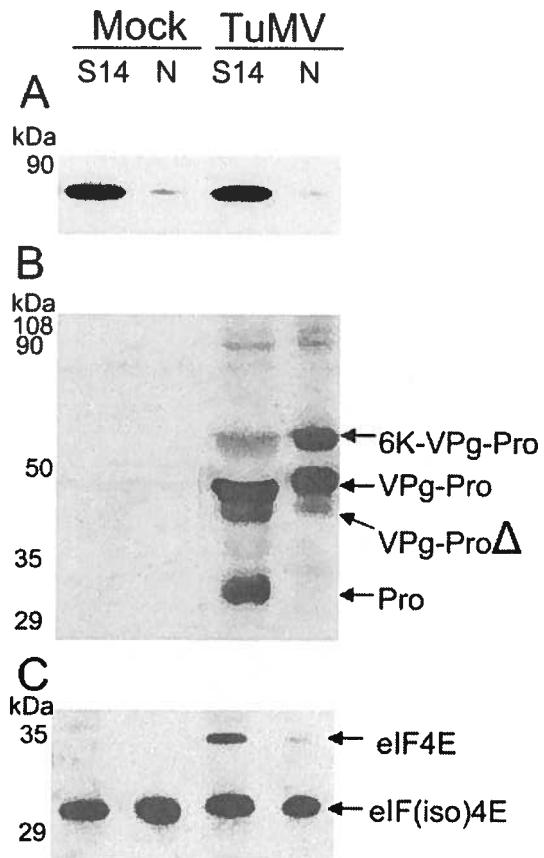


Figure 5 : Immunoblot analysis of nuclear and postnuclear fraction proteins from healthy or TuMV-infected plants.

B. peruviana plants were mock inoculated or infected with TuMV. Twelve days later, leaves were homogenized and centrifuged at 14,000 x g to separate the “soluble” fraction (S) from crude nuclei, which were further purified by Percoll gradient centrifugation (N). Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using a rabbit serum against Bip (A), VPg-Pro (B), or eIF(iso)4E (C). The text on the right shows the electrophoretic migration positions of the indicated proteins.

DsRed2 expressed alone was observed exclusively in the cytoplasm but was also observed in the nucleolus along with VPg-Pro-GFP (data not shown). Nuclear localisation of the interaction between VPg-Pro and eIF(iso)4E was visualised in the absence of other viral proteins. In attempt to confirm the presence of VPg-Pro and eIF(iso)4E in the nucleus of TuMV-infected cells, nuclei were purified from mock-inoculated and TuMV-infected leaves as described in Materials and Methods. Isolation of nuclei was confirmed by phase-contrast microscopy and 4',6'-diamidino-2-phenylindole staining (data not shown). The S14 fraction and the purified nuclei were analysed by immunoblot assay using antibodies raised against BiP, which is a marker of the ER (Cascardo *et al.*, 2000). For the post-nuclear fraction, 1/1,000 of the preparation was loaded on the acrylamide gel, whereas one-fifth was loaded for the nuclear fraction. A strong signal for BiP was detected in the S14 fraction while a faint band was observed in the nuclear preparation of mock- and TuMV-infected cells (Fig. 5A), suggesting that the purified nuclei were essentially free of ER membranes.

These fractions were analysed using a rabbit serum raised against VPg-Pro. Bands corresponding to 6K-VPg-Pro and VPg-Pro were found in both fractions (Fig. 5B). However, Pro was detected in the S14 fraction only. This suggests that the nuclei were free of cytoplasmic proteins, since the viral protein is a soluble cytoplasmic protein (Fig. 1) and does not contain a nuclear localization signal. Consequently, a fraction of VPg-Pro is localised to the nucleus of infected cells, which confirms the GFP fusion and BiFC experiments. The presence of 6K-VPg-Pro in the nuclear fraction is explained by its often peri-nuclear localisation, as observed in the GFP fusion experiments. The purification of nuclei probably resulted in the copurification of some of the 6K-VPg-Pro-induced vesicles.

When the post-nuclear and the nuclear fractions were analysed with a serum raised against eIF(iso)4E, the signal for translation factor was detected in both fractions with similar intensity. In contrast, the BiP signal was observed at a much lower level in the nuclear than in the post-nuclear fraction, indicating that the detection of eIF(iso)4E in purified nuclei was not the result of impurities in the preparation. The presence of VPg-

Pro and eIF(iso)4E in nuclear-enriched fractions of infected cells provides additional support for the suggested interaction of these two proteins in the nucleus. Interestingly, eIF4E was found mainly in the S14 fraction. Again, this differential localisation might reflect differential activity of the two isomers.

Although positive-sense RNA viruses replicate in the cytoplasm, there are several examples of proteins from such viruses that have been found in the nucleus, and often in the nucleolus [for reviews, see references (Hiscox, 2002; Hiscox, 2003)]. The general hypothesis that has been presented is that the presence of these viral proteins is required for disruption of nuclear functions and/or inhibition of antiviral responses (Weidman *et al.*, 2003). However, the exact mode of action of these proteins in the nucleus remains to be fully described. Nuclear interaction with eIF(iso)4E may thus offer a novel perspective for the mode of action of VPg-Pro in this organelle. The traditional role of eIFs is to initiate protein synthesis in the cytoplasm, which requires the coordinated activities of a large number of eIFs (Pestova et Hellen, 2000). However, a wide variety of studies showed that a number of “classical” translation machinery components are located in the nucleus of mammalian cells, including eIF4E [for a review, see reference (Strudwick et Borden, 2002)]. eIF4E controls the expression of certain growth stimulatory proteins by regulating mRNA export from the nucleus (Rosenwald *et al.*, 1995; Rousseau *et al.*, 1996). Additionally, nuclear eIF4E might be involved in nuclear translation, possibly required for proof-reading transcripts before they are transported to the cytoplasm (Iborra *et al.*, 2001). Consequently, nuclear/nucleolar interaction of VPg-Pro with eIF(iso)4E may perturb the nuclear role of the factor by sequestration. Interestingly, VPg-Pro possesses DNase and RNase activities (Anindya et Savithri, 2004; Cotton *et al.*, 2006). Association with eIF(iso)4E might thus target VPg-Pro to particularly sensitive areas for DNA and RNA degradation. This possibility may then explain the host gene shutoff that has been observed in *Pea seedborne mosaic virus*-infected cells (Wang et Maule, 1995).

Vesicular localisation of 6K-VPg-Pro and eIF(iso)4E interaction

Green fluorescence was observed in cytoplasmic vesicles when 6K-VPg-Pro-ctGFP was coexpressed with ntGFP-eIF(iso)4E. Figure 4F represents a “maximum

intensity Z projection” of 13 1- μ m slices stacked on top of each other for one interaction event. One vesicle is clearly depicted: it was oblong shaped with a length of 15 μ m, a height of 7 μ m and a depth of at least 13 μ m. It was embedded on the surface of the ER, which was seen as a convoluted web-like reticular network of interconnected tubules. Smaller vesicles around ER membranes were also observed. Possibly, these structures were in transit for the formation of the larger vesicles. The ~10 μ m vesicles were an out-growth of the ER membrane system (Fig. 4G to I). No fluorescence was observed when ntGFP-eIF(iso)4E was expressed with ctGFP, or ntGFP with 6K-VPg-Pro-ctGFP (data not shown). This result suggests that the vesicles induced by 6K-VPg-Pro is the site for interaction with eIF(iso)4E.

The interaction of eIF(iso)4E with 6K-VPg-Pro in cytoplasmic vesicles points to a direct involvement of the translation factor in virus replication. The very first events upon entry of a positive-strand RNA virus into a cell are uncoating of the virion, followed by translation of the genome. This leads to the production of viral proteins that induce the formation of cytoplasmic vesicles (Schaad *et al.*, 1997a; Turner *et al.*, 2004). Upon maturation, these vesicles house replication complexes for virus RNA replication to take place (Egger et Bienz, 2005). However, it is not clear yet if translation and replication are physically separate events or whether they are tightly coupled processes. 6K-VPg-Pro is a likely component of the replication complex and interacts with the viral RdRp (Daros *et al.*, 1999). The 6K domain of TEV has been shown to be an integral membrane protein (Restrepo-Hartwig et Carrington, 1994) responsible for the formation of ER-derived cytoplasmic vesicles sheltering replication complexes (Schaad *et al.*, 1997a). The vesicles induced by TuMV 6K-VPg-Pro (this study) are very similar in size and origin to those described for the TEV replication complex (Schaad *et al.*, 1997a). The presence of eIF(iso)4E in these vesicles thus suggests a close physical relationship between translation and replication of the viral RNA. The presence of host translation factor in highly purified replication complexes has been described for other plant viruses. For instance, *Tobacco mosaic virus* and *Brome mosaic virus* replication complexes include a subunit of eIF3 (Quadt *et al.*, 1993; Taylor et Carr, 2000). Also, it has been shown that functional poliovirus replication complexes are formed in *cis* in a coupled process

involving viral translation, membrane modification, vesicle budding and viral RNA synthesis (Egger *et al.*, 2000). Our results raise the possibility that 6K-VPg-Pro not only induces the formation of cytoplasmic vesicles that house replication complexes but may also be responsible for the coupling of viral RNA translation and replication through interaction with both eIF(iso)4E and the viral RdRp within a single vesicle.

This study thus provides a fine example that precursor proteins derived from a polyprotein can have quite different functions. In the case of TuMV, VPg-Pro interaction with eIF(iso)4E may be involved in perturbing normal cellular functions, while 6K-VPg-Pro interaction with the translation factor may be required for viral replication, which is a complex process involving translation and replication of the RNA genome.

Acknowledgement

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. We would like to thank Marcel Desrosiers for his help with the confocal microscope, A. Vitale for the anti-BiP serum, M. Echeverría for AtFibrillarin1-GFP and H. Sanfaçon for her generous gift of ER-dsRed2 as well as for having critically read our manuscript.

Reference List

- Anindya, R., and Savithri, H. S. (2004). Potyviral Nla proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. *J Biol Chem* **279**(31), 32159-69.
- Barneche, F., Steinmetz, F., and Echeverria, M. (2000). Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **275**(35), 27212-20.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., and Ohad, N. (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**(3), 419-27.
- Browning, K. S. (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol* **32**(1-2), 107-44.
- Browning, K. S., Webster, C., Roberts, J. K., and Ravel, J. M. (1992). Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem* **267**(14), 10096-100.
- Carrington, J. C., Haldeman, R., Dolja, V. V., and Restrepo-Hartwig, M. A. (1993). Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (Nla) of tobacco etch potyvirus *in vivo*. *J Virol* **67**(12), 6995-7000.
- Cascardo, J. C., Almeida, R. S., Buzeli, R. A., Carolino, S. M., Otoni, W. C., and Fontes, E. P. (2000). The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *J Biol Chem* **275**(19), 14494-500.
- Cotton, S., Dufresne, P. J., Thivierge, K., Ide, C., and Fortin, M. G. (2006). The VPgPro protein of Turnip mosaic virus: *in vitro* inhibition of translation from a ribonuclease activity. *Virology* **351**(1), 92-100.

- Daros, J. A., Schaad, M. C., and Carrington, J. C. (1999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (N1a) and RNA polymerase (N1b) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J Virol* 73(10), 8732-40.
- Davies, E. and S. Abe. 1995. Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods Cell Biol* 50:209-222.
- Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S. A., and Sonenberg, N. (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* 19(12), 3142-56.
- Egger, D., and Bienz, K. (2005). Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *J Gen Virol* 86(Pt 3), 707-18.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., and Bienz, K. (2000). Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 74(14), 6570-80.
- Gallie, D. R., and Browning, K. S. (2001). eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 276(40), 36951-60.
- Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C. L., Noel Ellis, T. H., and Maule, A. J. (2004). The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J* 40(3), 376-85.
- Gaudino, R. J., and Pikaard, C. S. (1997). Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 272(10), 6799-804.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68, 913-63.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberte, J. F., and Roberts, L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* 6(10), 968-72.
- Goodin, M. M., Dietzgen, R. G., Schichnes, D., Ruzin, S., and Jackson, A. O. (2002). pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J* 31(3), 375-83.
- Grzela, R., Strokovska, L., Andrieu, J. P., Dublet, B., Zagorski, W., and Chroboczek, J. (2006). Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie* 88(7), 887-96.
- Hellens, R., Mullineaux, P., and Klee, H. (2000). Technical Focus:a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5(10), 446-51.

- Hiremath, L. S., Hiremath, S. T., Rychlik, W., Joshi, S., Domier, L. L., and Rhoads, R. E. (1989). In vitro synthesis, phosphorylation, and localization on 48 S initiation complexes of human protein synthesis initiation factor 4E. *J Biol Chem* **264**(2), 1132-8.
- Hiscox, J. A. (2002). The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol* **147**(6), 1077-89.
- Hiscox, J. A. (2003). The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus Res* **95**(1-2), 13-22.
- Iborra, F. J., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* **293**(5532), 1139-42.
- Kang, B. C., Yeam, I., Frantz, J. D., Murphy, J. F., and Jahn, M. M. (2005). The pvr1 locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J* **42**(3), 392-405.
- Kang, S. H., Lim, W. S., and Kim, K. H. (2004). A protein interaction map of soybean mosaic virus strain G7H based on the yeast two-hybrid system. *Mol Cells* **18**(1), 122-6.
- Laliberte, J. F., Nicolas, O., Chatel, H., Lazure, C., and Morosoli, R. (1992). Release of a 22-kDa protein derived from the amino-terminal domain of the 49-kDa Nla of turnip mosaic potyvirus in Escherichia coli. *Virology* **190**(1), 510-4.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of Arabidopsis thaliana reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol* **12**(12), 1046-51.
- Leonard, S., Chisholm, J., Laliberte, J. F., and Sanfacon, H. (2002). Interaction in vitro between the proteinase of Tomato ringspot virus (genus Nepovirus) and the eukaryotic translation initiation factor iso4E from Arabidopsis thaliana. *J Gen Virol* **83**(Pt 8), 2085-9.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* **74**(17), 7730-7.
- Leonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (2004). Interaction of VPg-Pro of turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J Gen Virol* **85**(Pt 4), 1055-63.
- Michon, T., Estevez, Y., Walter, J., German-Retana, S., and Le Gall, O. (2006). The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *Febs J* **273**(6), 1312-22.

- Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., Ohmori, T., and Natsuaki, T. (2006). Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie* **88**(3-4), 329-40.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., and Jacquemond, M. (2004). Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in Capsicum annuum and Lycopersicon hirsutum. *Mol Plant Microbe Interact* **17**(3), 322-9.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C., and LeGall, O. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol* **132**(3), 1272-82.
- Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2000). The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* **57**(4), 651-74.
- Puustinen, P., and Makinen, K. (2004). Uridylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J Biol Chem* **279**(37), 38103-10.
- Quadt, R., Kao, C. C., Browning, K. S., Hershberger, R. P., and Ahlquist, P. (1993). Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4), 1498-502.
- Restrepo-Hartwig, M. A., and Carrington, J. C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J Virol* **68**(4), 2388-97.
- Restrepo, M. A., Freed, D. D., and Carrington, J. C. (1990). Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell* **2**(10), 987-98.
- Rosenwald, I. B., Kaspar, R., Rousseau, D., Gehrke, L., Leboulch, P., Chen, J. J., Schmidt, E. V., Sonenberg, N., and London, I. M. (1995). Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* **270**(36), 21176-80.
- Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., and Sonenberg, N. (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3), 1065-70.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J* **32**(6), 1067-75.

- Ruffel, S., Gallois, J. L., Lesage, M. L., and Caranta, C. (2005). The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Mol Genet Genomics* **274**(4), 346-53.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J., and Carrington, J. C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus Nla protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* **273**(2), 300-6.
- Schaad, M. C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S., and Carrington, J. C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (Nla) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* **70**(10), 7039-48.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E., and Carrington, J. C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* **16**(13), 4049-59.
- Strudwick, S., and Borden, K. L. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* **70**(1), 10-22.
- Taylor, D. N., and Carr, J. P. (2000). The GCD10 subunit of yeast eIF-3 binds the methyltransferase-like domain of the 126 and 183 kDa replicase proteins of tobacco mosaic virus in the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* **81**(Pt 6), 1587-91.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44.
- Turner, K. A., Sit, T. L., Callaway, A. S., Allen, N. S., and Lommel, S. A. (2004). Red clover necrotic mosaic virus replication proteins accumulate at the endoplasmic reticulum. *Virology* **320**(2), 276-90.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L., and Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* **74**(1-2), 157-75.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**(3), 428-38.
- Wang, D., and Maule, A. J. (1995). Inhibition of Host Gene Expression Associated with Plant Virus Replication. *Science* **267**, 229-231.
- Weidman, M. K., Sharma, R., Raychaudhuri, S., Kundu, P., Tsai, W., and Dasgupta, A. (2003). The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res* **95**(1-2), 75-85.

- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**(1), 84-92.
- Zhang, S. C., Zhang, G., Yang, L., Chisholm, J., and Sanfacon, H. (2005). Evidence that insertion of Tomato ringspot nepovirus NTB-VPg protein in endoplasmic reticulum membranes is directed by two domains: a C-terminal transmembrane helix and an N-terminal amphipathic helix. *J Virol* **79**(18), 11752-65.

Publication no.2

The poly(A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during Turnip mosaic virus infection

Journal of Virology

Octobre 2007, p. 10 905-10 913

Running title : PABP and TuMV infection

Chantal Beauchemin and Jean-François Laliberté*

* Corresponding author

Jean-François Laliberté

Institut Armand-Frappier

Institut national de la recherche scientifique

531 boulevard des Prairies

Laval, Québec

Canada H7V 1B7

1-450-687-5010 ext 4445 (office)

1-450-686-5501 (fax)

jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca

Contexte

Lorsque j'ai débuté mon doctorat, l'interaction entre VPg-Pro et PABP était nouvellement mise au jour par notre laboratoire, en collaboration avec celui de Dr. Marc G. Fortin de l'Université McGill. Cette interaction avait été examinée puisque la PABP est un facteur de traduction important dans le complexe de synthèse protéique et qu'un rôle possible dans la réplication lui avait été attribué (Wang *et al.*, 2000). Simon Léonard avait montré que la PABP de blé interagit avec la VPg-Pro du TuMV. Ces résultats n'ont cependant pas été publiés.

Alors, la première expérience que j'ai réalisée pour mon doctorat est le clonage de la PABP2 d'*A. thaliana* dans un vecteur d'expression de *E. coli*, en fusion ou non avec les étiquettes T7 et HIS. Nous avons choisi PABP2 puisqu'elle est largement exprimée. De plus, il a été montré que cette isoforme interagit avec la polymérase du virus de la mosaïque du zucchini jaune (ZYMV). Ces protéines ont été purifiées, ainsi que VPg-Pro, pour faire une analyse d'interaction *in vitro* basée sur l'ELISA. Ces résultats confirmaient ceux de Simon : il y a effectivement une interaction entre VPg-Pro et PABP2. Ces données ont été publiées dans Journal of General Virology (Léonard *et al.*, 2004) (voir le chapitre IV : autres contributions).

Nous avons ensuite poursuivi cette étude avec une approche similaire à celle utilisée pour la publication précédente. Nous avons alors tenté le système de BiFC mais sans succès. C'est pourquoi nous avons eu recours à la co-localisation de PABP2 avec 6K-VPg-Pro et VPg-Pro et nous avons confirmé ces résultats par des expériences de fractionnement cellulaire, flottaison de membranes et gradient de saccharose à partir de feuilles infectées au TuMV.

La présence de deux facteurs de traduction dans les vésicules induites par 6K-VPg-Pro soulevait une question intrigante, à savoir si le complexe de réplication/traduction est localisé dans la lumière ou sur la périphérie cytoplasmique de la

vésicule. Nous avons donc entrepris des traitements au sel et à pH élevé. Nous avons obtenu ainsi des résultats forts intéressants.

Résumé

Il a été montré précédemment que la protéine de liaison aux poly(A) 2 (PABP2) d'*Arabidopsis thaliana* interagit avec la VPg-Pro du virus de la mosaïque du navet (TuMV) et pourrait conséquemment jouer un rôle important durant l'infection. Des expériences de fractionnement cellulaire ont révélé que la PABP2 est une protéine soluble cytoplasmique dans les plantes saines. Par contre, dans les plantes infectées au TuMV, une sous-population de PABP2 devient associée aux membranes et une autre est localisée dans le noyau. Les expériences de microscopie confocale indiquent que PABP2 est partiellement reciblée dans le nucléole en présence de la VPg-Pro du TuMV. De plus, l'association membranaire de la PABP2 pendant l'infection au TuMV résulte de l'internalisation de la protéine cellulaire dans les vésicules induites par 6K-VPg-Pro comme il a été montré par une combinaison de microscopie confocale et d'expériences de fractionnement sur gradient de saccharose. Cette redistribution d'un facteur d'initiation de traduction important au noyau et aux structures membranaires sous-tend vraisemblablement deux processus du cycle de réPLICATION du TuMV.

Summary

The poly(A) binding protein 2 (PABP2) of *Arabidopsis thaliana* has previously been shown to interact with VPg-Pro of Turnip mosaic virus (TuMV) and may consequently play an important role during infection. Sub-cellular fractionation experiments revealed that PABP2 was predominantly a cytoplasmic soluble protein in healthy plants. However, in TuMV-infected plants, a sub-population of PABP2 was membrane-associated or was localised in the nucleus. Confocal microscopy experiments indicated PABP2 was partially retargeted to the nucleolus in the presence of TuMV VPg-Pro. In addition, membrane association of PABP2 during TuMV infection resulted from the internalisation of the host protein in 6K-VPg-Pro-induced vesicles, as shown by a combination of confocal microscopy and sucrose gradient fractionation experiments. This redistribution of an important translation initiation factor to the nucleolus and to membrane structure likely underlies two important processes of the TuMV replication cycle.

Introduction

Cellular mRNAs are 5'capped and 3' polyadenylated. The cap structure (m^7GpppN , where N represents any nucleotide) and the poly(A) tail are involved in translation initiation by interacting with the cap-binding eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and the poly(A)-binding protein (PABP), respectively. eIF4E is part of the eIF4F complex, which also contains eIF4G and eIF4A. eIF4G functions as a scaffold protein that binds many factors involved in recruiting 40S ribosomal subunit to mRNAs, among which are eIF4E and PABP (Sonenberg et Dever, 2003). The interaction between eIF4G, eIF4E and PABP and with the extremities of the mRNA leads to the circularisation of the latter, which purportedly increases the efficiency of translation (Gallie, 2002). Viruses target translation initiation factors in order to take over the protein synthesis machinery of the infected cells. Several studies have shown that eIF4E is often directly or indirectly inactivated during virus-induced host translational shutdown (Connor et Lyles, 2002; Haghigiat et al., 1996; Kentsis et al., 2001). PABP is another frequent target of RNA viruses. For example, the non-structural protein 3 (NSP3) of rotaviruses binds the 3' non-polyadenylated end of the viral RNA. It also competes with PABP for eIF4G binding. Thus, it has been proposed that during rotavirus infection NSP3 evicts PABP from eIF4G, impairing the translation of cellular mRNAs while enhancing at the same time the translation of rotaviral mRNAs (Vende et al., 2000). Another strategy used by RNA viruses to shut down host translation is to cleave PABP. Cleavage has been observed during picornavirus (Kuyumcu-Martinez et al., 2002; Kuyumcu-Martinez et al., 2004b), calicivirus (Kuyumcu-Martinez et al., 2004a) and retrovirus infections (Alvarez et al., 2006).

PABP may be inactivated to prevent host mRNA translation from taking place, but it is often required for viral RNA synthesis and translation. The closed-loop model of translation initiation that mediates the cross talk between the 5' and 3' ends of mRNA appears to be also pertinent for explaining the replication and/or translation of several viruses. Poliovirus replication requires genome circularisation through a protein-protein bridge requiring among several proteins PABP (Herold et Andino, 2001). PABP

interaction with eIF4G, which interacts with picornavirus internal ribosome binding sites, stimulates viral translation likely through circularisation (Michel *et al.*, 2001; Svitkin *et al.*, 2001). Finally, involvement of PABP in genome circularisation and in translation has been suggested for coronavirus (Shi *et al.*, 2005). Potyviruses have a positive sense single-stranded RNA genome of approximately 10 kb that is linked at its 5' end to the viral protein VPg and is polyadenylated at its 3' end (Revers *et al.*, 1999). The genome encodes a single polyprotein that is processed by three viral proteinases. Genome circularisation may take place through protein-RNA and protein-protein interactions involving RNA-linked VPg, eIF4E, eIF4G, PAPB and the poly(A) tail. VPg has been shown to interact with eIF4E or its isomer eIF(iso)4E, depending of the virus-host combination (Khan *et al.*, 2006; Michon *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2006; Schaad *et al.*, 2000; Wittmann *et al.*, 1997). Several lines of evidence suggest that eIF4E plays an important role in potyvirus replication. Knockout *A. thaliana* plants for eIF(iso)4E are resistant to potyviruses (Duprat *et al.*, 2002; Lellis *et al.*, 2002). Recessive resistant genes against potyviruses have been shown to code for eIF4E (Kang *et al.*, 2005; Nicaise *et al.*, 2003; Ruffel *et al.*, 2002; Ruffel *et al.*, 2006). Complementing those experiments was the demonstration that the virulence determinant toward these recessive resistances was VPg (Moury *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 1997) and that failure of eIF4E alleles to bind VPg correlated with resistance in most cases (Kang *et al.*, 2005). Precursor forms of VPg (i.e. 6K-VPg-Pro and VPg-Pro) have been detected in TuMV infected plants (Léonard *et al.*, 2004). 6K-VPg-Pro, through its 6K domain, induces formation of vesicles from the endoplasmic reticulum membranes where RNA synthesis takes place (Schaad *et al.*, 1997a). Recent data has shown that these vesicles were the site of interaction between eIF(iso)4E and 6K-VPg-Pro. Interestingly, a population of VPg-Pro was present in the nucleolus where it also interacted with the translation factor (Beauchemin *et al.*, 2007).

VPg and its precursor forms interact with several other proteins (Guo *et al.*, 2001), notably the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Daros *et al.*, 1999) and PABP2 (Léonard *et al.*, 2004). Given the involvement of this host protein during the replication of several viruses, we investigated the implication of PABP in TuMV infection. We examined the subcellular localisation of PABP2 in TuMV-infected cells.

Using cellular fractionation and confocal microscopy, we observed that a subpopulation of PABP2 was internalised in virus-induced vesicles or was transported into the nucleolus. Using coagroinfiltration experiments, we provide evidence suggesting that this redistribution was the result of the interaction of the host protein with 6K-VPg-Pro and VPg-Pro, respectively.

Materials and Methods

Recombinant protein expression in *E. coli* and purification:

Recombinant eIF(iso)4E of *A. thaliana* was purified as described (Wittmann *et al.*, 1997). VPg-Pro was purified as previously described (Menard *et al.*, 1995). pETPABPhis encodes a His-tailed PABP2 of *A. thaliana* (accession no. NM_119572) and was produced as follows. PCR was performed on total cDNA of *A. thaliana* using a forward (5'- TATATACATATGGCTAGCCGAATTCGATGGCGCAGGTTCAACTT-3', NheI and EcoRI) and reverse primer (5'-TATATACTCGAGAGAGAGGTTCAAGGAAGC-3'; XhoI). The amplified fragment was digested with NheI and XhoI and ligated into similarly restricted pET21b (Novagen) and the recombinant plasmid was introduced in *E. coli* BL21 (DE3). An overnight culture of *E. coli* BL21 (DE3) was diluted 1:100 in fresh medium and incubated at 37°C until the OD₆₀₀ reached 0.6. Protein production was then induced at room temperature with 0.4 mM IPTG for 3 h. Purification by metal chelation was performed as in (Menard *et al.*, 1995).

ELISA-based binding assay:

VPg-Pro was absorbed to wells of an ELISA plate (100 µl of protein at 10 ng µl⁻¹) by overnight incubation at 4°C and wells were blocked with 5% Blotto in PBS. Appropriate proteins were diluted in PBS with 1% Blotto and 0.2% Tween 20 and incubated for 1.5 h at 4°C with the previously coated wells. Detection of retained protein was achieved as in ELISA with an anti-T7-tag or anti-HIS-tag sera followed by a peroxidise-labelled goat anti-mouse immunoglobulin G (KPL). Wells were washed three times with 0.05% Tween 20 between incubations.

Plasmid construction for expression in plants:

Plasmid encoding VPg-Pro-GFP, VPg-Pro-DsRed, VPg-Pro-ctGFP, 6K-VPg-Pro-GFP and ntGFP-eIF(iso)4E were described previously (Beauchemin *et al.*, 2007). PABP was obtained by PCR (JFPABP : 5'TCGGGATCCGAAGCTTATGGCGCGTT HindIII; FTPABP : 5'TGCTCACCCATGGGGATCCGAGAGAGAGGTTCAAGGA, NcoI) from pETT7PABP and ligated into HindIII/NcoI restricted pGreen/EGFP

(Beauchemin *et al.*, 2007). Fusion of eIF(iso)4E from *A. thaliana* with DsRed was obtained as follows. DsRed was obtained by PCR (JFDsRed : TCTAGAGGATCCCCATGGCCTCCTCCGAGAAC, BamHI; FTDsRedEcoRI : TAATTAAAGGAATTCTTACAGGAACGGTGGCGGCCA, EcoRI and **Stop codon**) from pER-DsRed (Han et Sanfacon, 2003; Zhang *et al.*, 2005) and ligated into a pSK/35S cassette by BamHI/EcoRI restriction sites. eIF(iso)4E (JFeIF(iso)4E : TCAACTTCTAGAAATATGGCGACCGAT, XbaI; FTeIF(iso)4E : CTCGAGAGGATCCGACAGTGAACCGGCT, BamHI) was amplified from PCR2.1/eIF(iso)4E and ligated into XbaI/BamHI restricted pSK/35S-DsRed. 35S-DsRed and 35S-eIF(iso)4E-DsRed were then transferred into pCambia1380 (<http://www.bioforge.net/forge/entry.jspa?externalID=161&categoryID=8>). pKS/35SDsRed and pSK/35S-eIF(iso)4E-DsRed were digested with EcoRV and EcoRI while pCambia1380 was digested with Xhol and blunted with T4 DNA polymerase followed by EcoRI digestion, resulting in pCambia/DsRed and pCambia/eIF(iso)4E-DsRed. mCherry was amplified (JFmCherry : 5'TATAATATTCTAGAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA, XbaI, BamHI; FTmCherry : 5' ATCTACTAGTTACGAATTCTTACTTGACAGCTCGTCCA, EcoRI, HpaI, **Stop codon**) from pRSET-B (Shaner *et al.*, 2004) and cloned XbaI/HpaI into pCambia/DsRed, resulting in pCambia/mCherry. To obtain pCambia/PABP2-mCherry, PABP2 was amplified (JFPABP : 5'TCGGGATCCGAAGCTTATGGCGCGGTT, HindIII; FTPABP : 5'TAATTATATTCTAGAGAGGTTCAAGGAAGCGA, XbaI) from pET-T7PABP2 and ligated into pCambia/mCherry vector, which was previously digested by HindIII/XbaI.

Protein expression in plants:

Vectors containing genes for fluorescent fusion proteins were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 by electroporation. Transformed cells were selected on kanamycin-ampicillin plates. Bacterial overnight cultures were centrifuged and cells were resuspended in water supplemented with 10 mM MgCl₂ and 150 μM acetosyringone. The resulting preparation was used to agroinfiltrate leaves from 3-week-old *Nicotiana*

benthamiana plants, along with *Agrobacterium* containing plasmids encoding P19 or HcPro. Plants were kept for 4 days in a growth chamber before observation.

Confocal microscopy:

Sections from agroinfiltrated leaves were cut out and placed in immersion oil on a microscope coverglass. The coverglass was then inverted over a microscope slide, presenting a depression above which was placed the leaf section. Individual cells were observed with a 40 X oil immersion objective on a Radiance 2000 confocal microscope from Bio-Rad. Fluorescent proteins were excited with an Argon-Krypton laser. The data for green and red channels were collected simultaneously. Images were collected with a charge-coupled-device camera and treated with Adobe Photoshop or Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) software.

Nuclei isolation:

Nuclei isolation was carried out according to the method of (Gaudino et Pikaard, 1997). *Brassica perviridis* plants (three-leaf stage) were infected with TuMV or mock inoculated with PBS. At 12 days post inoculation, leaves that developed next to the inoculated leaves were harvested. Leaf tissue (5 g) was cut in pieces with a blade and minced in 3 volumes (15 ml) of nucleus isolation buffer (NIB) (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 M sucrose, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The homogenate was filtered through nylon membranes (160 µm and 41 µm) and subjected to centrifugation at 14,000 x g for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in 1 volume (5 ml) of NIB and homogenized. Seven millilitres of nuclei in Percoll 5% was layered on a step gradient of Percoll with 5-ml layers of 15%, 30%, 45%, and 60% and subjected to centrifugation at 530 x g for 10 min and at 8,500 x g for 20 min at 4°C. Nuclei accumulated between the 60%-45% Percoll layers and the 30%-45% Percoll layers. Nuclei were diluted in 5 volumes of NIB, mixed gently by inversion, and subjected to centrifugation at 1,500 x g for 10 min. Nuclei were gently resuspended in 25 volumes of NIB and centrifuged again. Nuclei were resuspended in 100 µl of storage uffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.3 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 5 µM β-mercaptoethanol). Proteins from S14 and nucleus

preparations were diluted 1:5 in loading SDS buffer, separated by SDS-PAGE, and detected by immunoblot analysis with the ECL-based secondary antibody system (Amersham).

Sub-cellular fractionation and membrane flotation assay:

B. perviridis plants (three-leaf stage) were infected with TuMV or mock inoculated with PBS. At 12 days post inoculation, leaves that developed next to the inoculated leaves were harvested. Plant tissues were extracted and fractionated into post-nuclear (S3), soluble (S30) and membrane-enriched (P30) fractions as described (Han et Sanfacon, 2003; Schaad *et al.*, 1997a). Briefly, 1 g of tissue was ground in 4 mL of homogenization buffer (Schaad *et al.*, 1997a). Nuclei, chloroplasts, cell wall and debris were removed by centrifugation at 3 000 x g at 4°C for 10 min twice. The supernatant (S3) was centrifuged at 30 000 x g at 4°C for 30 min, resulting in soluble (S30) and crude membrane (P30) fractions. The pellets (P30-3) were resuspended in protein loading buffer (Lellis *et al.*, 2002) in a volume equal to that of the corresponding supernatant. Alternatively, the P30-2 fraction was resuspended in a volume of homogenization buffer (Q) equivalent to that used for the S30 fraction or treated with an equal volume of 1 M KCl or 0,1 M Na₂CO₃ (pH 10,5). For each extraction, the samples were incubated for 30 min on ice and then subjected to centrifugation at 30,000 x g at 4°C for 30 min. The pellets (P30-3) were resuspended in protein loading buffer (Lellis *et al.*, 2002) in a volume equal to that of the corresponding supernatant. 20 µL of S30-3 and P30-3 were analysed by SDS-PAGE and detected by immunoblot analysis with the ECL-based secondary antibody system (Amersham).

Membrane flotation assays were conducted essentially as previously described (Zhang *et al.*, 2005). Briefly, P30 fraction was resuspended in 400 µL of NTE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) and 300 µL was mixed with 1,6 mL of 85% (wt/vol) sucrose in NTE buffer and overlaid with 7 mL of 65% sucrose int NTE and then 3,1 mL of 10% sucrose in NTE. After centrifugation at 100 000 x g for 18 h in a Beckman SW41Ti rotor, twelve 1-mL fractions were collected from the bottom of the

tube and 20 µL were analysed by SDS-PAGE and detected by immunoblot analysis with the ECL-based secondary antibody system (Amersham).

Co-purification of VPg-Pro:

P30 fraction was resuspended in 4 mL of homogenisation buffer containing 300 mM KCl and 40 mM octyl-B-glucopyranoside. The P30 fraction was washed at 30 000 x g for 20 min (4°C) and purification of VPg-Pro containing complexes were performed by metal chelation as in (Menard *et al.*, 1995). Immunoreactions were detected using the ECL-based secondary-antibody system (Amersham).

Sucrose gradient:

The P30 fraction was resuspended in a volume of homogenization buffer equivalent to that used for the S30 fraction and layered onto a 9 ml 20–45% sucrose gradient containing the respective homogenization buffer and subjected to centrifugation at 143 000 x g in a Beckman SW41 Ti rotor for 4 h at 4°C. Fractions (0.75 ml) were collected, diluted 1 : 5 in protein dissociation buffer and subjected to immunoblot analysis following 12.5% SDS-PAGE. Immunoreactions were detected using the ECL-based secondary-antibody system (Amersham).

Results

Re-distribution of PABP2 in TuMV infected cells.

PABP2 has previously been shown to interact with VPg-Pro (Léonard *et al.*, 2004), and may consequently play an important role during the TuMV cell cycle. Its cellular distribution during infection was thus investigated by subcellular fractionation of extracts derived from mock-inoculated and TuMV-infected *B. perviridis* plants. *B. perviridis* was chosen because it is a natural host of TuMV, and because it provides ample infected material for cellular fractionation experiments. Leaves that developed symptoms next to the inoculated ones were harvested 12 days post-infection (dpi) and soluble (S30) as well as membrane-enriched (P30) fractions were separated by centrifugation. To allow a quantitative evaluation of the distribution of the proteins among the two fractions, the P30 pellet was resuspended in the same volume as that of the S30 supernatant. Total, soluble and membrane-associated proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis. Fractions were analysed with a rabbit serum raised against a recombinant form of PABP2 from *A. thaliana*. PABP2 was mainly found in the soluble fraction of mock-inoculated plants although a small quantity was also observed in the membrane-enriched fraction (Fig. 1A). Generally, somewhat higher level of PABP2 was noted in TuMV-infected cells. Most of PABP2 was observed in the soluble fraction, but a significant quantity was also found to be associated with membranes.

Nuclear distribution of PABP2 was also investigated. The S14 fraction and Percoll gradient-purified nuclei were analysed by immunoblot assay using antibodies raised against PABP2 (Fig. 1B). For the S14 fraction, 1/1000th of the preparation was loaded on the acrylamide gel, whereas 1/5th was loaded for the nuclear fraction. The PABP signal was detected in the S14 fraction of both mock and TuMV-inoculated leaves. However, PABP2 was also detected in the nuclear-enriched fraction of TuMV-infected leaves, but not in healthy leaves. These data then indicate that there is a cellular redistribution of PABP2 towards the nucleus and membranes during TuMV infection.

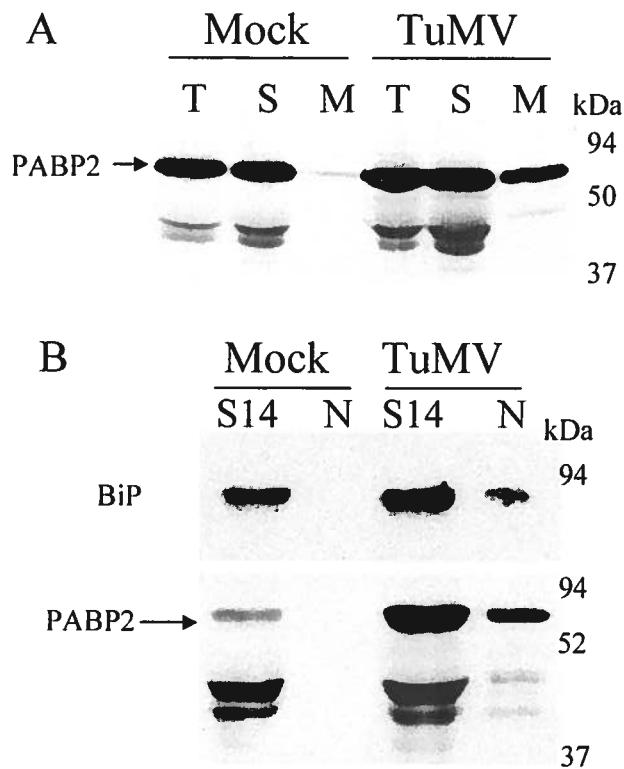


Figure 1 : Immunoblot analysis of soluble, membrane-associated and nuclear proteins from healthy or TuMV-infected plants.

B. perviridis plants were mock inoculated or infected with TuMV. A) Twelve days after infection, total proteins (T) were extracted and soluble proteins (S) were separated from membrane-associated proteins (M) by centrifugation at 30 000 x g. Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using a rabbit serum against PABP2. B) Twelve days after infection, leaves were homogenized and centrifuged at 14,000 x g to separate the “soluble” fraction (S) from crude nuclei (N), which were further purified by Percoll gradient centrifugation. Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using a rabbit serum against PABP2. The text on the right shows the electrophoretic migration positions of the indicated proteins.

Nuclear localisation of PABP2 in the presence of VPg-Pro.

Since infected nuclei contain VPg-Pro (Beauchemin *et al.*, 2007; Schaad *et al.*, 1996) and an *in vitro* interaction between this viral protein and PABP was reported (Léonard *et al.*, 2004), the localisation of PABP2 in the nucleus might be driven by the presence of the viral protein in this cellular organelle. PABP2 was fused at its C-terminal end with GFP and expressed in *N. benthamiana* by agroinfiltration. Expression of the fusion protein was assessed by immunoblot analysis using a rabbit serum raised against PABP2 and a signal corresponding to the expected molecular mass for the fusion protein was observed (data not shown). Fluorescence was visualised two to five days post-infiltration by confocal microscopy. No notable differences in cellular localization were observed during this time period. Fluorescence was generally observed in 30 to 50% of the cells in the infiltrated area. A previously described ER-targeted fluorescent marker (ER-DsRed) (Zhang *et al.*, 2005), which showed the expected reticulate pattern (Beauchemin *et al.*, 2007), was co-expressed along with the PABP2-GFP fusion to facilitate the identification of membrane structures and the nucleus. Fluorescence associated with PABP2-GFP was distributed exclusively in the cytoplasm (Fig. 2A). When PABP2-GFP was coexpressed with VPg-Pro-DsRed, green fluorescence was seen throughout the cytoplasm, but it was also observed in a sub-nuclear structure exactly where red fluorescence was emitted by VPg-Pro (Fig. 2B and C). Control experiment indicated that there was no green fluorescence emitted by VPg-Pro-DsRed under the experimental setup used (data not shown). A similar pattern was observed when PABP2 was fused to mCherry and VPg-Pro to GFP (data not shown). To get a better indication of the nature of the sub-nuclear structure, VPg-Pro-DsRed was co-expressed with a GFP fusion of *A. thaliana* fibrillarin 2, which localises in the dense fibrillar component of the nucleolus (Barneche *et al.*, 2000). Fig. 2D shows that VPg-Pro co-localised with fibrillarin 2, then suggesting that PABP2 was relocated in this substructure of the nucleolus in the presence of VPg-Pro.

The fluorescence pattern of eIF(iso)4E was similar to that of PABP2. The fluorescence of eIF(iso)4E-DsRed merged with that of GFP-ER around the nuclear membrane and the ER network while no eIF(iso)4E was detected in the nucleus (Fig. 2E).

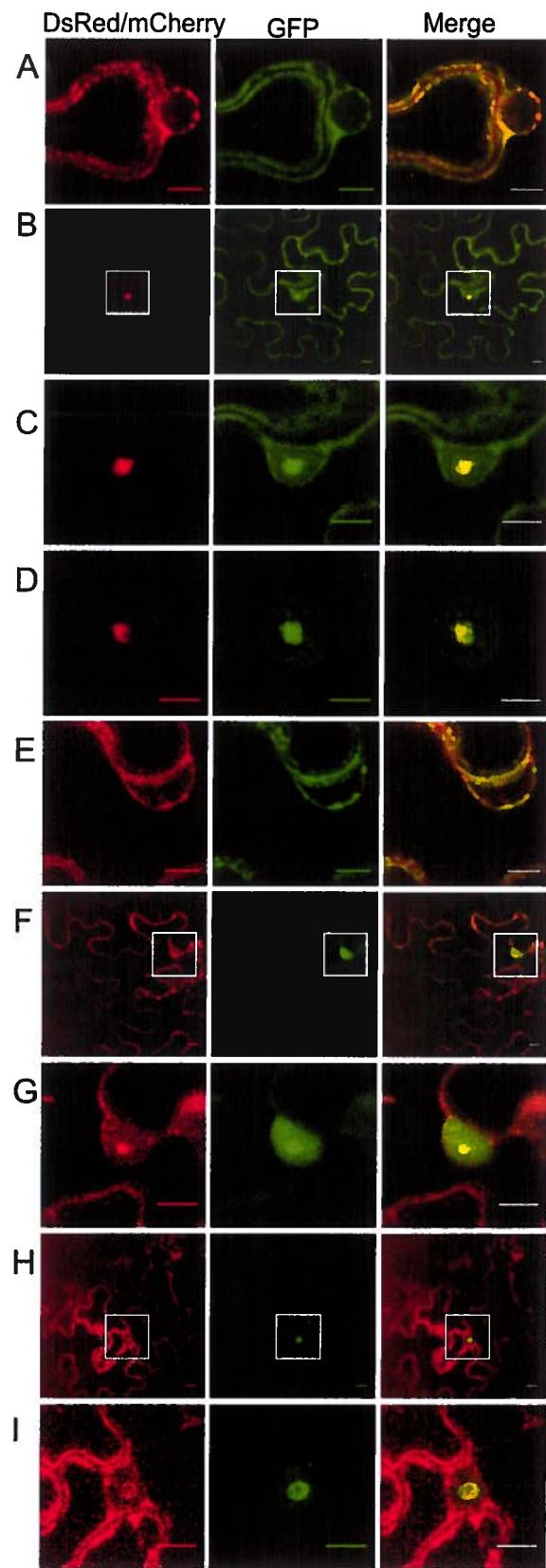


Figure. 2 : Subcellular localizations of PABP2, eIF(iso)4E and VPg-Pro. *N. benthamiana* leaves were infiltrated with *A. tumefaciens*, and expression of fluorescent proteins was visualized by confocal microscopy 4 to 5 days later. *A. tumefaciens* suspensions contained binary Ti plasmids encoding PABP2-GFP and ER-DsRed2 (A), PABP2-GFP and VPg-Pro-DsRed2 (B-C), VPg-Pro-DsRed2 and Atfib2-GFP (D), eIF(iso)4E-DsRed2 and GFP-ER (E), eIF(iso)4E-DsRed2 and VPg-Pro-GFP (F and G) and PABP2-mCherry, ntGFP-eIF(iso)4E and VPg-Pro-ctGFP (H and I). Left panels show fluorescence emitted by the red channel only while middle panels show fluorescence emitted by the green channel only; and right panels show the merge between the red and green channels. Panels C, G and I are a close-up view of the square depicted in panels B, F and H respectively. Bar, 10 μ m.

A similar distribution pattern was observed when eIF(iso)4E was fused to GFP (Beauchemin *et al.*, 2007). When co-expressed with VPg-Pro, eIF(iso)4E was now also observed in the nucleolus (Fig. 2F and G). The possibility of a tripartite complex between VPg-Pro, eIF(iso)4E and PABP2 was consequently investigated using a combination of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and colocalisation experiments. VPg-Pro was fused to the C-terminus (VPg-Pro-ctGFP) and eIF(iso)4E fused to the N-terminus of GFP (ntGFP-eIF(iso)4E) and were co-expressed with PABP2-mCherry in *N. benthamiana* leaves. Leaves were observed by confocal microscopy four to five days post-infiltration. Fluorescence generated from BiFC concomitant with that from mCherry was generally observed in 30 to 50% of the cells in the infiltrated area. A slightly longer incubation period than normal was required to observe the fluorescence emitted by PABP-mCherry, but the general localisation pattern was similar to that observed with PABP2-GFP after two days (compare with Fig. 2B and C). As expected, the green fluorescence emitted by the complementation between VPg-Pro-ctGFP and ntGFP-eIF(iso)4E was observed in the nucleolus. This structure was also characterized by the presence of a red fluorescence emitted by PABP2-mCherry, although PABP2 was also observed in the cytoplasm (Fig. 2H and I). Control experiments with VPg-Pro-ctGFP and ntGFP, or with ctGFP and ntGFP-eIF(iso)4E showed no fluorescence (Beauchemin *et al.*, 2007).

An ELISA-based binding assay has been used to show *in vitro* interaction of PABP2 or eIF(iso)4E with VPg-Pro from TuMV (Léonard *et al.*, 2004). Here, this assay was used to determine if both initiation factors can bind simultaneously VPg-Pro. Recombinant HIS-tagged PABP2 and T7-tagged eIF(iso)4E from *A. thaliana* were purified from *E. coli* by metal chelating or cap-binding chromatography, respectively. ELISA plate wells were then coated with VPg-Pro and were incubated with increasing concentrations of T7-tagged eIF(iso)4E in the absence or in the presence of a saturating binding concentration of HIS-tagged PABP2, or vice versa. Complex retention was detected using either an anti-T7-tag or anti-HIS-tag antibody. Fig. 3A shows a saturation binding curve of VPg-Pro with eIF(iso)4E. A similar saturation curve was obtained when 1,6 µg of PABP2 was added to all concentrations of eIF(iso)4E. PABP2 was retained in

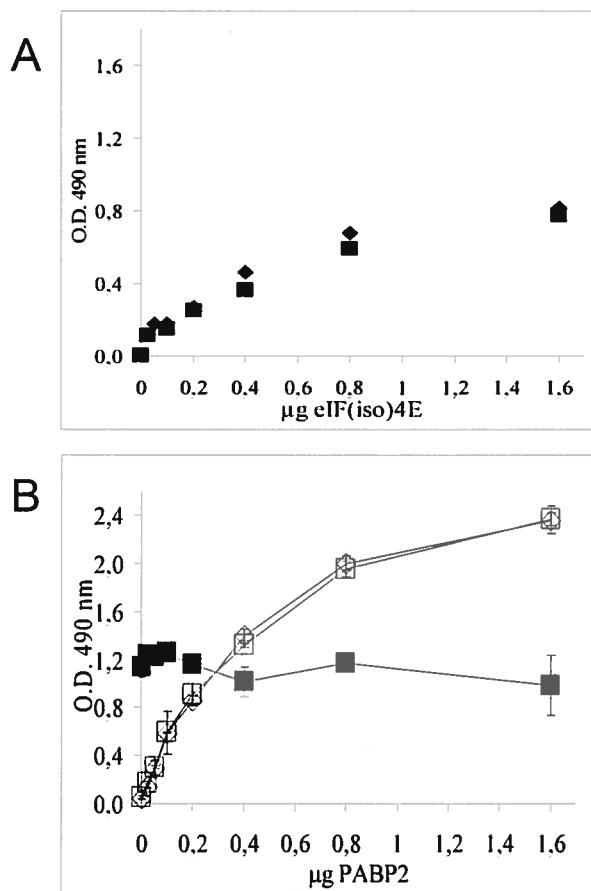


Figure 3 : VPg-Pro interaction with PAPB2 and eIF(iso)4E of *A. thaliana* as demonstrated by ELISA-based binding assay.

A) Wells were coated with 1.0 μg purified VPg-Pro and then incubated with increasing concentrations of purified T7-tagged eIF(iso)4E with 1.6 μg (■) or without (◆) His-tailed PAPB2. Retention of the complex was detected using anti-T7-tag (filled symbols) or anti-HIS (open symbols) antibodies. B) Wells were coated with 1.0 μg purified VPg-Pro and then incubated with increasing concentrations of purified His-tailed PAPB2 with 1.6 μg (■) or without (◆) T7-tagged eIF(iso)4E. Retention of the complex was detected using anti-T7-tag (filled symbols) or anti-HIS (open symbols) antibodies. Values are means of four replicates from a typical experiment. Error bars represent the standard deviation.

the wells by VPg-Pro because a constant signal was detected with the anti-HIS-tag antiserum. Control experiment using GST, metal-chelation or cap-binding-purified *E. coli* lysate containing pET-21b showed that the interaction with VPg-Pro was specific for the initiation factors (data not shown) (Léonard *et al.*, 2004; Wittmann *et al.*, 1997). Similar results were obtained when ELISA plate wells were coated with VPg-Pro and were then incubated with increasing concentrations of HIS-tagged PABP2 in the absence or with a constant saturating concentration of T7-tagged eIF(iso)4E (Fig 3B). eIF(iso)4E was also retained in the wells by VPg-Pro. This experiment then indicates that both PABP2 and eIF(iso)4E are not binding inhibitors of each other and that the VPg-Pro interaction domains are sufficiently far apart from each other so that both translation factors can bind simultaneously the viral protein. The above observations then suggest that a tri-molecular complex made up of PABP2, eIF(iso)4E and VPg-Pro can take place in the nucleolus of TuMV infected plants.

Membrane association of PABP2 in the presence of 6K-VPg-Pro.

6K-VPg-Pro was previously shown to induce the formation of cytoplasmic vesicles in which took place the interaction with eIF(iso)4E (Beauchemin *et al.*, 2007). To determine whether the membrane association of PABP2 during TuMV infection resulted from the formation of these vesicles, 6K-VPg-Pro-GFP was co-expressed with PABP2-mCherry in *N. benthamiana*. Leaves were observed by confocal microscopy four to five days post-infiltration. The fluorescence produced by PABP2-mCherry was observed throughout the cytoplasm but showed a similar emission pattern where green fluorescence produced by 6K-VPg-Pro was observed (Fig. 4A and B). Similarly, fluorescence produced by eIF(iso)4E-DsRed was observed throughout the cytoplasm but showed similar emission pattern where green fluorescence produced by 6K-VPg-Pro was observed (data not shown). The possibility of a tripartite complex between 6K-VPg-Pro, eIF(iso)4E and PABP2 in these vesicles was investigated using a combination of BiFC and colocalisation experiments. 6K-VPg-Pro was fused to the C-terminus of GFP (6K-VPg-Pro-ctGFP) and eIF(iso)4E fused to the N-terminus of the GFP (ntGFP-eIF(iso)4E) and were co-expressed with PABP2-mCherry in *N. benthamiana* leaves. Four to five days post-infiltration, leaves were observed by confocal microscopy. As expected, the green

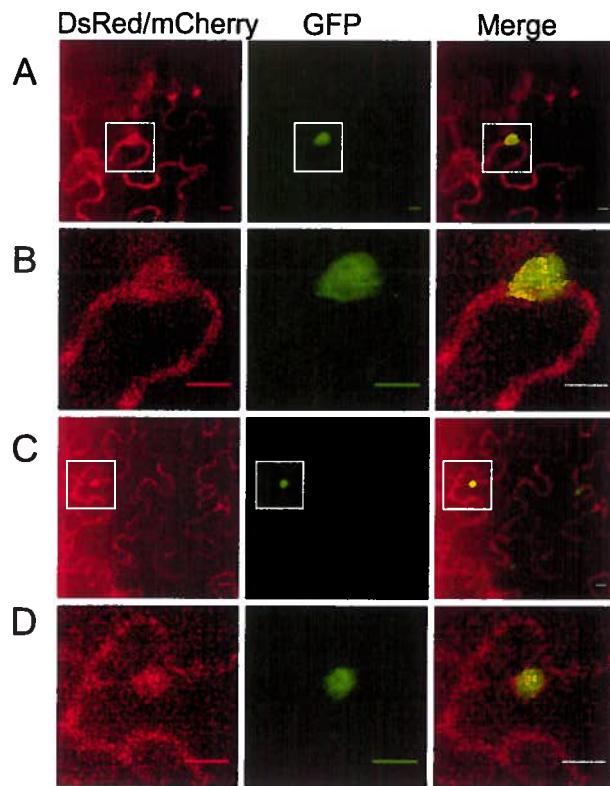


Figure 4 : Subcellular localization of eIF(iso)4E, PABP2 and 6K-VPg-Pro.

N. benthamiana leaves were infiltrated with *A. tumefaciens*, and expression of fluorescent proteins was visualized by confocal microscopy 4 to 5 days later. *A. tumefaciens* suspensions contained binary Ti plasmids encoding PABP2-mCherry and 6K-VPg-Pro-GFP (A and B), or PABP2-mCherry, ntGFP-eIF(iso)4E and 6K-VPg-Pro-ctGFP GFP (C and D). Left panels show fluorescence emitted by the red channel only while middle panels show fluorescence emitted by the green channel only; and right panels show the merge between the red and green channels. Panels B and D are a close-up view of the square depicted in panels A and C, respectively. Bar, 10 μ m.

fluorescence emitted by the complementation between 6K-VPg-Pro-ctGFP and ntGFP-eIF(iso)4E was observed in vesicles. This structure was also characterized by the presence of a red fluorescence emitted by PABP2-mCherry (Fig. 4C and D). Control experiments with 6K-VPg-Pro-ctGFP and ntGFP, or with ctGFP and ntGFP-eIF(iso)4E showed no fluorescence (Beauchemin *et al.*, 2007). These experiments then indicate that 6K-VPg-Pro might be responsible for the membrane association of PABP2 during TuMV infection and that a tri-molecular complex made up of 6K-VPg-Pro, eIF(iso)4E and PABP2 likely takes place in virus-induced vesicles.

Characterization of the association of PABP with membranes in TuMV infected cells

The presence of PABP2 in P30 fractions of TuMV-infected leaves may result from true membrane association or simply protein aggregation. To distinguish between these two possibilities, a membrane flotation assay was used (Zhang *et al.*, 2005). The membrane-enriched fraction (P30) was overlaid with a sucrose step gradient and subjected to centrifugation. Low-density membranes and proteins associated with these membranes float to the upper part of the gradient while soluble proteins or aggregated proteins remain at the bottom. We used BiP (an endogenous ER luminal protein) (Collis *et al.*, 1992) and 6K-VPg-Pro as membrane-associated protein controls. As shown in Fig. 5, BiP (panel A), 6K-VPg-Pro and VPg-Pro (panel B) rose towards the top of the gradient (fractions 8 and 9), indicating their membrane association. Detection of BiP in fractions 1 and 2 is likely the result of leakage from the ER lumen. Likewise, PABP2 was found in fractions 8 and 9 (panel C), confirming that it was membrane-associated. PABP2 was also detected at high level in fractions 1 and 2 and less so in fractions 3 to 7, and likewise may be the result of vesicle leakage during centrifugation (see below).

To further characterise the type of membranes to which PABP2 was associated, TuMV-infected membrane-enriched fractions (P30) were analyzed on a 20 to 45% sucrose gradient. 6K-VPg-Pro and VPg-Pro were found at the bottom of the gradient (Fig. 6A, fractions 1 to 5) where it was previously shown to contain ER membranes (Léonard *et al.*, 2002). Distribution of RdRp was found in the same fractions as for 6K-VPg-Pro

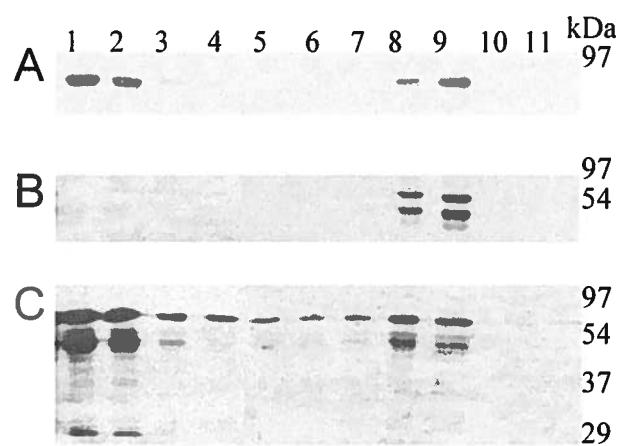


Figure 5 : Membrane flotation assays.

P30 fractions were used. Fractions were collected from the step sucrose gradient, and proteins present in each collected fraction were separated by SDS-PAGE (12%) and immunodetected with the anti-BiP (A), VPg-Pro (B) and PABP2 (C) antibodies.

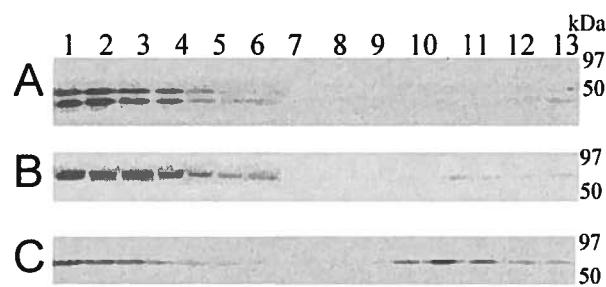


Figure 6 : Detection of proteins in membrane fractions following centrifugation in sucrose gradient.

P30 fraction was prepared and centrifuged on 20–45% sucrose density gradients. The direction of sedimentation was from right to left, with fraction 15 representing the top of the gradient. Fractions were collected and proteins separated by SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose and immunoblot analysed using anti-VPg-Pro (A), anti-RdRp (B) or anti-PABP2 serum (C).

(panel B). This would indicate the position of the replication complex vesicles in the sucrose gradient. PABP2 was also detected in fractions 1-5 (panel C), indicating that the protein was associated with the ER membranes, or ER-derived vesicles associated with replication complexes. A second peak of PABP2 was detected in fractions 11 to 15, corresponding to soluble protein fractions, and would indicate that PABP2 leakage from the vesicles took place during the centrifugation. Co-fractionation of PABP2 with 6K-VPg-Pro in the sucrose gradient suggests that the host protein might be associated with the vesicles induced by 6K-VPg-Pro through its association with the viral protein. VPg-Pro has an intrinsic capacity to bind to nickel–agarose resin, the presence of a histidine tail being unnecessary and the binding to the resin being mediated by the VPg domain (Menard *et al.*, 1995). Purification of 6K-VPg-Pro and VPg-Pro by metal chelation chromatography was thus attempted and the co-purification of PABP2 evaluated. For TuMV-infected and mock-inoculated tissues, solubilised membrane fraction was loaded on to a nickel–agarose column. After washing the resin, the bound proteins were eluted with 100 mM imidazole and analysed by immunoblot assay following SDS-PAGE. Fig. 7A shows that both 6K-VPg-Pro and VPg-Pro were effectively purified from infected tissues. Similarly, PABP2 were detected in the eluted protein fraction when the column was loaded with the membrane fractions from TuMV-infected leaves (Fig. 7B). The translation factor was not detected in the eluted protein fraction when membrane fractions from mock-inoculated plants were analysed, even after prolonged film exposure (Fig. 7B and data not shown). PABP by itself is not purified by metal chelation chromatography (Léonard *et al.*, 2004). This experiment, combined with the confocal microscopy data, indicates that PABP2 is associated with 6K-VPg-Pro-induced vesicles.

To determine the nature of PABP2 association with the vesicles, P30 fractions were extracted with different agents known to dislodge peripheral or luminal membrane proteins. Treatment with 1,0 M KCl solubilises peripheral proteins, while integral and luminal proteins remain associated with the membranes (Sankaram *et al.*, 1994). Under high-pH conditions (0,1 M Na₂CO₃, pH 10,5), membrane vesicles are converted to open membrane sheets, allowing the release of peripheral and luminal proteins but not of integral membrane proteins (Howell et Palade, 1982). After treatment with the various

agents, the membranes were collected by centrifugation and analyzed by immunoblotting. The immunoblots were probed with antibodies against VPg-Pro, RdRp, PABP2 and BiP (a soluble ER luminal protein) (Fig. 8). As expected, the 6K-VPg-Pro remained associated with the membrane pellet following extraction with 0,1 M Na₂CO₃ (pH 10,5) and 1 M KCl. In contrast, the luminal BiP protein, RdRp, PABP2 and a population of VPg-Pro were released in the supernatant after treatment with 0,1 M Na₂CO₃ (pH 10,5) but remained in the pellet after treatment with 1 M KCl. These results suggest that RdRp, PABP2 and VPg-Pro are luminal proteins of the 6K-VPg-Pro-induced vesicles.

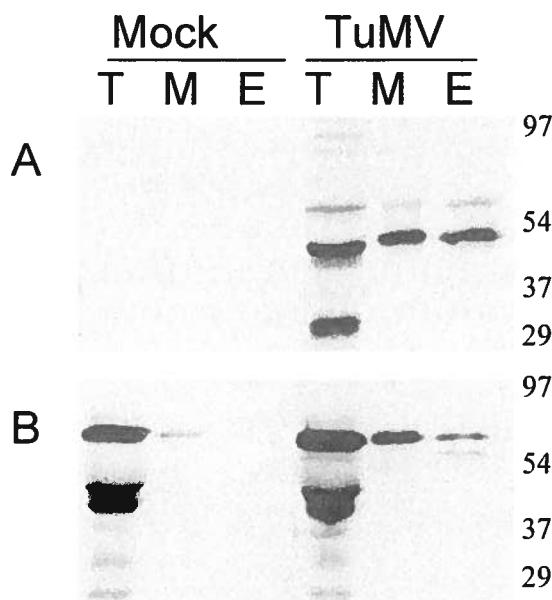


Figure 7 : Co-purification of 6K-VPg-Pro/VPg-Pro and PABP2 by metal chelation chromatography.

Membrane fractions were solubilised by the addition of 40 mM of OG and loaded on to a column containing 0.4 ml nickel-agarose resin. Proteins were eluted with 100 mM imidazole. Total (T), membrane-associated (M) and eluted (E) proteins from mock-inoculated and TuMV-infected *B. perviridis* plants were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose. The membrane was probed using (A) anti-VPg-Pro and (B) anti-PABP2 sera.

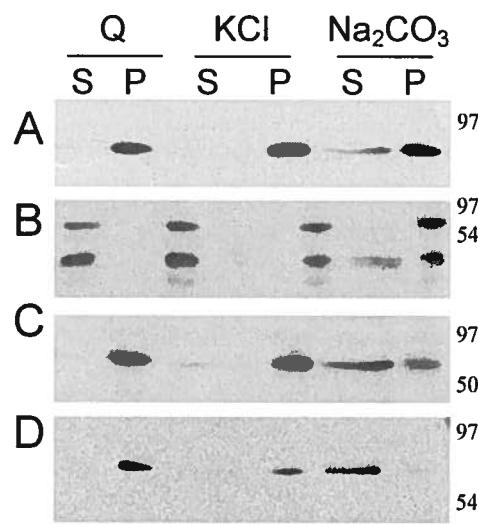


Figure 8 : Biochemical treatments of membrane-enriched fractions derived from TuMV-infected *B. perviridis*.

Membrane-enriched (P30) fractions were treated with homogenization buffer (Q), 1 M KCl or 0.1 M Na₂CO₃ (pH 10.5) for 30 min at 4°C. After separation of membrane-bound (P) and soluble (S) proteins, the presence of BiP (A), VPg-Pro (B), RdRp (C) and PABP2 (D) in these fractions was revealed by immunoblotting with the respective serum.

Discussion

In this report, we have observed that the intracellular distribution of PABP2 was altered in TuMV-infected *B. perviridis* cells. In healthy plants, PABP2 was mostly soluble and was excluded from the nucleus. However, in TuMV-infected plants, PABP2 was also found in cytoplasmic virus-induced vesicles and in the nucleolus. Co-expression experiments suggested that PABP2 redistribution in these compartments was the result of its interaction with 6K-VPg-Pro and VPg-Pro, respectively. This redistribution of an important translation initiation factor to the nucleolus and to membrane structures likely underlies two important processes in the TuMV replication cycle.

The first process may be perturbation of cellular functions by the virus in order to take over cellular machineries necessary for replication. Although positive-sense RNA viruses replicate in the cytoplasm, there are several examples of proteins from such viruses that have been found in the nucleus, often in the nucleolus, or that transit through the nuclear pore complex to enter and exit the nucleus [for reviews, see references (Hiscox, 2003; Hiscox, 2007)]. For instance, Schaad *et al.* (Schaad *et al.*, 1996) have observed the localisation of the Tobacco etch virus VPg-Pro in the nucleolar region and shown that the inhibition of nuclear import of the viral protein prevented virus replication. The nucleolus is the site of transcription of rRNA, processing of pre-rRNAs and biogenesis of preribosomal particles. Additionally, the nucleolus is involved in stress response, cell cycle regulation and gene silencing (Mayer et Grummt, 2005). The interaction of RNA viruses with the nucleolus could be to disrupt nucleolar function or to recruit nucleolar proteins to aid in virus replication.

There are two classes of PABP (Mangus *et al.*, 2003). One class is primarily nuclear and plays a role in the synthesis of poly(A) tails, but it also shuttles between the nucleus and the cytoplasm. The other class consists of primarily cytoplasmic PABPs. This latter class influences mRNA translation and decay, and it also shuttles between the nucleus and cytoplasm. A recent study has shown that mammalian PABPC1, a class 2 member, can bind nuclear pre-mRNA poly(A) tails (Hosoda *et al.*, 2006). This protein

may then have a role to play in pre-mRNA processing and stability and mRNA trafficking and nonsense-mediated mRNA decay. There are nine different gene families coding for PABPs in *A. thaliana*. PABP2 transcripts are the most abundant (Palanivelu *et al.*, 2000a). In this study, it was found that PABP2 is mostly a cytoplasmic soluble protein, thus categorising it as a class 2 PABP. However, in infected cells, or in the presence of VPg-Pro, a significant amount of it is redistributed to the nucleolus. A similar phenomenon was observed with eIF(iso)4E (Beauchemin *et al.*, 2007), and it appears that VPg-Pro could bind the two proteins simultaneously, as demonstrated by the *in vitro* binding experiments and co-localisation coupled with BiFC experiments. Similarly to PABP, eIF(iso)4E has been proposed to regulate mRNA export from the nucleus and may be required for proofreading of transcripts before they are transported to the cytoplasm (Strudwick et Borden, 2002; von der Haar *et al.*, 2004). Consequently, nuclear/ nucleolar interaction of VPg-Pro with eIF(iso)4E and PABP2 may perturb the (transient?) nuclear functions of these factors. This possibility may then explain the host gene shutoff that has been observed in the potyvirions Pea seedborne mosaic virus-infected cells (Wang et Maule, 1995). Additionally, VPg is involved into long-distance transport of potyviruses (Dunoyer *et al.*, 2004; Schaad *et al.*, 1997b). Recently, it was shown for umbraviruses that nucleolar localisation of the viral transport protein was required for its function (Kim *et al.*, 2007). Similar considerations could then be applicable for VPg.

The second process that may be regulated by the interaction of VPg-Pro with PABP and eIF(iso)4E is coupling viral translation with viral RNA synthesis. During replication in their host cells, positive-strand RNA viruses provoke membrane proliferation and modification that result in the formation of membrane-bound virus replication complexes (Mackenzie, 2005). This reorganization is induced by viral protein(s). For instance, brom mosaic virus helicase-like protein 1a induces the formation of spherular endoplasmic reticulum membrane invaginations (Schwartz *et al.*, 2004). Similarly, tomato bushy stunt virus replication protein p33 causes the formation of peroxisomal ghosts (McCartney *et al.*, 2005). These novel organelles have been shown to contain virus replication proteins. These virus-induced vesicles would provide a protective environment against host factors that might degrade viral RNA (e.g. RNases)

and optimal conditions for RNA synthesis. In the case of potyviruses, the 6K2 polypeptide is responsible for the formation of ER-derived vesicles (Schaad *et al.*, 1997a), which can reach a size of 10 μ m in diameter (Beauchemin *et al.*, 2007). It is through the fusion with this polypeptide that VPg-Pro (i.e. 6K-VPg-Pro) is membrane bound and can act as an anchoring point for other proteins, such as the viral RdRP as well as translation factors such as eIF(iso)4E and PABP2 [(Beauchemin *et al.*, 2007) and this study]. The interaction of 6K-VPg-Pro with translation factors within virus-induced vesicles suggests that there might be a physical connection between viral translation and RNA synthesis. A tight link exists between virus translation and replication. In the case of poliovirus, positive-strand RNA and newly synthesised viral proteins are initially dispersed throughout the ER during the earliest steps of the virus replication cycle. But as translation progresses, individual poliovirus vesicle clusters emerge at the ER, coalesce and mature into perinuclear fully active replication complexes (Egger et Bienz, 2005). Egger *et al* (Egger *et al.*, 2000) showed that the formation of the replication complexes was formed in *cis*, in a coupled process that involves viral translation, membrane modification, vesicle budding and viral RNA synthesis. This is in agreement with reports that viral RNA must first be translated in order to replicate (Novak et Kirkegaard, 1994), and also with the suggestion that all components of the replication complex are delivered en bloc directly following translation (Collis *et al.*, 1992; Towner *et al.*, 1998). The fate of the protein synthesis machinery during the formation and maturation of the vesicles into replication complex organelles has not yet been addressed. One possibility is that ribosomes and translation factors remain associated with the endoplasmic reticulum. This implies that at one point viral translation terminates and that viral RNAs disengage from the ribosomes and become trapped within the virus-induced vesicles via specific interaction with RNA-binding replication protein(s). The other possibility is that the protein synthesis machinery is internalised within the vesicles during their formation. As a consequence translation factors are expected to be membrane-associated. This is what has been observed for PABP2 during TuMV infection. This protein is mostly soluble in healthy plants. However, in infected cells, a significant proportion is membrane associated (as demonstrated by the membrane flotation and sucrose gradient experiments), and appears to be a luminal protein (as demonstrated by the Na₂CO₃

extraction experiment) of 6K-VPg-Pro-induced vesicles (as observed in the confocal microscopy experiments). Co-localisation experiment coupled with BiFC has also shown these same vesicles that contain PABP2 also include eIF(iso)4E. Presence of at least two translation initiation factors within 6K-VPg-Pro-induced vesicles thus points to hypothesis that the protein synthesis machinery is trapped during the formation of these vesicles. Similarly, eIF3 and eEF1A have been shown to co-purified with active replication complexes of BMV and TMV. However, it is not known if viral RNA translation is proceeding in these vesicles. It is also plausible that PABP2 is needed to initiate replication of the viral RNA with the vesicles. This possibility is supported by the interaction of PABP with the potyviral RdRP (Wang *et al.*, 2000).

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. We are grateful to Marcel Desrosiers for help with the confocal microscope, A. Vitale for the anti-BiP serum, M. Echeverría for AtFibrillarin2-GFP, R. Tsien for mCherry and H. Sanfaçon for the generous gift of ER-dsRed2. We finally thank H. Sanfaçon and K. A White for critically reading the manuscript.

References

- Alvarez, E., Castello, A., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2006). HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J* **396**(2), 219-26.
- Barneche, F., Steinmetz, F., and Echeverria, M. (2000). Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **275**(35), 27212-20.
- Beauchemin, C., Boutet, N., and Laliberté, J. F. (2007). Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of turnip mosaic virus, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in *Planta*. *J Virol* **81**(2), 775-82.

- Collis, P. S., O'Donnell, B. J., Barton, D. J., Rogers, J. A., and Flanegan, J. B. (1992). Replication of poliovirus RNA and subgenomic RNA transcripts in transfected cells. *J Virol* 66(11), 6480-8.
- Connor, J. H., and Lyles, D. S. (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* 76(20), 10177-87.
- Daros, J. A., Schaad, M. C., and Carrington, J. C. (1999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (N1a) and RNA polymerase (N1b) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J Virol* 73(10), 8732-40.
- Dunoyer, P., Thomas, C., Harrison, S., Revers, F., and Maule, A. (2004). A cysteine-rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *J Virol* 78(5), 2301-9.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., and Robaglia, C. (2002). The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* 32(6), 927-34.
- Egger, D., and Bienz, K. (2005). Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *J Gen Virol* 86(Pt 3), 707-18.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., and Bienz, K. (2000). Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 74(14), 6570-80.
- Gallie, D. R. (2002). Protein-protein interactions required during translation. *Plant Mol Biol* 50(6), 949-70.
- Gaudino, R. J., and Pikaard, C. S. (1997). Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 272(10), 6799-804.
- Guo, D., Rajamaki, M. L., Saarma, M., and Valkonen, J. P. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* 82(Pt 4), 935-9.
- Haghigiat, A., Svitkin, Y., Novoa, I., Kuechler, E., Skern, T., and Sonenberg, N. (1996). The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase. *J Virol* 70(12), 8444-50.
- Han, S., and Sanfacon, H. (2003). Tomato ringspot virus proteins containing the nucleoside triphosphate binding domain are transmembrane proteins that associate with the endoplasmic reticulum and cofractionate with replication complexes. *J Virol* 77(1), 523-34.

- Herold, J., and Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**(3), 581-91.
- Hiscox, J. A. (2003). The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus Res* **95**(1-2), 13-22.
- Hiscox, J. A. (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* **5**(2), 119-27.
- Hosoda, N., Lejeune, F., and Maquat, L. E. (2006). Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. *Mol Cell Biol* **26**(8), 3085-97.
- Howell, K. E., and Palade, G. E. (1982). Hepatic Golgi fractions resolved into membrane and content subfractions. *J Cell Biol* **92**(3), 822-32.
- Kang, B. C., Yeam, I., Frantz, J. D., Murphy, J. F., and Jahn, M. M. (2005). The pvr1 locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J* **42**(3), 392-405.
- Kentsis, A., Dwyer, E. C., Perez, J. M., Sharma, M., Chen, A., Pan, Z. Q., and Borden, K. L. (2001). The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *J Mol Biol* **312**(4), 609-23.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Ray, S., Natsuaki, T., Suehiro, N., and Goss, D. J. (2006). Interaction of genome-linked protein (VPg) of turnip mosaic virus with wheat germ translation initiation factors eIFiso4E and eIFiso4F. *J Biol Chem* **281**(38), 28002-10.
- Kim, S. H., Ryabov, E. V., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J. W., and Taliansky, M. (2007). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *Embo J* **26**(8), 2169-79.
- Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K. O., Green, K. Y., and Lloyd, R. E. (2004a). Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J Virol* **78**(15), 8172-82.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Joachims, M., and Lloyd, R. E. (2002). Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J Virol* **76**(5), 2062-74.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Van Eden, M. E., Younan, P., and Lloyd, R. E. (2004b). Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol Cell Biol* **24**(4), 1779-90.

- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol* **12**(12), 1046-51.
- Léonard, S., Chisholm, J., Laliberté, J. F., and Sanfacon, H. (2002). Interaction in vitro between the proteinase of Tomato ringspot virus (genus Nepovirus) and the eukaryotic translation initiation factor iso4E from *Arabidopsis thaliana*. *J Gen Virol* **83**(Pt 8), 2085-9.
- Léonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberté, J. F. (2004). Interaction of VPg-Pro of turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J Gen Virol* **85**(Pt 4), 1055-63.
- Mackenzie, J. (2005). Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* **6**(11), 967-77.
- Mangus, D. A., Evans, M. C., and Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* **4**(7), 223.
- Mayer, C., and Grummt, I. (2005). Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle* **4**(8), 1036-8.
- McCartney, A. W., Greenwood, J. S., Fabian, M. R., White, K. A., and Mullen, R. T. (2005). Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* **17**(12), 3513-31.
- Menard, R., Chatel, H., Dupras, R., Plouffe, C., and Laliberte, J. F. (1995). Purification of turnip mosaic potyvirus viral protein genome-linked proteinase expressed in *Escherichia coli* and development of a quantitative assay for proteolytic activity. *Eur J Biochem* **229**(1), 107-12.
- Michel, Y. M., Borman, A. M., Paulous, S., and Kean, K. M. (2001). Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Mol Cell Biol* **21**(13), 4097-109.
- Michon, T., Estevez, Y., Walter, J., German-Retana, S., and Le Gall, O. (2006). The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *Febs J* **273**(6), 1312-22.
- Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., Ohmori, T., and Natsuaki, T. (2006). Binding analyses for the interaction between plant

- virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie* **88**(3-4), 329-40.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., and Jacquemond, M. (2004). Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in Capsicum annuum and Lycopersicon hirsutum. *Mol Plant Microbe Interact* **17**(3), 322-9.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C., and LeGall, O. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol* **132**(3), 1272-82.
- Nicolas, O., Dunnington, S. W., Gotow, L. F., Pirone, T. P., and Hellmann, G. M. (1997). Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology* **237**(2), 452-9.
- Novak, J. E., and Kirkegaard, K. (1994). Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes Dev* **8**(14), 1726-37.
- Palanivelu, R., Belostotsky, D. A., and Meagher, R. B. (2000). Arabidopsis thaliana poly (A) binding protein 2 (PAB2) functions in yeast translational and mRNA decay processes. *Plant J* **22**(3), 187-98.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., and Maule, A. J. (1999). New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 367-376.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J* **32**(6), 1067-75.
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A., and Caranta, C. (2006). Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *J Gen Virol* **87**(Pt 7), 2089-98.
- Sankaram, M. B., Marsh, D., Giersch, L. M., and Thompson, T. E. (1994). Reorganization of lipid domain structure in membranes by a transmembrane peptide: an ESR spin label study on the effect of the Escherichia coli outer membrane protein A signal peptide on the fluid lipid domain connectivity in binary mixtures of dimyristoyl phosphatidylcholine and distearoyl phosphatidylcholine. *Biophys J* **66**(6), 1959-68.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J., and Carrington, J. C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus Nla protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* **273**(2), 300-6.

- Schaad, M. C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S., and Carrington, J. C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (Nla) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* **70**(10), 7039-48.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E., and Carrington, J. C. (1997a). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* **16**(13), 4049-59.
- Schaad, M. C., Lellis, A. D., and Carrington, J. C. (1997b). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* **71**(11), 8624-31.
- Schwartz, M., Chen, J., Lee, W. M., Janda, M., and Ahlquist, P. (2004). Alternate, virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(31), 11263-8.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**(12), 1567-72.
- Shi, S. T., and Lai, M. M. (2005). Viral and cellular proteins involved in coronavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 95-131.
- Sonenberg, N., and Dever, T. E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**(1), 56-63.
- Strudwick, S., and Borden, K. L. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* **70**(1), 10-22.
- Svitkin, Y. V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H. D., and Sonenberg, N. (2001). Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA* **7**(12), 1743-52.
- Towner, J. S., Mazanet, M. M., and Semler, B. L. (1998). Rescue of defective poliovirus RNA replication by 3AB-containing precursor polyproteins. *J Virol* **72**(9), 7191-200.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N., and Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* **74**(15), 7064-71.
- von der Haar, T., Gross, J. D., Wagner, G., and McCarthy, J. E. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* **11**(6), 503-11.

- Wang, D., and Maule, A. J. (1995). Inhibition of Host Gene Expression Associated with Plant Virus Replication. *Science* **267**, 229-231.
- Wang, X., Ullah, Z., and Grumet, R. (2000). Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology* **275**(2), 433-43.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**(1), 84-92.
- Zhang, S. C., Zhang, G., Yang, L., Chisholm, J., and Sanfacon, H. (2005). Evidence that insertion of Tomato ringspot nepovirus NTB-VPg protein in endoplasmic reticulum membranes is directed by two domains: a C-terminal transmembrane helix and an N-terminal amphipathic helix. *J Virol* **79**(18), 11752-65.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Nos travaux ont mis en évidence deux phénomènes distincts dans des cellules infectées au TuMV : la séquestration de facteurs de traduction dans le noyau/nucléole et leur présence dans des vésicules cytoplasmiques. Ce dernier cas indique une possible relation physique entre la traduction et la réplication des potyvirus. Ces deux événements sont orchestrés par les précurseurs de la VPg, soit VPg-Pro et 6K-VPg-Pro respectivement.

Les virus à ARN ont une relation importante avec le noyau, et souvent avec le nucléole. Même si le cycle de multiplication de ces virus se déroule dans le cytoplasme, certaines de leurs protéines sont accumulées dans le noyau/nucléole (Hiscox, 2007). Cette présence de protéines virales dans le noyau/nucléole n'est généralement pas le résultat d'une diffusion passive à travers les pores nucléaires. En fait, il a été montré que plusieurs protéines virales, principalement les protéines de la capsid et de liaison aux ARN, possèdent des séquences de localisation nucléaire (NLS) et parfois même nucléolaire (NoLS). Ces protéines virales peuvent aussi parfois être transportées dans le nucléole par la liaison à des protéines cellulaires, comme la nucléoline (Hiscox, 2007 ; Hiscox *et al.*, 2001 ; Dove *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2002) ou B23.1 (Hiscox, 2007 ; Tsuda *et al.*, 2006). Ceci indique que les virus ont développé des fonctions nucléaires/nucléolaires qui semblent être nécessaires pour l'infection. Par exemple, la modification d'un acide aminé dans la séquence de la protéine non-structurale nsP2 du Semliki Forest virus perturbe sa localisation nucléolaire et en conséquence réduit sa neurovirulence (Fazakerley *et al.*, 2002). Ainsi, l'interruption de la circulation nucléaire et nucléolaire de protéines virales affecte leur pathogénicité.

Un rôle possible des protéines nucléaires/nucléolaires des virus à ARN est de perturber les fonctions normales de la cellule. La présence des protéines 2A et 3BCD des picornavirus dans le nucléole en est un bon exemple. Leur action dans le noyau des cellules infectées semble contrôler la transcription des ARNr et ARNm cellulaires (Aminev *et al.*, 2003a; Aminev *et al.*, 2003b). Ainsi, ces protéines du EMCV interrompent la synthèse des ARNm cellulaires conduite par la polymérase II. Dans le nucléole, il a été spéculé que 2A déclenche la synthèse en continue des ARNr et s'intègre

dans les sous-unités ribosomales nouvellement synthétisées (Aminev *et al.*, 2003a). Ces ribosomes modifiés auraient une préférence pour la traduction IRES-dépendante des ARN viraux, inhibant ainsi la traduction des ARNm cellulaires (Groppo et Palmenberg, 2007). Il a aussi été montré que 3C^{pro} ou son précurseur 3CD du rhinovirus humain-16 et du poliovirus affectent plus drastiquement la synthèse des ARNr en inhibant la fonction des polymérases I et III. Ces protéines virales seraient aussi responsables du clivage du facteur de transcription OCT-1 impliqué dans la synthèse des ARNm cellulaires (Aminev *et al.*, 2003a; Aminev *et al.*, 2003b). De plus, il a été observé que le nucléole des cellules infectées au poliovirus et au rhinovirus devient diffus et se désassemble. L'action de 2A et 3BCD dans le noyau résulterait entre autre à l'inhibition de l'expression des gènes cellulaires et, en conséquence, de la synthèse protéique de la cellule hôte, un phénomène largement répandu chez les virus.

Un deuxième rôle attribué à certaines protéines virales est de perturber la circulation nucléo-cytoplasmique. L'inhibition de l'import nucléaire est probablement une tactique répandue parmi les virus à ARN positif. Il a été montré que plusieurs protéines nucléaires sont relocalisées dans le cytoplasme de cellules infectées au poliovirus, au coxsackievirus B3, au virus de l'hépatite de la souris (coronavirus), au virus de l'hépatite C (HCV) et au virus à ARN négatif de la stomatite vésiculeuse (VSV) par exemple (Belov *et al.*, 2000; Gustin, 2003; Gustin et Sarnow, 2001; Gustin et Sarnow, 2002). Pour poliovirus, ce phénomène serait dû à la dégradation des nucléoporines Nup153 et p62 entre autre (Gustin et Sarnow, 2002). Ces nucléoporines sont des composantes du complexe du pore nucléaire (NPC). Leur protéolyse pendant une infection au poliovirus corrèle avec l'incapacité de cargos contenant un NLS classique de s'arrimer au NPC et d'être transporté dans le noyau. Certaines protéines nucléaires accumulées ainsi dans le cytoplasme sont alors vraisemblablement recrutées pour servir à la traduction, l'amplification ou encore l'encapsidation du génome viral. Parmi les plus connues, le facteur nucléaire Sam68 (Src-associated in mitosis, 68 kDa) interagit avec la polymérase virale 3D^{pol} de poliovirus et se retrouve dans les membranes où la réPLICATION de l'ARN a lieu (McBride *et al.*, 1996). Aussi, l'autoantigène La augmente la traduction de l'ARN viral par son interaction avec l'IRES de poliovirus et du HCV (Meerovitch *et*

al., 1989). De plus, la nucléoline participe dans les événements précoce de la synthèse d'ARN de poliovirus (Waggoner et Sarnow, 1998). Cette dernière protéine nucléolaire peut lier l'IRES de poliovirus et du HCV pour stimuler la traduction de leur ARN viral. Elle serait également impliquée dans la régulation de la synthèse du brin négatif en se liant au 3'NTR de poliovirus (Izumi *et al.*, 2001; Waggoner et Sarnow, 1998). Ces protéines cellulaires ont la propriété de lier l'ARN et performent normalement diverses fonctions dans le métabolisme de l'ARN, incluant la synthèse, le traitement, la stabilité, le transport et la traduction des ARN cellulaires (Gustin et Sarnow, 2006).

Pour le virus de la rosette de l'arachide (groundnut rosette virus, GRV), un umbravirus, la stratégie diffère du poliovirus pour arriver à une fin similaire : relocaliser des protéines nucléaires dans le cytoplasme (Kim *et al.*, 2007). La protéine du cadre de lecture 3 (ORF3) du GRV est importée dans le noyau, où elle se localise avec les corps de cajal (« cajal bodies »). Ces corps nucléaires sont en étroite relation avec le nucléole et d'autres structures nucléaires. La protéine de l'ORF3 cible et réorganise les corps de cajal pour promouvoir leur fusion avec le nucléole. Cette action de l'ORF3 dans le noyau est requise pour la formation des complexes ribonucléoprotéiques et, conséquemment, de la propagation longue-distance des particules virales. Il a été noté qu'une protéine nucléaire, la fibrillarine, est alors redistribuée du nucléole et des corps de cajal vers le cytoplasme où elle fait partie des complexes ribonucléoprotéiques viraux. L'ORF3 serait responsable de la redistribution de la fibrillarine du nucléole vers le cytoplasme seulement si la protéine virale peut d'abord entrer dans le noyau/nucléole et ensuite en sortir vers le cytoplasme.

Une autre fonction suggérée de l'inhibition de l'importation nucléaire seraient de contourner les réponses antivirales. La séquestration de signaux de transduction dans le cytoplasme empêcherait ainsi la production de molécules antivirales, telles les interférons. Les protéines impliquées dans l'apoptose pourraient aussi être inhibées par cette stratégie virale (Gustin et Sarnow, 2001). Chez les plantes, la protection antivirale peut également être contournée et plusieurs stratégies existent. Pour le virus de la mosaïque du concombre (CMV), la protéine C2 contient une séquence de localisation nucléaire (Guo

et Ding, 2002). Son action prévient le « gene silencing post-transcriptionnel » (PTGS) en interférant directement avec le signal de silence mobile et la méthylation subséquente de l'ADN. Cette interférence est dépendante de la localisation nucléaire de C2.

Le cycle cellulaire peut également être influencé par plusieurs virus (Hiscox, 2006). En interagissant avec des protéines nucléaires/nucléolaires dans cet organite, comme par exemple la nucléoline, les virus peuvent arrêter le cycle cellulaire normal à la phase préférentielle afin de bénéficier de conditions optimales pour leur cycle de multiplication. La relation entre les virus et le noyau/nucléole cellulaire permet donc d'améliorer la traduction, la réPLICATION et l'empaquetage des virus, d'empêcher les fonctions normales du noyau et d'éviter la capacité de l'organisme à monter une réponse antivirale.

VPg-Pro et RdRp sont les deux protéines des potyvirus qui sont localisées dans le noyau grâce à un NLS. Il n'est pas connu comment VPg-Pro se dirige dans le nucléole, à savoir si elle possède un NoLS en plus du NLS, si elle s'y dirige par simple diffusion dans le nucléole à l'aide de son activité de liaison non-spécifique aux ARN ou si elle est transportée par une protéine nucléolaire. De plus, jusqu'à maintenant, aucune fonction n'a été reliée à leur présence dans cette organelle. La localisation nucléaire de VPg-Pro est cependant essentielle pour l'infectivité des potyvirus. Il est fort possible que, comme d'autres protéines virales, VPg-Pro dérange le fonctionnement normal du noyau/nucléole afin d'utiliser la machinerie cellulaire à son avantage. Il a d'ailleurs été montré que l'expression des gènes de l'hôte, et en conséquence l'accumulation protéique, était grandement diminuée durant l'infection au Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) (Wang et Maule, 1995). Les différentes fonctions qui lui ont été octroyées suggèrent quelques rôles possibles de la VPg-Pro dans le noyau/nucléole. Son activité protéinase pourrait notamment promouvoir le clivage de certaines protéines cellulaires qui possèdent la séquence spécifique du site de clivage. Ces protéines seraient impliquées dans la transcription, la traduction ou le transport nucléo-cytoplasmique par exemple. Aussi, VPg-Pro possède une activité DNase/RNase non spécifique (Anindya et Savithri, 2004). Ainsi, son importation dans le nucléole provoque possiblement un dérèglement dans la

population des ARNr qui y sont transcrits activement, ce qui mènerait à une diminution de la production des sous-unités ribosomales. À l'instar de C2 du CMV, la présence de VPg-Pro pourrait également contribuer à contourner l'effet du PTGS et ainsi favoriser la multiplication virale.

Nous avons aussi observé la relocalisation nucléolaire de deux facteurs de traduction importants, eIF(iso)4E et PABP2, durant l'infection au TuMV. Quoiqu'une population de eIF(iso)4E se retrouve déjà dans le noyau de cellules saines, en quantité similaire par rapport aux cellules infectées, elle est relocalisée dans le nucléole en interagissant directement avec VPg-Pro. Pour sa part, PABP2 est importée dans le noyau/nucléole par le précurseur de VPg puisqu'elle ne semble pas être présente dans cet organite de cellules non-infectées. Ces résultats suggèrent que VPg-Pro transporte PABP2 du cytoplasme vers le noyau, où la protéine virale interagit aussi avec eIF(iso)4E.

La séquestration de eIF(iso)4E et de PABP2 dans le nucléole par VPg-Pro doit certainement apporter des conséquences majeures à la cellule infectée. eIF4E possède des fonctions nucléaires où elle est impliquée dans l'épissage des pré-ARNm (Dostie *et al.*, 2000b) et le transport nucléo-cytoplasmique de certains ARNm cellulaires incluant la cycline D1 chez les mammifères (Culjkovic *et al.*, 2005). Si le facteur de traduction détient ces mêmes fonctions chez les végétaux, la diminution de la quantité de eIF(iso)4E dans le nucléoplasme pourrait résulter en une inhibition de la maturation des pré-ARNm. En conséquence, l'exportation des ARNm cellulaires du noyau vers le cytoplasme serait réduite et en bout de ligne la synthèse protéique de l'hôte serait inhibée. De même, la réduction de l'ARNm de la cycline D1 dans le cytoplasme pourrait mener en une modification du cycle cellulaire. La cycline D1 est un régulateur d'initiation de la progression de la phase G1 dans plusieurs types cellulaires (Hiscox, 2006). Une diminution dans sa production ralentit la croissance cellulaire et empêche la cellule de poursuivre son cycle vers la phase de réPLICATION de son ADN (phase S). Si tel en est le cas, la phase G1 serait vraisemblablement optimale pour la multiplication du TuMV.

D'autre part, la présence de PABP2 dans le noyau pourrait restreindre la quantité de ce facteur de traduction dans le cytoplasme et ainsi contribuer à minimiser la traduction des ARNm cellulaires. Par contre, nos résultats ne montrent pas une telle diminution de PABP2 dans le cytoplasme des cellules infectées au TuMV. D'ailleurs, une augmentation de la quantité d'ARNm des PABP de classe II (PABP2, 4 et 8) a été observée durant l'infection virale, corroborant nos résultats (communication personnelle de Philippe Dufresne du laboratoire du Dr Marc G. Fortin, Université McGill). Cette protéine de liaison aux polyadénosyl doit certainement avoir une fonction particulière dans le nucléole pour aider le bon déroulement du cycle de multiplication viral. Par exemple, comme la PABP est possiblement une protéine navette des ARNm du noyau vers le cytoplasme, la rétention de cette protéine cellulaire dans le noyau pourrait empêcher les ARNm d'être exportés dans le cytoplasme pour s'y faire traduire. Cette contribution de la PABP serait un autre mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique de l'hôte.

La formation du complexe eIF(iso)4E/VPg-Pro/PABP2 peut certainement avoir un impact sur les fonctions normales du nucléole. Ce complexe pourrait être nécessaire pour cueillir d'autres protéines nucléaires impliquées dans une des étapes de la multiplication virale. Bien que nous n'ayons pas observé de relocalisation de la protéine nucléolaire fibrillaire en présence de VPg-Pro seulement, nous ne pouvons exclure que le complexe eIF(iso)4E/VPg-Pro/PABP2 ait une telle répercussion sur le nucléole. Il est intéressant de remarquer que deux facteurs de traduction, qui sont proposés de partager quelques fonctions, sont séquestrés simultanément dans le noyau/nucléole des cellules infectées au TuMV. eIF4E et PABP sont suggérés d'avoir un rôle dans le contrôle de l'intégrité et le transit du noyau vers le cytoplasme d'ARNm entre autre. Leur séquestration par VPg-Pro pourrait ainsi se répercuter sur la transcription, l'épissage et le transport nucléo-cytoplasmique des ARNm ainsi que sur le cycle cellulaire.

En plus de prendre le contrôle du noyau, les virus à ARN positif forment de petites usines de production de virions souvent associées aux membranes cytoplasmiques. Ce sont dans ces endroits restreints que la réPLICATION virale semble avoir lieu. Tandis que le

courant de pensée entourant plusieurs virus à ARN propose plutôt que les complexes de réPLICATION SOIENT FORMÉS SUR LA SURFACE CYTOPLASMIQUE DES MEMBRANES (Egger et Bienz, 2005), il semble que ce n'est pas le cas de certains virus. Par exemple, le complexe de réPLICATION DU VIRUS DE L'HÉPATITE C EST PROTÉGÉ DES PROTÉASES ET DES NUCLÉASES PAR UNE VÉSICULE MEMBRANAIRE ASSOCIÉE AU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE (Quinkert *et al.*, 2005). Il est proposé que ces structures aient une connexion avec le cytoplasme pour permettre un ravitaillement continu de nucléotides pour la synthèse d'ARN mais qui empêcherait la circulation de grosses molécules.

Chez le virus à ADN poxvirus, la réPLICATION GÉNOMIQUE ET L'ASSEMBLAGE DES PARTICULES VIRALES SE FAIT DANS DES DOMAINES CYTOPLASMATIQUES SOUVENT SURNOMMÉS USINES À ADN (Cairns, 1960; Dales et Siminovitch, 1961; Harford *et al.*, 1966; Katsafanas et Moss, 2007) QUI SONT ASSOCIÉS AU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE RUGUEUX (RER) (Tolonen *et al.*, 2001). IL A RÉCENTEMENT ÉTÉ MONTRÉ QUE CES USINES À ADN SONT ÉGALEMENT LE SITE DE SYNTHÈSE DES PROTÉINES VIRALES (Katsafanas et Moss, 2007). DES PROTÉINES CELLULAIRES IMPLIQUÉES DANS LA TRADUCTION, TELLES EIF4E, EIF4G ET DES PROTÉINES RIBOSOMALES, SONT CONCENTRÉES DANS CES SOUS-DOMAINES CYTOPLASMATIQUES. Ce détournement de la machinerie de traduction contribuerait à inhiber la synthèse protéique de l'hôte afin de favoriser la réPLICATION ET LA TRADUCTION VIRALE.

Nos études montrent que deux facteurs de traduction, EIF(iso)4E et PABP2, se trouvent dans des vésicules semblables à celles observées par Schaad *et al.* (1997) et qui sont induites par le domaine 6K2. Ce sont dans ces vésicules que la réPLICATION DU GÉNOME VIRAL AURAIT LIEU, PROTÉGÉE PAR DES STRUCTURES MEMBRANAIRES. Les deux facteurs de traduction ont la capacité d'interagir directement avec le précurseur 6K-VPg-Pro dans ces vésicules. Étant donné l'implication de EIF(iso)4E et de PABP2 dans la synthèse protéique, ces résultats suggèrent une relation étroite entre la traduction et la réPLICATION DU GÉNOME DU TuMV.

VPg EST UNE PROTÉINE MULTIFONCTIONNELLE QUI SEMBLE ÊTRE AU COEUR DE LA PLUPART DES PROCESSUS VIRAUX, DE LA TRADUCTION (Lellis *et al.*, 2002), À LA RÉPLICATION (Fellers *et al.*,

1998) jusqu'à la transmission intercellulaire et longue-distance (Grzela *et al.*, 2007; Schaad *et al.*, 1997b). Cependant, la VPg des potyvirus n'a pas d'homologue et sa structure atomique n'est pas connue puisque les essais pour obtenir des cristaux de cette protéine virale ont jusqu'à maintenant été infructueux (Grzela *et al.*, 2007). Les récentes prédictions de structures sont par contre en accord avec la multifonctionnalité de la VPg. La forme native de la VPg du virus de la patate Y (PVY) existerait sous une conformation dépliée et possèderait ainsi de grandes régions non-structurées (Grzela *et al.*, 2007). Ce désordre intrinsèque apporte une plus grande malléabilité à la protéine et est typique des protéines multifonctionnelles (Tompa, 2002 ; Grzela *et al.*, 2007). Conséquemment, des régions peuvent être utilisées pour différentes interactions en prenant avantage de leur capacité à adopter des conformations différentes lors des liaisons. Par exemple, la région centrale de VPg, incluant les résidus 85 à 120, interagit avec la protéine de liaison à la coiffe ainsi qu'à HCPro (Roudet-Tavert *et al.*, 2007). Ces deux protéines compétitionnent pour le même domaine central. Le désordre structural de cette région serait alors impliqué dans la dualité fonctionnelle de VPg d'engager la traduction en présence de eIF4E et de favoriser la propagation longue-distance lorsque lié à HCPro.

L'interaction physique entre les facteurs d'initiation de la traduction eIF4E ou eIF(iso)4E avec la VPg est critique pour l'infection virale par plusieurs membres du genre potyvirus (Grzela *et al.*, 2006; Léonard *et al.*, 2000; Miyoshi *et al.*, 2006; Robaglia et Caranta, 2006; Wittmann *et al.*, 1997). L'importance de l'interaction VPg-eIF4E est reflété par l'existence de plusieurs résistances récessives naturelles observées dans le locus *eIF4E* (Gao *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005; Nicaise *et al.*, 2003; Ruffel *et al.*, 2002; Ruffel *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2005; Nieto *et al.*, 2006). Ce polymorphisme est le résultat de changements d'acides aminés uniques dans la séquence protéique qui compromettent à divers degrés l'association de VPg avec eIF4E et qui corrèle avec les différents phénotypes de résistance à la maladie (Yeam *et al.*, 2007). Puisque ces substitutions codées par les allèles récessifs de résistance sont situées dans ou près de la poche de liaison à la coiffe, elles réduisent aussi la capacité du facteur de traduction à lier la coiffe *in vitro*. D'ailleurs, il a été montré que VPg peut interférer avec l'habileté de eIF4E ou eIF(iso)4E de lier la coiffe (Miyoshi *et al.*, 2006). Ce phénomène serait

responsable de l'interruption de la formation du complexe d'initiation de la traduction, un autre mécanisme d'inhibition de la synthèse des protéines de l'hôte.

Cependant, la conséquence majeure de l'interaction VPg-eIF4E serait dans l'initiation de la traduction. Il a été suggéré que VPg soit utilisée comme une analogue de la coiffe m⁷G des ARNm (Khan *et al.*, 2006; Wittmann *et al.*, 1997). La participation de VPg dans l'initiation de la traduction n'a été mise en évidence que récemment chez le TEV (Khan *et al.*, 2007). Il a été montré que la VPg accroît considérablement la traduction des ARNm non-coiffés tout en inhibant la traduction des ARNm coiffés dans un lysat de germe de blé. D'ailleurs, l'affinité de liaison d'eIF4F avec l'ARN viral est augmentée en présence de VPg et corrèle avec l'efficacité de traduction. Cette étude propose que la VPg utilisée pour la traduction ne soit pas liée de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ARN viral mais reconnaîtrait plutôt la séquence 5'NTR pour s'y associer.

Puisque nos études indiquent que seulement les précurseurs VPg-Pro et 6K-VPg-Pro sont présents en grande quantité dans les fractions membranaires, il est possible qu'un précurseur, et non la VPg seule, soit impliqué dans l'initiation de la traduction. Le domaine VPg serait responsable de l'interaction avec le complexe eIF4F tandis que le rôle du domaine Pro serait de lier la PABP pour favoriser la circularisation de l'ARN viral. Nos résultats indiquent également qu'une population de VPg-Pro est résistante à se dissocier des membranes suite aux traitements salin et alcalin. Ce phénomène est probablement dû à une forte liaison avec une protéine transmembranaire. Puisque VPg a la propriété de se dimériser (Guo *et al.*, 2001), l'interaction 6K-VPg-Pro/VPg-Pro serait à l'origine de cette association membranaire. Ainsi, VPg-Pro accomplirait deux fonctions dans les vésicules : agir comme protéinase et lier l'extrémité 5' de l'ARN viral (Murphy *et al.*, 1990). La population associée aux membranes doit être utilisée dans l'initiation de la traduction de l'ARN viral et le recrutement du complexe de réPLICATION. Les complexes seraient alors ancrés par l'association entre VPg-Pro et 6K-VPg-Pro. L'autre population de VPg-Pro serait celle qui clive la polyprotéine pour former des protéines matures.

Contrairement à eIF(iso)4E, PABP2 n'est pas essentielle pour l'infection au TuMV (communication personnelle de Philippe Dufresne du laboratoire du Dr Marc G. Fortin, Université McGill). PABP2 fait partie de la classe II des PABP de plantes, qui inclue également les PABP4 et 8. Cette classe est vitale pour le développement de la plante puisque les triples mutants ne sont pas viables. De plus, VPg-Pro interagit avec ces trois formes de PABP. Des plants d'*A. thaliana* mutants homozygotes pour les PABP2, 4 ou 8 ne présentent pas de phénotype particulier et sont toujours sensibles à l'infection au TuMV. Par contre, des double-mutants PABP2-PABP4 ou PABP2-PABP8 exhibent un phénotype particulier de retard de croissance, de petites inflorescences et de grosses siliques. Ces plants sont toujours sensibles à l'infection au TuMV mais avec une production moindre de protéines et d'ARN viraux. Les potyvirus peuvent donc tirer profit de cette redondance et utiliser une ou l'autre des PABP selon les besoins. Il serait intéressant de déterminer la localisation cellulaire des formes 4 et 8 de la PABP et d'observer l'influence des précurseurs de VPg sur leur distribution.

La traduction précoce de l'ARN viral mène vraisemblablement à la formation de petites vésicules dispersées le long du réticulum endoplasmique. Avec la synthèse protéique, la quantité de la polymérase virale augmente. Ainsi, la concentration des composantes du complexe de réPLICATION par rapport au complexe de traduction dirigerait lequel des processus, traduction ou réPLICATION, doit avoir lieu sur le brin d'ARN positif contenu dans les vésicules. Deux candidats de choix pour le contrôle du changement de la traduction vers la réPLICATION seraient eIF(iso)4E et PABP2 puisque ces deux facteurs de traduction se trouvent à proximité de l'ARN viral et de la VPg-Pro. PABP2 pourrait avoir un rôle similaire à celui défini lors de l'infection aux picornavirus. L'équilibre du complexe VPg-Pro/eIF(iso)4G/PABP/poly(A) pourrait être modifié par l'interaction de RdRp avec PABP et VPg-Pro. D'un autre côté, il est aussi possible que l'interaction entre VPg-Pro et eIF(iso)4E soit perturbée par l'association de RdRp avec VPg-Pro. En conséquence, le complexe de traduction serait délogé pour pouvoir entamer un cycle de réPLICATION. Dans ce modèle, le changement de la traduction vers la réPLICATION pourrait se faire de façon graduelle, selon les modifications des conditions dans la lumière de la vésicule. Ainsi, pour une même vésicule, les deux processus pourraient avoir lieu mais

sur des brins d'ARN différents, puisque tous les éléments nécessaires, 6K-VPg-Pro/VPg-Pro, eIF(iso)4F, PABP2 et la RdRp sont confinés dans la même vésicule membranaire.

Selon les études sur poliovirus, les complexes de réPLICATION se déplacent sur les microtubules vers la région périnucléaire pour y compléter leur cycle de multiplication en synthétisant l'ARN positif à encapsider (Egger et Bienz, 2005). En microscopie confocale, nous avons aussi observé un tel mouvement des vésicules induites par 6K-VPg-Pro le long du réticulum endoplasmique. De plus, plusieurs sont localisées autour du noyau. Dans les cellules végétales, eIF(iso)4G interagit avec les microtubules. L'interaction VPg/eIF(iso)4E/eIF(iso)4G serait un lien potentiel entre le complexe de traduction/réPLICATION, le réticulum endoplasmique et les microtubules, permettant aux vésicules de se déplacer vers le noyau. Nous avons également noté que deux jours post-inoculation (dpi), 6K-VPg-Pro induit la formation de plusieurs petites vésicules dispersées dans le cytoplasme des cellules. À quatre dpi, de grandes vésicules sont visibles et localisées, pour plusieurs, dans la région périnucléaire. Ces résultats, en accord avec ceux obtenus par Egger et Bienz (2005), suggèrent que le mouvement des vésicules provoque la fusion de celles-ci. La fusion vésiculaire, avec la production de protéines virales, ferait partie du processus de maturation des complexes viraux. Cette maturation mènerait au changement de la traduction vers la réPLICATION virale, à commencer par la synthèse du brin négatif d'ARN. Finalement, le déplacement vers le noyau complèterait le cycle de multiplication par la synthèse du brin positif d'ARN et l'assemblage des virions (Figure 6).

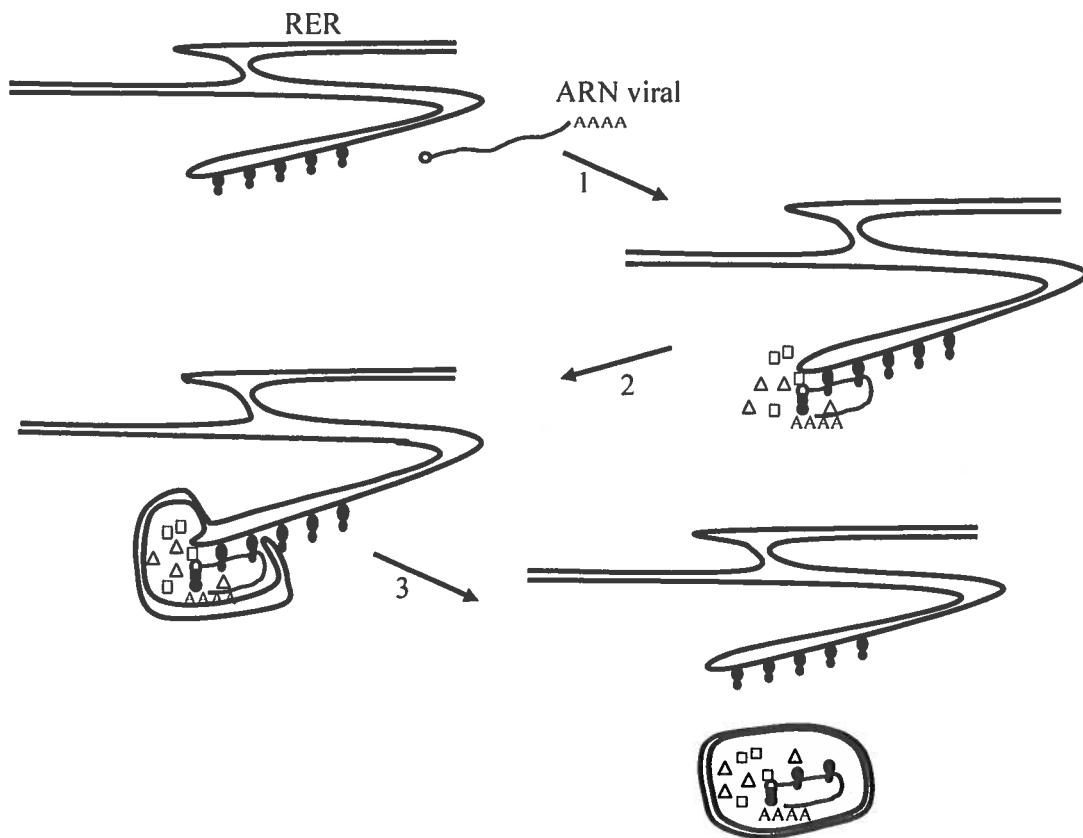


Figure 6 : Modèle de formation des vésicules dans une cellule infectée au TuMV

L'ARN viral lié de façon covalente à la VPg (○) est d'abord traduit par les ribosomes (●) associés au réticulum endoplasmique (RER) (étape 1). La synthèse de protéines virales (□), et plus particulièrement de 6K-VPg-Pro, induit la formation de vésicules membranaires (étape 2). La machinerie cellulaire de traduction (où △ représente les facteurs de traduction) est trappée dans ces vésicules. Les vésicules bourgeonnent pour se mouvoir le long des microtubules, vers le noyau (étape 3).

CONCLUSION

Nos études sur l'interaction entre les précurseurs VPg-Pro et 6K-VPg-Pro du TuMV et les facteurs de traduction eIF(iso)4E et PABP2 apportent une nouvelle vision sur la formation des complexes de traduction et de réPLICATION. Les complexes de traduction seraient confinés à l'intérieur des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique formées par 6K-VPg-Pro et mèneraient à la formation de complexes de réPLICATION. De plus, VPg-Pro aurait la tâche de séquestrer eIF(iso)4E et PABP2 dans le nucléole des cellules infectées. Cette action aurait la capacité d'inhiber l'expression des gènes cellulaires et la synthèse protéique en dérangeant les fonctions normales du noyau/nucléole.

Les résultats obtenus lors de ce projet ont soulevé plusieurs questions, entre autre sur le contenu des vésicules formées par 6K-VPg-Pro. Des observations récentes de microscopie confocale par Karine Thivierge du laboratoire de notre collaborateur Marc G. Fortin à McGill ont montré que le facteur d'elongation eEF1a co-localise avec 6K-VPg-Pro dans les vésicules. Ces résultats sont en accord avec notre modèle où le complexe de traduction est localisé dans les vésicules membranaires. D'autre part, elle a aussi confirmé que la RdRp devient associée aux vésicules en présence de 6K-VPg-Pro, indiquant à nouveau un lien physique entre la traduction et la réPLICATION. Avec la détection de ces facteurs de traduction dans les mêmes complexes que la réPLICATION, il devient maintenant important d'enquêter sur la présence de la machinerie traductionnelle incorporée dans les vésicules virales. Il faudra alors montrer que les ribosomes ainsi que d'autres facteurs de traduction et d'elongation se trouvent dans la lumière des vésicules. La synthèse protéique devra aussi être démontrée.

Un vecteur infectieux du TuMV dans lequel 6KGFP est ajouté entre P1 et HCPro de la polyprotéine a récemment été construit dans le laboratoire. Ce vecteur permet d'étiqueter les vésicules et le complexe de réPLICATION avec la GFP. Il a été observé qu'à quatre jours post-infection, les cellules infectées contiennent en moyenne trois vésicules d'environ 10 µm de diamètre qui sont accompagnées d'une série de petites vésicules tout

le long du réseau formant le réticulum endoplasmique. Il a aussi été observé que ces vésicules se déplacent. Ce vecteur viral sera donc un outil important qui permettra de poursuivre la caractérisation des vésicules en faisant des études de co-localisation dans des conditions d'infection avec des protéines virales et cellulaires fusionnées à la DsRed ou la mCherry, telles eIF(iso)4E, PABP2, RdRp, eEF1a, etc. Des études d'immunocytochimie sur des protoplastes infectés avec ce TuMV-6KGFP sont aussi à l'ordre du jour.

L'interaction entre VPg-Pro, PABP2 et eIF(iso)4E mérite d'être exploitée d'avantage. Il serait intéressant d'abord de déterminer la région d'interaction de PABP2 sur le domaine Pro. Ceci serait possible en réalisant de la mutagénèse aléatoire sur la VPg-Pro. L'effet sur l'interaction avec PABP2 et/ou eIF(iso)4E pourrait être analysé par le double hybride chez la levure. Les différents mutants de VPg-Pro ayant des changements d'affinité pour les facteurs de traduction pourraient ensuite être observés en microscopie confocale pour visualiser les effets sur la localisation cellulaire de la protéine virale. Aussi, il serait nécessaire d'introduire les mutations dans le génome viral afin d'observer les conséquences de ces modifications sur l'infectivité, la vitesse de propagation viral, les symptômes ainsi que sur la grosseur et la quantité des vésicules. Ces études permettraient de mieux caractériser la fonction de PABP2 et de eIF(iso)4E dans le cycle viral des potyvirus.

Finalement, les microtubules semblent avoir une fonction importante dans le mouvement des vésicules. Pour en étudier l'implication, la tubuline a été fusionnée à mCherry. Il sera alors possible de vérifier si les vésicules induites par 6K-VPg-Pro ou TuMV-6KGFP se meuvent sur la tubuline contenue dans les microtubules.

Mon projet de thèse a contribué à proposer un modèle où la traduction et la réplication des potyvirus sont en relation étroite. Cette idée est peu répandue mais est probablement applicable à d'autres stratégies virales. L'élaboration de ce modèle a aussi fourni des idées et des outils pour poursuivre dans cette quête de la connaissance des tactiques de multiplication des potyvirus.

BIBLIOGRAPHIE

Thèse de Simon Léonard, 2004

- Algire, M. A., Maag, D., and Lorsch, J. R. (2005). Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Mol Cell* **20**(2), 251-62.
- Allen, N. P., Huang, L., Burlingame, A., and Rexach, M. (2001). Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *J Biol Chem* **276**(31), 29268-74.
- Aminev, A. G., Amineva, S. P., and Palmenberg, A. C. (2003a). Encephalomyocarditis viral protein 2A localizes to nucleoli and inhibits cap-dependent mRNA translation. *Virus Res* **95**(1-2), 45-57.
- Aminev, A. G., Amineva, S. P., and Palmenberg, A. C. (2003b). Encephalomyocarditis virus (EMCV) proteins 2A and 3BCD localize to nuclei and inhibit cellular mRNA transcription but not rRNA transcription. *Virus Res* **95**(1-2), 59-73.
- Anindya, R., Chittori, S., and Savithri, H. S. (2005). Tyrosine 66 of Pepper vein banding virus genome-linked protein is uridylylated by RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **336**(2), 154-62.
- Anindya, R., and Savithri, H. S. (2004). Potyviral NIa proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. *J Biol Chem* **279**(31), 32159-69.
- Baer, B. W., and Kornberg, R. D. (1980). Repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(4), 1890-2.
- Baer, B. W., and Kornberg, R. D. (1983). The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* **96**(3), 717-21.
- Barton, D. J., O'Donnell, B. J., and Flanagan, J. B. (2001). 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J* **20**(6), 1439-48.
- Belostotsky, D. A. (2003). Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants: three conserved lineages that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics* **163**(1), 311-9.
- Belostotsky, D. A., and Meagher, R. B. (1993). Differential organ-specific expression of three poly(A)-binding-protein genes from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14), 6686-90.

- Belostotsky, D. A., and Meagher, R. B. (1996). A pollen-, ovule-, and early embryo-specific poly(A) binding protein from *Arabidopsis* complements essential functions in yeast. *Plant Cell* **8**(8), 1261-75.
- Belov, G. A., Evstafieva, A. G., Rubtsov, Y. P., Mikitas, O. V., Vartapetian, A. B., and Agol, V. I. (2000). Early alteration of nucleocytoplasmic traffic induced by some RNA viruses. *Virology* **275**(2), 244-8.
- Bernstein, P., Peltz, S. W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* **9**(2), 659-70.
- Bi, X., and Goss, D. J. (2000). Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem* **275**(23), 17740-6.
- Bienroth, S., Keller, W., and Wahle, E. (1993). Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J* **12**(2), 585-94.
- Bokros, C. L., Hugdahl, J. D., Kim, H. H., Hanesworth, V. R., van Heerden, A., Browning, K. S., and Morejohn, L. C. (1995). Function of the p86 subunit of eukaryotic initiation factor (iso)4F as a microtubule-associated protein in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15), 7120-4.
- Bonneau, A. M., and Sonenberg, N. (1987). Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* **262**(23), 11134-9.
- Borman, A. M., Michel, Y. M., and Kean, K. M. (2000). Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* **28**(21), 4068-75.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., and Ohad, N. (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**(3), 419-27.
- Brown, E. J., and Schreiber, S. L. (1996). A signaling pathway to translational control. *Cell* **86**(4), 517-20.
- Browning, K. S. (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol* **32**(1-2), 107-44.
- Browning, K. S. (2004). Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 4), 589-91.

- Browning, K. S., Webster, C., Roberts, J. K., and Ravel, J. M. (1992). Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem* **267**(14), 10096-100.
- Buchanan, B. B., Gruisse, W., and Jones, R. L. (2000). Nucleic Acids. In "Biochemistry and molecular biology of plants", pp. 260-310. American Society for Plant Biologists.
- Burd, C. G., Matunis, E. L., and Dreyfuss, G. (1991). The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol Cell Biol* **11**(7), 3419-24.
- Bushell, M., and Sarnow, P. (2002). Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* **158**(3), 395-9.
- Cao, Q., and Richter, J. D. (2002). Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *EMBO J* **21**(14), 3852-62.
- Carberry, S. E., Darzynkiewicz, E., and Goss, D. J. (1991). A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F. *Biochemistry* **30**(6), 1624-7.
- Carberry, S. E., and Goss, D. J. (1991). Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit alpha-globin mRNA. *Biochemistry* **30**(18), 4542-5.
- Chaudhry, Y., Nayak, A., Bordeleau, M. E., Tanaka, J., Pelletier, J., Belsham, G. J., Roberts, L. O., and Goodfellow, I. G. (2006). Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J Biol Chem* **281**(35), 25315-25.
- Chekanova, J. A., and Belostotsky, D. A. (2003). Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *RNA* **9**(12), 1476-90.
- Chen, H., Wurm, T., Britton, P., Brooks, G., Hiscox, J.A. (2002). Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J Virol* **76**(10):5233-50.
- Cheung, Y. N., Maag, D., Mitchell, S. F., Fekete, C. A., Algire, M. A., Takacs, J. E., Shirokikh, N., Pestova, T., Lorsch, J. R., and Hinnebusch, A. G. (2007). Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo. *Genes Dev* **21**(10), 1217-30.
- Chu, M., Lopez-Moya, J. J., Llave-Correas, C., and Pirone, T. P. (1997). Two separate regions in the genome of the tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of Tabasco pepper. *Mol Plant Microbe Interact* **10**(4), 472-80.

- Clarke, I. N., and Lambden, P. R. (2000). Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis* **181 Suppl 2**, S309-16.
- Cohen, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J. M., Strudwick, S., and Borden, K. L. (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* **20**(16), 4547-59.
- Combe, J. P., Petracek, M. E., van Eldik, G., Meulewaeter, F., and Twell, D. (2005). Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco. *Plant Mol Biol* **57**(5), 749-60.
- Cooper, G. M., and Hausman, R. E. (2007). The Cell : A Molecular Approach. Fourth ed. In "The Cell : A Molecular Approach" (A. Press, Ed.). Sinauer Associates, Inc, Washington D.C.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabaneck, L., Ruiz-Gutierrez, M., and Borden, K. L. (2005). eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *J Cell Biol* **169**(2), 245-56.
- Das, S., Ghosh, R., and Maitra, U. (2001). Eukaryotic translation initiation factor 5 functions as a GTPase-activating protein. *J Biol Chem* **276**(9), 6720-6.
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W., and Hardy, M. E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* **22**(11), 2852-9.
- Donaldson, R. W., Hagedorn, C. H., and Cohen, S. (1991). Epidermal growth factor or okadaic acid stimulates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4F. *J Biol Chem* **266**(5), 3162-6.
- Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S. A., and Sonenberg, N. (2000a). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* **19**(12), 3142-56.
- Dostie, J., Lejbkowicz, F., and Sonenberg, N. (2000b). Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J Cell Biol* **148**(2), 239-47.
- Dove, B.K., You, J.H., Reed, M.L., Emmett, S.R., Brooks, G., Hiscox, J.A. (2006). Changes in nucleolar morphology and proteins during infection with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Cell Microbiol* **8**(7):1147-57.
- Duncan, R. F., and Hershey, J. W. (1989). Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *J Cell Biol* **109**(4 Pt 1), 1467-81.

- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., and Robaglia, C. (2002). The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* **32**(6), 927-34.
- Egger, D., and Bienz, K. (2005). Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *J Gen Virol* **86**(Pt 3), 707-18.
- Etchison, D., Milburn, S. C., Edery, I., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. (1982). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem* **257**(24), 14806-10.
- Fazakerley, J. K., Boyd, A., Mikkola, M. L., and Kaariainen, L. (2002). A single amino acid change in the nuclear localization sequence of the nsP2 protein affects the neurovirulence of Semliki Forest virus. *J Virol* **76**(1), 392-6.
- Feigenblum, D., and Schneider, R. J. (1993). Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J Virol* **67**(6), 3027-35.
- Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G. B., and Hunt, A. G. (1998). In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* **79** (Pt 8), 2043-9.
- Fraser, C. S., Pain, V. M., and Morley, S. J. (1999). The association of initiation factor 4F with poly(A)-binding protein is enhanced in serum-stimulated Xenopus kidney cells. *J Biol Chem* **274**(1), 196-204.
- Gallie, D. R. (1998). A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* **216**(1), 1-11.
- Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C. L., Noel Ellis, T. H., and Maule, A. J. (2004). The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J* **40**(3), 376-85.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**, 913-63.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* **15**(7), 807-26.
- Gingras, A. C., Svitkin, Y., Belsham, G. J., Pause, A., and Sonenberg, N. (1996). Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11), 5578-83.

- Golini, F., Semler, B. L., Dorner, A. J., and Wimmer, E. (1980). Protein-linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of translation in vitro. *Nature* **287**(5783), 600-3.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberte, J. F., and Roberts, L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* **6**(10), 968-72.
- Govier, D. A., Kassanis, B., and Pirone, T. P. (1977). Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* **78**(1), 306-14.
- Groppi, R. et Palmenberg. A.C. (2007). Cardiovirus 2A protein associates with 40S but not 80S ribosome subunits during infection. *J Virol* **81**(23), 13067-74.
- Grzela, R., Strokovska, L., Andrieu, J. P., Dublet, B., Zagorski, W., and Chroboczek, J. (2006). Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie* **88**(7), 887-96.
- Grzela, R., Szolajska, E., Ebel, C., Madern, D., Favier, A., Wojtal, I., Zagorski, W., and Chroboczek, J. (2007). Virulence factor of potato virus Y, genome-attached terminal protein VPg, is a highly disordered protein. *J Biol Chem* Epub Oct 30.
- Guo, D., Rajamaki, M. L., Saarma, M., and Valkonen, J. P. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* **82**(Pt 4), 935-9.
- Guo, H. S., and Ding, S. W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *Embo J* **21**(3), 398-407.
- Gustin, K. E. (2003). Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex. *Virus Res* **95**(1-2), 35-44.
- Gustin, K. E., and Sarnow, P. (2001). Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO J* **20**(1-2), 240-9.
- Gustin, K. E., and Sarnow, P. (2002). Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus. *J Virol* **76**(17), 8787-96.
- Gustin, K. E., and Sarnow, P. (2006). Positive-strand RNA viruses and the nucleus. In "Viruses and the nucleus" (J. A. Hiscox, Ed.), pp. 161-184. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England.
- Haghigiat, A., and Sonenberg, N. (1997). eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *J Biol Chem* **272**(35), 21677-80.

- Hajimorad, M. R., Ding, X. S., Flasinski, S., Mahajan, S., Graff, E., Haldman-Cahill, R., Carrington, J. C., and Cassidy, B. G. (1996). Nla and Nlb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. *Virology* **224**(2), 368-79.
- Hammell, C. M., Gross, S., Zenklusen, D., Heath, C. V., Stutz, F., Moore, C., and Cole, C. N. (2002). Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. *Mol Cell Biol* **22**(18), 6441-57.
- Hancock, R. (2004). A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus. *J Struct Biol* **146**(3), 281-90.
- Hector, R. E., Nykamp, K. R., Dheur, S., Anderson, J. T., Non, P. J., Urbiniati, C. R., Wilson, S. M., Minvielle-Sebastia, L., and Swanson, M. S. (2002). Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *EMBO J* **21**(7), 1800-10.
- Herold, J., and Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**(3), 581-91.
- Hilson, P., Carroll, K. L., and Masson, P. H. (1993). Molecular characterization of PAB2, a member of the multigene family coding for poly(A)-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **103**(2), 525-33.
- Hiscox, J.A., Wurm, T., Wilson, L., Britton, P., Cavanagh, D., Brooks, G. (2001). The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J Virol*, **75**(1), 506-12.
- Hiscox, J. A. (2006). "Viruses and the nucleus." (J. A. Hiscox, Ed.) Wiley, University of Leeds, UK.
- Hiscox, J. A. (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* **5**(2), 119-27.
- Hugdahl, J. D., Bokros, C. L., and Morejohn, L. C. (1995). End-to-end annealing of plant microtubules by the p86 subunit of eukaryotic initiation factor-(iso)4F. *Plant Cell* **7**(12), 2129-38.
- Hull, R. (2002). Nomenclature et Classification of Plant Viruses. Fourth ed. In "Matthews' Plant Virology" (J. I. C. Emeritus Research Fellow, Ed.), pp. 13-44. Academic Press.
- Iborra, F. J., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* **293**(5532), 1139-42.

- Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* 17(24), 7480-9.
- Imataka, H., and Sonenberg, N. (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* 17(12), 6940-7.
- Izumi, R. E., Valdez, B., Banerjee, R., Srivastava, M., and Dasgupta, A. (2001). Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 76(1), 17-29.
- Jen, G., Detjen, B. M., and Thach, R. E. (1980). Shutoff of HeLa cell protein synthesis by encephalomyocarditis virus and poliovirus: a comparative study. *J Virol* 35(1), 150-6.
- Johansen, I. E., Lund, O. S., Hjulsager, C. K., and Laursen, J. (2001). Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *J Virol* 75(14), 6609-14.
- Kang, B. C., Yeam, I., Frantz, J. D., Murphy, J. F., and Jahn, M. M. (2005). The pvr1 locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J* 42(3), 392-405.
- Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95(4), 461-70.
- Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2001). Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* 285(1), 71-81.
- Kasschau, K. D., Cronin, S., and Carrington, J. C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228(2), 251-62.
- Keller, R. W., Kuhn, U., Aragon, M., Bornikova, L., Wahle, E., and Bear, D. G. (2000). The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *J Mol Biol* 297(3), 569-83.
- Kessler, S. H., and Sachs, A. B. (1998). RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 18(1), 51-7.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y. V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* 21(15), 5200-13.

- Khan, M. A., and Goss, D. J. (2004). Phosphorylation states of translational initiation factors affect mRNA cap binding in wheat. *Biochemistry* **43**(28), 9092-7.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Ray, S., Natsuaki, T., Suehiro, N., and Goss, D. J. (2006). Interaction of genome-linked protein (VPg) of turnip mosaic virus with wheat germ translation initiation factors eIFiso4E and eIFiso4F. *J Biol Chem* **281**(38), 28002-10.
- Khan, M.A., Miyoshi, H., Gallie, D.R., Goss, D.J. (2007). Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ in vitro translation: interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. *J Biol Chem* Epub Nov 28.
- Kim, S. H., Ryabov, E. V., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J. W., and Taliantsky, M. (2007). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *Embo J* **26**(8), 2169-79.
- Kleijn, M., Vrins, C. L., Voorma, H. O., and Thomas, A. A. (1996). Phosphorylation state of the cap-binding protein eIF4E during viral infection. *Virology* **217**(2), 486-94.
- Klein, P. G., Klein, R. R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A. G., and Shaw, J. G. (1994). Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* **204**(2), 759-69.
- Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, R. A., Roizman, B., and Straus, S. E. (2007). Fifth ed. In "Fields : Virology". LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.
- Korner, C. G., and Wahle, E. (1997). Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J Biol Chem* **272**(16), 10448-56.
- Koromilas, A. E., Lazaris-Karatzas, A., and 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**(11), 4153-8.
- Kuhn, U., and Pieler, T. (1996). Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J Mol Biol* **256**(1), 20-30.
- Kuhn, U., and Wahle, E. (2004). Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1678**(2-3), 67-84.
- Lai, H. K., and Borden, K. L. (2000). The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* **19**(13), 1623-34.
- Laliberté, J. F., Nicolas, O., Chatel, H., Lazure, C., and Morosoli, R. (1992). Release of a 22-kDa protein derived from the amino-terminal domain of the 49-kDa Nla of turnip mosaic potyvirus in Escherichia coli. *Virology* **190**(1), 510-4.

- Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R. E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* **270**(37), 21975-83.
- Lang, V., Zanchin, N. I., Lunsdorf, H., Tuite, M., and McCarthy, J. E. (1994). Initiation factor eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*. Distribution within the cell, binding to mRNA, and consequences of its overproduction. *J Biol Chem* **269**(8), 6117-23.
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J., and Gallie, D. R. (1997). Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* **272**(26), 16247-55.
- Lejbkowicz, F., Goyer, C., Darveau, A., Neron, S., Lemieux, R., and Sonenberg, N. (1992). A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20), 9612-6.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol* **12**(12), 1046-51.
- Léonard, S., Chisholm, J., Laliberté, J. F., and Sanfacon, H. (2002). Interaction in vitro between the proteinase of Tomato ringspot virus (genus Nepovirus) and the eukaryotic translation initiation factor iso4E from *Arabidopsis thaliana*. *J Gen Virol* **83**(Pt 8), 2085-9.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberté, J. F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* **74**(17), 7730-7.
- Léonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberté, J. F. (2004). Interaction of VPg-Pro of turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J Gen Virol* **85**(Pt 4), 1055-63.
- Li, X. H., Valdez, P., Olvera, R. E., and Carrington, J. C. (1997). Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (Nla). *J Virol* **71**(2), 1598-607.
- Lin, T. A., Kong, X., Haystead, T. A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., and Lawrence, J. C., Jr. (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* **266**(5185), 653-6.
- Llave, C., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24), 13401-6.

- Lopez-Moya, J. J., Fernandez-Fernandez, M. R., Cambra, M., and Garcia, J. A. (2000). Biotechnological aspects of plum pox virus. *J Biotechnol* **76**(2-3), 121-36.
- Luo, Y., and Goss, D. J. (2001). Homeostasis in mRNA initiation: wheat germ poly(A)-binding protein lowers the activation energy barrier to initiation complex formation. *J Biol Chem* **276**(46), 43083-6.
- Maag, D., and Lorsch, J. R. (2003). Communication between eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A on the yeast small ribosomal subunit. *J Mol Biol* **330**(5), 917-24.
- Mangus, D. A., Evans, M. C., and Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* **4**(7), 223.
- McBride, A. E., Schlegel, A., and Kirkegaard, K. (1996). Human protein Sam68 relocalization and interaction with poliovirus RNA polymerase in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6), 2296-301.
- Meerovitch, K., Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1989). A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Genes Dev* **3**(7), 1026-34.
- Merits, A., Guo, D., Jarvekulg, L., and Saarma, M. (1999). Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* **263**(1), 15-22.
- Metz, A. M., and Browning, K. S. (1996). Mutational analysis of the functional domains of the large subunit of the isozyme form of wheat initiation factor eIF4F. *J Biol Chem* **271**(49), 31033-6.
- Michel, Y. M., Borman, A. M., Paulous, S., and Kean, K. M. (2001). Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Mol Cell Biol* **21**(13), 4097-109.
- Michon, T., Estevez, Y., Walter, J., German-Retana, S., and Le Gall, O. (2006). The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *Febs J* **273**(6), 1312-22.
- Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., Ohmori, T., and Natsuaki, T. (2006). Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie* **88**(3-4), 329-40.

- Molla, A., Paul, A. V., and Wimmer, E. (1991). Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science* **254**(5038), 1647-51.
- Montero, H., Arias, C. F., and Lopez, S. (2006). Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* **80**(18), 9031-8.
- Moreno, M., Bernal, J. J., Jimenez, I., and Rodriguez-Cerezo, E. (1998). Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus. *J Gen Virol* **79** (Pt 11), 2819-27.
- Moreno, M., Brandwagt, B. F., Shaw, J. G., and Rodriguez-Cerezo, E. (1999). Infectious virus in transgenic plants inoculated with a nonviable, P1-proteinase defective mutant of a potyvirus. *Virology* **257**(2), 322-9.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., and Jacquemond, M. (2004). Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in Capsicum annuum and Lycopersicon hirsutum. *Mol Plant Microbe Interact* **17**(3), 322-9.
- Murphy, J. F., Rhoads, R. E., Hunt, A. G., and Shaw, J. G. (1990). The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* **178**(1), 285-8.
- Nagy, E., and Maquat, L. E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* **23**(6), 198-9.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C., and LeGall, O. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol* **132**(3), 1272-82.
- Nomoto, A., Kitamura, N., Golini, F., and Wimmer, E. (1977). The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12), 5345-9.
- Oh, C. S., and Carrington, J. C. (1989). Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology* **173**(2), 692-9.
- Palanivelu, R., Belostotsky, D. A., and Meagher, R. B. (2000). Conserved expression of *Arabidopsis thaliana* poly (A) binding protein 2 (PAB2) in distinct vegetative and reproductive tissues. *Plant J* **22**(3), 199-210.
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., Lorsch, J. R., and Ramakrishnan, V. (2007). The eukaryotic translation

- initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* **26**(1), 41-50.
- Patton, J. T., and Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* **277**(2), 217-25.
- Paulin, F. E., Campbell, L. E., O'Brien, K., Loughlin, J., and Proud, C. G. (2001). Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein. *Curr Biol* **11**(1), 55-9.
- Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donze, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr., and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**(6500), 762-7.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**(6180), 320-5.
- Pestova, T. V., and Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* **16**(22), 2906-22.
- Pettersson, R. F., Flanagan, J. B., Rose, J. K., and Baltimore, D. (1977). 5'-Terminal nucleotide sequences of polio virus polyribosomal RNA and virion RNA are identical. *Nature* **268**(5617), 270-2.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* **17**(19), 5811-21.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C., and Bowman Vance, V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**(6), 859-68.
- Ptushkina, M., von der Haar, T., Vasilescu, S., Frank, R., Birkenhager, R., and McCarthy, J. E. (1998). Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20. *EMBO J* **17**(16), 4798-808.
- Puustinen, P., and Makinen, K. (2004). Uridylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J Biol Chem* **279**(37), 38103-10.
- Quinkert, D., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2005). Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* **79**(21), 13594-605.

- Rajamaki, M. L., Kelloniemi, J., Alminaite, A., Kekarainen, T., Rabenstein, F., and Valkonen, J. P. (2005). A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology* 342(1), 88-101.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Yang, S. J., Lot, H., Le Gall, O., and Candresse, T. (2001). Lettuce mosaic virus pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol Plant Microbe Interact* 14(6), 804-10.
- Reibarkh, M., Yamamoto, Y., Singh, C. R., Del Rio, F., Fahmy, A., Lee, B., Luna, R. E., Wagner, G., and Asano, K. (2007). Eukaryotic initiation factor (eIF) 1 carries two distinct EIF5-binding faces important for multifactor assembly and AUG selection. *J Biol Chem* Epub Nov 1.
- Restrepo-Hartwig, M. A., and Carrington, J. C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *J Virol* 66(9), 5662-6.
- Rhoads, R. E., Joshi-Barve, S., and Rinker-Schaeffer, C. (1993). Mechanism of action and regulation of protein synthesis initiation factor 4E: effects on mRNA discrimination, cellular growth rate, and oncogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 46, 183-219.
- Riechmann, J. L., Lain, S., and Garcia, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73 (Pt 1), 1-16.
- Robaglia, C., and Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci* 11(1), 40-5.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L., and Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237(2), 283-95.
- Roudet-Tavert G, Michon T, Walter J, Delaunay T, Redondo E, Le Gall O. (2007). Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *J Gen Virol* 88(Pt 3):1029-33.
- Roy, G., De Crescenzo, G., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2002). Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Mol Cell Biol* 22(11), 3769-82.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J* 32(6), 1067-75.

- Ruffel, S., Gallois, J. L., Lesage, M. L., and Caranta, C. (2005). The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Mol Genet Genomics* **274**(4), 346-53.
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A., and Caranta, C. (2006). Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *J Gen Virol* **87**(Pt 7), 2089-98.
- Sachs, A. B., Bond, M. W., and Kornberg, R. D. (1986). A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. *Cell* **45**(6), 827-35.
- Saenz, P., Cervera, M. T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J. B., Riechmann, J. L., and Garcia, J. A. (2000). Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K(1). *J Gen Virol* **81**(Pt 3), 557-66.
- Saenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., and Garcia, J. A. (2002). Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *J Virol* **76**(4), 1922-31.
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M., and Uyeda, I. (2005). Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett* **579**(5), 1167-71.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J., and Carrington, J. C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus Nla protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* **273**(2), 300-6.
- Schaad, M. C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S., and Carrington, J. C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (Nla) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* **70**(10), 7039-48.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E., and Carrington, J. C. (1997a). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* **16**(13), 4049-59.
- Schaad, M. C., Lellis, A. D., and Carrington, J. C. (1997b). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* **71**(11), 8624-31.
- Schneider, R. J., and Mohr, I. (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* **28**(3), 130-6.

- Searfoss, A., Dever, T. E., and Wickner, R. (2001). Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol* 21(15), 4900-8.
- Silvestri, L. S., Parilla, J. M., Morasco, B. J., Ogram, S. A., and Flanegan, J. B. (2006). Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3' poly(A) tail. *Virology* 345(2), 509-19.
- Stein, N., Perovic, D., Kumlehn, J., Pellio, B., Stracke, S., Streng, S., Ordon, F., Graner, A. (2005). The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant J* 42(6):912-22.
- Strudwick, S., and Borden, K. L. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* 70(1), 10-22.
- Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T., and Okuda, S. (2004). An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J Gen Virol* 85(Pt 7), 2087-98.
- Svitkin, Y. V., Herdy, B., Costa-Mattioli, M., Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* 25(23), 10556-65.
- Svitkin, Y. V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H. D., and Sonenberg, N. (2001). Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA* 7(12), 1743-52.
- Tarun, S. Z., Jr., and Sachs, A. B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* 15(24), 7168-77.
- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci*. 27(10):527-33
- Tsuda, Y., Mori, Y., Abe, T., Yamashita, T., Okamoto, T., Ichimura, T., Moriishi, K., Matsuura, Y. (2006). Nucleolar protein B23 interacts with Japanese encephalitis virus core protein and participates in viral replication. *Microbiol Immunol* 50(3):225-34.
- Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N., and Katada, T. (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* 277(52), 50286-92.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M.,

- Fields, S., and Rothberg, J. M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**(6770), 623-7.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L., and Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* **74**(1-2), 157-75.
- Valasek, L., Nielsen, K. H., Zhang, F., Fekete, C. A., and Hinnebusch, A. G. (2004). Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection. *Mol Cell Biol* **24**(21), 9437-55.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N., and Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* **74**(15), 7064-71.
- Verchot, J., and Carrington, J. C. (1995). Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *J Virol* **69**(3), 1582-90.
- Villa-Komaroff, L., Guttman, N., Baltimore, D., and Lodishi, H. F. (1975). Complete translation of poliovirus RNA in a eukaryotic cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(10), 4157-61.
- von der Haar, T., Gross, J. D., Wagner, G., and McCarthy, J. E. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* **11**(6), 503-11.
- Waggoner, S., and Sarnow, P. (1998). Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J Virol* **72**(8), 6699-709.
- Wahle, E. (1991). A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* **66**(4), 759-68.
- Wahle, E. (1995). Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J Biol Chem* **270**(6), 2800-8.
- Wahle, E., and Ruegsegger, U. (1999). 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **23**(3), 277-95.
- Wakiyama, M., Imataka, H., and Sonenberg, N. (2000). Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for Xenopus oocyte maturation. *Curr Biol* **10**(18), 1147-50.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J. (2004).

- Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**(3), 428-38.
- Wang, D., and Maule, A. J. (1995). Inhibition of Host Gene Expression Associated with Plant Virus Replication. *Science* **267**, 229-231.
- Wang, X., Ullah, Z., and Grumet, R. (2000). Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology* **275**(2), 433-43.
- Wei, C. C., Balasta, M. L., Ren, J., and Goss, D. J. (1998). Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues. *Biochemistry* **37**(7), 1910-6.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., and Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**(1), 135-40.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**(1), 84-92.
- Yambao, M. L., Masuta, C., Nakahara, K., and Uyeda, I. (2003). The central and C-terminal domains of VPg of Clover yellow vein virus are important for VPg-HCPro and VPg-VPg interactions. *J Gen Virol* **84**(Pt 10), 2861-9.
- Yao, G., Chiang, Y. C., Zhang, C., Lee, D. J., Laue, T. M., and Denis, C. L. (2007). PAB1 self-association precludes its binding to poly(A), thereby accelerating CCR4 deadenylation in vivo. *Mol Cell Biol* **27**(17), 6243-53.
- Yeam, I., Cavatorta, J.R., Ripoll, D.R., Kang, B.C., Jahn, M.M. (2007). Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* **19**(9):2913-28.
- Zhang, Y., Feigenblum, D., and Schneider, R. J. (1994). A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. *J Virol* **68**(11), 7040-50.

ANNEXE II : Contributions supplémentaires

Interaction de la VPg-Pro du virus de la mosaïque du navet avec le facteur d'initiation de la traduction 4E et la protéine de liaison aux poly(A) *in planta*.

Simon Léonard, Catherine Viel, Chantal Beauchemin, Nicole Daigneault, Marc G. Fortin
and Jean-François Laliberté

Journal of General Virology (2004). 85 : 1055-63.

Dans cette publication, ma participation s'est limitée à la dernière figure. J'ai donc réalisé le clonage de PABP2 d'*A. thaliana* dans un vecteur d'expression de *E. coli*, la purification de VPg-Pro et de PABP2 recombinantes et à l'essai de liaison basé sur l'ELISA où il est montré que VPg-Pro interagit avec PABP2.

Résumé

La protéine virale liée au génome (VPg) du virus de la mosaïque du navet (TuMV) interagit *in vitro* avec le facteur d'initiation de traduction eucaryote (eIF) 4E. Dans cette étude, nous enquêtons sur les conséquences d'une infection au TuMV sur l'expression de eIF4E. Deux isomères sont présents dans les plantes, eIF4E et eIF(iso)4E. L'expression de ce dernier a été détecté dans les plantes infectées au TuMV et non-infectées de *Brassica perviridis*, mais l'expression de eIF4E a été trouvée seulement dans les plantes infectées. Les membranes provenant de tissus infectés au TuMV et non-infectés ont été séparés par centrifugation sur un gradient de sucre et les fractions ont été collectés. Les analyses d'immunobuvardage montrent que les polyprotéines 6K-VPg-Pro/VPg-Pro sont associés avec les membranes du réticulum endoplasmique et sont les formes virales qui semblent interagir avec eIF(iso)4E et eIF4E. L'interaction *in planta* entre 6K-VPg-Pro/VPg-Pro et eIF(iso)4E/eIF4E a été confirmé par co-purification par chromatographie de métal chélatisé. La protéine de liaison aux poly(A) (PABP) a aussi été co-purifiée avec la VPg-Pro. Une interaction directe entre VPg-Pro et PABP a été montrée par un essai de liaison basé sur l'ELISA. Ces expériences suggèrent que le complexe multiprotéique peut être formé autour de la VPg-Pro du TuMV.

Interaction of VPg-Pro of *Turnip mosaic virus* with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein *in planta*

Simon Léonard,¹ Catherine Viel,¹ Chantal Beauchemin,¹ Nicole Daigneault,¹ Marc G. Fortin² and Jean-François Laliberté¹

Correspondence
Jean-François Laliberté
jean-francois.laliberte@
inrs-iaf.quebec.ca

¹Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

²Department of Plant Science, McGill University, 21 111 Lakeshore, Ste-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada H9X 3V9

The viral protein linked to the genome (VPg) of *Turnip mosaic virus* (TuMV) interacts *in vitro* with the translation eukaryotic initiation factor (eIF) 4E. In the present study, we investigated the consequence of TuMV infection on eIF4E expression. Two isomers are present in plants, namely eIF4E and eIF(iso)4E. Expression of the latter was detected in both TuMV-infected and mock-inoculated *Brassica perviridis* plants, but expression of eIF4E was found only in infected plants. Membranes from TuMV-infected or mock-inoculated tissues were separated by sucrose gradient centrifugation and fractions were collected. Immunoblot analyses showed that 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro polyproteins were associated with endoplasmic reticulum membranes and were the viral forms likely to interact with eIF(iso)4E and eIF4E. *In planta* interaction between 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro and eIF(iso)4E/eIF4E was confirmed by co-purification by metal chelation chromatography. The poly(A)-binding protein (PABP) was also found to co-purify with VPg-Pro. Direct interaction between VPg-Pro and PABP was shown by an ELISA-based binding assay. These experiments suggest that a multi-protein complex may form around VPg-Pro of TuMV.

Received 7 October 2003

Accepted 28 November 2003

INTRODUCTION

Translation of viral RNAs by the host machinery is a crucial event in the virus cell cycle and proceeds essentially as for cellular mRNAs (Gale *et al.*, 2000; Thompson & Sarnow, 2000). One of the first steps in translation is the recruitment of mRNAs by the translation eukaryotic initiation factor (eIF) 4F complex. eIF4E is a member of this complex and recognizes the cap structure ($m^7\text{GpppN}$, where N is any nucleotide) at the 5' end of mRNAs. The other members of the eIF4F complex are eIF4G and eIF4A. In conjunction with additional proteins, the eIF4F complex links mRNAs to ribosomes and promotes the search for the translation start site. Among the proteins that interact with components of eIF4F is the poly(A)-binding protein (PABP) (Le *et al.*, 1997; Tarun *et al.*, 1997). A functional consequence of this interaction is an increase in the affinity of PABP for the poly(A) tail and of eIF4F for the 5' cap structure of mRNAs (Gallie, 1998). In addition, association of PABP with eIF4F results in the circularization of mRNAs, which facilitates multiple rounds of translation (Sachs, 2000).

Animal viruses have elaborated strategies that allow the preferential translation of viral mRNAs (Bushell & Sarnow, 2002), with the consequence that host protein synthesis is

usually blocked. This phenomenon is known as host translation shutdown. Plant virus infection and its impact on cell protein synthesis has, however, not been studied as extensively as animal virus infections (Aranda & Maule, 1998). The most-studied example of a block in translation involves the animal picornaviruses. The inhibition is mediated by the cleavage of eIF4G by viral or cellular proteinases. Hydrolysis of eIF4G prevents eIF4E from binding to the 43S ribosome subunit complex and thus precludes the recruitment of capped cellular mRNAs (Lamphear *et al.*, 1995; Liebig *et al.*, 1993). However, this presumption has recently been challenged (Ali *et al.*, 2001). Equally, adenovirus and influenza viruses inhibit host-cell protein synthesis by inactivating eIF4E through dephosphorylation (Huang & Schneider, 1991; Feigenblum & Schneider, 1993). Finally, the ring Z protein of the lymphocytic choriomeningitis virus was shown to interact with eIF4E and to repress host mRNA translation (Campbell Dwyer *et al.*, 2000).

RNA viruses may also recruit translation factors to increase their translation efficiency further. A case in point is the rotavirus NSP3 protein. This interacts with the 3' end of rotavirus mRNAs, which are capped but not polyadenylated (Poncet *et al.*, 1993, 1994). NSP3 also interacts with eIF4G (Piron *et al.*, 1998). Further studies have shown that

enhancement of rotavirus mRNA translation requires the simultaneous interaction of NSP3 with eIF4G and the mRNA 3' end (Vende *et al.*, 2000). During rotavirus infection, PABP is probably evicted from eIF4G, impairing the translation of polyadenylated host mRNAs (Piron *et al.*, 1998). Finally, the VPg (viral protein linked to the genome) of the Norwalk virus has been shown to bind eIF3, suggesting a role for the viral protein in translation initiation complex recruitment (Daughenbaugh *et al.*, 2003).

Turnip mosaic virus (TuMV) is a member of the genus *Potyvirus* (Riechmann *et al.*, 1992). Potyviruses have a plus-sense, single-stranded RNA genome of about 10 kb in length, a poly(A) tail at the 3' end and a VPg covalently linked to the 5' end. The genome encodes one large polyprotein, which is processed into at least ten mature proteins by three viral proteinases (Pro) (Riechmann *et al.*, 1992). Several functions have been attributed to the potyvirus VPg. First, the viral protein and its precursor form, VPg-Pro, interact with, and have a stimulating effect on the activity of, the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), suggesting participation in virus replication (Daros *et al.*, 1999; Fellers *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997). Additionally, interaction between VPg and eIF4E has been reported for *Tobacco etch virus* (TEV) (Schaad *et al.*, 2000) and TuMV (Léonard *et al.*, 2000; Wittmann *et al.*, 1997). The importance of this factor for TuMV infection has been shown in mutant *Arabidopsis thaliana* plants that do not express eIF(iso)4E (Lellis *et al.*, 2002; Duprat *et al.*, 2002). Although these plants had a normal phenotype, they were immune to TuMV. Finally, VPg has also been shown to have a role in overcoming viral resistance in plants (Borgstrom & Johansen 2001; Johansen *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 1998; Masuta *et al.*, 1999; Nicolas *et al.*, 1996, 1997; Rajamaki & Valkonen, 1999; Schaad *et al.*, 1997b). In the case of pepper and lettuce, the recessive resistance gene against *Potato virus Y* and *Lettuce mosaic virus* has been identified as encoding eIF4E (Ruffel *et al.*, 2002; Nicaise *et al.*, 2003).

In the present study, we investigated whether eIF4E expression is affected following TuMV infection and whether VPg and its precursor form, VPg-Pro, could act as a recruitment focal point for other proteins of cellular origin. Our data show that the eIF4E isomers expression profile was indeed modified and that, in addition to eIF(iso)4E and eIF4E, PABP can interact with VPg-Pro *in planta*.

METHODS

Microorganisms and media. Manipulations of bacteria as well as nucleic acids and proteins were done by standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). *E. coli* XL-1 Blue was used for subcloning and *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) was used for protein expression.

PABP expression in *E. coli*. Plasmid pETtagPABPhis encodes PABP2 of *A. thaliana* (accession no. NM_119572). RT-PCR was performed on total RNA of *A. thaliana* using a forward (5'-TATACATATGGCTAGCCGAATTGATGGCGCAGGTTCAACT-T-3'; *Nhe*I and *Eco*RI sites are underlined) and reverse primer

(5'-TATATACTCGAGAGAGAGGTCAAGGAAGC-3'; *Xba*I site is underlined). The amplified fragment was digested with *Eco*RI and *Xba*I and cloned in the similarly restricted pET21b (Novagen). The resulting PABP was fused at its N-terminal end to the 11 amino acid N-terminal peptide of the T7 gene 10 protein (T7 tag), which is recognized by the anti-T7-tag monoclonal antibody (Novagen). It also had a His tail at its C terminus. pETtagPABPhis was digested with *Xba*I and the ends were blunted with Klenow fragment giving PABP2 without the His tail. An overnight culture of *E. coli* BL21 (DE3) was diluted 1:100 in fresh medium and incubated at 37 °C until the OD₆₀₀ reached 0.6. Protein production was then induced at room temperature with 0.4 mM IPTG for 3 h. Purification by metal chelation was performed as in Ménard *et al.* (1995).

ELISA-based binding assay. The specified proteins were absorbed to wells of an ELISA plate (100 µl of protein at 10 ng µl⁻¹) by overnight incubation at 4 °C and wells were blocked with 5% Blotto in PBS. Appropriate proteins were diluted in PBS with 1% Blotto and 0.2% Tween 20 and incubated for 1.5 h at 4 °C with the previously coated wells. Detection of retained protein was achieved as in ELISA with the anti-T7-tag antibody and peroxidase-labelled goat anti-mouse immunoglobulin G (KPL). Wells were washed three times with 0.05% Tween 20 between incubations.

Membrane fractionation. Membrane recovery from plants was carried out according to Schaad *et al.* (1997a). *Brassica perviridis* plants (three-leaf stage) were infected with TuMV or mock-inoculated with PBS. At 10 days post-inoculation, the leaf that developed next to the inoculated leaf was harvested. Leaf tissue (2 g) was minced in 6 ml homogenization buffer [50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% BSA, 0.3% dextran, 13% sucrose, plus one tablet of Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) per 10 ml of buffer]. The homogenate was filtered through Miracloth and subjected to centrifugation at 3700 g for 10 min at 4 °C. The supernatant (2.5 ml) was layered on to a 9 ml 20–45% sucrose gradient containing the respective homogenization buffer and subjected to centrifugation at 143 000 g in a Beckman SW41 Ti rotor for 4 h at 4 °C. Fractions (0.9 ml) were collected, diluted 1:1 in protein dissociation buffer and subjected to immunoblot analysis following 12.5% SDS-PAGE. Immunoreactions were detected using the ECL-based secondary antibody system (Amersham).

RESULTS

Expression of eIF4E isomers following TuMV infection

There are at least two isomers of initiation factor 4E in plants, namely eIF4E and eIF(iso)4E (Browning, 1996). They share significant sequence homology, but their respective role in translation initiation is unknown. Furthermore, the functional state of eIF4E is altered following infection by certain animal viruses (Campbell Dwyer *et al.*, 2000; Feigenblum & Schneider, 1993; Huang & Schneider, 1991). The consequence of TuMV infection on the expression state of the eIF4E isomers was thus investigated. *B. perviridis* plants at the three-leaf stage were mock inoculated or TuMV infected. Ten days after inoculation, the leaf that developed next to the inoculated leaf was harvested. Infection was confirmed by immunoblot analysis using a rabbit serum raised against the capsid protein of TuMV (data not shown). The harvested leaf was minced in homogenization buffer and the extract centrifuged at

3700 g. Proteins from the supernatant were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis using a rabbit serum raised against a recombinant form of eIF(iso)4E from *A. thaliana*. eIF4E and eIF(iso)4E of *A. thaliana* have a calculated size of 26.5 and 22.5 kDa, respectively (Rodriguez *et al.*, 1998). Although the size for the *B. perviridis* isomers was not known, it was expected to be very similar, since both plants belong to the same family. Fig. 1 shows that eIF(iso)4E was detected in mock-inoculated plants, migrating at the same position as recombinant eIF(iso)4E of *A. thaliana*. This protein was retained on m⁷GTP Sepharose, which confirmed its cap-binding property (data not shown). eIF(iso)4E was also detected in TuMV-infected plants along with an additional protein that had the same molecular mass as recombinant eIF4E of *A. thaliana*. Cross-reaction of the anti-eIF(iso)4E serum with eIF4E can be expected since the two proteins are highly homologous (Rodriguez *et al.*, 1998) and a rabbit serum raised against wheat eIF(iso)4E recognized both eIF4E and eIF(iso)4E of *A. thaliana* (Ruud *et al.*, 1998). TuMV infection thus induced the production of eIF4E, while the expression level of eIF(iso)4E did not appear to change significantly compared with its level in mock-inoculated plants. Interestingly, a protein migrating ahead of eIF(iso)4E was detected in infected leaves, but the nature of this species was not investigated further.

Membrane localization of eIF4E, eIF(iso)4E and VPg-Pro

eIF4E is associated with 48S ribosomal complexes (Hiremath *et al.*, 1989). To determine which VPg-containing protein type is found in ribosome-containing structures, cellular membranes from mock-inoculated and TuMV-infected leaves were fractionated on 20–45% sucrose gradients. The fractionation was carried out in either the presence or absence of 3 mM MgCl₂. The presence of MgCl₂ preserves the integrity of ribosomes associated with the endoplasmic

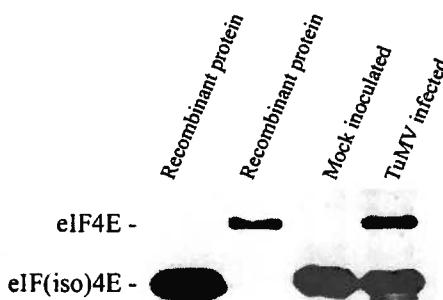
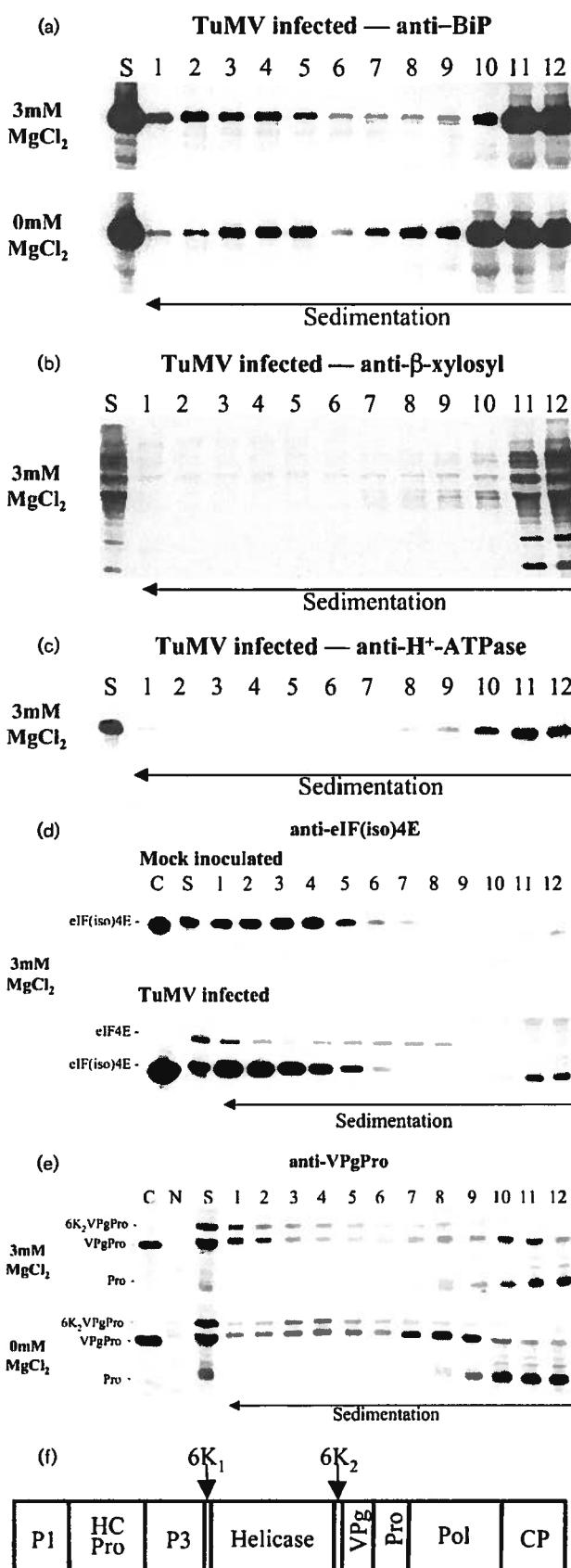


Fig. 1. Expression profile of eIF4E isomers following TuMV infection. Recombinant *A. thaliana* eIF(iso)4E and eIF4E, as well as proteins from mock-inoculated and TuMV-infected leaf extracts were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose. The membrane was probed with a rabbit serum against eIF(iso)4E of *A. thaliana*.

reticulum (ER). On the other hand, the absence of MgCl₂ promotes the dissociation of ribosomes from the ER, which results in a shift of the ER membranes towards the top of the gradient (Lord *et al.*, 1973). Fractions were collected and first analysed by immunoblot assay using antibodies raised against BiP (a marker of the ER; Cascardo *et al.*, 2000), proteins containing xylose-β1 → 2-mannose modifications (a marker of the medial- and trans-Golgi) and the tonoplast H⁺-ATPase. In the presence of 3 mM MgCl₂, two BiP-containing peaks were resolved, one near the bottom and one near the top of the gradient (Fig. 2a). This result has previously been described by others (Han & Sanfaçon, 2003; Schaad *et al.*, 1997a), but no explanation was provided concerning the nature of the light BiP-containing peak. This may reflect the tendency of BiP to be released from the ER membranes and to float in the gradient. The heavy BiP-containing fractions contained rRNA (data not shown). The peak moved two to three fractions up the gradient in the absence of MgCl₂, which suggested that fractions 1–5 contained the ER, with a proportion of the membranes associated with ribosomes. The proteins containing β-xylosyl were detected near the top of the gradient (Fig. 2b; fractions 11 and 12). Likewise, the tonoplast H⁺-ATPase was located in fractions 10–12 (Fig. 2c). This indicated that the Golgi apparatus and vacuolar membranes were well resolved from the ER in the sucrose gradient.

In mock-inoculated tissue, eIF(iso)4E sedimented at a position near the bottom of the gradient in the presence of 3 mM MgCl₂ (Fig. 2d; fractions 1–5). The sucrose gradient sedimentation of eIF(iso)4E in TuMV-infected plants was similar. On the other hand, two eIF4E-containing peaks were resolved, one near the bottom of the gradient (fractions 1 and 2) and one in the middle (fractions 5–8). These last fractions also contained rRNA (data not shown). This dual distribution may reflect the position of eIF4E in polysomes and monosomes in the sucrose gradient (Davies & Abe, 1995). No shift of the initiation factors to lighter fractions was observed in the absence of MgCl₂ (data not shown), which was expected since they are associated with ribosomes and not with ER membranes. Localization of eIF(iso)4E in fractions 1–5 supports the notion that these fractions contained ribosomes. Interestingly, the anti-eIF(iso)4E-reacting protein of low molecular mass was found in the top fractions where no rRNA was detected.

When the anti-VPg-Pro serum was used, no reactivity was noticed in the 3700 g supernatant (S3) recovered from mock-inoculated plants (Fig. 2e, lane N). On the other hand, several VPg-Pro-related polypeptides were detected in the S3 extract from TuMV-infected plants (Fig. 2e, lane S). These species had the expected molecular masses for 6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro and Pro (see Fig. 2f for a schematic presentation of TuMV polyprotein). Recombinant forms of these proteins have been previously expressed in *E. coli* (Ménard *et al.*, 1995) and migrated to the same positions as the proteins detected in TuMV-infected plants (data not



shown). However, no polypeptide corresponding to the mature VPg was detected. The different viral proteins localized to different fractions in the 3 mM MgCl₂ sucrose gradient. A subpopulation of VPg-Pro, C-terminally processed VPg-Pro (Ménard *et al.*, 1995) and Pro were found in the lighter fractions of the sucrose gradient. On the other hand, 6K₂-VPg-Pro and the remaining portion of VPg-Pro were found near the bottom of the gradient (fractions 1–5). In the sucrose gradient fractionation carried out in the absence of MgCl₂, the 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro peak moved up the gradient by approximately two to three fractions, which was similar to what had been observed for the bottom BiP-containing fractions. This shift thus suggested that 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro are present with ribosome-associated ER membranes and are likely to be the protein type to interact with the translation initiation factor(s) *in planta*.

Co-purification of 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro with eIF(iso)4E/eIF4E

Detection of 6K₂-VPg-Pro and VPg-Pro in the same sucrose gradient fractions as the initiation factors raises the question of whether the two viral proteins interact with eIF(iso)4E, eIF4E, or both, *in planta*. VPg-Pro has an intrinsic capacity to bind to nickel-agarose resin, the presence of a histidine tail being unnecessary (Ménard *et al.*, 1995). The binding to the resin is mediated by the VPg domain (data not shown). Purification of 6K₂-VPg-Pro and VPg-Pro by metal chelation chromatography was thus attempted and the co-purification of both eIF(iso)4E and eIF4E evaluated. For TuMV-infected and mock-inoculated tissues, fractions 1–5 from a 3 mM MgCl₂ membrane fractionation experiment were pooled and loaded on to a nickel-agarose column. After washing the resin, the bound

Fig. 2. Detection of proteins in membrane fractions following centrifugation in sucrose gradient. Tissue extracts were prepared and centrifuged on 20–45% sucrose density gradients in the presence or absence of MgCl₂, as indicated. The direction of sedimentation was from right to left, with fraction 12 representing the top of the gradient. Fractions were collected and proteins separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose. (a–c) Sucrose gradients in the presence or absence of 3 mM MgCl₂ (as indicated) of infected extract and immunoblot analysis using anti-BiP serum (a), anti-β-xylosyl serum (b) and anti-tonoplast H⁺-ATPase serum (c). (d) Sucrose gradient in the presence of 3 mM MgCl₂ of mock-inoculated and TuMV-infected extract and immunoblot analysis using anti-eIF(iso)4E serum. Recombinant eIF(iso)4E from *A. thaliana* (C) and non-fractionated extracts (S) were analysed. Gel migration position of eIF4E and eIF(iso)4E is indicated on the left. (e) Sucrose gradient in the presence or absence of 3 mM MgCl₂ of infected extract and immunoblot analysis using anti-VPg-Pro serum. Recombinant VPg-Pro from TuMV (C), mock-inoculated (N) and TuMV-infected non-fractionated extracts (S) were also analysed. (f) Schematic representation of the TuMV polyprotein. Fully processed proteins are indicated by boxes.

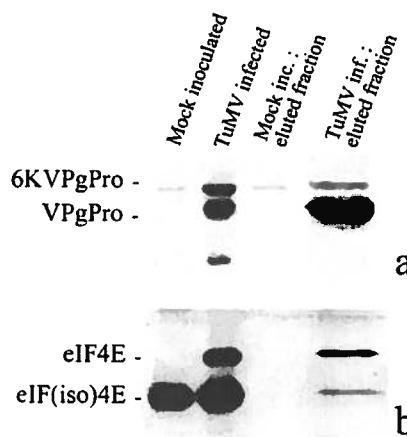


Fig. 3. Co-purification of 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro with eIF(iso)4E and eIF4E by metal chelation chromatography. Fractions 1–5 from a sucrose gradient centrifugation experiment were pooled, and the membranes solubilized by the addition of 0·5% Tween-20 and loaded on to a column containing 0·4 ml nickel-agarose resin. Proteins were eluted with 100 mM imidazole, separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose. The membrane was probed using (a) anti-VPg-Pro serum and (b) anti-eIF(iso)4E serum. Wells were loaded with proteins derived from membrane fractions of mock-inoculated tissue, proteins derived from membrane fractions of TuMV-infected tissue, eluted proteins from mock-inoculated tissue and eluted proteins from TuMV-infected tissue.

proteins were eluted with 100 mM imidazole and analysed by immunoblot assay following SDS-PAGE. Fig. 3(a) shows that both 6K₂-VPg-Pro and VPg-Pro were effectively purified from infected tissues. Similarly, eIF4E and eIF(iso)4E were detected in the eluted protein fraction when the column was loaded with the membrane fractions from TuMV-infected leaves (Fig. 3b). They were not detected with mock-inoculated membrane fractions, even after prolonged film exposure. This experiment thus indicated that 6K₂-VPg-Pro and/or VPg-Pro interact with both eIF(iso)4E and eIF4E in infected cells.

VPg-Pro interaction with PABP

Interaction of 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro with eIF(iso)4E and eIF4E *in planta* raises the possibility that other factors involved in the initiation of translation might be, directly or indirectly, associated with the viral protein. One candidate protein is PABP. A rabbit serum raised against PABP2 of *A. thaliana* (Palanivelu *et al.*, 2000b) was used to detect PABP co-purification with 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro. Fig. 4 shows that a *B. perviridis* 69 kDa PABP2-like isomer can be co-purified from infected tissues. This protein was not purified by metal chelation chromatography from mock-inoculated membrane fractions. This experiment then indicates that 6K₂-VPg-Pro and/or VPg-Pro interact with PABP *in planta*. The higher concentration of PABP in

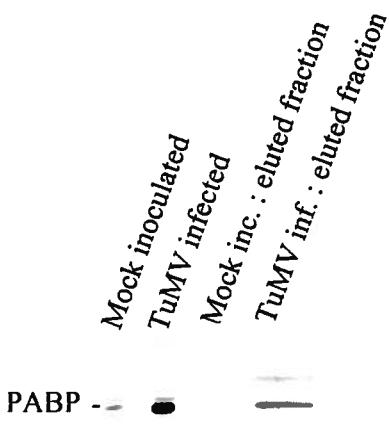


Fig. 4. Co-purification of PABP2 by metal chelation chromatography. The experimental approach was as described in Fig. 3. The membrane was probed using anti-PABP2 serum. Wells were loaded with proteins derived from the membrane fraction of mock-inoculated tissue, proteins derived from the membrane fraction of TuMV-infected tissue, eluted proteins from mock-inoculated tissue and eluted proteins from TuMV-infected tissue.

infected plants was found not to be significant in subsequent experiments.

PABP co-purification with 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro may be the result of direct interaction with the viral protein or through the intermediary of another protein that directly interacts with VPg-Pro. ELISA-based binding assays with recombinant proteins were carried out to investigate direct interaction. PABP2 of *A. thaliana* was produced in *E. coli* as a T7-tagged, His-tailed fusion protein and purified by metal chelation chromatography. ELISA plate wells were coated either with VPg-Pro or metal chelation chromatography-purified proteins from a control *E. coli* lysate containing pET21b. The coated wells were then incubated with increasing concentrations of T7-tagged His-tailed PABP2. Complex retention was detected using an anti-T7-tag antibody. Fig. 5(a) shows that proteins from the *E. coli* lysate did not interact with PABP2. However, a saturation binding curve was observed for VPg-Pro. This experiment then indicates that VPg-Pro interacts directly with PABP2. Binding conferred by the presence of the His tail was excluded, as complex formation between VPg-Pro and PABP2 was equally observed, whether PABP was His-tailed or not (Fig. 5b). The T7 tag has been shown previously not to interact with VPg-Pro (Wittmann *et al.*, 1997).

DISCUSSION

Infection of *B. perviridis* by TuMV modified the expression profile of the eIF4E isomers. Only eIF(iso)4E was detected in mock-inoculated, healthy leaves, while both isomers were present in infected tissues. A previous study demonstrated

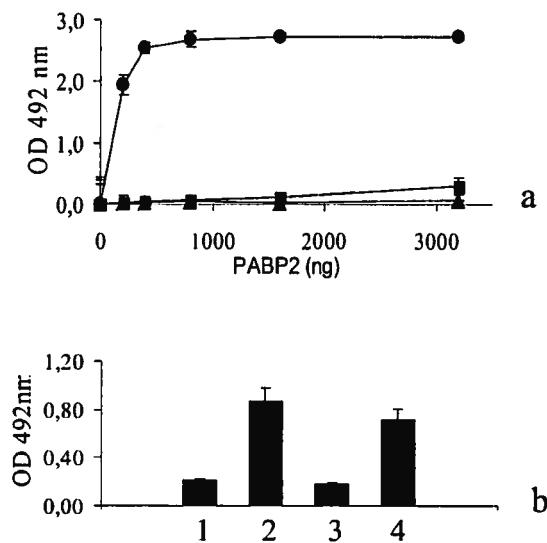


Fig. 5. VPg-Pro interaction with PABP of *A. thaliana* as demonstrated by ELISA-based binding assay. (a) Wells were coated with 1·0 µg purified VPg-Pro (●), metal chelation-purified *E. coli* lysate containing pET21b vector (■) or with Blotto only (▲) and then incubated with increasing concentrations of purified T7-tagged His-tailed PAPB. Retention of the complex was detected using anti-T7-tag antibodies. (b) Wells were coated with 1·0 µg metal chelation-purified *E. coli* lysate containing pET21b only (lanes 1 and 3) or purified VPg-Pro (lanes 2 and 4) and incubated with 50 µg of an *E. coli* lysate expressing T7-tagged His-tailed PABP (lanes 1 and 2) or expressing T7-tagged PABP (lanes 3 and 4). Retention of the complex was detected using anti-T7-tag antibodies. Values are means of four replicates from a typical experiment. Error bars represent the standard deviation.

that the eIF4E and eIF(iso)4E mRNAs accumulated differentially in *A. thaliana* tissues (Rodriguez *et al.*, 1998). The eIF4E mRNA was expressed in flower, cauline leaf, leaf and stem tissues, but the relative abundance in root tissues was very low. On the other hand, the eIF(iso)4E mRNA, although detected in all tissues analysed, was particularly abundant in floral organs and in young developing tissues. This is in contrast to our result on protein expression. Dinkova *et al.* (2000) noticed that eIF4E expression was under post-transcriptional control in maize, and preliminary data in our laboratory indicate that this is also the case in *B. perviridis*. Post-transcriptional control is adopted when a cell has to respond quickly to a particular stressful situation, without bringing into play nuclear pathways for mRNA synthesis. An additional eIF(iso)4E-related protein was also detected in infected leaves and may correspond to another isomer of the initiation factor (Ruud *et al.*, 1998) or may be a cleavage product of the initiation factor. This protein does not appear to be associated with ribosomes and it is not known whether it has any cap-binding activity. Differential expression supports the notion that eIF(iso)4E and eIF4E carry out distinct cellular functions (Browning,

1996). For instance, Gallie & Browning (2001) proposed that eIF4F (a higher-order protein complex containing eIF4E) may promote translation under cellular conditions in which cap-dependent translation is inhibited. This statement is appealing in light of the fact that viral infection often leads to cap-dependent inhibition of host mRNA translation (Bushell & Sarnow, 2002; Gale *et al.*, 2000). Other proteins have been shown to increase during plant viral infections (Aranda *et al.*, 1996; Havelda & Maule, 2000). Although the mechanism and purpose of induction remain unknown, it was proposed that this increase in expression could prepare the cell for the biosynthetic demands of virus replication (Maule *et al.*, 2002). It is thus possible that eIF4E production in *B. perviridis* is linked to the cellular response needed to adjust to the pressure on protein synthesis caused by TuMV infection. This is supported by the work of Lellis *et al.* (2002) and Duprat *et al.* (2002) who have isolated *A. thaliana* lines bearing mutations in the gene encoding eIF(iso)4E. These lines had a normal phenotype, even though they did not produce eIF(iso)4E. It was noted that the amount of eIF4E had increased significantly in the transposon-mutated line (Duprat *et al.*, 2002). The mutant *A. thaliana* may thus have compensated for the lack of eIF(iso)4E by an increased synthesis of eIF4E to keep up with the demand of protein synthesis associated with normal plant development. Additionally, absence of eIF(iso)4E rendered these lines resistant to TuMV. We thus suggest that TuMV infection of *B. perviridis* leads to the inactivation of eIF(iso)4E or to its monopolization for viral protein synthesis. The pressure by the virus on the host protein synthesis machinery would then have to be relieved by *de novo* synthesis of eIF4E to fulfil the needs of the plant.

The binding domain to eIF(iso)4E is located within VPg (Léonard *et al.*, 2000; Wittmann *et al.*, 1997). We have shown by membrane co-localization and co-purification experiments that it was 6K₂-VPg-Pro and/or VPg-Pro, precursor forms of VPg, that do the actual binding in plants. VPg can exist as a fully processed protein and also as precursor forms, which each may have different functions during virus replication (Riechmann *et al.*, 1992). In the case of Potato virus A (PVA), several precursor forms of VPg were detected in insect and plant cells, notably P3-6K₁-helicase-6K₂-VPg-Pro-Pol, helicase-6K₂-VPg-Pro-Pol, helicase-6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro-Pol and VPg-Pro-Pol-CP (Merits *et al.*, 2002). These high-molecular-mass forms were not detected in the case of TuMV, most likely because the PAGE conditions were not optimal for this size range. Interestingly, 6K₂-VPg-Pro, which was clearly detected in TuMV-infected leaves, was not detected in the case of PVA. This may reflect that this form does not exist, or is processed at a much faster rate, in PVA-infected cells. Curiously, we did not detect fully processed VPg in infected leaves. Fully processed VPg would at the very least be found within virions. Detection of this form would, however, require significant loading of material on SDS gels (Murphy *et al.*, 1990). Alternatively, lack of VPg detection may reflect

a high turnover rate or may be artefactual. We thus cannot exclude the possibility of free VPg binding the initiation factors. Our membrane fractionation experiment also indicated that the interaction is likely to take place in ribosome-associated ER membranes. In the case of TEV, Schaad *et al.* (1997a) showed an association of 6K₂-VPg-Pro with these subcellular membranes and demonstrated that the 6K₂ domain is an integral protein of ER membranes. Furthermore, the potyvirus RNA replication complex is associated with ER membranes (Martin & Garcia, 1991; Schaad *et al.*, 1997a) and it has been proposed that 6 kDa-containing proteins, notably 6K₂-VPg-Pro, would participate in replication (Riechmann *et al.*, 1992). It appears thus that potyvirus replication and translation are closely linked phenomena involving a common set of proteins that are found in the same subcellular compartment. This close link between replication and translation is in agreement with the finding that another translation initiation factor, eIF3, was present in highly purified replication complexes of both *Brome mosaic virus* (Quadt *et al.*, 1993) and *Tobacco mosaic virus* (Osman & Buck, 1997). In the case of the latter virus, there is *in vitro* evidence that the factor interacts with the methyltransferase-like domain of the 126 and 183 kDa replicase proteins (Taylor & Carr, 2000).

Furthermore, we showed that VPg-Pro can also interact with PABP *in planta*. PABP is ubiquitous in eukaryotes and participates in at least three major post-transcriptional processes: initiation of protein synthesis, mRNA turnover and mRNA biogenesis. *A. thaliana* PABPs are encoded by a very diverse gene family (Belostotsky & Meagher, 1993). The isomer PABP2 is highly expressed in all organs of *A. thaliana* (Palanivelu *et al.*, 2000b) and was shown to function in yeast translational processes (Palanivelu *et al.*, 2000a). This isomer was thus the first choice to test for interaction with the viral protein. It remains to be seen whether the other isomers of PABP are also capable of interacting with VPg-Pro. VPg-Pro and PABP could interact with each other in two separate ways, potentially increasing the overall stability of the complex. First, the interaction can be direct as shown in this study. The other way would be through the connection of the eIF(iso)4E/eIF(iso)4G dimer. Indeed, eIF(iso)4G has been shown to bind PABP (Le *et al.*, 1997) and can interact with VPg-Pro through the intermediary of eIF(iso)4E (M. G. Fortin, unpublished data). However, this last possibility needs to be experimentally demonstrated. Moreover, the interaction between VPg-Pro and eIF(iso)4E/eIF4E as well as PABP could possibly promote RNA circularization during translation. Circularization has been shown to be necessary for efficient translation of cellular mRNAs (Gallie, 1998) and also to take place for animal viral RNAs (Michel *et al.*, 2001). Linkage of VPg-Pro to the viral RNA (Murphy *et al.*, 1990) and formation of the VPg-Pro-PABP complex and a likely VPg-Pro-eIF4E-eIF4G-PABP complex could bring both ends of the viral RNA in close proximity. It now remains to be demonstrated, through an approach similar to that used for eIF(iso)4E (Lellis *et al.*, 2002; Duprat *et al.*, 2002),

whether *A. thaliana* PABP2 knockouts are immune to TuMV infection.

Finally, interaction with eIF(iso)4E, eIF4E and PABP suggests that VPg-Pro may serve as a focal point for translation initiation complex assembly. Preliminary experiments also showed that other proteins interact with the viral protein (C. Viel, unpublished data). This concept of VPg as a protein recruitment factor has recently been suggested for the Norwalk virus VPg (Daughenbaugh *et al.*, 2003). This VPg was shown to interact with eIF3, and pull-down experiments showed that other translation initiation factors were co-purified, notably eIF4GI, eIF4E and eIF2 α . To what extent these interactions are directly with VPg or mediated through eIF3 is not yet known. Future experiments will investigate which other proteins are found associated with VPg-Pro of TuMV and if these proteins are the same whether the viral protein is localized in the ER, the cytoplasm or the nucleus.

ACKNOWLEDGEMENTS

S.L. and C.V. contributed equally to this work. We wish to thank A. Vitale for the anti-BiP, M. Boutry for the anti-tonoplast H⁺-ATPase, A. Sturm for the anti- β -xylosyl and D. A. Belostotsky for the anti-PABP2 sera. We are also grateful to Dr H. Sanfaçon for critical reading of the manuscript. This work was supported by NSERC of Canada and the Fonds FCAR awarded to J.-F. L. and M. G. F.

REFERENCES

- Ali, I. K., McKendrick, L., Morley, S. J. & Jackson, R. J. (2001). Truncated initiation factor eIF4G lacking an eIF4E binding site can support capped mRNA translation. *EMBO J* 20, 4233–4242.
- Aranda, M. & Maule, A. (1998). Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology* 243, 261–267.
- Aranda, M. A., Escaler, M., Wang, D. & Maule, A. J. (1996). Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15289–15293.
- Belostotsky, D. A. & Meagher, R. B. (1993). Differential organ-specific expression of three poly(A)-binding-protein genes from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6686–6690.
- Borgstrom, B. & Johansen, I. E. (2001). Mutations in pea seedborne mosaic virus genome-linked protein VPg after pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 707–714.
- Browning, K. S. (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol* 32, 107–144.
- Bushell, M. & Sarnow, P. (2002). Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* 158, 395–399.
- Campbell Dwyer, E. J., Lai, H., MacDonald, R. C., Salvato, M. S. & Borden, K. L. (2000). The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J Virol* 74, 3293–3300.
- Cascardo, J. C. M., Almeida, R. S., Buzell, R. A. A., Carolino, S. M. B., Otoni, W. C. & Fontes, E. P. B. (2000). The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *J Biol Chem* 275, 14494–14500.
- Daros, J. A., Schaad, M. C. & Carrington, J. C. (1999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (N1a) and RNA

- polymerase (Nlb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J Virol* 73, 8732–8740.
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. & Hardy, M. E. (2003).** The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* 22, 2852–2859.
- Davies, E. & Abe, S. (1995).** Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods Cell Biol* 50, 209–222.
- Dinkova, T. D., Aguilar, R. & Sanchez de Jimenez, E. (2000).** Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem J* 351, 825–831.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S. & Robaglia, C. (2002).** The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* 32, 927–934.
- Feigenblum, D. & Schneider, R. J. (1993).** Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J Virol* 67, 3027–3035.
- Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G. B. & Hunt, A. G. (1998).** *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 79, 2043–2049.
- Gale, M., Jr, Tan, S. L. & Katze, M. G. (2000).** Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 239–280.
- Gallie, D. R. (1998).** A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216, 1–11.
- Gallie, D. R. & Browning, K. S. (2001).** eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 276, 36951–36960.
- Han, S. & Sanfaçon, H. (2003).** Tomato ringspot virus proteins containing the nucleoside triphosphate binding domain are transmembrane proteins that associate with the endoplasmic reticulum and cofractionate with replication complexes. *J Virol* 77, 523–534.
- Havelda, Z. & Maule, A. J. (2000).** Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell* 12, 1975–1986.
- Hiremath, L. S., Hiremath, S. T., Rychlik, W., Joshi, S., Domier, L. L. & Rhoads, R. E. (1989).** *In vitro* synthesis, phosphorylation, and localization on 48 S initiation complexes of human protein synthesis initiation factor 4E. *J Biol Chem* 264, 1132–1138.
- Hong, Y., Levay, K., Murphy, J. F., Klein, P. G., Shaw, J. G. & Hunt, A. G. (1995).** A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* 214, 159–166.
- Huang, J. T. & Schneider, R. J. (1991).** Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* 65, 271–280.
- Johansen, I. E., Lund, O. S., Hjulsager, C. K. & Laursen, J. (2001).** Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *J Virol* 75, 6609–6614.
- Keller, K. E., Johansen, I. E., Martin, R. R. & Hampton, R. O. (1998).** Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 124–130.
- Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T. & Rhoads, R. E. (1995).** Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* 270, 21975–21983.
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J. & Gallie, D. R. (1997).** Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* 272, 16247–16255.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A. & Carrington, J. C. (2002).** Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol* 12, 1046–1051.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G. & Laliberté, J. F. (2000).** Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* 74, 7730–7737.
- Li, X. H., Valdez, P., Olvera, R. E. & Carrington, J. C. (1997).** Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (Nlb): subcellular transport and protein–protein interaction with VPg/proteinase (Nla). *J Virol* 71, 1598–1607.
- Lieblig, H. D., Ziegler, E., Yan, R. & 9 other authors (1993).** Purification of two picornaviral 2A proteinases: interaction with eIF-4 gamma and influence on *in vitro* translation. *Biochemistry* 32, 7581–7588.
- Lord, J. M., Kagawa, T., Moore, T. S. & Beevers, H. (1973).** Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. *J Cell Biol* 57, 659–667.
- Martin, M. T. & Garcia, J. A. (1991).** Plum pox potyvirus RNA replication in a crude membrane fraction from infected *Nicotiana clevelandii* leaves. *J Gen Virol* 72, 785–790.
- Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H. & Hataya, T. (1999).** A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus Y correlates with resistance breaking in 'virgin A mutant' tobacco. *Phytopathology* 89, 118–123.
- Maule, A., Leh, V. & Lederer, C. (2002).** The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr Opin Plant Biol* 5, 279–284.
- Ménard, R., Chatel, H., Dupras, R., Plouffe, C. & Laliberté, J. F. (1995).** Purification of turnip mosaic potyvirus viral protein genome-linked proteinase expressed in *Escherichia coli* and development of a quantitative assay for proteolytic activity. *Eur J Biochem* 229, 107–112.
- Merits, A., Rajamäki, M. L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen, J. P. & Saarma, M. (2002).** Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J Gen Virol* 83, 1211–1221.
- Michel, Y. M., Borman, A. M., Paulous, S. & Kean, K. M. (2001).** Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Mol Cell Biol* 21, 4097–4109.
- Murphy, J. F., Rhoads, R. E., Hunt, A. G. & Shaw, J. G. (1990).** The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* 178, 285–288.
- Nicalse, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.-P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. & Le Gall, O. (2003).** The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus lettuce mosaic virus. *Plant Physiol* 132, 1272–1282.
- Nicolas, O., Pirone, T. P. & Hellmann, G. M. (1996).** Construction and analysis of infectious transcripts from a resistance-breaking strain of tobacco vein mottling potyvirus. *Arch Virol* 141, 1535–1552.

- Nicolas, O., Dunnington, S. W., Gotow, L. F., Pirone, T. P. & Hellmann, G. M. (1997).** Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. *Virology* 237, 452–459.
- Osman, T. A. & Buck, K. W. (1997).** The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3. *J Virol* 71, 6075–6082.
- Palanivelu, R., Belostotsky, D. A. & Meagher, R. B. (2000a).** *Arabidopsis thaliana* poly (A) binding protein 2 (PAB2) functions in yeast translational and mRNA decay processes. *Plant J* 22, 187–198.
- Palanivelu, R., Belostotsky, D. A. & Meagher, R. B. (2000b).** Conserved expression of *Arabidopsis thaliana* poly (A) binding protein 2 (PAB2) in distinct vegetative and reproductive tissues. *Plant J* 22, 199–210.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998).** Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17, 5811–5821.
- Poncet, D., Aponte, C. & Cohen, J. (1993).** Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* 67, 3159–3165.
- Poncet, D., Laurent, S. & Cohen, J. (1994).** Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J* 13, 4165–4173.
- Quadt, R., Kao, C. C., Browning, K. S., Hershberger, R. P. & Ahliquist, P. (1993).** Characterization of a host protein associated with bromo mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1498–1502.
- Rajamaki, M. L. & Valkonen, J. P. (1999).** The 6K₂ protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicandra physaloides*. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 1074–1081.
- Riechmann, J. L., Lain, S. & Garcia, J. A. (1992).** Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73, 1–16.
- Rodriguez, C. M., Freire, M. A., Camilleri, C. & Robaglia, C. (1998).** The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J* 13, 465–473.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. & Caranta, C. (2002).** A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J* 32, 1067–1075.
- Ruud, K. A., Kuhlwein, C., Goss, D. J. & Browning, K. S. (1998).** Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 273, 10325–10330.
- Sachs, A. (2000).** Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail. In *Translational Control of Gene Expression*, pp. 447–466. Edited by N. Sonenberg, J. W. B. Hershey & M. B. Mathews. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. & Carrington, J. C. (1997a).** Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16, 4049–4059.
- Schaad, M. C., Lellis, A. D. & Carrington, J. C. (1997b).** VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* 71, 8624–8631.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J. & Carrington, J. C. (2000).** Strain-specific interaction of the tobacco etch virus Nla protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273, 300–306.
- Tarun, S. Z., Jr, Wells, S. E., Deardorff, J. A. & Sachs, A. B. (1997).** Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9046–9051.
- Taylor, D. N. & Carr, J. P. (2000).** The GCD10 subunit of yeast eIF-3 binds the methyltransferase-like domain of the 126 and 183 kDa replicase proteins of tobacco mosaic virus in the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* 81, 1587–1591.
- Thompson, S. R. & Sarnow, P. (2000).** Regulation of host cell translation by viruses and effects on cell function. *Curr Opin Microbiol* 3, 366–370.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N. & Poncet, D. (2000).** Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74, 7064–7071.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G. & Laliberté, J. F. (1997).** Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234, 84–92.