

# Thèse : Meriem SENISSAR

## Résumé

L'ARN hélicase à boîte DEAD de la levure *S.cerevisiae* Ded1 est une protéine essentielle dont la fonction a été conservée au cours de l'évolution. Ses homologues fonctionnels sont impliqués dans le développement et le cycle cellulaire. Ded1 a longtemps été associée à l'étape de scanning de la région 5'UTR des ARNm au niveau de l'initiation de la traduction. Nous avons utilisé différentes approches comme les co-immunoprécipitations, des analyses de spectrométrie de masse, des tests de complémentation génétique, de séparation des complexes sur gradients de saccharose, des expériences de localisation *in situ* et d'enzymologie pour montrer que Ded1 interagissait physiquement avec des complexes cytoplasmique et nucléaire de liaison à la coiffe des ARNm. Nous avons également montré que Ded1 peut passer du noyau vers le cytoplasme par différentes voies d'export nucléaire. De façon intéressante, ses partenaires protéines sont capables de stimuler son activité ATPase. De plus, nous avons montré qu'il existait un lien génétique entre Ded1 et ses partenaires. Nous avons également montré que Ded1 colocalise partiellement avec ses partenaires dans des gradients de saccharose, suggérant que Ded1 pourrait être associée à certains mRNPs. Nos résultats encore préliminaires indiquent que Ded1 pourrait s'associer à d'autres ARNs coiffés. Ainsi, Ded1 pourrait remodeler les complexes associés à différentes étapes de la vie des ARN coiffés.

## Abstract

The budding yeast DEAD-box RNA helicase Ded1 is an essential yeast protein that is closely related to a subfamily of DEAD-box proteins that are involved in developmental and cell-cycle regulation. Ded1 is generally considered to be a translation-initiation factor that helps the 40S ribosome scan the mRNA from the 5' 7-methylguanosine cap to the AUG start codon. We have used IgG pulldown experiments, mass spectroscopy analyses, genetic experiments, saccharose gradients, *in situ* localizations, and enzymatic assays to show that Ded1 is a cap-associated factor that actively shuttles between the cytoplasm and the nucleus. We show that Ded1 physically interacts with various cap-associated factors and that its enzymatic activity is stimulated by these factors. By using various mutated proteins, we show that Ded1 is genetically linked to these factors. Ded1 comigrates with these factors on saccharose gradients, but the peak of Ded1 sediments slightly heavier than for the other factors, which suggests that Ded1 is predominately associated with a subset of the mRNPs. Finally, purification of the protein complexes associated with Ded1 and subsequent analysis by nanoLC-MS/MS indicates that Ded1 is associated with both nuclear and cytoplasmic mRNPs. Preliminary experiments showed that Ded1 can associate with other capped RNA. We conclude that Ded1 may function as a remodeling factor that is needed to form the different complexes associated with the different processing steps of the capped RNA.