

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE LA PETITE
RIBONUCLÉOPROTÉINE NUCLÉOLAIRE SNR30

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

VINCENT LEMAY

AVRIL 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce projet de maîtrise de deux ans qui tire à sa fin avec l'écriture de ce mémoire n'aurait pu être possible sans l'aide et le support de plusieurs personnes que j'aimerais remercier. D'abord, le plus grand des mercis au Dr. François Dragon, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné la chance de travailler sur un projet aussi intéressant. Ton encadrement, ton encouragement, tes conseils précieux et ta patience m'ont permis d'atteindre mes objectifs tout en me permettant de parfaire mes connaissances en biologie moléculaire. Merci pour cette opportunité qui m'a été des plus enrichissantes. Je voudrais aussi remercier mes collègues de laboratoire ainsi que mes collègues biologistes de nos laboratoires voisins qui m'ont aidé de près ou de loin dans ce projet. Vos conseils et votre support ont été grandement appréciés.

Ensuite, je voudrais remercier les différents chercheurs et étudiants membres du Ribo-club de Sherbrooke et du Yeast Club de Montréal pour leurs conseils et expertise dans ces différents domaines; les Dr Louise Brissette, Laurent Poliquin et Éric Rassart, membres de mon comité d'évaluation et les différents professeurs, chargés de cours et étudiants qui m'ont supporté, encouragé et conseillé au cours de mes études au baccalauréat et à la maîtrise.

Enfin, un merci particulier à ma copine, mes parents, mes deux frères et mes amis qui m'ont grandement supporté au cours de ce projet. Sans vos encouragements constants, je n'y serais pas arrivé. Merci pour tout.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	vii
RÉSUMÉ	viii
CHAPITRE I	
1 INTRODUCTION	1
1.1 ÉTAT DES CONNAISSANCES	1
1.1.1 MATURATION DES ARNR	1
1.1.2 LES PETITS ARN NUCLÉOLAIRES (SNORNA)	3
1.1.3 FONCTION DES PETITES RIBONUCLÉOPROTÉINES NUCLÉOLAIRES	3
1.1.4 EXPRESSION DES SNORNA	5
1.1.5 LES PROTÉINES ASSOCIÉES AUX SNORNA À BOÎTES H/ACA	6
1.1.6 LA PETITE RIBONUCLÉOPROTÉINE NUCLÉOLAIRE SNR30	7
1.1.7 LES APTAMÈRES OU ÉTIQUETTES DE PURIFICATION D'ARN	8
1.2 LE PROJET	10
1.2.1 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	10
1.2.2 PARALLÈLE AVEC LA SNORNP U3 DE LA FAMILLE C/D	10
1.2.3 BUT	11
1.2.4 HYPOTHÈSES SUR LES PROTÉINES ASSOCIÉES À SNR30	11
1.2.5 INTÉRÊT DU PROJET	12
CHAPITRE II	
2 MÉTHODOLOGIE	13
2.1 PRÉPARATION DES SOUCHES EXPRIMANT SNR30 CONTENANT L'APTAMÈRE S1	13
2.1.1 DÉTERMINATION DU SITE D'INTRODUCTION DE L'APTAMÈRE S1	13

2.1.2 GÉNÉRATION DU PLASMIDE PRS316-S1-SNR30	13
2.1.3 MÉTHODE DE PRÉPARATION DES EXTRAITS DE LEVURES	16
2.1.4 VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DE S1-SNR30 <i>IN VIVO</i> PAR HYBRIDATION NORTHERN	18
2.1.5 TEST DE FONCTIONALITÉ DE LA CONSTRUCTION S1-SNR30	18
2.2 PURIFICATION DE SNR30 CONTENANT L'APTAMÈRE S1	19
2.2.1 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ AVEC DES BILLES STREPTAVIDINE-AGAROSE POUR RÉCUPÉRER LA SNORN SNR30	19
2.2.2 MARQUAGE DES ARN AU 5' [³² P]-PCP	20
2.2.3 ANALYSE DE L'ARN PAR HYBRIDATION NORTHERN	20
2.2.4 ANALYSE DES PROTÉINES PAR ÉLECTROPHORÈSE	21
2.2.4.1 ANALYSE DES PROTÉINES H/ACA PAR IMMUNOBUVARDAGE	21
2.2.4.2 COLORATION AU NITRATE D'ARGENT	22
CHAPITRE III	
3 RÉSULTATS	23
3.1 TEST DE DILUTION EN SERIE	23
3.2 MARQUAGE DES ARN AU [5'- ³² P] PCP	24
3.3 ANALYSE DES ARN PAR HYBRIDATION NORTHERN	26
3.4 ANALYSES DES PROTEINES H/ACA PAR IMMUNOBUVARDAGE	26
3.5 COLORATION DU SDS-PAGE AU NITRATE D'ARGENT	28
CHAPITRE IV	
4 DISCUSSION	30
4.1 LA LEVURE <i>S. CEREVISIAE</i> COMME MODÈLE POUR ÉTUDIER LA MATURATION DES ARNR	30
4.2 AVANTAGES DE L'UTILISATION DE L'APTAMÈRE S1	30
4.3 INTRODUCTION DE L'APTAMÈRE S1 ET FONCTION DE SNR30	31

	v
4.4 PURIFICATION DU SNORNA S1-SNR30	32
4.5 PROTEINES ASSOCIEES AU SNORNA S1-SNR30	33
4.6 PERSPECTIVES	34
CHAPITRE V	
5 CONCLUSIONS	35
5.1 CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU PROJET	35
BIBLIOGRAPHIE	36

LISTE DES FIGURES

Figure	Description	Page
1.1	Maturation du pré-ARNr chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	2
1.2	Structure secondaire des snoRNA et protéines associées.	4
1.3	Expression de petits ARN nucléolaires.	6
1.4	Structure secondaire de snR30.	9
1.5	Structure secondaire de la portion minimale de l'aptamère d'ARN S1.	10
2.1	Structure secondaire du snoRNA S1-SNR30 H1.	14
2.2	Structure secondaire du snoRNA S1-SNR30 H2.	15
2.3	Méthode des «megaprimers».	17
3.1	La construction S1-snR30 est fonctionnelle <i>in vivo</i> .	23
3.2	Analyse des ARN marqués au [5'- ³² P] pCp	25
3.3	L'ARN S1-snR30 interagit avec des billes streptavidine-agarose.	27
3.4	La snoRNP S1-snR30 contient des protéines H/ACA.	28
3.5	La snoRNP S1-snR30 contient plusieurs protéines.	29

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
DMSO	Sulfoxyde de diméthyl
DO	Densité optique
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
G418	Généticine
IgG	Immunoglobuline G
kb	Kilobase
kpb	Kilo paires de bases
kDa	KiloDalton
k-turn	« kink-turn »
LiAc	Acétate de lithium
m ₃ G	Coiffe triméthyl-guanosine
MK	Marqueur
nt	nucléotide
pBS	Plasmide pBluescript II (Stratagene®)
PCR	Réplication à répétition par la polymérase
PVDF	fluorure de polyvinylidène
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS
SP	Souche parentale
SELEX	Sélection <i>in vitro</i>
snoRNA	petit ARN nucléolaire
snoRNP	petite ribonucléoprotéine nucléolaire
Sup.	Surnageant
TAP	Purification par affinité en tandem

RÉSUMÉ

Le nucléole est un compartiment spécialisé où les ARN ribosomiques (ARNr) sont transcrits, mûrissent et sont assemblés pour former les sous-unités du ribosome. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'ADN ribosomique est transcrit en un précurseur de 35S qui code pour l'ARN 18S de la petite sous-unité ribosomique ainsi que les ARN 5.8S et 25S de la grande sous-unité du ribosome. Le nucléole contient environ 100 petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP), qui sont constituées d'une molécule d'ARN (snoRNA) et de quelques protéines. Les snoRNA forment deux grandes familles: les familles à boîtes C/D et à boîtes H/ACA. Ces snoRNA servent de guides pour des modifications post-transcriptionnelles des ARNr, i.e. méthylation du ribose en 2'-OH (C/D) et pseudouridylation (H/ACA). Le snoRNA va d'abord s'apparier à l'ARNr et les protéines associées au snoRNA vont effectuer les modifications. Certains de ces snoRNA sont requis pour des réactions de clivage du précurseur des ARNr; ces clivages servent à éliminer des régions espaceur dans le pré-ARNr. Les snoRNP de la famille H/ACA contiennent quatre protéines essentielles, Cbf5p, Gar1p, Nhp2p, et Nop10p. Contrairement aux autres snoRNA H/ACA, snR30 n'a pas de cible pour la pseudouridylation. Par contre, le snoRNA snR30 est essentiel dans les étapes de maturation menant à la production de l'ARNr 18S, ce qui n'est pas le cas des autres snoRNA H/ACA. Le but de cette recherche est de purifier le complexe snR30 et d'identifier ses composantes protéiques. snR30 possède probablement des protéines qui lui sont spécifiques, en plus des quatre protéines H/ACA, et qui contribuent à ses propriétés fonctionnelles uniques, à savoir, son rôle dans la maturation des ARNr. Afin de purifier snR30, l'aptamère S1 a été utilisé et le contenu protéique de snR30 identifié par spectrométrie de masse. L'aptamère S1 est une courte séquence d'acides nucléiques qui possède une haute affinité et spécificité pour la streptavidine. Cette séquence a été introduite par mutagenèse dirigée par PCR dans la séquence codant pour *SNR30* et cette construction S1-SNR30 a été exprimée *in vivo* à partir d'un vecteur d'expression de levure. Il a ensuite été possible de purifier le complexe S1-snR30 par chromatographie d'affinité utilisant des billes couplées à la streptavidine. Le snoRNA S1-snR30 est associé non seulement aux protéines H/ACA Gar1p et Nhp2p mais aussi à plusieurs autres protéines. Ces protéines doivent maintenant être identifiées afin de les caractériser et élucider leur(s) rôle(s) dans la maturation des ARNr.

Mots clés : SnR30, Nucléole, Ribosome, ARN ribosomique (ARNr), Petit ARN nucléolaire (snoRNA), petite ribonucléoprotéine nucléolaire (snoRNP), H/ACA, Chromatographie d'affinité, Aptamère.

CHAPITRE I

1 INTRODUCTION

1.1 ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1.1 Maturation des ARNr

Il y a de cela quelques années, nous possédions très peu d'informations au sujet de la maturation des ARN ribosomiques (ARNr) chez les eucaryotes. Nous connaissons maintenant la majorité des facteurs cellulaires impliqués dans ce processus. Par contre, comment ces différents facteurs fonctionnent et interagissent pour mener aux formes matures des ARNr reste encore à être élucidé. Parmi ces différents facteurs, on dénombre au moins 170 facteurs protéiques, dont différentes exonucléases et endonucléases ainsi que des ARN hélicases (Venema et Tollervey, 1999; Kressler *et al.*, 1999). De plus, des petits ARN nucléolaires (snoRNA), agissant sous forme de complexes associés à quelques protéines (snoRNP), sont impliqués dans ce processus. Environ une centaine de ces complexes ribonucléoprotéiques sont impliqués dans la maturation des ARNr chez la levure (Bachelierie *et al.*, 2000). Chez les eucaryotes, c'est dans le nucléole que se déroulent la synthèse et la maturation des ARNr (McConkey et Hopkins, 1964). On y retrouve les gènes codant pour les ARNr ainsi que des ARNr à différents stades de maturation et d'assemblage avec les protéines ribosomiques. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'ADNr se retrouve en plusieurs unités de transcription faisant environ 9,1 kpb. Chacune de ces unités est transcrite en un pré-ARNr d'environ 6 kb. Ensuite, ce précurseur subit différentes modifications post-transcriptionnelles ; principalement la méthylation des riboses et la pseudouridylation mais aussi la méthylation de bases (revu dans Maden et Hughes, 1997). Enfin, le précurseur est clivé à différents sites afin d'éliminer les régions espaceur menant à la formation des ARNr 18S, 5.8S et du 25S (Figure 1.1; revu dans Kressler *et al.*, 1999).

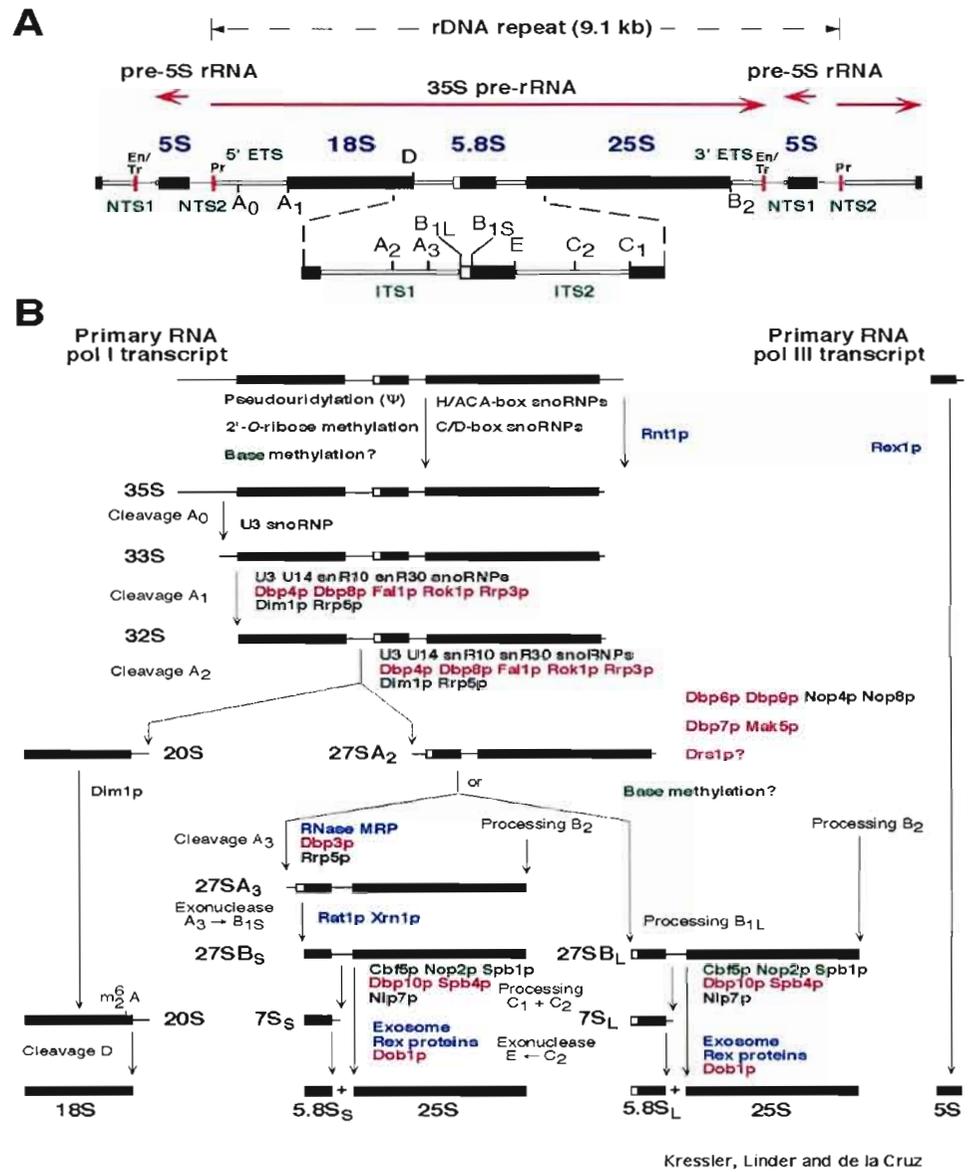


Figure 1.1 : Maturation du pré-ARNr chez *Saccharomyces cerevisiae*. La structure de l'unité d'ADNr est présentée en (A). La voie de maturation du pré-ARNr est présentée en (B). Le pré-ARNr 35S est sujet à des modifications post-transcriptionnelles par les snoRNP C/D et H/ACA. Il est ensuite clivé au site A₀. Ce clivage est dépendant du snoRNP U3. Les autres snoRNP impliqués dans la production de l'ARNr 18S (U14, snR10 et snR30) sont requis de façon spécifique pour les clivages aux sites A₁ et A₂. Le clivage en A₂ sépare les voies menant d'une part, à la biogenèse de la petite sous-unité d'ARNr (18S) et, d'autre part, de la grande sous-unité d'ARNr (5.8S et 25S). Adapté de Kressler *et al.* 1999.

1.1.2 Les petits ARN nucléolaires (snoRNA)

Il existe dans le nucléole de la levure environ 100 snoRNA. Ces snoRNA sont impliqués dans la maturation de l'ARNr, mais aussi des petits ARN nucléaires (snRNA), des ARN de transfert (ARNt) et possiblement des ARN messagers (ARNm) (Bachellerie *et al*, 2002). Les snoRNA sont divisés en deux grandes familles basées sur des motifs conservés soit, la famille des snoRNA à boîtes C et D (C/D) et les snoRNA de la famille à boîtes H et ACA (H/ACA). Les snoRNA d'une même famille adoptent une structure secondaire similaire (Figure 1.2). Les snoRNA à boîte C/D possèdent les motifs PuUGAUAG (Boîte C) et CUGA (Boîte D) situés près des extrémités 5' et 3', respectivement. Les motifs C et D sont appariés, formant un « kink-turn » (k-turn), un motif conservé au cours de l'évolution, présent aussi dans l'ARNr et reconnu pour lier des protéines spécifiques (Klein *et al*, 2001). Des boîtes C et D alternatives (C' et D') peuvent aussi être retrouvées dans le snoRNA et ces boîtes sont séparées par une courte séquence d'espacement. Les snoRNA C/D possèdent une ou deux longue(s) séquence(s) complémentaire(s) à des régions conservées de l'ARNr. Ces séquences font 10 à 21 nt et se retrouvent juste en amont des boîtes D et/ou D'. Les snoRNA H/ACA possèdent une structure secondaire consistant en une tige-boucle suivie d'une région charnière où se situe la boîte H (ANANNA, où N est n'importe quel nucléotide), suivie d'une deuxième tige-boucle et se terminant par une région simple brin contenant la boîte ACA trois nucléotides en amont de l'extrémité 3' (Balakin *et al*, 1996; Ganot *et al*, 1997). Les tige-boucles sont généralement interrompues par des boucles internes, nommées poches de pseudouridylation situées près de la base de la tige-boucle. Ces boucles internes contiennent de courtes séquences de part et d'autres du sommet de la boucle interne. Ensemble, ces séquences sont complémentaires à l'ARN cible. (revue dans Filipowicz et Pogacic, 2002).

1.1.3 Fonction des petites ribonucléoprotéines nucléolaires

Les snoRNA fonctionnent sous forme de complexes associés à quelques protéines (snoRNP) (Filipowicz et Pogacic, 2002). Les snoRNA C/D sont impliqués dans les réactions post-transcriptionnelles de méthylation en 2'-OH de riboses spécifiques (Kiss-Laszlo *et al*,

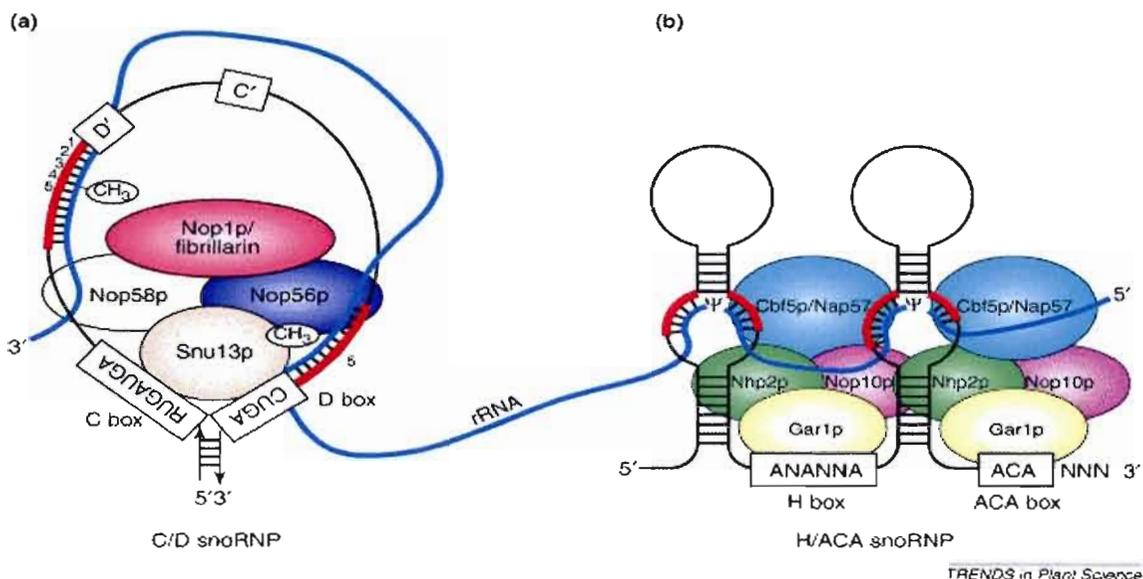


Figure 1.2 : Structure secondaire des snoRNA et protéines associées. a) Les snoRNA C/D adoptent une structure secondaire où les boîtes C et D près des extrémités 3' et 5' se retrouvent une en face de l'autre. Il est aussi possible de trouver des boîtes C et D alternatives (C' et D'). L'ARNr s'apparie dans une région complémentaire en amont de la boîte D et la méthylation est effectuée sur le 5^e nucléotide en amont de la boîte D. Ici est aussi représentée la disposition possible des protéines C/D soit Nop1p/fibrillarine, Nop56p, Nop58p et Snu13p (15.5 K chez l'humain). La structure secondaire des H/ACA consiste en une tige-boucle suivie d'une région charnière où se situe la boîte H (ANANNA), suivie d'une deuxième tige-boucle et se terminant par une queue dans laquelle on retrouve la boîte ACA trois nucléotides en amont de l'extrémité 3'. Il est aussi possible de voir où l'ARNr s'apparie dans la poche de pseudouridylation afin d'effectuer la modification de l'uridine en pseudouridine. On voit ici les quatre protéines H/ACA, Gar1p, Cbf5p/Nap57p (dyskérine chez l'humain), Nhp2p et Nop10p. Chez les snoRNA C/D, la protéine Nop1p est présente en deux exemplaires sous forme d'hétérodimère avec Nop56p et Nop58p et dans certains cas, Snu13p est aussi présente en deux exemplaires. Chez les snoRNA H/ACA, des images de microscopie électronique (Watkins *et al*, 1998) favorisent l'hypothèse du complexe composé de deux exemplaires des protéines. Tiré de Brown *et al*, 2003.

1996). Ce type de modification pourrait participer à la bonne conformation de l'ARNr en modifiant la conformation locale ou encore à sa stabilité puisque les résidus méthylés sont résistant aux nucléases (Cavaillé *et al.*, 1996). Tous les snoRNA C/D sont associés aux protéines Nop1p (fibrillarine chez l'humain), Nop56p, Nop58p et Snu13p (15.5K chez l'humain). Pour leur part, les snoRNA H/ACA sont tous associés aux protéines Gar1p, Cbf5p (dyskérine chez l'humain), Nhp2p et Nop10p. Les snoRNA H/ACA sont impliqués dans les modifications post-transcriptionnelles de pseudouridylation (Ganot *et al.*, 1997; Ni *et al.*, 1997). Cette modification consiste en un clivage du lien glycosyle N₁-C₁ suivi d'une rotation de la base et reformation d'un lien entre les carbones C₅ et C₁ (Ni *et al.*, 1997). Certaines de ces snoRNP comme les C/D U3 et U14 et les H/ACA snR30 et snR10 sont impliquées dans des réactions de clivage sur le pré-35S (Venema et Tollervey, 1999).

1.1.4 Expression des snoRNA

La plupart des snoRNA chez la levure *S. cerevisiae* sont encodés par des gènes indépendants. Par contre, chez cet organisme, il existe sept snoRNA qui sont introniques et cinq qui sont encodés dans des polycistrons. La majorité des snoRNA produits de gènes indépendants sont transcrits par l'ARN polymérase II et ont donc une coiffe triméthyl-guanosine (m₃G) à leur extrémité 5'. Contrairement aux snoRNA de levure, la grande majorité des snoRNA des vertébrés sont encodés dans les introns de pré-ARNm. Chez l'humain, seulement quatre snoRNA (U3, U8, U13 et 7-2/MRP) sont encodés par des gènes indépendants. Un pré-ARNm peut contenir plusieurs snoRNA (généralement un par intron) ce qui permet la production d'un grand nombre de snoRNA avec peu de gènes. Les gènes contenant les snoRNA codent généralement pour des protéines impliquées dans la synthèse ou dans la fonction de ribosomes. Il existe même des gènes hôtes qui contiennent des snoRNA mais ne codent pour aucune protéine comme, par exemple, les gènes dUHG1 et dUHG2 chez *Drosophila melanogaster*. Chez les plantes, les snoRNA sont produits majoritairement à partir de polycistrons; c'est-à-dire contenant plus d'un snoRNA par unité de transcription. Comme aucun exon ne se retrouve entre les différents snoRNA, ce sont des clivages par des endonucléases et non l'épissage qui sont responsables de leur production. Exceptionnellement chez les plantes, certains introns peuvent contenir plus d'un snoRNA (Figure 1.3 ; revue dans Brown *et al.*, 2003).

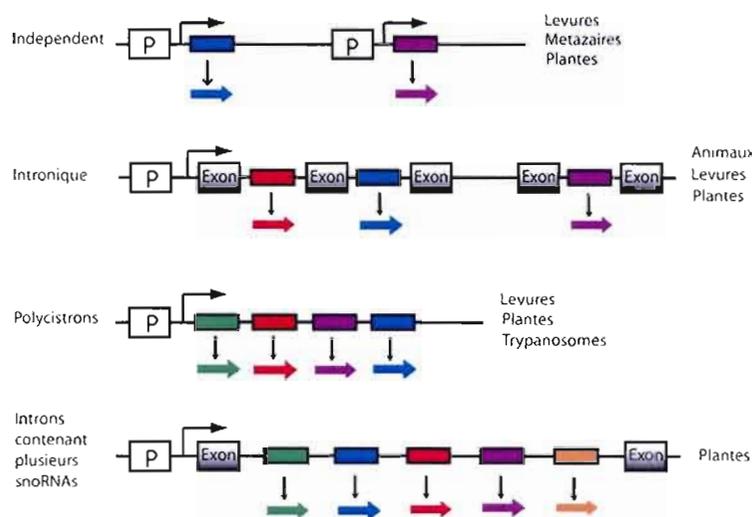


Figure 1.3 : Expression de petits ARN nucléolaires. Les snoRNA peuvent être exprimés à partir de gènes indépendants, d'introns de pré-ARNm, de polycistrons et d'introns contenant plusieurs snoRNA. Les boîtes blanches correspondent aux régions promotrices (P), les boîtes grises aux exons (E), les boîtes colorées aux séquences d'ADN des snoRNA et les flèches colorées aux snoRNA.

1.1.5 Les protéines associées aux snoRNA à boîtes H/ACA

Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine Gar1p est nécessaire à la production de l'ARNr 18S (Girard *et al*, 1992). Cette protéine de 25 kDa possède des domaines riches en glycines et arginines (GAR). Ces domaines contiennent plusieurs motifs RGG répétés. Les domaines GAR seraient des domaines de liaison à l'ARN mais ils ne sont pas nécessaires à la viabilité. Seul le domaine central de la protéine est essentiel à la viabilité (Girard *et al*, 1994). Gar1p est aussi nécessaire aux réactions de pseudouridylation des ARNr. Par contre, la déplétion de Gar1p n'affecte pas l'accumulation des snoRNA H/ACA (Bousquet-Antonelli *et al*, 1997). Gar1p est donc essentielle à la formation d'une snoRNP fonctionnelle mais n'est pas requise pour la production des autres composantes du complexe, soit le snoRNA ou les autres protéines H/ACA. La protéine Cbf5p a une masse de 64 kDa et a été découverte en recherchant des protéines liant le centromère (Jiang *et al*, 1993). Cette protéine est une pseudouridine synthase putative car elle possède des domaines d'homologie avec la pseudouridine synthase TruB d'*Escherichia coli*. Un de ces domaines est un domaine de liaison à l'uridine et le second est le domaine catalytique. Cbf5p est essentielle à la

production du 18S. Elle est aussi essentielle à l'accumulation des snoRNA H/ACA et de Gar1p. Finalement, Cbf5p est nécessaire à l'activité de pseudouridylation (Lafontaine *et al.*, 1998). Cbf5p interagit à la protéine Nopp140p qui se retrouve dans le nucléole et les corps de Cajal et qui servirait de transport entre le nucléole et le cytoplasme (Meier et Blobel, 1994). Nhp2p est une protéine qui fait environ 22 kDa. Il a été démontré que cette protéine peut lier des snoRNA H/ACA directement *in vitro* et son domaine central est possiblement le domaine de liaison à l'ARN. Nhp2p possède un haut degré d'homologie avec d'autres protéines liant l'ARN, dont Rpl32p et 15.5K. Ces protéines proviendraient possiblement d'un ancêtre commun (Vilardell et Warner, 1997; Nottrot *et al.*, 1999). Nhp2p est essentielle à la production de l'ARNr 18S, à l'accumulation des snoRNA H/ACA et de la protéine Gar1p ainsi qu'à l'activité de pseudouridylation (Henras *et al.*, 1998; Watkins *et al.*, 1998). Nop10p est une protéine dont la masse est 10 kDa et qui est essentielle à la production de l'ARN 18S, aux réactions de pseudouridylation et à l'accumulation des snoRNA H/ACA (Henras *et al.*, 1998). Naf1p est une protéine qui est requise lors de la maturation des ARNr. Cette protéine est localisée au noyau mais n'est pas une composante des snoRNP H/ACA. Par contre, elle est nécessaire à l'accumulation des snoRNA H/ACA. Il a été démontré que Naf1p liait l'ARN *in vitro* et lie directement Cbf5p et Nhp2p. Il a été montré aussi par crible double-hybride que Naf1p lie aussi la forme phosphorylée de CTD de l'ARN polymérase II (Yang *et al.*, 2005; Ballarino *et al.*, 2005). Ceci tend à montrer que Naf1p pourrait être recrutée par le CTD lors de la transcription de snoRNA H/ACA ce qui favoriserait l'assemblage des snoRNP. Dans cette optique, différents chercheurs ont démontré que Naf1p et Cbf5p et possiblement Nhp2p étaient recrutées lors de la transcription de snoRNA H/ACA (Yang *et al.*, 2005; Ballarino *et al.*, 2005). D'autres travaux montrent plutôt que ces protéines formeraient un complexe (tétramère) dans le cytoplasme avant de s'associer à l'ARN H/ACA dans le noyau et cette association requiert la synthèse *de novo* d'ARN (Wang et Meier, 2004).

1.1.6 La petite ribonucléoprotéine nucléolaire snR30

SnR30 est un membre de la famille des snoRNA H/ACA. C'est un snoRNA conservé au cours de l'évolution. En plus de *S. cerevisiae*, des homologues ont été retrouvés chez l'humain (U17), *Caretta caretta*, *Xenopus laevis*, *Fugu rubripes*, *Schizosaccharomyces*

pombe, *Tetrahymena thermophila* (Atzorn *et al*, 2004). Ces 608 nucléotides (*S.cerevisiae*) font de lui le plus long ARN de cette famille (Bally *et al*, 1988). Il a été démontré qu'il possède les boîtes H et ACA et adopte la structure secondaire typique des H/ACA (Atzorn *et al*, 2004 ; Figure 1.4). Cet ARN est exprimé à partir d'un gène indépendant et possède une coiffe triméthyl-guanosine à son extrémité 5'(m₃G) (Atzorn *et al*, 2004). Ce snoRNA est associé aux quatre protéines communes aux H/ACA (Lübben *et al*, 1995 ; Henras *et al*, 1998 ; Watkins *et al*, 1998). SnR30 est nécessaire aux clivages aux sites A1 et A2 (Figure 1.1) menant à la production de l'ARNr 18S de la petite sous-unité du ribosome (Morissey et Tollervey, 1993). Par contre, snR30 ne possède aucune cible connue pour la pseudouridylation. SnR30 possède aussi deux motifs qui lui sont spécifiques et présents dans ces homologues, soit les motifs m1 (AUAUCCUA) et m2 (AAACCAU) (Figure 1.4). Des mutations dans ces motifs montrent qu'ils sont essentiels à la production du 18S mais n'influencent pas l'accumulation de snR30. Les motifs m1 et m2 pourraient être des sites spécifiques de liaison de protéines (Atzorn *et al*, 2004).

1.1.7 Les aptamères ou étiquettes de purification d'ARN

Les aptamères sont de courtes séquences d'acides nucléiques possédant une haute affinité et spécificité pour leur substrat (Bock *et al*, 1992). L'aptamère S1 dont la structure minimale est constituée de 44 nucléotides a été développé par sélection *in vitro* (SELEX; Famulok et Szostak, 1992.) dans le laboratoire de David R. Engelke (Figure 1.5 ; Srisawat et Engelke, 2001). Cette méthode consiste à générer un grand nombre de séquences d'ADN ou d'ARN aléatoires et de tester leur affinité pour une molécule. Ronde après ronde, les séquences sont purifiées par chromatographie d'affinité pour la molécule d'intérêt et les séquences ayant le plus d'affinité sont conservées pour la ronde suivante. Chaque ronde est de plus en plus stringente de manière à isoler les séquences ayant le plus d'affinité pour le substrat choisi (Famulok et Szostak, 1992). L'aptamère S1 possède une haute affinité et spécificité pour la streptavidine. L'affinité de l'aptamère S1 pour la streptavidine est dépendante de la séquence nucléotidique

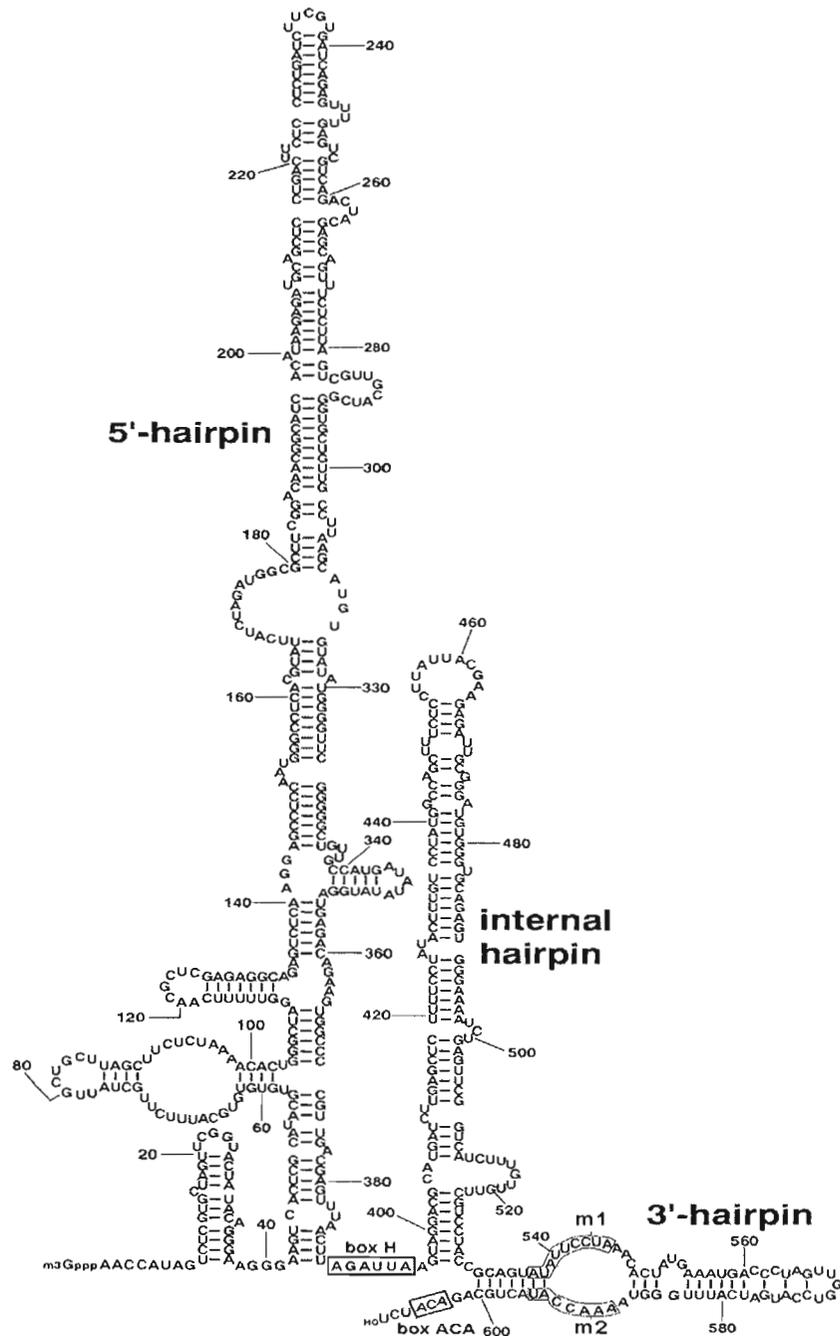


Figure 1.4 : Structure secondaire de snR30. Le snoRNA snR30 adopte une structure secondaire typique des snoRNA de la famille H/ACA. SnR30 possède une première tige-boucle (42-389) suivie d'une boîte H (390-395) dans la portion charnière, une seconde tige-boucle (532-600) et une boîte ACA à trois nucléotides en amont de l'extrémité 3' (603-605). Certains snoRNA possèdent des tiges boucles additionnelles situées dans la première tige-boucle (104-371) et après la boîte H (397-530) appelées éléments d'insertions H1 et H2, respectivement. Adapté de Atzorn *et al*, 2004.

de l'aptamère mais aussi de sa conformation. Il est alors possible d'intégrer l'aptamère S1 dans un ARN et de purifier ce dernier par chromatographie d'affinité avec des billes couplées à la streptavidine. L'éluion est effectuée avec de la biotine qui possède une plus grande affinité pour la streptavidine que l'aptamère S1 (Srisawat et Engelke, 2001). Il est alors possible de purifier l'ARN contenant l'aptamère S1 exprimé à partir d'une souche de *S. cerevisiae* et analyser les protéines qui y sont associées.

Aptamère S1 minimal

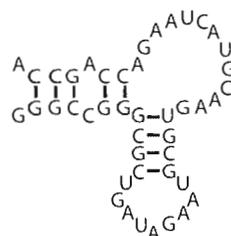


Figure 1.5 : Structure secondaire de la portion minimale de l'aptamère d'ARN S1. Cet aptamère possède une haute affinité et spécificité pour la streptavidine. Il doit adopter cette structure secondaire afin d'être fonctionnel pour la purification

1.2 LE PROJET

1.2.1 Hypothèses de travail

La snoRNP snR30 possède tous les éléments nécessaires pour effectuer la pseudouridylation, mais elle n'a pas de cible connue pour cette modification et elle est impliquée dans des réactions de clivage menant à la formation de l'ARNr 18S de la petite sous-unité ribosomique. L'ARN snR30 est peut-être un ARN catalytique lui permettant alors de cliver le 35S aux sites A1 et A2. Il est aussi possible que snR30 soit associé à des protéines qui lui sont spécifiques et qui lui confèrent sa fonction unique.

1.2.2 Parallèle avec la snoRNP U3 de la famille C/D

La deuxième hypothèse est celle qui est au centre de mon projet de recherche. Premièrement, il est rare de retrouver dans une cellule de l'ARN « nu » car ce dernier est plus

susceptible d'être dégradé. Avec sa grande taille (608 nucléotides), il est peu probable que snR30 ne soit associé qu'à quatre protéines, même si ces dernières peuvent se retrouver en deux exemplaires, soit un exemplaire de chaque protéine par tige boucle. De plus, la deuxième hypothèse est supportée par un parallèle qu'il est possible de faire entre snR30 et U3, une snoRNP de la famille C/D. Les snoRNA de cette famille sont aussi associés à quatre protéines communes à tous les membres de la famille. Les snoRNP à boîtes C/D sont impliquées dans des modifications post-transcriptionnelles de méthylation sur le pré-ARNr 35S. Comme snR30, U3 n'est pas impliquée dans des modifications post-transcriptionnelles sur l'ARN 35S mais plutôt dans les réactions de clivage. De plus, U3 est aussi le plus gros ARN de sa famille. Dans le cas de U3, il a été démontré que ce snoRNA est associé à pas moins de 30 protéines qui lui sont spécifiques et qui lui confèrent probablement sa fonction unique (Dragon *et al*, 2002; Gallagher *et al*, 2004). Il est possible que snR30 possède lui aussi des protéines qui lui sont spécifiques et qui lui confèrent ces propriétés uniques.

1.2.3 But

Afin d'identifier ces protéines, nous avons utilisé l'aptamère S1 pour purifier la snoRNP snR30. Comme ce « tag » est une séquence d'acides nucléiques et que le seul élément spécifique à snR30 est son ARN, il sera possible d'isoler snR30 sur colonne de streptavidine-agarose. L'utilisation de l'aptamère S1 permettra donc de récupérer snR30 de façon spécifique afin d'en identifier le contenu protéique. Nous pourrons par la suite caractériser ces protéines dans le but de déterminer leur implication dans la fonction de snR30.

1.2.4 Hypothèses sur les protéines associées à snR30

Le snoRNA snR30 est possiblement associé non seulement aux quatre protéines H/ACA soit, Gar1p, Nhp2p, Cbf5p, et Nop10p, mais est aussi associé à une ou quelques protéine(s) qui est (sont) spécifique(s) à cet ARN et qui lui confère(nt) sa fonction particulière au sein de la maturation des ARN ribosomiques. Cette hypothèse est supportée par le parallèle effectué avec la snoRNP U3 mentionné précédemment. Ces protéines peuvent être associées au snoRNA par des liaisons directes ARN-protéine ou de façon

indirecte par liaison protéine-protéine. Leur(s) fonction(s) peut(peuvent) être variée(s). Ces protéines pourraient servir lors de la maturation de snR30 et aussi participer au bon repliement de son ARN. Ces protéines pourraient servir à lier la snoRNP au pré-ARNr grâce à des domaines de liaison à l'ARN. Il se pourrait aussi que ces protéines aient une activité endonucléase et participent directement au clivage du pré-ARNr. Finalement, ces protéines pourraient servir à recruter d'autres protéines ou snoRNP impliquées dans la maturation des ARNr.

1.2.5 Intérêt du projet

Connaître les composantes protéiques de snR30 approfondirait nos connaissances sur sa biogenèse et sa fonction au sein de la maturation du pré-ARNr 35S. Il est connu que certaines protéines nucléolaires jouent un rôle dans certaines maladies. Le syndrome de Werner est associé à la protéine nucléolaire Wrm. Lorsque celle-ci est mutée, ceci provoque des modifications de la fonction nucléolaire (Marciniak *et al*, 1998). Le syndrome de Treacher Collins est dû à des mutations dans le gène TCOF1 qui code pour la protéine nucléolaire Treacle qui ne localise plus au nucléole lorsque mutée (Isaac *et al*, 2000). La dyskératose congénitale est due à des mutations de la dyskérine qui affecte la pseudouridylation de l'ARNr. Cette protéine est principalement nucléolaire et est aussi associée aux snoRNA de la famille H/ACA dont snR30 fait partie (Bessler *et al*, 2004). Une fois le contenu protéique de snR30 identifié, ceci pourrait nous donner des indices sur les causes de certaines maladies reliées aux protéines nucléolaires et même nous aider à élaborer de nouveaux traitements pour ces maladies.

CHAPITRE II

2 MÉTHODOLOGIE

2.1 PRÉPARATION DES SOUCHES EXPRIMANT SNR30 CONTENANT L'APTAMÈRE S1

2.1.1 Détermination du site d'introduction de l'aptamère S1

Afin de déterminer l'endroit où l'aptamère S1 doit être introduit, une étude de la structure secondaire de l'ARN snR30 a été effectuée. La structure secondaire de l'ARN snR30 est analysée grâce au programme mFold (Zuker, 2003). Notre modèle de structure secondaire a été confirmé par la suite par le groupe de T. Kiss (Atzorn *et al*, 2004). L'aptamère doit être placé à un endroit où il adoptera la bonne structure secondaire (Srisawat et Engelke, 2001). Deux sites potentiels ont été sélectionnés. Le premier se trouve au bout de l'élément d'insertion H1 et les nucléotides 234 à 238 ont été remplacés par l'aptamère S1 (construction H1; Figure 2.1). Le second site se trouve au bout de l'élément d'insertion H2 et les nucléotides 456 à 458 sont remplacés par l'aptamère S1 (construction H2 : Figure 2.2).

2.1.2 Génération du plasmide pRS316-S1-SNR30

Pour construire ce plasmide, le locus *SNR30* complet (promoteur, séquence codante et terminateur) est amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche sauvage de *S. cerevisiae* YPH499. Le PCR débute par une dénaturation à 94°C pendant 5 minutes suivi de trente cycle composés d'une phase de dénaturation (94°C pendant 45s), une phase d'hybridation (50°C pendant 45s) et une phase d'extension (72°C pendant 2 min 30s) et terminé par une extension de 5 minutes à 72°C. Le PCR a été effectué avec l'ADN polymérase Pfu Turbo de Stratagene® et les oligonucléotides SNR30-Cla-1 et SNR30-Cla-2 (Appendice A ; Tableau I). SNR30-Cla-1 et SNR30-Cla-2 sont des oligonucléotides spécifiques à snR30 auxquels des sites ClaI ont été ajoutés en 5' des oligonucléotides. Le produit de PCR est digéré par l'enzyme de restriction ClaI et cloné dans le plasmide pBluescript II SK(-) (pBS) (Stratagene®) au site ClaI (pBS-snR30) (ClaI et T4 DNA ligase

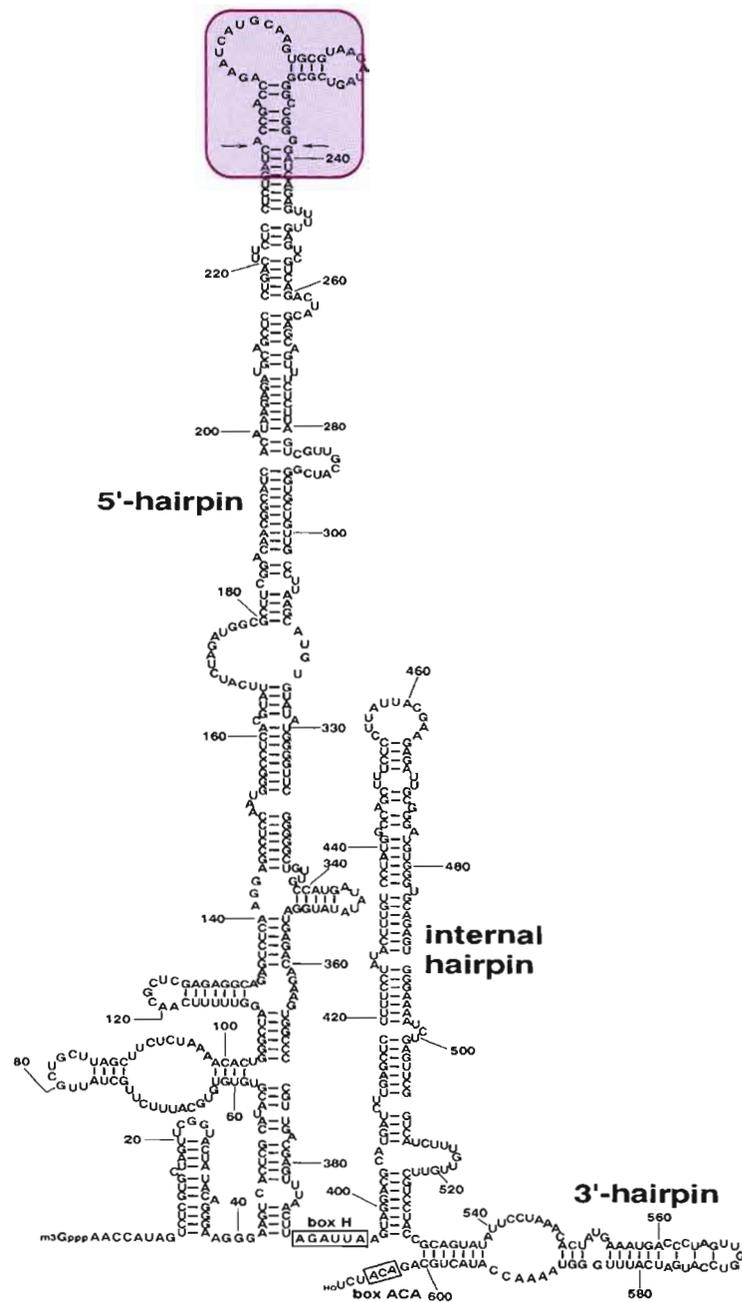


Figure 2.1 : Structure secondaire du snoRNA S1-SNR30 H1. Dans cette construction, les nucléotides 234 à 238 ont été remplacés par l'aptamère S1 (boîte violette). Adapté de Atzorn *et al*, 2004.

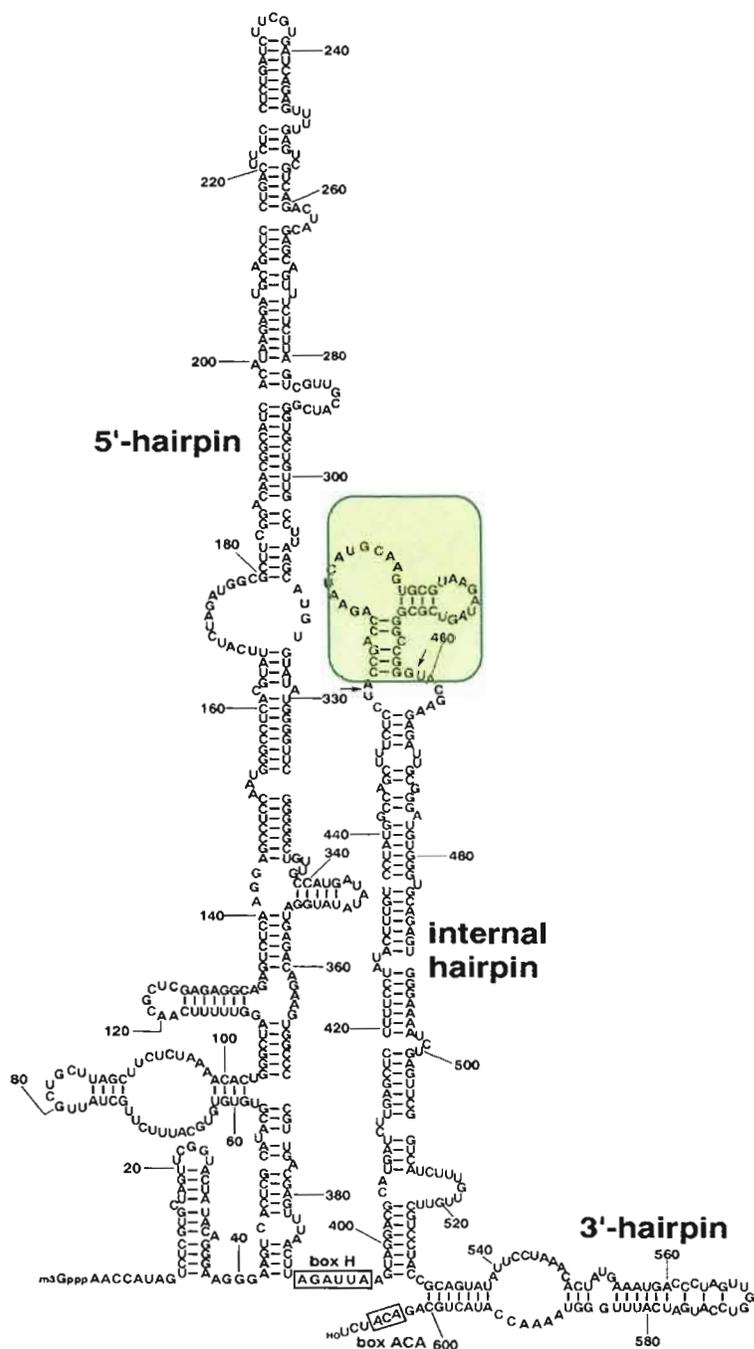


Figure 2.2 : Structure secondaire du snoRNA S1-SNR30 H2. Dans cette construction, les nucléotides 456 à 458 ont été remplacés par l'aptamère S1 (boîte verte). Adapté de Atzorn *et al*, 2004.

de New England Biolabs®). Puisqu'il est généralement plus facile de travailler avec de petits vecteurs, nous utilisons le plasmide pBS car ce vecteur est plus petit que le vecteur d'expression. Ceci facilitera l'introduction de l'aptamère S1 par mutagenèse dirigée par PCR. La construction pBS-snR30 a été vérifiée par séquençage (Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill). À partir de ce plasmide, l'aptamère S1 est introduit dans la séquence codante de snR30 par la méthode des «megaprimers» (Sarkar et Sommer, 1990; Figure 2.3). Cette méthode s'effectue en deux étapes de PCR. Le premier PCR permet l'amplification de chaque moitié de la séquence dans laquelle nous voulons introduire la mutation (dans le cas présent, l'aptamère S1). Un second PCR est effectué avec ces deux moitiés de séquence. Comme ces deux fragments possèdent maintenant la mutation, ceci permet un appariement entre les deux portions chevauchantes de chaque moitié et, grâce aux oligonucléotides de chaque extrémité, la séquence complète est amplifiée et clonée dans pBS au site KpnI-EcoRI. Par la suite, cette nouvelle construction est vérifiée par séquençage. Cette construction est sous-clonée dans un vecteur d'expression de levure, soit pRS316 (Sikorski et Hieter, 1989) aux sites KpnI et EcoRI (KpnI et EcoRI de Amersham Pharmacia® et T4 DNA ligase de New England Biolabs®). Ce plasmide est transformé dans la souche GAL1::SNR30 Gar1-TAP. La transformation est effectuée par la méthode à l'acétate de lithium (LiOAc) (Gietz *et al.*, 1992).

2.1.3 Méthode de préparation des extraits de levures

Une culture de levures de 60mL dans le milieu YPD (1% «yeast extract», 2% peptone, 2% dextrose) est effectuée et récoltée en phase exponentielle (à une densité optique entre 0,4 et 0,8 à A_{600}) par centrifugation à 2000g pendant 5 minutes. Elles sont ensuite resuspendues dans l'eau stérile froide puis centrifugée une seconde fois à 2000g pendant 5 minutes. Cette étape est répétée une seconde fois dans le but d'éliminer le milieu de culture. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 1,5mL de tampon d'extraction TMN100 froid (25mM Tris-HCl pH 7,8, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), 0,1% NP-40 et cocktail d'inhibiteur de protéase Complete® de Roche). Un volume de 300µL de billes de verres de 400 à 625 microns (Sigma®) est ajouté et le tout est passé au vortex pendant 45s puis mis sur glace immédiatement pendant 45s. Cette étape est répétée 7 ou 8 fois.

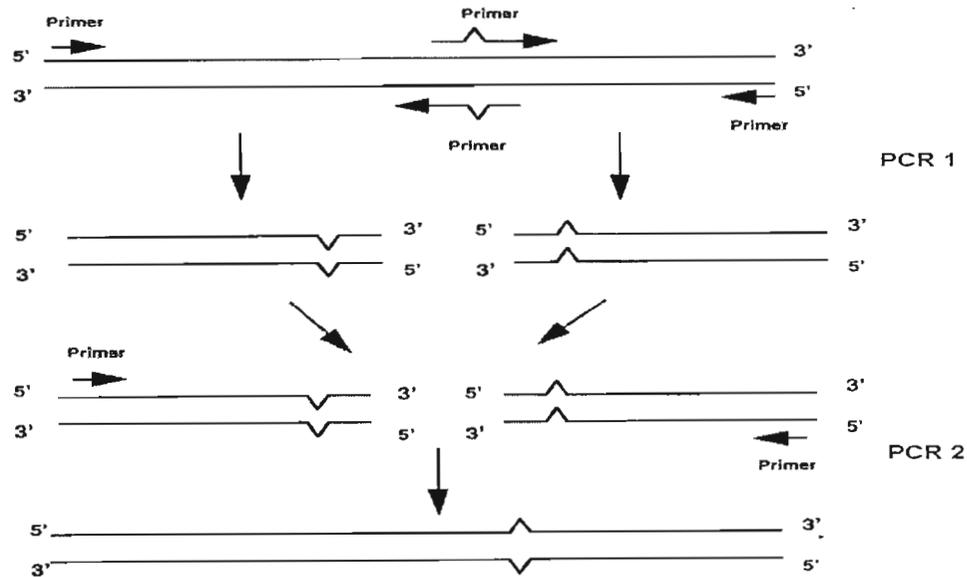


Figure 2.3 : Méthode des «megaprimers». Cette méthode de mutagenèse dirigée par PCR est composée de deux étapes. Le premier PCR permet l'amplification de chaque moitié de la séquence dans laquelle nous voulons introduire la mutation. Un second PCR est effectué avec ces deux moitiés de séquence. Comme ces deux moitiés possèdent maintenant la mutation, ceci permet une hybridation entre les deux portions chevauchantes (PCR1 : M13for avec SNR30S1H1.1ou SNR30S1H2.1 et M13rev avec SNR30S1H1.2 ou SNR30S1H2.2PCR2 : M13for et M13rev. M13for et M13rev sont des oligonucléotides universels pour le plasmide pBS ; voir Appendice A ; Tableau I).

Le tout est ensuite centrifugé 5 minutes à environ 10000 g dans une microcentrifugeuse réfrigérée afin d'éliminer les billes de verre et les plus gros débris cellulaires. Toutes les manipulations subséquentes sont effectuées sur glace ou à 4°C. Pour les extraits à grande échelle (4L de culture), les levures sont resuspendues dans 20mL de TMN100 et gelées immédiatement dans l'azote liquide. Les levures sont ensuite dégelées et brisées par la même méthode décrite précédemment mais avec 4 mL de billes de verre.

2.1.4 Vérification de l'expression de S1-snR30 *in vivo* par hybridation Northern

À partir d'un extrait frais des souches H1 et H2, 1,2 mL ont été pris afin d'effectuer une immunoprécipitation de la protéine Gar1p grâce à l'étiquette de purification TAP. L'extrait est incubé une heure à 4 °C avec agitation en présence de 30 µL de billes IgG-sépharose (IgG Sepharose® 6 Fast Flow, Amersham Biosciences). Les billes sont récupérées par centrifugation à 4000g pendant 30s. Le surnageant est conservé pour analyses ultérieures et les billes sont lavées 6 à 8 fois avec du tampon TMN100. Les billes sont finalement resuspendues dans du tampon TMN100. Une extraction d'ARN directement à partir des billes est faite avec 1 volume de mélange phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1). La phase aqueuse est récupérée et cette étape est répétée une seconde fois suivie d'une troisième étape comme celle-ci mais avec du chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1). L'ARN est récupéré pour analyse Northern par précipitation à l'éthanol en ajoutant 40µg de glycogène (Roche®) comme entraîneur.

2.1.5 Test de fonctionnalité de la construction S1-snR30

Ce test consiste à incuber différentes dilutions d'une culture sur géloses afin de d'évaluer la croissance des souches l'une par rapport à l'autre. Comme snR30 est une snoRNP essentielle, une modification affectant sa fonction nous permettra d'observer un problème de croissance lorsqu'on compare la souche modifiée à la souche sauvage. Une pré-culture en milieu liquide contenant du galactose est effectuée avec la souche parentale YPH499 Gar1p-TAP, et la souche GAL1::snR30 Gar1p-TAP transformée avec soit le plasmide pRS316 seul ou pRS316-snR30 sans l'aptamère S1 ou avec ce dernier en position H1 ou H2 . Les cultures sont lavées deux fois à l'eau stérile afin d'éliminer le milieu de culture. La densité optique (DO) (A_{600}) est mesurée et les cellules sont resuspendues dans de l'eau stérile afin que les DO des cultures soient de 1. Une série de six dilutions successives (1/10) est effectuée à partir de la culture de départ. Un volume de 10µL de chaque dilution est inoculé en points successifs sur des géloses contenant soit du galactose ou du glucose. Les géloses sont incubées à 30°C pendant deux ou trois jours selon le milieu de croissance.

2.2 PURIFICATION DE SNR30 CONTENANT L'APTAMÈRE S1

Toutes les analyses pour la purification de S1-SNR30 ont été effectuées à partir d'extraits provenant de la souche YPH499 GAL1 ::SNR30 Gal1p-TAP exprimant la construction H1 à partir du vecteur pRS316. Nous utilisons cette souche puisqu'en présence de glucose, elle peut exprimer seulement S1-SNR30 et non SNR30 endogène.

2.2.1 Chromatographie d'affinité avec des billes streptavidine-agarose pour récupérer la snoRNP snR30

L'aptamère S1 introduit dans la séquence de snR30 a une haute spécificité pour la streptavidine et il est possible de récupérer snR30 par chromatographie d'affinité avec des billes de streptavidine-agarose. L'extrait de levures (1,5 mL) est incubé 10 minutes sur glace avec de l'avidine de blanc d'œuf (5µg/mg de protéines). Ceci sert à bloquer l'interaction de la biotine endogène avec les billes streptavidine-agarose. Un volume de 200µL de l'extrait est mis de côté pour analyses futures. Le volume restant (1,3mL) est incubé en présence de 50µL de billes streptavidine-agarose (Novagen®) pendant une heure avec agitation à 4°C. Les billes sont ensuite récupérées par centrifugation à 4000g pendant 30s, resuspendues dans du TMN100 contenant 5mM de biotine et incubées une heure avec agitation à 4°C. Après une autre centrifugation à 4000 g afin d'éliminer les billes, l'éluat (surnageant) est récupéré et analysé immédiatement. Après extraction au phénol, les ARN sont analysés par hybridation Northern et marquage au pCp et les protéines par SDS-PAGE et immunobuvardage ou coloration au nitrate d'argent (techniques décrites ultérieurement). Pour ce qui est des préparations à grande échelle, l'extrait (20mL) est aussi incubé avec de l'avidine (5µg/mg de protéines) sur glace pendant 10min et 200µL de l'extrait est mis de côté pour fins d'analyses. L'extrait est incubé avec un volume de 2mL de billes de streptavidine-agarose (Novagen®) pendant une heure avec agitation à 4°C. Les billes sont ensuite récupérées grâce à une colonne Econo-Pac de 20 mL(Bio-Rad®). Les billes sont lavées 6 à 8 fois avec 10 mL de TMN100. L'éluat est effectuée avec 2 mL de TMN100 contenant 5mM de biotine et les

fractions sont récupérées dans des tubes 1,5mL et congelée -80°C. Les analyses des ARN extrait au phénol et des protéines sont effectuées comme décrit précédemment.

2.2.2 Marquage des ARN au 5' [³²P]-pCp

Après extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol, les ARN sont resuspendus dans 8 µL d'H₂O ultrapure auxquels on ajoute 2 µL de DMSO, 2 µL de 5' [³²P]-α pCp (3000 Ci/mmol; NEN®), 3 µL de glycérol, 2 µL de tampon de ligation 10X (100mM MgCl₂ ; 500mM Hepes pH 8,3; 25mM DTT ; 0.4mM ATP), 1 µL (40 unités) d'inhibiteur de RNase (RNasin, Promega®) et 2 µL (800 unités) de T4 RNA ligase (New England Biolabs) (England et Uhlenbeck, 1978). Le mélange de réaction est incubé à 4°C pour la nuit. Un volume de bleu de chargement (95% formamide, 20mM acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), 0,5% bleu bromophénol, 0,5% xylène cyanol) est ajouté au mélange de réaction. Les ARN (4 µL pour les extraits et 10 µL pour les échantillons de purification) sont séparés par migration de 3 heures à 70W dans un grand gel de séquence dénaturant à 8% de polyacrylamide et 8M d'urée préparé dans du TBE (89mM Tris, 89mM acide borique, 2mM EDTA). Le gel est transféré sur papier Wattmann et séché puis exposé avec un film à autoradiographie avec un écran intensifiant à -80°C (pendant 16 heures).

2.2.3 Analyse de l'ARN par hybridation Northern

Un volume de bleu de chargement est ajouté à l'ARN resuspendu après précipitation à l'éthanol. L'ARN est séparé dans un gel dénaturant de 8% polyacrylamide (15cm par 17cm) contenant de l'urée 8M dans du TBE. La migration est effectuée à 10 watts pendant environ 1 heure trente minutes. L'ARN est transféré sur une membrane de nylon chargée positivement (Zeta-Probe GT® de BIO-RAD) avec le « Semi-Dry Blotter » Trans-Blot® selon le protocole de BIO-RAD (70 min à 300mA dans du tampon TBE 0,5X). La membrane est ensuite pré-hybridée à 37°C dans un four à hybridation pendant une heure dans 30mL de solution de pré-hybridation (5X SSPE (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄-H₂O, 5 mM EDTA, à pH 7.7), 7,5X Denhardt (0,15% Ficoll, 0,15% polyvinylpyrrolidone et 0,15% bovine serum albumin), 0,1% de sodium-dodecyl-sulphate (SDS), 1,5 mg d'ARNt dénaturé). Les

oligonucléotides spécifiques aux ARN à détecter (ex : snR30, U3, U14) sont phosphorylés avec de l'adénosine-tri-phosphate marqué radioactivement au [γ - 32 P]. Ceci est effectué avec la T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs) selon les spécifications du manufacturier. Les nucléotides libres après le marquage des oligonucléotides sont retirés grâce au « nucleotide removal kit ® » de Qiagen. La sonde est incubée avec la membrane à 37°C pour la nuit dans un four à hybridation. La membrane est ensuite lavée trois fois. Les deux premiers lavages sont effectués avec du SSPE 5X et le troisième avec du SSPE 0,5X. La membrane est exposée avec un écran au phosphore ou un film à autoradiographie. (Sondes utilisées : anti S1, SNR30, SNR10, U3, U14, SNR46 et U24; voir appendice A, Tableau I).

2.2.4 Analyse des protéines par électrophorèse

L'éluât (100 μ L) est précipité en ajoutant 1/4 de volume d'acide trichloroacétique 100% contenant 4mg/mL de déoxycholate. Le mélange est mis sur glace pendant 20 minutes et centrifugé à environ 18000 g pendant 15 minutes à température de la pièce. Le culot est nettoyé avec 3 volumes d'acétone froid, incubé à température de la pièce pendant 10 minutes et recentrifugé. Le culot obtenu est séché à l'air 10 minutes et resuspendu dans 14 μ L d'eau ultrapure. Un volume de bleu de chargement SDS 2X (0.1M Tris-HCl/SDS pH 6.8, 20% glycérol, 4% SDS, 0.2M DTT) ou de bleu de chargement pour les gels Criterion XT de Bio-Rad est ajouté à l'éluât et il est séparé dans un gel de polyacrylamide contenant du SDS. Les échantillons sont fractionnés dans des gels de 10% acrylamide à 100V pour 1 heure (jusqu'à ce que le bleu d'échantillon soit sorti du gel) ou sur un gel à gradient de polyacrylamide 4-12% pré-coulé (Critérium XT de BIORAD®) à 200V pendant 40min.

2.2.4.1 Analyse des protéines H/ACA par immunobuvardage

Les protéines sont transférées sur une membrane «polyvinylidene fluoride» (PVDF) préalablement traité au méthanol selon le protocole de BIO-RAD pour l'appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® (15 min à 15V dans du tampon Towbin). Pour bloquer les liaisons non spécifiques de l'anticorps à la membrane, cette dernière est ensuite incubée de 30 min à 1 heure avec une solution de 5% de lait en poudre et de TBS-Tween

(20mM Tris-Cl pH 7.6, 136.8mM NaCl, 0.2% Tween). Toujours dans le lait, l'anticorps primaire est ajouté à la concentration de travail selon l'anticorps (1/5000 pour l'anticorps PAP contre le TAP selon le protocole de Sigma et 1/8000 pour l'anticorps de lapin contre Nhp2p selon le protocole de Henras *et al*, 2001) et incubé pendant 1 heure. La solution d'anticorps primaires est enlevée puis la membrane est ensuite lavée 3 fois (1 fois 15 min et 2 fois 5 min) avec du TBS-Tween. Dans du TBS-Tween, l'anticorps secondaire est ajouté à la concentration de travail (anti-IgG lapin 1/100000, pas besoin d'anticorps secondaire pour PAP puisque ce dernier est déjà couplé à une peroxydase) et incubé pendant 1 heure. Une seconde série de trois lavages est effectuée après l'incubation. La membrane est ensuite traitée avec la trousse d'immunofluorescence ECL ou ECL-Plus (Amersham-Pharmacia®) selon le protocole du fabricant. Un film à autoradiographie (Super RX Fujii medical X-Ray film de Fujii Film®) est exposé à la membrane.

2.2.4.2 Coloration au nitrate d'argent

Pour la coloration au nitrate d'argent, la méthode compatible avec la spectrométrie de masse est utilisée (Nesterenko *et al*, 1994). Le gel est d'abord fixé 2 fois avec une solution 50% méthanol et 10% d'acide acétique pendant 20 minutes. Il est ensuite rincé 10 min avec de l'éthanol 20% et 10min avec de l'eau distillée. Le gel est réduit avec du thiosulfate de sodium (0,2g/L) de 1 à 2 minutes. Le gel est rincé pendant 10min deux fois avec de l'eau distillée. Il est incubé avec agitation pendant 30min avec du nitrate d'argent (2g/L) et rincé 20s avec de l'eau distillée. Le gel est ensuite rincé 30s avec la solution de développement avant d'être incubé jusqu'à l'intensité voulue avec la solution de développement (30g/L de carbonate de sodium, 1,4mL/L de solution à 37% de formaldéhyde, 10mg/L de thiosulfate de sodium). La réaction est arrêtée en incubant le gel le même temps que le développement dans une solution contenant 1% d'acide acétique glaciale. Finalement, le gel est lavé 2 fois 20 minutes avec de l'eau distillée.

CHAPITRE III

3 RÉSULTATS

3.1 Test de dilution en série

Afin de vérifier la viabilité d'une souche de levure exprimant la snoRNP snR30 contenant l'aptamère S1 en position H1 ou H2, un test de croissance par dilution en série a été effectué. Cinq souches différentes ont été inoculées en points, correspondants à des dilutions successives de 1/10 d'une culture de départ à DO_{600} égale à 1, sur gélose contenant du galactose ou du glucose. Comme snR30 est une snoRNP essentielle, si l'insertion de l'aptamère S1 interfère avec sa fonction, il sera possible d'observer un défaut de croissance. Dans le cas de la souche parentale YPH499 Gar1p-TAP, la croissance est normale autant en milieu galactose qu'en milieu glucose (Figure 3.1, rangée du haut). Ceci était attendu puisque dans cette souche, snR30 est sous le contrôle de son promoteur naturel qui permet l'expression du snoRNA snR30 autant en milieu galactose que glucose. Pour ce qui est de la

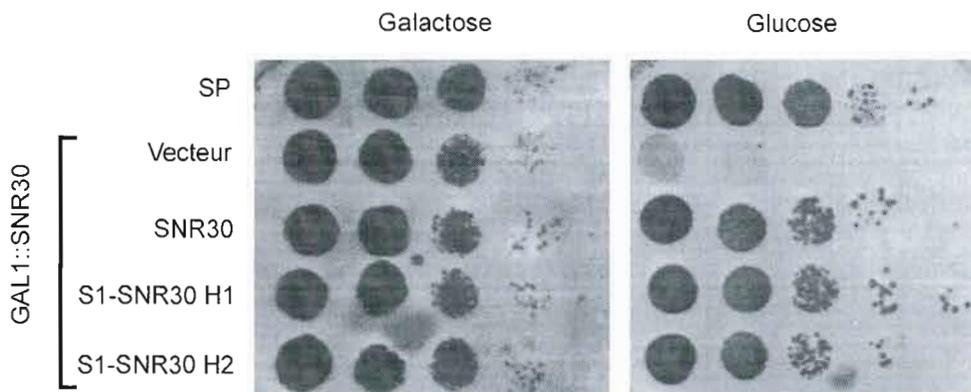


Figure 3.1 : La construction S1-snR30 est fonctionnelle *in vivo*. Des dilutions en série à partir de cultures en phase exponentielle ont été incubées sur des plaques contenant du galactose ou du glucose. YPH499 Gar1p-TAP est la souche parentale (SP). La souche GAL1::SNR30 a été transformée avec pRS316 (vecteur), pRS316-SNR30 ou pRS316-S1-SNR30 (H1 ou H2). Des dilutions 1/10 ont été faites à partir de la culture de départ (colonne de gauche).

souche GAL1::SNR30, cette dernière a été transformée avec soit le vecteur d'expression pRS316 vide, le même vecteur contenant le gène codant pour snR30 ou snR30 avec

l'aptamère S1. La souche contenant le vecteur vide montre une croissance normale sur milieu galactose lorsque snR30 endogène est exprimé. Par contre, lorsque la souche est déplétée de snR30 endogène (en milieu glucose) il n'y a aucune croissance, même à la plus haute densité en cellules. Pour les souches transformées avec le vecteur contenant snR30 et S1-snR30 (H1 et H2), la croissance est normale lorsque snR30 endogène est exprimé (en galactose). Lorsque les souches sont transférées en milieu glucose et que snR30 endogène est déplété, les souches peuvent être sauvées en exprimant snR30 à partir d'un plasmide. Les niveaux de croissance en glucose pour les souches exprimant snR30 et S1-snR30 à partir de plasmides sont similaires au type sauvage surtout si on compare les dilutions 4 et 5 pour chacune des souches (Figure 3.1). Ceci montre d'une part, qu'il est possible de compléter une souche dépourvue de snR30 endogène en exprimant ce snoRNA à partir d'un plasmide et, d'autre part, que l'introduction de l'aptamère S1 dans la séquence codant pour snR30 n'affecte pas sa fonction *in vivo*.

3.2 Marquage des ARN au [5'-³²P] pCp

Après la purification avec les billes de streptavidine d'un extrait total de levure de la souche S1-SNR30 H1, tous les ARN de l'éluat ont été extraits et un [5'-³²P] pCp a été ajouté à leur extrémité 3'. Cette molécule radioactive permet qu'un seul phosphate radioactif soit ajouté en 3' par molécule d'ARN, le second phosphate (en 3' du pCp) empêchant la liaison d'une autre molécule. Les ARN marqués ont ensuite été séparés dans un grand gel de séquençage. Cette méthode nous permet d'évaluer la population d'ARN présents dans les échantillons analysés. La piste 2 de la Figure 3.2 correspond à l'extrait cellulaire total. Il est possible de voir plusieurs bandes correspondant aux différents ARN cellulaires. Parmi celles-ci, quelques bandes de forte intensité peuvent être observées. Elles correspondent aux ARN abondants dont le 5S, le 5.8S et les ARNt. À partir de ce même extrait, une immunoprécipitation pour la protéine Gar1p a aussi été effectuée, l'éluat de cette purification marqué au [5'-³²P] pCp et les ARN séparés sur ce gel (piste 3). Plusieurs bandes correspondent à des snoRNA de la famille H/ACA connus chez *S. cerevisiae* (acolade) puisque Gar1p est une protéine commune à tous les snoRNA de la famille H/ACA. Il est aussi possible de détecter dans cette piste une bande de la taille de snR30 contenant

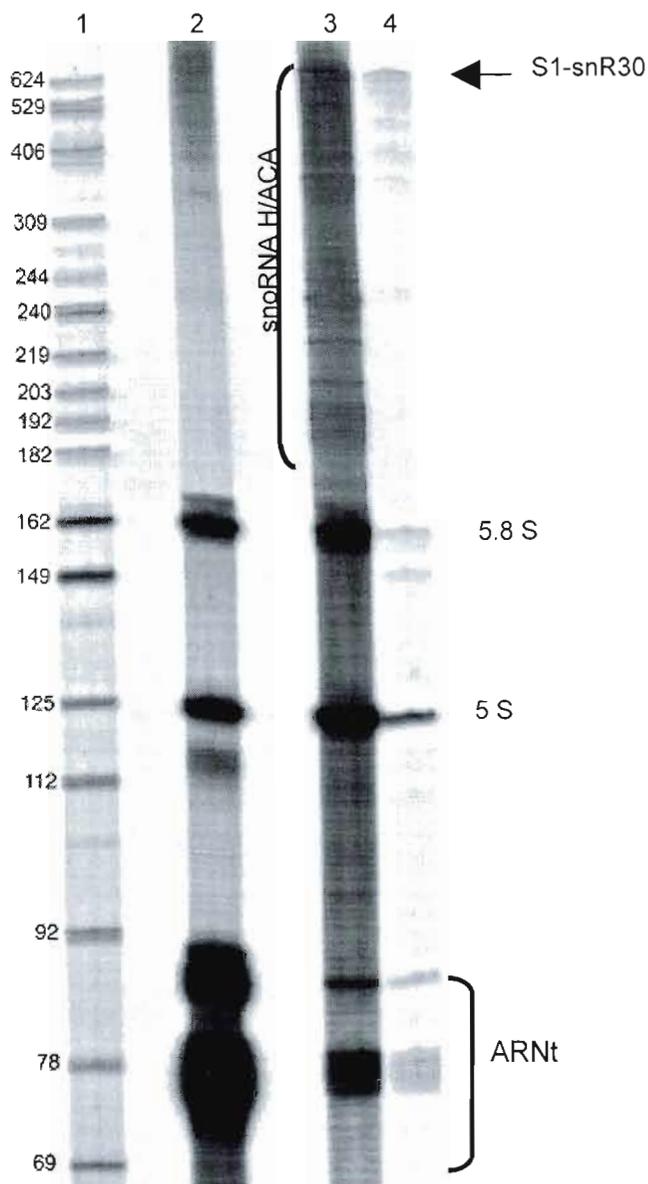


Figure 3.2 : Analyse des ARN marqués au $[5'-^{32}\text{P}]$ pCp. À partir d'extrait de la souche GAL1::SNR30 transformée avec pRS316-S1-SNR30, les ARN ont été récupérés par extraction au phénol, précipitation à l'éthanol et marqués par la ligation d'un $[5'-^{32}\text{P}]$ pCp. Les ARN sont ensuite séparés sur un grand gel de polyacrylamide dénaturant 8%. La piste 1 correspond au marqueur pBR322 DNA-Msp I Digest de New England Biolabs®. La piste 2 correspond aux ARN de l'extrait (1% input). La piste 3 correspond aux ARN après immunoprécipitation pour Gar1p, protéine commune à tous les snoRNA H/ACA. La piste 4 est le profil des ARN purifiés après la chromatographie. Les ARN 5S, 5.8S et les ARNt sont des contaminants normaux.

l'aptamère S1 (652 nt) puisque snR30 est un snoRNA H/ACA. Pour ce qui est de la purification avec les billes streptavidine-agarose, la bande correspondant à S1-snR30 est enrichie. Si nous comparons l'ARN correspondant à S1-snR30 et l'ARNr 5.8S dans les pistes 3 et 4, le signal de S1-snR30 est réduit légèrement de la piste 3 à la piste 4 contrairement au signal pour le 5.8S qui est grandement diminué de la piste 3 à la piste 4 ; ceci montre clairement que l'ARN de 652 nt est enrichi. Il est important de noter que les ARNr 5S et 5.8S ainsi que les ARN de transfert (ARNt) sont des ARN très abondants dans la cellule. Ces ARN sont des contaminants normaux de cette méthode d'analyse. En conclusion, un ARN de la taille de S1-snR30 semble avoir été purifié par chromatographie d'affinité.

3.3 Analyse des ARN par hybridation Northern

À partir de la même préparation d'ARN qu'au point 3.2, les ARN ont été séparés dans un petit gel de polyacrylamide dénaturant et transférés sur une membrane de nylon. Ensuite, la membrane a été hybridée avec des sondes radioactives spécifiques à différents snoRNA. Une sonde était spécifique à snR30 et les autres étaient spécifiques à des snoRNA impliqués dans les étapes de clivage du pré-ARNr 35S (U3, U14 et snR10) ainsi que des snoRNA impliqués dans les modifications post-transcriptionnelles (snR46 et U24) et ce pour les deux familles de snoRNA (C/D : U3, U14 et U24. H/ACA : snR10 et snR46). Ceci permet de vérifier que l'ARN détecté par marquage au $[5' \text{-}^{32}\text{P}] \text{ pCp}$ est bel et bien S1-snR30 et que d'autres snoRNA impliqués dans la maturation des ARNr ne sont pas présents dans l'éluat de notre purification par chromatographie d'affinité. Les résultats montrent que tous ces snoRNA sont présents dans l'extrait cellulaire brut et le surnageant de purification. Par contre, seulement S1-snR30 a pu être détecté dans l'éluat de la purification (Figure 3.3). Ceci montre que le snoRNA S1-snR30 a été purifié et que l'éluat est exempt d'autres snoRNA. Pour ce qui est de l'efficacité de la purification, celle-ci n'est pas très grande. Moins de 1% de S1-snR30 total a pu être récupéré.

3.4 Analyses des protéines H/ACA par immunobuvardage

Après les différentes analyses d'ARN, des analyses de protéines ont été effectuées sur le même éluat de purification. Les protéines de l'éluat ont été séparées par SDS-PAGE

puis transférées sur une membrane de PVDF avant d'effectuer un immunobuvardage. Des anticorps pour détecter Gar1p-TAP et Nhp2p ont été utilisés. Comme ces deux protéines sont communes à tous les snoRNA de la famille H/ACA, cette expérience nous permet de vérifier que l'ARN purifié est associé à des protéines H/ACA. Les pistes correspondant à l'extrait et au surnageant présentent un signal pour les protéines Gar1p-TAP et Nhp2p. Dans la piste correspondant à l'éluat de la purification, il est aussi possible d'observer un signal pour ces deux protéines. Ceci montre que le snoRNA S1-snr30 est associé aux protéines H/ACA Gar1p et Nhp2p (Figure 3.4).

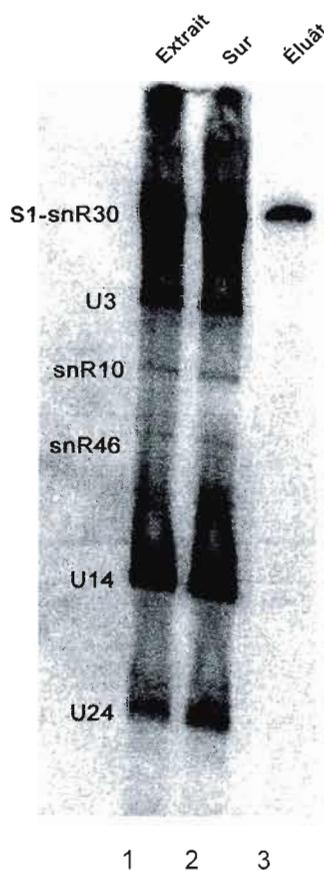


Figure 3.3 : L'ARN S1-snr30 interagit avec des billes streptavidine-agarose. Une chromatographie d'affinité avec des billes streptavidine-agarose a été effectuée à partir d'extrait de la souche GAL1::SNR30 transformée avec pRS316-S1-SNR30. Les pistes 1, 2 et 3 correspondent aux ARN de l'extrait (1% input), du surnageant (1%) et de l'éluat, respectivement. Une hybridation Northern a été faite avec un oligonucléotide spécifique à l'aptamère S1 marqué au ^{32}P . Il est possible de voir qu'après purification, snR30 est détecté.

3.5 Coloration du SDS-PAGE au nitrate d'argent

Maintenant que nous savions que le snoRNA S1-snr30 était associé à des protéines H/ACA, il nous fallait déterminer s'il était associé à d'autres protéines que celles qui venaient d'être identifiées. Pour ce faire, nous avons effectué un second SDS-PAGE, mais celui-ci a été coloré au nitrate d'argent afin d'observer les protéines présentes dans l'éluat de la chromatographie d'affinité pour l'aptamère S1. Il a été possible d'observer des bandes correspondant aux protéines H/ACA Cbf5p, Gar1p-TAP et Nhp2p. En plus de ces trois protéines H/ACA, plusieurs autres bandes ont pu être détectées. Ceci nous indique que S1-snr30 est associé à d'autres protéines que les protéines H/ACA (Figure 3.5).

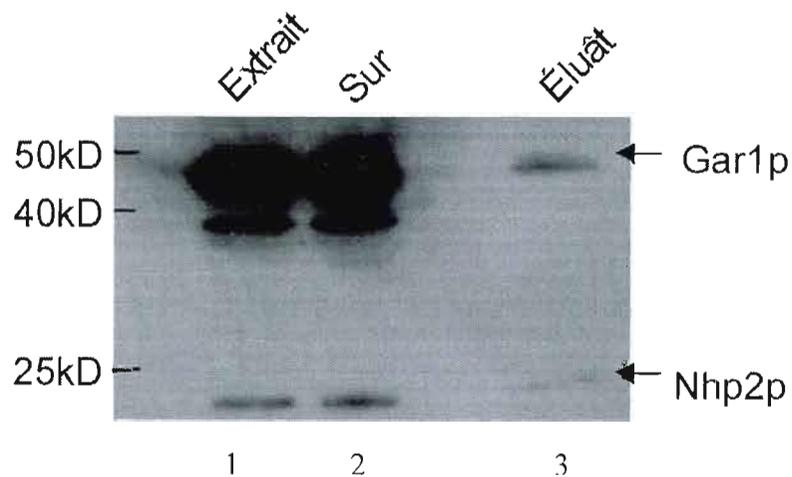


Figure 3.4 : La snoRNP S1-snr30 contient des protéines H/ACA. Les pistes 1, 2 et 3 correspondent aux protéines de l'extrait (1% input), du surnageant (1% input) et de éluat, respectivement. Un immunobuvardage avec des anticorps spécifiques à l'épitope TAP et à la protéine Nhp2p a été effectué. Les protéines H/ACA Gar1p et Nhp2p ont été détectées.

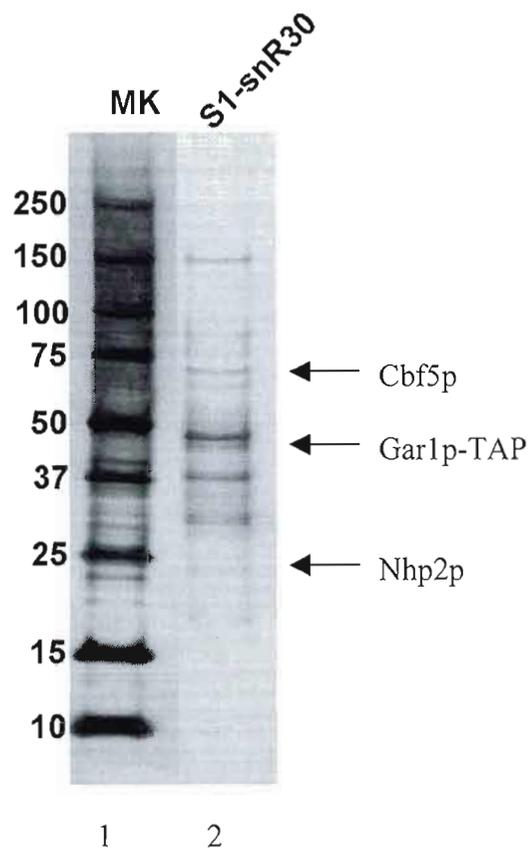


Figure 3.5 : La snoRNP S1-snR30 contient plusieurs protéines. La piste 1 correspond au marqueur de poids moléculaires. La piste 2 correspond à éluat de purification. Les protéines ont été fractionnées sur un gradient d'acrylamide 4 à 12% puis colorées au nitrate d'argent. Il est possible de détecter des bandes correspondant aux protéines H/ACA Cbf5p, Gar1p-TAP et Nhp2p. En plus de ces bandes, d'autres bandes ont aussi été détectées ce qui nous indique que snR30 est associé à plusieurs protéines.

CHAPITRE IV

4 DISCUSSION

La snoRNP snR30 est impliquée dans les clivages précoces du pré-ARNr 35S aux sites A1 et A2. Nous connaissons déjà la plupart des particules impliquées dans ces clivages. Par contre, comment ces particules interagissent entre-elles et avec le 35S n'est pas encore connu. De plus, les enzymes responsables de ces clivages n'a pas encore été identifiée. La purification de snR30 permettra de caractériser cette particule et d'approfondir nos connaissances sur les premières étapes de maturation des ARNr et d'identifier toutes les particules responsables de ces clivages. Comme snR30 est hautement conservé au cours de l'évolution, les données obtenues chez la levure permettront de parfaire aussi nos connaissances de la biogenèse des ribosomes chez les organismes supérieurs.

4.1 La levure *S. cerevisiae* comme modèle pour étudier la maturation des ARNr

La levure *S. cerevisiae* est un organisme modèle de choix pour aborder l'étude des grandes fonctions de base communes à toutes les cellules eucaryotes comme la maturation des ARNr, qui est l'un des processus cellulaires les mieux conservés chez les eucaryotes. De plus, *S. cerevisiae* est le premier eucaryote dont le génome fut séquencé en entier (Goffeau *et al*, 1996). Cet organisme se prête facilement aux manipulations génétiques, un peu comme les bactéries et il offre des outils de génétique et biologie moléculaire non disponibles présentement chez les eucaryotes supérieurs. Ces différents points font de cette levure un modèle idéal pour comprendre ce processus complexe qu'est la maturation des ARNr. La découverte de nouvelles protéines impliquées dans la maturation des ARNr chez *S. cerevisiae* est généralement transposable à l'humain.

4.2 Avantages de l'utilisation de l'aptamère S1

En 1995, le groupe du Dr Lührmann a réussi à purifier snR30. Ils ont d'abord isolé les ARN possédant une coiffe m₃G par immunoprécipitation et ensuite, utilisé un gradient de sulfate de césium pour isoler snR30. Ils ont réussi à démontrer que snR30 est associé aux quatre protéines H/ACA (qui n'étaient pas toutes connues à l'époque) (Lübben *et al*, 1995).

Par contre, le gradient de sulfate de césium est une méthode de séparation très stricte et ne permet pas d'observer des protéines qui pourraient être associées à snR30 moins fortement que les quatre protéines H/ACA. L'utilisation de l'aptamère S1 permet une purification dans des conditions « natives » très douces et beaucoup moins stricte que le gradient de sulfate de césium. De plus, l'introduction de l'aptamère S1 dans la séquence de snR30 permet une plus grande spécificité pour ce snoRNA que l'immunoprécipitation des ARN possédant une coiffe m³G suivi d'un gradient de sulfate de césium. Par ailleurs, il a été possible de démontrer que S1-snR30 est associé à plusieurs protéines. Cette méthode de purification appliquée à snR30 est donc une excellente alternative au gradient de sulfate de césium et permet l'étude de protéines associées à snR30 plus faiblement ou même de façon transitoire. Cette méthode a déjà fait ses preuves auparavant. Le groupe du Dr Engelke avait démontré que lorsque purifié dans des conditions plus douces (en utilisant l'aptamère S1), l'interaction entre la RNase P et la RNase MRP n'était pas aussi forte que prévue et que la RNase P existe sous forme monomérique. Plus important encore, ils ont réussi à purifier une forme active de la RNase P (Srisawat et Engelke, 2001).

4.3 Introduction de l'aptamère S1 et fonction de snR30

Lors de l'introduction de l'aptamère S1 dans la séquence de *SNR30*, il était important de choisir un site où l'aptamère S1 n'affecterait pas la fonction de snR30. La snoRNP snR30 est impliquée dans les étapes de clivage précoces de l'ARNr 35S menant à la production de l'ARNr 18S. Une perturbation de son activité peut donc avoir des conséquences importantes sur la croissance cellulaire (Morissey et Tollervey, 1993). Dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de snR30 dans les clivages précoces du pré-35S, il est important de purifier une snoRNP fonctionnelle. Les tests de dilution en série montrent que le niveau de croissance de la souche qui dépend de S1-snR30 est comparable à la souche de type sauvage (Figure 3.1). Ceci démontre que l'introduction de l'aptamère S1 au site que nous avons choisis n'affecte pas sa fonction *in vivo*. Il se peut que l'introduction de l'aptamère S1 empêche la liaison de certaines protéines spécifiques à snR30. Par contre, il a été démontré que les éléments d'insertions H1 et H2 ne sont pas nécessaires à la fonction de snR30 (Atzorn *et al*, 2004). Donc, si des protéines spécifiques à snR30 interagissent avec les éléments

d'insertion H1 et H2 de snR30, ces protéines ne sont pas essentielles aux réactions de clivage du 35S dans les conditions normales de cultures en laboratoire.

4.4 Purification du snoRNA S1-snR30

Deux autres conditions ont été prises en considération lors de l'introduction de l'aptamère S1. La première est que l'aptamère S1 devait être accessible pour la purification. La seconde condition impliquait que l'aptamère S1 devait adopter la bonne conformation afin qu'il puisse se lier aux billes de streptavidine. Introduire l'aptamère S1 à l'extrémité d'une tige-boucle remplissait ces deux conditions. Les résultats des différentes analyses d'ARN montrent que ces conditions ont été respectées et qu'il a été possible de purifier le snoRNA S1-snR30 par chromatographie d'affinité. D'abord, l'expérience de marquage des ARN au [5'-³²P] pCp indique qu'il a été possible de purifier un ARN dont la taille correspond à S1-snR30, soit 652 nt. Cet ARN migre à la taille attendue pour S1-snR30 soit environ 650 nt (snR30 est constitué de 608 nt et l'aptamère S1 44 nt). De plus, ce même ARN est aussi enrichi lorsque la protéine Gar1p est immunoprécipitée et que les ARN associés à Gar1p sont analysés de la même façon. Ceci indique qu'en plus d'avoir la bonne taille, cet ARN est associé à une protéine commune à tous les snoRNA H/ACA. À l'exception des ARNr 5S, 5.8S et des ARNt, des contaminants habituels de cette méthode d'analyse, l'échantillon purifié avec les billes de streptavidine-agarose semble exempt d'ARN contaminants. Une analyse plus précise des ARN présents dans l'éluat de purification a été effectuée par hybridation Northern. Les snoRNA impliqués dans la maturation des ARNr ont donc été analysés. Cette technique permet de confirmer l'identité de l'ARN détecté par le marquage au [5'-³²P] pCp mais aussi de voir si d'autres snoRNA, particulièrement ceux qui sont impliqués dans les mêmes étapes de clivage que snR30, pouvaient avoir été isolés lors de la purification. Comme la maturation des ARNr nécessite l'interaction de plusieurs facteurs cellulaires, il ne serait pas surprenant qu'un autre snoRNA impliqué dans la production de l'ARNr 18S soit récupéré en association avec snR30. De tous les snoRNA que nous avons sondés, seul S1-snR30 a été détecté. Tous ces résultats indiquent d'une part, que l'introduction de l'aptamère S1 à l'extrémité de l'élément d'insertion H1 (Figure 2.1) lui permet d'adopter la bonne conformation tout en étant accessible pour la purification avec les

billes de streptavidine-agarose. D'autre part, le snoRNA S1-snrR30 est purifié de façon spécifique indépendamment des autres snoRNA impliqués dans les clivages menant à la production de l'ARNr 18S.

4.5 Protéines associées au snoRNA S1-snrR30

Maintenant que nous savions que l'ARN purifié par chromatographie d'affinité était S1-snrR30, il fallait s'assurer que cet ARN était associé à des protéines. Comme mentionné précédemment, il a été démontré que snR30 est associé aux protéines Cbf5p, Gar1p, Nhp2p et Nop10p (Lübber *et al*, 1995; Henras *et al*, 1998; Watkins *et al*, 1998). Nous avons donc utilisé des anticorps spécifiques à Gar1p-TAP et Nhp2 afin de détecter ces protéines par immunobuvardage. Comme attendu, ces deux protéines ont été détectées dans éluat de purification pour l'aptamère S1. Il est donc possible de purifier le snoRNA S1-snrR30 avec les protéines qui y sont associées. SnR30 adopte la structure commune à tous les snoRNA H/ACA (Atzorn *et al*, 2004). Par contre, contrairement aux autres snoRNP H/ACA, snR30 n'a pas de cible connue pour la pseudouridylation. SnR30 est plutôt impliqué dans les clivages précoces du précurseur 35S menant à la formation de l'ARNr 18S (Morissey et Tollervey, 1993; Venema et Tollervey, 1999). Nous pensons que ce qui rend snR30 différent des autres snoRNP H/ACA est son contenu protéique. Plusieurs éléments favorisent cette hypothèse. D'abord, la grande taille de snR30 (608 nt) laisse beaucoup de place pour la liaison avec d'autres protéines, même en tenant compte des quatre protéines H/ACA. Ensuite, le parallèle qui peut être effectué entre snR30 et la snoRNP U3 de la famille C/D favorise l'hypothèse que les snoRNP impliquées dans les étapes de clivage du 35S sont associées à un ensemble de protéines qui leur sont spécifiques et qui sont essentielles à cette fonction clé de la maturation des ARNr. Enfin, snR30 possède les deux motifs m1 et m2 (Figure 1.4). Ces motifs lui sont spécifiques et sont aussi présents chez tous ses homologues. De plus, ces motifs sont essentiels à la production de l'ARNr 18S et pourraient être des sites spécifiques de liaison de protéines (Atzorn *et al*, 2004). Dans le but d'analyser le contenu protéique de snR30, un SDS-PAGE a été effectué et coloré au nitrate d'argent. En plus de bandes correspondant aux protéines H/ACA Cbf5p, Gar1p-TAP et Nhp2p, d'autres bandes ont aussi

été observées. Ceci semble démontrer que S1-snR30 est associé à plusieurs protéines et non seulement aux quatre protéines H/ACA.

4.6 Perspectives

Il reste maintenant à identifier et caractériser ces protéines. D'une part, il faudra déterminer si elles sont spécifiques à snR30 et d'autre part, si elle le sont, déterminer leur(s) rôle(s) dans la maturation des ARNr. Afin d'identifier ces protéines, des analyses par spectrométrie de masse devront être effectuées sur les échantillons purifiés. Pour vérifier que les protéines potentielles sont vraiment spécifiques à snR30, ces dernières seront étiquetées avec le « tag » TAP précédemment utilisé avec Gar1p et une immunoprécipitation de ces protéines sera effectuée. S'il est possible de détecter snR30 par hybridation Northern, ceci nous indiquera que ces protéines font vraiment partie du complexe ribonucléoprotéique snR30. De plus, un marquage des ARN au [5'-³²P] pCp nous permettra de déterminer si cette protéine est associée à d'autres ARN que snR30. Par la suite, un travail de caractérisation de ces protéines devra être fait. Plusieurs éléments seront vérifiés. D'abord des souches exprimant conditionnellement ces protéines seront générées afin de déterminer leur importance dans la fonction de la snoRNP snR30 et leur rôle dans la maturation des ARNr. Nous prévoyons introduire le promoteur GAL1 à la place du promoteur normal de la protéine testée. Des tests de mutagenèse et de délétion seront aussi effectués sur la protéine testée afin de déterminer quels éléments sont essentiels à sa fonction. Finalement, une analyse bioinformatique sera faite afin de savoir si cette/ces protéine(s) possède(nt) des homologues chez d'autres organismes ou des domaines fonctionnels connus. Notre prédiction est que les protéines seront phylogénétiquement conservées. De plus, comme mentionné dans l'Introduction, il est connu que des dérèglements de protéines nucléolaires impliquées dans la maturation des ARNr sont reliés à différentes maladies chez l'humain. La découverte de protéines liées à ce processus chez la levure pourrait ouvrir des voies de recherche pour le développement de traitements dans le cas où ces nouvelles protéines seraient impliquées dans ces maladies.

CHAPITRE V

5 CONCLUSIONS

5.1 Conclusions générales du projet

Le snoRNA snR30 fait partie de la grande famille des snoRNA à boîtes H et ACA. Comme tous les membres de cette grande famille, snR30 adopte une structure qui consiste en deux tige-boucles séparées par une région charnière où se situe la boîte H, et se terminant par une queue dans laquelle on retrouve la boîte ACA trois nucléotides en amont de l'extrémité 3'. Tout comme les autres membres de sa famille, snR30 est associé aux quatre protéines H/ACA, soit Cbf5p, Gar1p, Nhp2p et Nop10p. À partir de ces informations, il serait possible de penser que snR30 est impliqué lui aussi dans la pseudouridylation. Cette snoRNP est plutôt nécessaire aux réactions de clivage du pré-ARNr 35S menant à la formation de l'ARNr 18S qui compose la petite sous-unité ribosomique. Nous pensons que snR30 est associé à des protéines qui lui sont spécifiques et qui sont essentielles à cette étape clé de la maturation des ARNr. Le développement d'une méthode de purification des snoRNA par chromatographie d'affinité a permis de montrer que snR30 est associé à d'autres protéines que les protéines H/ACA, ce qui tend à confirmer notre hypothèse. L'étude de ces nouvelles protéines nous permettra de découvrir leur importance dans la maturation des ARNr et de mieux comprendre le fonctionnement de snR30 dans les réactions de clivage du précurseur 35S. Il est connu que des dérèglements de protéines impliqués dans la maturation des ARNr peut avoir des conséquences graves sur la cellule et sont reliés à différentes maladies graves chez l'humain. Une meilleure compréhension de ce processus cellulaire essentiel pourrait nous permettre de découvrir la cause de certaines maladies reliées à ce processus cellulaire mais aussi d'ouvrir de nouvelles voies de traitements des maladies déjà reliées à des dérèglements de la maturation des ARNr.

BIBLIOGRAPHIE

Atzorn V, Fragapane P, Kiss T. 2004. «U17/snR30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production». *Mol. Cell. Biol.* vol. 24, p. 1769-1778.

Bachelierie JP, Cavaille J, Huttenhofer A. 2002. «The expanding snoRNA world». *Biochimie.* vol.84, p. 775-790.

Bachelierie JP, Cavaille J, Qu LH. 2000. «Nucleotides modifications of eukaryotic rRNAs: the world of small nucleolar RNA guides». In *The Ribosome: Structure, Function Antibiotics and Cellular Interactions*, sous la dir. De Garret RA, Douthwaite SR, Liljas A, Matheson AT, Moore PB et Noller HF, , Washington, DC (É-U) ASM Press editeurs p. 191-204.

Balakin AG, Smith L, Fournier MJ. 1996. «The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions». *Cell* vol. 6, p. 823-834

Ballarino M, Morlando M, Pagano F, Fatica A, Bozzoni I. 2005. «The cotranscriptional assembly of snoRNPs controls the biosynthesis of H/ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell Biol.* vol. 25 p. 5396-5403.

Bally M, Hughes J, Cesareni G. 1988. «SnR30: a new, essential small nuclear RNA from *Saccharomyces cerevisiae*». *Nucleic Acids Res.* vol. 16, p. 5291-5303.

Bessler M, Wilson DB, Mason PJ. 2004. «Dyskeratosis congenita and telomerase». *Curr. Opin. Pediatr.* vol. 16, p. 23-28.

Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. 1992. «Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin». *Nature.* vol. 355, p. 564-566.

Bousquet-Antonelli C, Henry Y, G'elugne JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. 1997. «A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs». *EMBO J.* vol. 16, p. 4770-4776.

Brown JW, Echeverria M, Qu LH. 2003. «Plant snoRNAs: functional evolution and new modes of gene expression». *Trends Plant Sci.* vol. 8, p. 42-49.

Cavaille J, Nicoloso M, Bachelierie JP. 1996. «Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides». *Nature.* vol. 383, p. 732-735.

Cheng TH, Chang CR, Joy P, Yablok S, Gartenberg MR. 2000. «Controlling gene expression in yeast by inducible site-specific recombination». *Nucleic Acids Res.* vol. 28, p. E108.

Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlage RE, Shabanowitz J, Osheim Y, Beyer AL, Hunt DF, Baserga SJ. 2002. «A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis». *Nature*. vol. 417, p. 967-970.

England TE, Uhlenbeck OC. 1978. «Enzymatic oligoribonucleotide synthesis with T4 RNA ligase». *Biochemistry*. vol. 17, p. 2069-2076.

Famulok M, Szostak JW. 1992. «In Vitro Selection of Specific Ligand Binding Nucleic Acids». *Angew. Chem*. p. 979-988

Fatica A, Dlakic M, et Tollervey D. 2002. «Naf1p is a box H/ACA snoRNP assembly factor». *RNA* vol. 8 p. 1502-1514

Filipowicz W, Pogacic V. 2002. «Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins». *Curr. Opin. Cell Biol.* vol. 14, p. 319-327.

Gallagher JE, Dunbar DA, Granneman S, Mitchell BM, Osheim Y, Beyer AL, Baserga SJ. 2004. «RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components». *Genes Dev.* vol. 15 p. 2506-2517.

Ganot P, Bortolin ML, Kiss T. 1997. «Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs». *Cell*. vol. 30;89 p. 799-809.

Ganot P, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. 1997. «The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation». *Genes Dev.* vol. 11 p. 941-956.

Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH. 1992. «Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells». *Nucleic Acids Res.* vol. 20, p. 1425

Girard JP, Bagni C, Caizergues-Ferrer M, Amalric F, Lapeyre B. 1994. «Identification of a segment of the small nucleolar ribonucleoprotein-associated protein GAR1 that is sufficient for nucleolar accumulation». *J. Biol. Chem.* vol. 269, p. 18499-18506.

Girard JP, Lehtonen H, Caizergues-Ferrer M, Amalric F, Tollervey D, Lapeyre B. 1992. «GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast». *EMBO J.* vol. 11, p. 673-682.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. 1996. «Life with 6000 genes». *Science* vol. 274, p. 563-567

- Henras A, Dez C, Noaillac-Depeyre J, Henry Y, Caizergues-Ferrer M.** 2001. «Accumulation of H/ACA snoRNPs depends on the integrity of the conserved central domain of the RNA-binding protein Nhp2p». *Nucleic Acids Res.* vol. 29, p. 2733-2746
- Henras A, Henry Y, Bousquet-Antonelli C, Noaillac-Depeyre J, Gelugne JP, Caizergues-Ferrer M.** 1998. «Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs». *EMBO J.* vol. 17, p. 7078-7090.
- Isaac C, Marsh KL, Paznekas WA, Dixon J, Dixon MJ, Jabs EW, Meier UT.** 2000. «Characterization of the nucleolar gene product, treacle, in Treacher Collins syndrome». *Mol. Biol. Cell.* vol. 11, p. 3061-3071.
- Jiang W, Middleton K, Yoon HJ, Fouquet C, Carbon J.** 1993. «An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules». *Mol. Cell. Biol.* vol. 13, p. 4884-4893.
- Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T.** 1996. «Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs». *Cell.* vol. 28, p. 1077-1088.
- Klein DJ, Schmeing TM, Moore PB, Steitz TA.** 2001 «The kink-turn: a new RNA secondary structure motif». *EMBO J.* vol. 1;20, p. 4214-4221.
- Kressler D, Linder P, de La Cruz J.** 1999. «Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol. Cell. Biol.* vol. 19, p. 7897-7912.
- Lafontaine DL, Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Caizergues-Ferrer M, Tollervey D.** 1998. «The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase». *Genes Dev.* vol. 12, p. 527-537.
- Lübber B, Fabrizio P, Kastner B, Luhrmann R.** 1995. «Isolation and characterization of the small nucleolar ribonucleoprotein particle snR30 from *Saccharomyces cerevisiae*». *J. Biol. Chem.* vol. 270, p. 11549-11554.
- Maden BE, Hughes JM.** 1997. «Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem». *Chromosoma.* vol. 105 p. 391-400.
- Marciniak RA, Lombard DB, Johnson FB, Guarente L.** 1998. «Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* vol. 95, p. 6887-6892.
- McConkey EH, Hopkins JW.** 1964. «The relationship of the nucleolus to the synthesis of ribosomal RNA in HeLa Cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 51, p. 1197-1204

- Meier, UT, et Blobel G.** 1992. «Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm». *Cell* vol. 70 p. 127-138
- Morrissey JP, Tollervey D.** 1993. «Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis». *Mol. Cell. Biol.* vol. 13, p. 2469-2477
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ.** 1994. «A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys.* Methods. vol. 28, p. 239-242.
- Ni J, Tien AL, Fournier MJ.** 1997. «Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA». *Cell.* vol. 89, p. 565-573.
- Nottrott S, Hartmuth K, Fabrizio P, Urlaub H, Vidovic I, Ficner R, Luhrmann R.** 1999. «Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA». *EMBO J.* vol. 1 p. 6119-633.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B.** 1999. «A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration». *Nat. Biotechnol.* vol. 17, p. 1030-1032.
- Sarkar G, Sommer SS.** 1990. «The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis». *Biotechniques.* vol. 8, p. 404-407.
- Sikorski, RS. Hieter, P.** 1989. «A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*». *Genetics.* vol. 122, p. 19-27
- Srisawat C, Engelke DR.** 2001. «Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins». *RNA.* vol. 7, p. 632-641.
- Venema J, Tollervey D.** 1999. «Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*». *Annu Rev Genet.* vol. 33, p. 261-311.
- Vilardell J, Warner JR.** 1997. «Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* influences both the splicing of its own transcript and the processing of rRNA.». *Mol Cell Biol.* vol. 17 p. 1959-1965.
- Wang C, Meier UT.** 2004. «Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins». *EMBO J.* vol. 23, p. 1857-1867.
- Watkins NJ, Gottschalk A, Neubauer G, Kastner B, Fabrizio P, Mann M, Luhrmann R.** 1998. «Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure». *RNA.* vol. 4, p. 1549-1568

Yang PK, Hoareau C, Froment C, Monsarrat B, Henry Y, Chanfreau G. 2005. «Cotranscriptional recruitment of the pseudouridylsynthetase Cbf5p and of the RNA binding protein Naf1p during H/ACA snoRNP assembly». *Mol Cell Biol.* vol. 25 p. 3295-3304.

Zuker M. 2003. «Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction». *Nucleic Acids Res.* vol. 31, p. 3406-3415.

APPENDICE A

Tableau I: Liste des oligonucléotides

Identité	Séquence nucléotidique
Clonage de SNR30 dans pBS	
SNR30- Cla-1	5' CCATCGATCTGTAAATTGCTCTTACTACAAACC 3'
SNR30- Cla-2	5' CCATCGATCATGGAAGTGGGCCAAGGGAATTA 3'
Mutagenèse dirigée par PCR	
SNR30 H1.1	5' CCC GGC CCG CGA CTA TCT TAC GCA CTT GCA TGA TTC TGG TCG GTG ATC AGA GGA GAA GTC AGG AGC 3'
SNR30 H2.1	5' CCC GGC CCG CGA CTA TCT TAC GCA CTT GCA TGA TTC TGG TCG GTA GGA GAA AGC TGG CCA TAG GAC 3'
SNR30 H1.2	5' ACC GAC CAG AAT CAT GCA AGT GCG TAA GAT AGT CGC GGG CCG GGG ATC AGA GTT TTG AGT CGT CAG AC 3'
SNR30 H2.2	5' ACC GAC CAG AAT CAT GCA AGT GCG TAA GAT AGT CGC GGG CCG GGT ACG AAG AGA TTG CGG GAT GTG 3'
Sondes utilisées pour hybridation Northern	
S1	5' AGC TTC CCG GCC CGC GAC TAT CTT ACG CAC T 3'
SNR30	5' GGA ATA TAC TGC GGT AGG ACG AAC 3'
SNR10	5' CAA TCC TTG CAA CGG TCC TCA TCC 3'
U3	5' CCA AGT TGG ATT CAG TGG CTC 3'
U14	5' CGA TGG GTT CGT AAG CGT ACT CCT ACC GTG G 3'
SNR46	5' TCT ACG GAT CTT CGA AGA GGC CAT 3'
U24	5' GGT ATG TCT CAT TCG GAA CTC AAA GTT C 3'