

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION DES PROTÉINES KRE33 ET TAN1  
IMPLIQUÉES DANS L'ACÉTYLATION DES ARNt

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

Nazim RABOUHI

Décembre 2023

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.04-2020). 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

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr François Dragon, pour sa patience, ses idées, le partage de ses immenses connaissances, son soutien moral et financier ainsi que sa confiance en moi tout au long de mes travaux de recherche.

Je tiens aussi à remercier mes collègues (Sandra, Aniket, Jessica, Mouloud et Frédérique) pour leurs qualités humaines et scientifiques et particulièrement Ismaël et Sophie pour leur aide dans le perfectionnement de mes techniques de laboratoire et leurs idées et conseils. Je remercie aussi tous les membres du centre de recherche CERMO FC, les professeurs du département des sciences biologiques de l'UQAM ainsi que les techniciens de laboratoire. Je remercie de façon très spéciale Denis Flipo pour son aide apportée à l'utilisation des microscopes confocaux.

Mes remerciements aussi aux professeurs Benoit Barbeau et Tatiana Scorza pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Je remercie aussi ma famille, mes parents plus particulièrement pour leur amour, leur soutien constant et leur écoute.

## DÉDICACES

À mes parents qui ont toujours cru en moi.

« Le plus grand ennemi du savoir n'est pas l'ignorance, c'est l'illusion du savoir »

Stephen Hawking

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	viii
RÉSUMÉ .....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION .....	1
1. ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1.1 Le nucléole et la biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes .....	1
1.1.1 Le nucléole.....	1
1.1.2 La biogenèse des ribosomes.....	2
1.1.3 Le SSU processome .....	5
1.2 L'acétylation des ARN de transfert .....	7
1.3 Les superhélices .....	9
1.4 Les signaux de localisation nucléaire et nucléolaire.....	11
1.5 La protéine Kre33 .....	15
1.6 La protéine Tan1 .....	18
1.7 Les ribosomopathies .....	20
2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	21
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
2.1 Souches bactériennes et souches de levures .....	23
2.2 Milieux de culture .....	24
2.3 Prédiction bio-informatiques et analyses statistiques.....	25
2.4 Plasmides et oligonucléotides.....	25
2.5 Clonage moléculaire et transformation des bactéries compétentes .....	26
2.6 PCR sur colonies et séquençage .....	27
2.7 Préparation de levures compétentes et transformation .....	28

2.8 Extraction des protéines de levures et analyse par « <i>Western blotting</i> » .....	29
2.9 Extraction de protéines et co-immunoprécipitation .....	30
2.10 Microscopie à immunofluorescence .....	31
2.11 Système double hybride .....	32
2.12 Expérience de PLA « Proximity ligation assay » .....	33
CHAPITRE III RÉSULTATS .....	35
3.1 La protéine Tan1 contient un NLS, une superhélice et un domaine THUMP .....	35
3.2 Les mutations $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS n'empêchent pas l'interaction Kre33/Tan1 .....	35
3.3 Kre33 co-précipite avec la protéine Tan1 mais pas avec les mutants $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS ....	40
3.4 Tan1 est nucléolaire et les mutations $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS empêchent Tan1 de se localiser au noyau .....	41
3.5 Kre33 et Tan1 interagissent dans le nucléole .....	43
CHAPITRE IV DISCUSSION .....	45
4.1 Tan1 co-précipite avec Kre33 mais pas les mutants $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS .....	45
4.2 Les mutations $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS ne perturbent pas l'interaction des protéines Kre33 et Tan1. ....	46
4.3 Tan1 est une protéine nucléolaire et les mutations $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS empêchent la localisation nucléaire de Tan1 .....	47
4.4 L'interaction Kre33/Tan1 se fait dans le nucléole .....	49
CHAPITRE V CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	51
RÉFÉRENCES .....	54

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 L'assemblage des ribosomes chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
Figure 1.2 La biogenèse des ribosomes de levure. ....	6
Figure 1.3 L'acétylation post-transcriptionnelle des résidus d'ARN cytidine donne la N4-acétylcytidine (ac4C).. ....	9
Figure 1.4 Représentation schématique d'une superhélice.....	11
Figure 1.5 La coévolution moléculaire des NLS et NoLS au sein du domaine basique de la protéine Tat du VIH-1.....	11
Figure 1.6 Représentation du mécanisme de transport de la protéine cNLS-cargo dans le nucléoplasme.....	15
Figure 1.7 Modèle hypothétique pour l'acétylation des ARN par Kre33.....	11
Figure 2.1 Liste des étapes de clonage moléculaire et de transformation des bactéries compétentes .....	27
Figure 2.2 Représentation schématique du Y2H utilisé pour l'étude des interactions protéine-protéine entre Kre33 et Tan1 ainsi que ses mutants.. ....	33
Figure 3.1 Modélisation de Tan1.....	35
Figure 3.2 Alignement des séquences protéiques de Tan1 et de ses homologues chez diverses espèces.. ....	35
Figure 3.3 Illustration des acides aminés éliminés chez les mutants Tan1 $\Delta$ NoLS et Tan1 $\Delta$ NLS.....	35
Figure 3.4 Les mutants $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS peuvent interagir avec Kre33.....	39
Figure 3.5 Co-immunopécipitations illustrant les immunobuvardages anti-FLAG et anti-Myc..	41
Figure 3.6 Localisation de Tan1 et des mutants $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS par microscopie à immunofluorescence .....	42
Figure 3.7 Visualisation de l'interaction nucléolaire Kre33/Tan1 par PLA.....	43
Figure 4.1 Représentation visuelle des protéines Kre33 et Tan1 avec leurs motifs superhélices	42

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Liste des oligonucléotides utilisés.....	32
--	----

## LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

A <sub>600</sub>	Absorbance à 600 nm
ac4C	N4-acetylcytidine
AD	Domaine d'activation
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	ARN de transfert
BD	Domaine basique
cNLS	Signal de localisation nucléaire classique
CTE	Extrémité C-terminale
Co-IP	Co-immunoprécipitation
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DFC	Composant fibrillaire dense
DTT	1,4-Dithiothreitol
ETS	« External transcribed spacer »
FC	Centre fibrillaire
FG	Phénylalanine-glycine
GC	Composant granulaire
GFP	Protéine fluorescente verte
HGPS	Progéria, ou syndrome d'Hutchinson-Gilford
IF	Immunofluorescence
IP	Immunoprécipitation
ITS1	« Internal transcribed spacer 1 »

KO	« Knock-out »
LB	Luria-Bertani
LECA	Dernier ancêtre commun eucaryote
Leu	Leucine
LiOAc	Acétate de lithium
LSU	Grande sous-unité (« large subunit »)
MDa	Mégadalton
Met	Méthionine
ncNLS	Signal de localisation nucléaire non classique
NLS	Signal de localisation nucléaire
NoLS	Signal de localisation nucléolaire
NOD	« Nucleolar localization sequence Detector »
NOR	Régions organisatrices nucléolaires
NPC	Complexe du pore nucléaire
NTE	Extrémité N-terminale
NUP	Nucléoprotéine
PCR	« Polymerase chain reaction »
PLA	« Proximity ligation assay »
Pol	Polymérase
Pré-ARNr	ARN ribosomique précurseur
PVDF	« Polyvinylidene fluoride »
RES	Complexe de rétention et d'épissage de l'ARNm précurseur
Ser	Sérine
snoRNA	Petit ARN nucléolaire (« small nucleolar RNA »)
snoRNP	Petite ribonucléoprotéine nucléolaire
SPAF	Facteurs d'assemblage du SSU processome
SSU	Petite sous-unité (« small subunit »).

TBE	Tris/Borate/EDTA
TE	Tris-EDTA
UTP	« U3 protein »
UV	Ultraviolet
WT	Type sauvage
Y2H	Double hybride

## RÉSUMÉ

Le SSU processome est un grand complexe ribonucléoprotéique nécessaire au traitement des précurseurs d'ARN ribosomique et à l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique dans le nucléole. L'acétyltransférase Kre33 fait partie de ce complexe. En plus de son rôle essentiel dans le traitement du pré-ARNr, Kre33 acétyle des cytidines spécifiques dans l'ARNr 18S et acétyle les ARNt sérine et leucine. Cependant, la formation de N4-acétylcytidine (ac4C) dans les ARNt nécessite la participation de la protéine adaptatrice Tan1. On ne sait pas dans quel compartiment cellulaire Tan1 et Kre33 interagissent et on ne sait pas non plus dans quel compartiment se fait l'acétylation des ARNt. À l'aide d'outils bio-informatiques, nous avons identifié un signal de localisation nucléaire (NLS) et nucléolaire (NoLS) dans la protéine Tan1 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ici, nous démontrons par microscopie à immunofluorescence et essai de ligature de proximité (PLA) que Tan1 interagit avec Kre33 dans le nucléole. Nous avons généré des mutants de délétion dépourvus du NLS et NoLS et avons constaté que ces mutants ne transitent plus par le noyau et perdent leur interaction avec Kre33. Les expériences de double hybride (Y2H) ont indiqué que les mutants de délétion maintenaient la capacité d'interagir avec Kre33. On peut supposer que l'avantage d'avoir Kre33 et sa protéine adaptatrice Tan1 dans le même compartiment pourrait permettre une acétylation efficace et plus spécifique des ARNt sérine et leucine. En somme, cette étude a apporté des connaissances essentielles concernant les mécanismes moléculaires à l'œuvre dans l'interaction entre Tan1 et Kre33, et a ouvert des perspectives prometteuses pour de futures recherches visant à approfondir la compréhension du rôle de ces deux protéines dans la biologie des ARNt.

Mots clés : nucléole, ARNt, Tan1, ac4C, levure.

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1. ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1.1 Le nucléole et la biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes

##### 1.1.1 Le nucléole

Semblable à d'autres organismes eucaryotes, le matériel génétique de *Saccharomyces cerevisiae* est contenu dans 16 chromosomes entourés d'une double membrane, appelée noyau, qui les sépare des autres composants cellulaires. Les composants essentiels de cette structure comprennent l'enveloppe nucléaire (NE), le complexe du pore nucléaire (NPC) et le nucléole (Kim *et al.*, 2009; Taddei et Gasser, 2012).

Le nucléole constitue un compartiment spécialisé du noyau où les loci d'ADNr sont regroupés en plusieurs centaines de répétitions en tandem dans des régions organisatrices nucléolaires (NOR) (McStay, 2016; Taddei *et al.*, 2010). C'est le compartiment subnucléaire le plus visible présent dans presque tous les noyaux eucaryotes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a une forme de croissant et occupe environ un tiers du volume nucléaire. Il est situé à côté de l'enveloppe nucléaire (NE) et se trouve à l'opposé du corps polaire du fuseau (Bystricky *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 1989). On pourrait considérer que cette zone est une usine spécialisée dans la création de ribosomes. La structure physique de cette région est fortement influencée par le taux de croissance de la cellule, probablement en raison d'ajustements effectués dans la production de ribosomes pour répondre aux besoins de la cellule (Oakes *et al.*, 1993; Powers et Walter, 1999; Taddei et Gasser, 2012).

La morphologie ultrastructurale du nucléole est bien conservée chez les eucaryotes. Trois régions nucléolaires de base peuvent être distinguées par microscopie électronique : le composant fibrillaire dense (DFC) dans lequel se produit la synthèse des pré-ARNr ainsi que divers événements de traitement précoces, le centre fibrillaire (FC) qui contient des gènes d'ADNr inactifs et le composant granulaire (GC) où l'assemblage des particules ribosomiques et les événements de traitement tardifs se produisent (Thiry et Lafontaine, 2005).

Chez les eucaryotes, la transcription des gènes ribosomiques ainsi que l'assemblage des deux sous-unités du ribosome s'effectuent au niveau du nucléole (Olson *et al.*, 2000). Le nucléole est aussi le lieu de la synthèse et la maturation des ribosomes et de l'ARN ribosomique (Feng *et al.*, 2012). C'est une structure sans membrane (Girke et Seufert, 2019), et les interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique sont importantes afin d'assurer une bonne coordination des fonctions nucléolaires (Cmarko *et al.*, 2008). Plus de 4000 protéines nucléolaires humaines ont déjà été identifiées et environ 90% possèdent des homologues chez la levure (Ahmad *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2005). Ceci suggère que le protéome du nucléole et possiblement ses fonctions sont bien conservés à travers l'évolution (Boisvert *et al.*, 2007). Dans le nucléole, le SSU processome commence à s'assembler (Barandun *et al.*, 2018; Dragon *et al.*, 2002). C'est un complexe ribonucléoprotéique impliqué dans le traitement, la maturation et l'assemblage de la petite sous-unité des ribosomes eucaryotes. L'identification de ses composants est la première étape vers la compréhension de son fonctionnement moléculaire (Phipps *et al.*, 2011).

Les eucaryotes, de la levure à l'homme, présentent les principes de base de l'organisation nucléaire. Cela permet de tester les implications fonctionnelles de l'organisation nucléaire dans un organisme unicellulaire malgré des caractéristiques nucléaires spécifiques à l'espèce et au tissu. Avec les approches génétiques, la microscopie et la cartographie à l'échelle du génome, la levure s'est avérée être extrêmement utile pour évaluer les rôles fonctionnels de la structure nucléaire (Taddei et Gasser, 2012).

### 1.1.2 La biogenèse des ribosomes

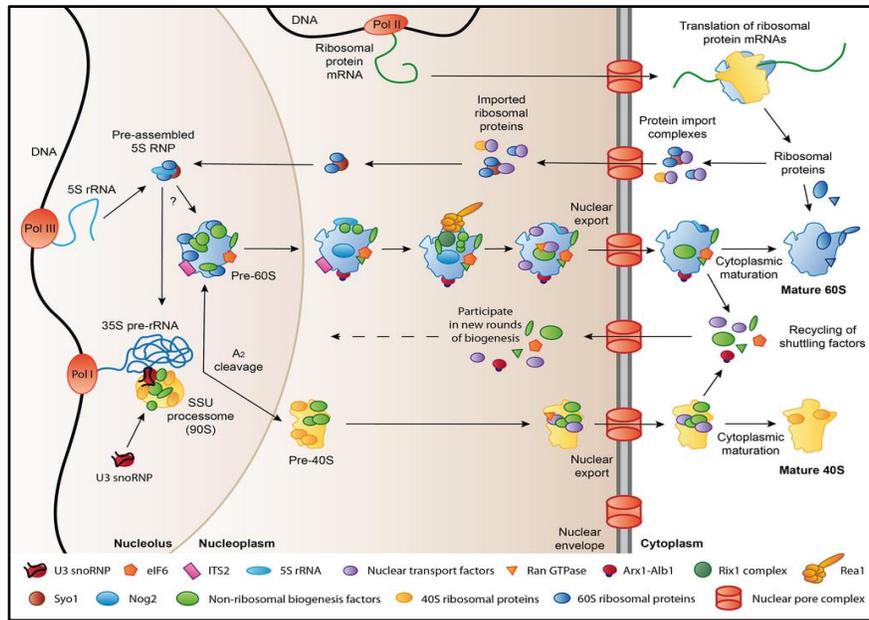
La biogenèse des ribosomes est le processus d'assemblage du complexe ribosomique (Melnikov *et al.*, 2018). C'est un processus biologique très complexe, dynamique et hautement régulé. Il requiert l'expression de gènes codant pour des composants du ribosome (ARNr et protéines ribosomiques) ainsi que des petits ARN nucléolaires (snoRNA) impliqués dans la maturation, l'assemblage et l'exportation de particules pré-ribosomiques. Les snoRNA représentent un type d'ARN non codant qui sont largement présents dans le nucléole des

cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle important dans la modification de l'ARNr (Huang *et al.*, 2022). Des centaines de facteurs d'assemblage sont aussi requis (Olson, 2011; Woolford et Baserga, 2013). Le processus de fabrication d'un seul ribosome est une tâche extrêmement ardue et représente l'une des activités les plus coûteuses sur le plan métabolique d'une cellule. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, près de 7000 nucléotides de pré-ARNr doivent être transcrits, clivés, repliés, modifiés chimiquement par des petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP) dirigeant soit la pseudo-uridylation ou la 2'-O-méthylation et assemblés avec 78 protéines ribosomiques pour produire un ribosome mature. Environ 2000 nouveaux ribosomes sont produits chaque minute dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Warner, 1999).

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique, qui est à la fois structurellement et fonctionnellement conservé. Il joue un rôle essentiel dans la traduction de l'information génétique contenue dans les ARNm en protéines fonctionnelles, ce qui constitue l'étape finale du programme génétique (Thomson *et al.*, 2013). Les structures du ribosome bactérien ont permis de fournir une meilleure compréhension des mécanismes régissant la synthèse des protéines. Les ribosomes eucaryotes sont plus gros et ont des structures plus complexes que leurs homologues bactériens. La petite sous-unité 40S est formée par l'ARNr 18S et 33 protéines ribosomiques tandis que la grande sous-unité 60S contient les ARNr 5S, 5.8S et 28S (25S pour *Saccharomyces cerevisiae*) ainsi que 47 protéines ribosomiques (46 pour *Saccharomyces cerevisiae*) (Wilson et Doudna Cate, 2012). La transcription de l'ADN ribosomique en ARNr est la première étape de l'assemblage des ribosomes (Figure 1.1). L'ARN va ensuite subir des repliements couplés à diverses voies de modification de nucléotides, de liaison aux protéines ribosomiques et d'élimination de séquences d'espacement. Après l'exportation des pré-ribosomes du noyau vers le cytoplasme, ils subissent les dernières étapes de maturation avant d'entrer dans le pool des ribosomes fonctionnels. En tout, plus de 200 facteurs d'assemblage et 76 petits ARN nucléolaires s'associent de manière transitoire à l'assemblage des ribosomes (Woolford et Baserga, 2013). La fabrication des ribosomes représente l'une des activités cellulaires les plus énergivores, témoignant de la complexité remarquable de ce processus (Fromont-Racine *et al.*, 2003; Thomson *et al.*, 2013; Warner, 1999).

Toutes les protéines ribosomiques interagissent directement avec l'ARN ribosomique dans les ribosomes matures, bien qu'à différents degrés. Aussi, l'absence d'une quelconque protéine ribosomique mène à un défaut de traitement du pré-ARNr. L'assemblage se déroule de manière coopérative et hiérarchique, et les protéines primaires de liaison à l'ARN ribosomique sont nécessaires pour démarrer l'assemblage et permettre l'association ultérieure des protéines de liaison secondaires, et ces dernières sont nécessaires à l'assemblage d'autres protéines ribosomiques tertiaires. Environ 90 protéines peuvent être trouvées dans les précurseurs 66S des sous-unités 60S matures et jouent un rôle dans l'assemblage. Parmi ces protéines, on peut citer les ARN hélicases/ATPases, les endo- et exonucléases impliquées dans le traitement du pré-ARNr, les protéines de liaison à l'ARN, les enzymes dont le rôle est de modifier l'ARN ou les protéines, les protéines AAA, les GTPases, les phosphatases et kinases, les protéines d'échafaudage putatives. On peut aussi noter la présence de quelques protéines hautement homologues aux protéines ribosomiques. Le fonctionnement de la plupart de ces facteurs a été lié à une étape particulière du traitement des pré-ARNr, de l'exportation nucléaire ou de la maturation des sous-unités selon les phénotypes observés lors de leur déplétion (Woolford et Baserga, 2013).

Contrairement aux procaryotes, chez qui les ribosomes sont directement assemblés à partir de leurs constituants sur leur site d'utilisation, dans le cytosol, les eucaryotes doivent résoudre le problème de la compartimentation. Cette compartimentation a nécessité l'apparition de mécanismes spécifiques d'import nucléaire des constituants ribosomiques, et d'export des particules vers le cytoplasme, ainsi que de systèmes de contrôle de l'avancement de la biogenèse entre deux compartiments. Ceci vient augmenter considérablement la complexité de la voie de biogenèse. En contrepartie, il est possible que cette séparation physique des différentes étapes de la biogenèse, et surtout des particules précurseurs et matures, permette la fabrication de ribosomes plus performants que ceux produits dans le seul compartiment cytoplasmique (Woolford et Baserga, 2013).



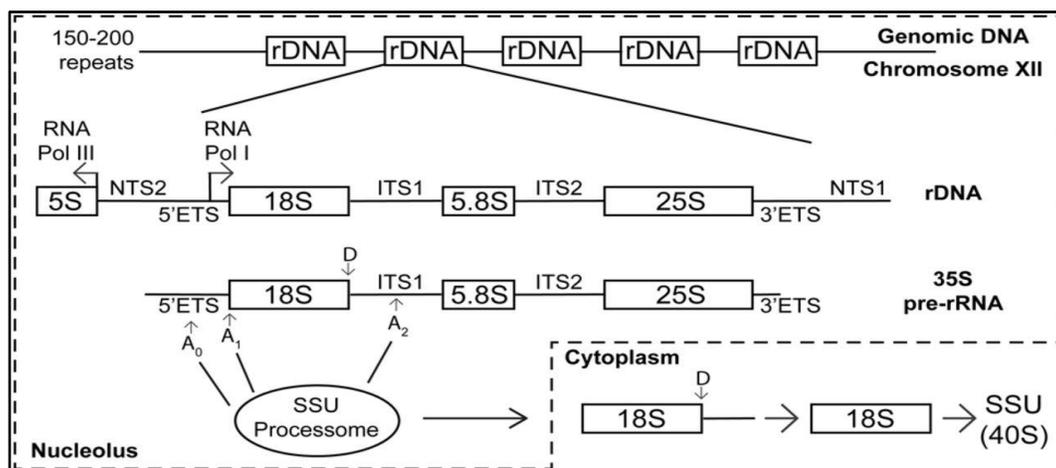
**Figure 1.1** L'assemblage des ribosomes chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les ARNm des protéines ribosomiques sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) et traduits dans le cytoplasme. Un grand nombre de protéines ribosomiques sont importées dans le noyau, tandis que d'autres protéines ribosomiques s'assemblent en tant qu'intermédiaires de biogenèse ribosomique cytoplasmique tardive. Dans le noyau, les ARN polymérases I et III effectuent la transcription des précurseurs du pré-ARNr 35S et de l'ARNr 5S. Le pré-ARNr 35S est incorporé dans le SSU processome, où le clivage A2 dépendant de la snoRNP U3 sépare les grandes et petites sous-unités naissantes. Ces dernières subissent ensuite une maturation et une exportation nucléaire indépendantes. La maturation finale se fait au niveau cytoplasmique. Les facteurs de transport qui voyagent du noyau au cytoplasme liés aux particules pré-ribosomiques sont recyclés dans le noyau pour participer à de nouveaux cycles de biogenèse des ribosomes (Greber, 2016).

### 1.1.3 Le SSU processome

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique (SSU) nécessite l'action coordonnée d'environ 75 facteurs d'assemblage pour former le SSU processome, un complexe ribonucléoprotéique de 6 MDa, précédemment purifié (Dragon *et al.*, 2002). Ce dernier est nécessaire pour la modification, le traitement et le repliement de l'ARN pré-ribosomique (pré-ARNr) afin de le préparer à l'incorporation en SSU mature. Le SSU processome est requis pour le traitement du pré-ARNr et assure la médiation des clivages aux sites A0, A1 et A2 sur le pré-ARNr (Figure 1.2). Plus précisément, le clivage au niveau de ITS1

sépare la biogenèse des petites sous-unités de la biogenèse des grandes sous-unités ribosomiques (LSU), ce qui va compartimenter le futur ARNr 18S mature de ce qui deviendra plus tard les ARNr 5.8S et 25S du LSU mature. Quant à l'ARNr 5S, il est transcrit par l'ARN polymérase III individuellement puis incorporé dans le LSU. Après l'exportation vers le cytoplasme, les sous-unités matures SSU et LSU se réunissent pour procéder à la formation du ribosome 80S mature.

Les facteurs d'assemblage du SSU processome (SPAF) sont utilisés pour cliver, traiter et modifier le pré-ARNr. Certains de ces facteurs d'assemblage se réunissent pour former cinq sous-complexes protéiques : tUtp/UtpA, UtpB, UtpC, Mpp10 et la snoRNP U3. L'une des premières étapes de la biogenèse des ribosomes est médiée par tUtp/UtpA, qui relie la transcription du pré-ARNr au traitement du pré-ARNr et se lie au début de l'ETS 5' du pré-ARNr. La snoRNP U3 quant à elle, agit comme un chaperon pour le repliement et l'incorporation de l'ARN pré-18S dans le processome SSU en croissance. Les sous-complexes UtpB, UtpC et Mpp10 sont moins bien caractérisés sur le plan fonctionnel, mais il a néanmoins été proposé qu'ils rejoignent le SSU processome naissant après les interactions initiales de tUtp/UtpA et U3 snoRNP avec le pré-ARNr naissant (Vincent *et al.*, 2018). Les mutations touchant les protéines ribosomiques et les facteurs d'assemblage des ribosomes, et qui ont été liées à des maladies humaines, illustrent l'importance de ce processus (Singh *et al.*, 2021).



**Figure 1.2 La biogenèse des ribosomes de levure.** L'ADNr de levure est disposé en 150 à 200 répétitions en tandem sur le chromosome XII. Ce dernier est transcrit sous la forme d'un pré-ARNr

précurseur polycistronique qui contient les ARNr matures 5,8S, 18S et 25S par l'ARN polymérase I. Le SSU processome est nécessaire pour le clivage en A0 et A1 de la séquence ETS en 5' du pré-ARNr 35s et en A2 au niveau de ITS1, ce qui va séparer la biogenèse LSU et SSU. La SSU résultante va être exportée vers le cytoplasme, où un clivage final au site D va se produire. Ici, la SSU est considérée comme le 40S mature contenant l'ARNr 18S. L'ARNr 5S quant à lui est transcrit séparément par l'ARN polymérase III (Vincent et al., 2018).

Le SSU processome est présent dans presque toutes les lignées eucaryotes et provient probablement du dernier ancêtre commun eucaryote (LECA) par duplication de gènes anciens et divergence fonctionnelle. L'évolution du SSU processome a impliqué non seulement l'augmentation de ses composants, mais aussi l'émergence d'autres fonctions nucléolaires et du compartiment sous-nucléaire (nucléole) dans le LECA. La duplication des gènes, l'émergence de nouveautés génétiques et la perte de gènes ont contribué à davantage de divergences au sein du complexe au cours de l'évolution des eucaryotes (Feng *et al.*, 2013).

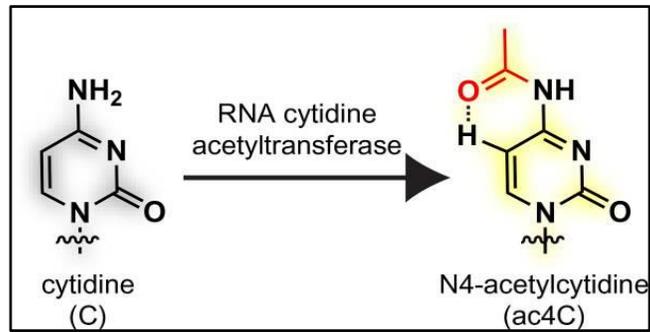
## 1.2 L'acétylation des ARN de transfert

Les ARN de transfert jouent un rôle d'adaptateur en reliant, de manière spécifique, chaque codon de l'ARN messager à son acide aminé correspondant pendant la synthèse des protéines. Après leur transcription, ces ARN sont soumis à des modifications enzymatiques (Suzuki, 2021), avec une variété impressionnante de plus de 100 types de modifications différentes dans tous les organismes. Chaque molécule d'ARNt est en moyenne modifiée par 13 de ces modifications (Broly *et al.*, 2022).

À ce jour plus d'une centaine de modifications de nucléotides ont été identifiées dans l'ARN, dont la majorité ont été caractérisées dans les ARN ribosomiques ainsi que dans les ARN de transfert. Ces modifications sont trouvées dans des sites hautement conservés pouvant influencer divers processus comme la maturation des ribosomes. Le potentiel régulateur des modifications d'ARN a souvent été vu comme analogue à l'épigénome où des changements dynamiques dans l'acétylation servent de marque de transcription active. L'acétylation de l'ARN existe sous forme de 3 nucléobases, dont la N4-acétylcytidine (ac4C), qui est présente

dans tous les domaines de la vie (Figure 1.3). La fonction d'ac4C a bien été étudiée sur les ARNt bactériens : par exemple, l'ac4C a été liée à l'adaptation au stress, à la dormance et à la persistance. Chez *Escherichia coli*, la base « wobble » de l'élongateur ARNt<sup>Met</sup> est modifiée en ac4C afin d'assurer la reconnaissance précise du codon AUG en empêchant une lecture erronée du codon AUA. TmcA est l'enzyme de *E. coli* qui acétyle spécifiquement la base « wobble » en utilisant l'acétyl-coenzyme A et l'ATP (ou GTP) (Ikeuchi *et al.*, 2008). Aussi, chez la bactérie *Bacillus subtilis*, le gène *tmcAL* a été identifié comme gène responsable de la formation d'ac4C. Les modifications au niveau des anticodons d'ARNt jouent ainsi un rôle essentiel pour permettre une traduction précise (Taniguchi *et al.*, 2018). Cependant, peu de choses sont connues à propos du rôle d'ac4C chez les eucaryotes même si certaines études ont démontré un rôle dans la biogenèse des ARNr et dans la stabilité des ARNt (Thomas *et al.*, 2019). Par exemple, l'absence de *TANI* chez un mutant de levure a provoqué une diminution d'ARNt<sup>Ser</sup> mature, indiquant que l'ac4C et/ou la protéine Tan1 sont importants pour la stabilité de l'ARNt (Johansson et Byström, 2004).

Les ARNt sont composés de 75 à 95 nucléotides et sont omniprésents dans tous les organismes. Les principales régions fonctionnelles des ARNt sont le triplet anticodon qui lie les codons de l'ARNm ainsi que la séquence CCA en 3' sur laquelle un acide aminé apparenté à l'ARN de transfert s'attache (Goodenbour et Pan, 2006). Il y a peu d'informations sur la localisation exacte de la biosynthèse précoce des ARNt. En utilisant des hybridations fluorescentes *in situ* chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été démontré que des pré-ARNt nucléaires résident principalement au nucléole lors de la biosynthèse des ARNt (Bertrand *et al.*, 1998). Ceci semble logique car la sous-compartmentation des précurseurs faciliterait le déplacement des intermédiaires via la série de clivages nucléolytiques et de modifications de nucléotides. Le nucléole est le site de traitement et de synthèse des ARNr; La colocalisation de ces deux voies fournirait l'opportunité de partager des aspects liés à la régulation incluant le transport vers le cytoplasme. Le pourcentage exact de précurseurs ARNt nucléaires est encore inconnu à ce jour, mais il est possible que certaines classes de pré-ARNt empruntent des voies nucléoplasmiques alternatives (Bertrand *et al.*, 1998).



**Figure 1.3 L'acétylation post-transcriptionnelle des résidus d'ARN cytidine donne la N4-acétylcytidine (ac4C).** Il s'agit de la conformation proximale la plus stable qui permet de préserver le bord natif Watson-Crick de la cytidine (Thomas et al., 2019).

De plus en plus de gènes impliqués dans les modifications des ARNt sont associés aux troubles intellectuels. Il a été démontré que des variants de dix gènes différents impliqués dans les modifications des ARNt sont liés à des troubles neurologiques et neurodéveloppementaux, soulignant l'importance croissante des modifications des ARNt dans les maladies humaines (Broly et al., 2022).

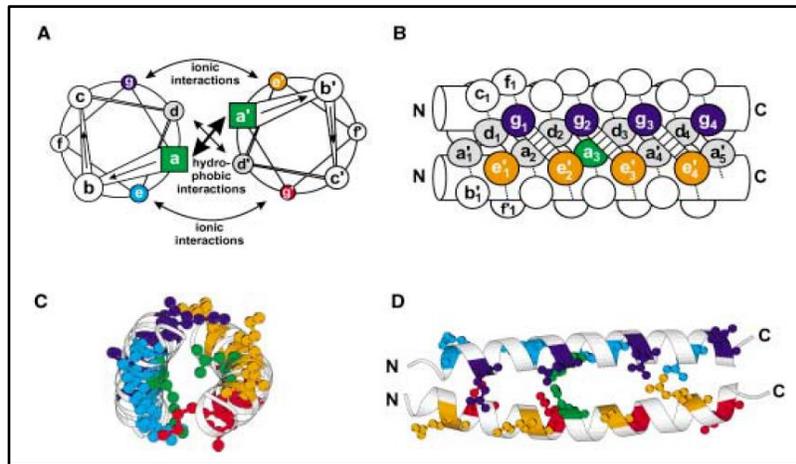
### 1.3 Les superhélices

Les protéines contenant des hélices  $\alpha$  sont caractérisées par un motif d'oligomérisation en hélice  $\alpha$  qui se compose d'une répétition heptadique de résidus apolaires comme interface d'oligomère. Malgré sa simplicité, ce motif de pliage est très versatile et les protéines contenant des hélices  $\alpha$  peuvent remplir diverses fonctions selon leur architecture de domaine superhélice, qui influe sur leur état d'oligomérisation, leur rigidité et leur capacité à agir comme un système de reconnaissance moléculaire (Burkhard *et al.*, 2001).

La superhélice est un motif structuré qui se compose de deux à cinq hélices alpha qui s'enroulent les unes autour des autres dans une hélice gauche qui forme un *supercoil* (Figure 1.4). Les hélices régulières possèdent 3,6 résidus pour chaque tour complet d'hélice, mais la superhélice impose une distorsion qui porte cette valeur à 3,5 résidus. Ainsi, une répétition d'heptade se produit à chaque deux tours d'hélice. Des découvertes récentes ont poussé les

superhélices sous les projecteurs, car il est devenu clair qu'elles se trouvent au niveau de structures importantes impliquées dans des interactions, telles que le contrôle de la transcription. La superhélice la plus couramment observée est le type gauche, au niveau de laquelle chaque hélice a une répétition heptade, avec deux à 200 de ces répétitions dans une protéine. Cette répétition est notée  $(a-b-c-d-e-f-g)_n$  dans une hélice, et  $(a'-b'-c'-d'-e'-f'-g')_n$  dans l'autre. Dans ce modèle, a et d sont généralement des résidus non polaires à l'interface des deux hélices, alors que e et g sont des résidus polaires exposés au solvant donnant une spécificité entre les deux hélices avec des interactions électrostatiques (Mason et Arndt, 2004).

Les hélices alpha entrelacées des superhélices fournissent des sites d'interaction protéine-protéine pour permettre l'assemblage et le désassemblage dynamiques de complexes protéiques. La superhélice combine l'adaptabilité structurelle et la polyvalence avec la spécificité et la résistance mécanique (Strauss et Keller, 2008). Les superhélices ne sont pas seulement médiatrices d'interactions protéine-protéine cruciales dans la cellule, mais constituent aussi un échafaudage attrayant en biologie synthétique et une cible thérapeutique potentielle (Wang *et al.*, 2012). Les interfaces des superhélices peuvent être divisées en trois catégories par rapport à leur stœchiométrie d'interaction. Le premier cas présente un dimère hélicoïdal d'une protéine qui interagit avec un seul partenaire protéique. Dans le deuxième cas, un dimère hélicoïdal d'une protéine établit une interaction avec deux partenaires protéiques différents. Enfin, dans le dernier cas, un seul motif dimérique hélicoïdal se forme à l'interface entre les protéines partenaires (Watkins *et al.*, 2015).



**Figure 1.4 Représentation schématique d'une superhélice** Les deux motifs sont parallèles dimériques (A et B). Les deux autres (C et D) sont sous forme de tracé en ruban de la structure rayons X de la glissière à leucine de GCN4 (Mason et Arndt, 2004).

#### 1.4 Les signaux de localisation nucléaire et nucléolaire

Pour que les protéines synthétisées dans le cytoplasme atteignent les compartiments de destination, elles doivent être transportées de manière sélective et efficace à travers le complexe du pore nucléaire (NPC). Ce complexe, qui agit comme une barrière de perméabilité entre le cytoplasme et le nucléoplasme, est une structure multimérique de grande taille. Le transport des protéines cargos à travers le NPC requiert la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) sur ces protéines, signal qui est reconnu par les transporteurs nucléaires afin d'aider les protéines cargos à atteindre le noyau à travers les NPC (Cautain *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2018; Lu, Juane *et al.*, 2021; Strambio-De-Castillia *et al.*, 2010).

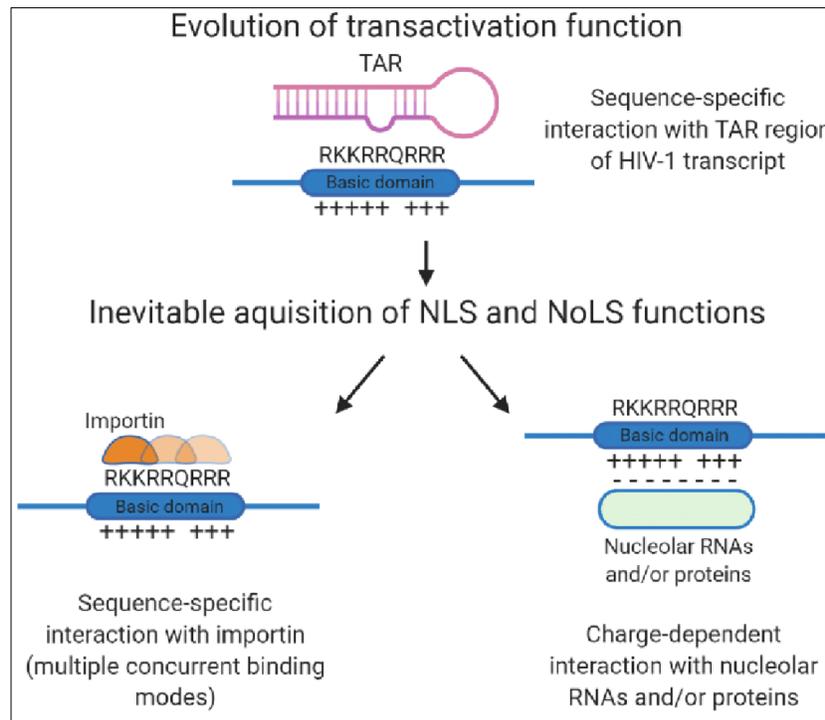
Un signal de localisation nucléaire (NLS) est une courte séquence d'acides aminés qui assure le transport des protéines nucléaires vers le noyau. Les mécanismes de reconnaissance des NLS ont été largement étudiés et beaucoup de NLS ont été identifiés (Boulikas, 1993; Cokol *et al.*, 2000). Les NLS les mieux décrits expérimentalement sont ceux contenant des motifs monopartites et bipartites. Le motif monopartite est caractérisé par un *cluster* de résidus basiques, tels que l'arginine (R) et la lysine (K), précédé d'un résidu  *$\alpha$ -helix-breaking*, comme la proline (P) ou la glycine (G) (Imai et Mitaku, 2005). Le motif bipartite se compose de deux groupes de résidus basiques séparés par 9 à 12 résidus. Cependant, tous les NLS ne respectent

pas ces « règles de consensus » (Cokol *et al.*, 2000). Quant aux NoLS, ils assurent l'accumulation de la protéine au niveau du nucléole, et ils contiennent une forte proportion d'acides aminés basiques, ce qui les rend assez similaires aux NLS. Ceci se manifeste par le fait que 48% des résidus retrouvés dans les séquences de ces signaux sont des lysines ou des arginines. En raison de cette similarité, les NLS et NoLS sont souvent considérés comme analogues et sont utilisés de manière interchangeable pour l'annotation des protéines. Aussi, une étude a suggéré que les peptides contenant seulement 6 arginines chargées positivement avec un point isoélectrique supérieur à 12,6 étaient suffisants pour la localisation nucléolaire (Martin *et al.*, 2015).

Pour confirmer que ces signaux sont suffisants pour ce ciblage, ils sont généralement fusionnés à des protéines rapporteuses et visualisés par microscopie. Une analyse du positionnement des NoLS validés expérimentalement dans des protéines montre que ces derniers se localisent surtout au niveau des extrémités N-terminale et C-terminale des protéines. Il y a de plus en plus de preuves que ces deux types de signaux sont discernés par la cellule. Les deux types de signaux peuvent être regroupés en trois classes: Les signaux strictement NoLS qui permettent l'accumulation de protéines au nucléole mais qui ne sont pas capables d'effectuer une translocation au niveau de l'enveloppe nucléaire. Ils se trouvent dans des protéines qui contiennent aussi un signal strictement NLS. Les signaux strictement NLS qui ciblent les protéines vers le noyau mais ne peuvent pas établir une accumulation importante dans le nucléole.

Il y a aussi les régions conjointes NoLS-NLS qui peuvent à la fois cibler des protéines à travers l'enveloppe nucléaire et en même temps entraîner l'accumulation de protéines au niveau du nucléole. Par exemple, la protéine UTP20 contiendrait des NoLS et des NLS qui se chevauchent près de son extrémité C-terminale (Scott *et al.*, 2010). Un autre exemple de régions conjointes NoLS-NLS peut être observé chez le virus VIH-1 (Figure 1.5). Le domaine basique (BD) de la protéine Tat du VIH-1 joue plusieurs rôles essentiels, sa fonction principale étant l'activation de la transcription virale. De plus, le BD fonctionne en tant que NLS, et sa charge nette positive élevée entraîne inévitablement son fonctionnement en tant que NoLS grâce à un mécanisme spécifique lié à la charge. L'intégration du NLS et NoLS au sein de domaines fonctionnels

riches en acides aminés positivement chargés représente potentiellement un mécanisme permettant de condenser diverses séquences fonctionnelles dans des régions protéiques compactes. Par conséquent, cette réduction de la taille des protéines peut influencer l'émergence et l'évolution des NLS et NoLS chez les virus.

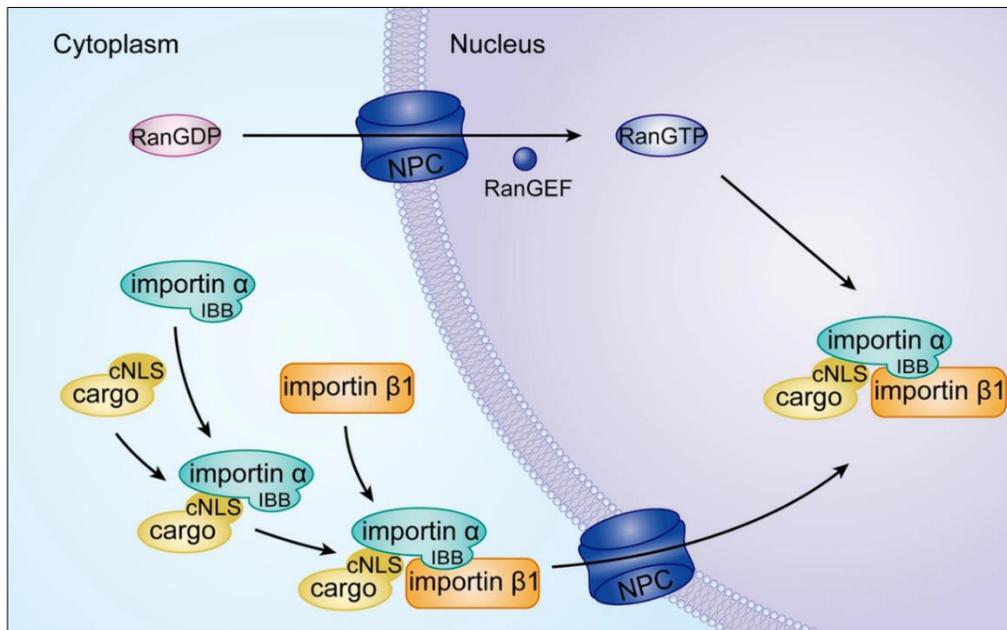


**Figure 1.5 La Coévolution moléculaire des NLS et NoLS au sein du domaine basique de la protéine Tat du VIH-1.** L'évolution de domaines riches en acides aminés chargés positivement peut aboutir à l'acquisition progressive de fonctions supplémentaires, comme le fonctionnement à la fois comme NLS et NoLS du domaine basique de la protéine Tat.

Il existe aussi des signaux de localisation nucléaire non classiques (ncNLS) qui diffèrent des signaux classiques et ne contiennent pas nécessairement des résidus d'arginine ou de lysine, contrairement à ces derniers (Bradley *et al.*, 2007; Lu, Juane *et al.*, 2021). De plus, plusieurs types de NLS spécifiques existent en dehors des cNLS et ncNLS, tels que les NLS putatifs, les NLS d'épitope spatial, les NLS cryptiques et les NLS multiples. Alors que les NLS putatifs peuvent ou non avoir une fonction de positionnement nucléaire, les NLS d'épitope spatial nécessitent une interaction protéine-protéine pour former une structure reconnue par le

récepteur de transport, les NLS cryptiques ne sont exposés que sous des signaux spécifiques et les NLS multiples permettent la coopération de plusieurs NLS fonctionnels pour favoriser la localisation nucléaire d'une protéine (Gu *et al.*, 2003; Lu, Juane *et al.*, 2021; Mallet et Bachand, 2013; Meyer et Vinkemeier, 2004).

La voie de transport des protéines via un cNLS comprend quatre étapes : la formation du complexe d'importation cargo-transporteur dans le cytoplasme, la traversée du NPC, la dissociation du complexe dans le noyau, et le recyclage de l'importine (Lu, Juane *et al.*, 2021; Stewart, 2007) (Figure 1.6). Le NLS de la protéine de cargaison est liée à l'importine  $\alpha$ , qui est reconnue par l'importine  $\beta 1$  pour former un complexe trimère. L'importine  $\beta 1$  guide ce complexe vers le NPC, où il transloque dans le noyau en interagissant avec des répétitions de phénylalanine-glycine (FG) présentes sur les nucléoporines (Nup), les composants protéiques du NPC (Hodel *et al.*, 2001) (Lu, Juane *et al.*, 2021; Terry et Went, 2009). Une fois à l'intérieur du noyau, l'interaction avec le RanGTP induit une modification de la conformation de l'importine  $\beta 1$ , permettant la libération de la protéine cargo (Lange *et al.*, 2007; Lu, Juane *et al.*, 2021). Après la libération du cargo protéique, l'importine  $\alpha$  est exportée du noyau, tandis que l'importine  $\beta 1$  liée au RanGTP retourne dans le cytoplasme. L'hydrolyse du GTP libère le RanGDP, qui peut alors être réutilisé pour d'autres processus biologiques (Lu, Juane *et al.*, 2021; Oka et Yoneda, 2018).



**Figure 1.6 Représentation du mécanisme de transport de la protéine cNLS-cargo dans le nucléoplasme.** Les protéines de cargaison avec un cNLS sont importées par le transporteur importine  $\beta 1$  et la protéine adaptatrice importine  $\alpha$  pour former le trimère cNLS-cargo-importine  $\alpha$ -importine  $\beta 1$ . L'importine  $\beta 1$  dirige le complexe trimère vers le noyau en interagissant avec plusieurs répétitions FG sur le complexe du pore nucléaire (Kapinos *et al.*, 2017; Lu, Juane *et al.*, 2021)

### 1.5 La protéine Kre33

Parmi les diverses enzymes nucléolaires impliquées dans la biogenèse des ribosomes, il y a Kre33 (NAT10 chez l'humain). Les protéines conservées Kre33 et NAT10 présentent une homologie limitée avec la protéine TmcA bactérienne (autour de 25 % d'identité), y compris dans le domaine acétyltransférase et le motif de liaison à l'ARN, qui dans le cas de TmcA se lie aux ARN<sup>tMet</sup> (Sharma *et al.*, 2015). Kre33 est une cytidine acétyltransférase essentielle avec une spécificité envers l'ARNr 18S et les ARN<sup>tSer</sup> et ARN<sup>tLeu</sup>. Elle est impliquée dans la médiation de l'acétylation de la cytidine dans la tige du bras D des ARN<sup>tSer</sup> et ARN<sup>tLeu</sup> à la position 12 ainsi que dans l'hélice 34 et l'hélice 45 de l'ARN ribosomique 18S aux positions 1280 et 1773. Kre33 est donc nécessaire pour l'acétylation de l'ARNr 18S, mais cette acétylation de l'ARNr 18S n'est pas essentielle à la croissance des cellules de levure. La présence physique de Kre33 dans les ribosomes précurseurs est nécessaire pour un traitement efficace du pré-ARNr (Ito *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2015). Il a aussi été découvert que la

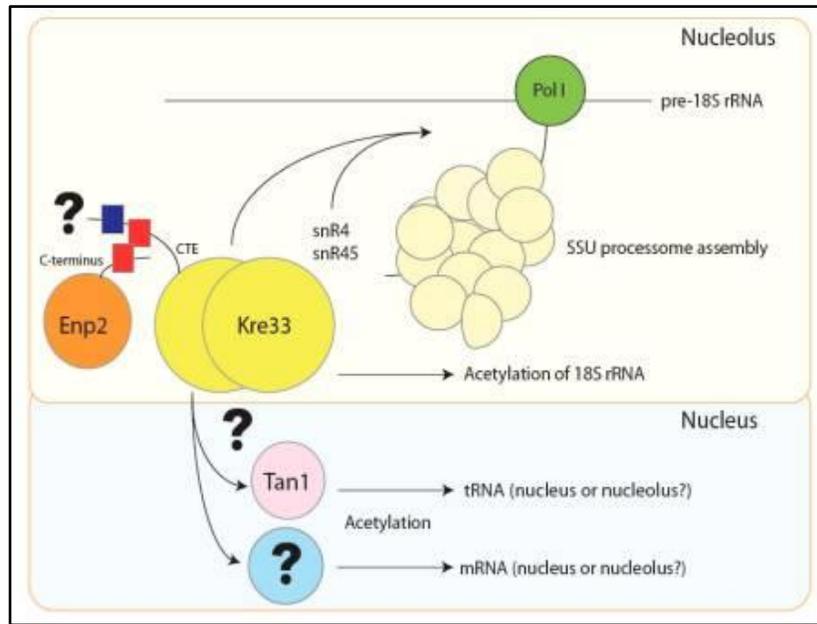
fonction acétyltransférase de Kre33 sur les ARNt était bien conservée au cours de l'évolution, car la protéine humaine NAT10 exprimée de manière ectopique dans des cellules de levure *kre33Δ* a la capacité d'acétyler les ARNt à 85 % du niveau de type sauvage. De plus, des expériences de *spot assay* ont montré que NAT10 complémente la croissance de cellules *kre33Δ* dans la même mesure que des cellules contenant la protéine Kre33 sauvage. Le *spot assay* est une technique qui consiste à déposer de petits volumes d'une culture avec des dilutions variables sur un milieu solide pour évaluer la viabilité, la croissance ou la sensibilité des cellules face à différentes conditions ou composés (Sharma *et al.*, 2015).

Kre33 est donc active sur les ARNr et les ARNt, deux substrats très structurés, et dans les deux cas, les modifications post-transcriptionnelles se retrouvent au sein des hélices des molécules matures. Il a été montré que le domaine hélicase RecD conservé de Kre33 contribue à son accès efficace au substrat et donc à l'acétylation. Ainsi, un domaine hélicase Kre33 fonctionnel est nécessaire pour une acétylation optimale de l'ARN (Sharma *et al.*, 2015). Kre33 est aussi liée avec le phénomène de résistance à la toxine tueuse K1 d'où elle tient son nom. La toxine tueuse K1 est une protéine qui tue les cellules de levures via la formation de pores, et les mutants hétérozygotes Kre33 présentent une haploinsuffisance dans la résistance à la toxine tueuse K1 (Bussey, 1991; Pagé *et al.*, 2003).

Kre33 est aussi nécessaire aux processus de maturation et d'exportation de la petite sous-unité 40S du ribosome (Grandi *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009), car elle est requise pour les clivages nucléolaires précoces de l'ARNr précurseur aux sites A0, A1 et A2 pendant la synthèse de l'ARNr 18S (Figure 1.2). De plus, elle fait partie du module Kre33-Enp2-Brf2-Lcp5 qui médie le compactage final du pré-ribosome 90S (Cheng *et al.*, 2019). Au cours des dernières années, des structures cryo-EM du SSU processome de levure ont révélé que Kre33 forme un dimère (Kornprobst *et al.*, 2016; Sleiman et Dragon, 2019). Il est possible que cette dimérisation permette à une sous-unité de rester active en tant qu'acétyltransférase capable de couvrir la distance jusqu'à son substrat, tandis que l'autre sous-unité fonctionne en recrutant et en ancrant le dimère dans la particule 90S en évolution (Cheng *et al.*, 2019).

NAT10 et ses homologues sont essentielles chez les souris, les humains et les levures, mais de récentes études indiquent que l'activité acétyltransférase de NAT10 serait non-essentielle. Par ailleurs, l'acétylation des ARNt<sup>Ser</sup> et ARNt<sup>Leu</sup> nécessite une protéine adaptatrice (THUMPD1 chez l'homme et Tan1 chez la levure). NAT10 serait aussi parmi les acétyltransférases les plus abondantes chez l'homme, et sa dérégulation est liée à diverses maladies comme le syndrome de Hutchinson-Gilford, le cancer ovarien, le cancer colorectal et le cancer du foie (Thomas *et al.*, 2019). L'acétylation de l'ARNr 18S est bien conservée chez les organismes eucaryotes, mais la fonction exacte de cette modification reste évasive. La machinerie impliquée dans la modification de l'ARN (dont Kre33 fait partie) est essentielle aux premières étapes de traitement nucléolaire menant à la synthèse de l'ARNr 18S. Cette machinerie est donc requise pour la production des petites sous-unités (Sharma *et al.*, 2015). La Figure 1.7 illustre un modèle hypothétique pour l'acétylation des ARN par l'acétyltransférase Kre33.

Les extensions à l'extrémité N-terminale (NTE) et à l'extrémité C-terminale (CTE) de Kre33 contiennent des motifs putatifs que l'on ne trouve que dans les paralogues eucaryotes. La NTE contient au moins un NLS putatif et un motif NoLS possible, et ces deux motifs peuvent se chevaucher. La CTE contient une superhélice responsable de l'interaction protéine-protéine, suivi d'un NLS et d'un NoLS qui se chevauchent (Sleiman et Dragon, 2019).



**Figure 1.7 Modèle hypothétique pour l'acétylation des ARN par Kre33.** Kre33 catalyse l'acétylation de deux cytosines d'ARNr 18S : chaque modification est guidée par un petit ARN nucléolaire (snoRNA) box C/D différent, snR4 (C1280 dans l'hélice 34) et snR45 (C1773 dans l'hélice 45 (Sleiman et Dragon, 2019).

## 1.6 La protéine Tan1

Un criblage génétique a révélé qu'un gène nommé *TAN1* (pour Trna Acetylation 1) est requis pour la formation de la N4-acétylcytidine dans les ARNt<sup>Ser</sup> et ARNt<sup>Leu</sup>. Il a aussi été démontré que la protéine Tan1 interagit avec ces ARNt (Johansson et Byström, 2004). L'intégrité fonctionnelle de l'ARNt est cruciale pour la traduction. C'est pour cela qu'il existe un mécanisme qui soumet certaines espèces de pré-ARNt aberrantes à une surveillance nucléaire, qui les conduit à une dégradation exonucléolytique en 3'. Ce dernier provoque aussi chez certaines espèces d'ARNt matures une désintégration rapide (nommée RTD pour *rapid tRNA decay*) si elles portent des mutations déstabilisantes spécifiques ou si elles sont hypomodifiées. Ainsi, il a été démontré que des souches *tan1Δ* sont sensibles à la température en raison du manque d'ac<sup>4</sup>C<sub>12</sub> et de la RTD conséquente des ARNt<sup>Ser</sup> et ARNt<sup>Leu</sup> (Dewe *et al.*, 2012).

Le complexe de rétention et d'épissage de l'ARNm précurseur (RES) est un complexe du splicéosome présent chez l'homme et la levure qui est important pour l'épissage de l'ARN et

la rétention des pré-ARNm non-épissés (Wysoczański *et al.*, 2014). L'inactivation de ce complexe conduit donc à des niveaux réduits d'ac4C. L'abondance relative d'un nucléoside modifié dans l'ARNt et l'efficacité d'épissage de certains transcrits individuels constituent deux phénomènes pouvant être influencés par des signaux environnementaux. Il est donc possible que le traitement du pré-ARNm de *TANI* puisse, dans certaines conditions, contrôler les niveaux d'ac4C dans l'ARNt. Et comme l'ac4C est important pour la stabilité de l'ARNt, un tel mécanisme pourrait être un moyen de réguler l'abondance des isoaccepteurs de sérine et de leucine (Zhou *et al.*, 2013).

Tan1 aurait aussi un lien avec le facteur d'initiation eucaryote 2B (eIF2B). Ce dernier contrôle la première étape de la traduction en catalysant l'échange de guanine sur le facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2). La surexpression de Tan1 supprime des mutations spécifiques de eIF2B, ce qui fait de Tan1 un suppresseur extragénique des mutations de eIF2B causant le syndrome CACH. La même étude a démontré que Tan1 serait impliquée dans la régulation de la traduction médiée par eIF2B (Sharma *et al.*, 2017).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'ac4C est présente au niveau de l'ARNr 18S, et en position 12 chez les ARNt spécifiques pour la leucine et la sérine. L'analyse de l'ARN isolé d'un mutant *tan1Δ* a révélé que l'ac4C est absente dans les ARNt mais pas dans les ARNr (Sharma *et al.*, 2015). On observe chez le mutant *tan1Δ* une baisse du taux de ARNt-Ser-CGA indiquant ainsi que *TANI* est requis pour la stabilité des ARNt (Johansson et Byström, 2004). L'acétylation de l'ARNt chez les levures nécessite donc la protéine adaptatrice Tan1. Tous les organismes où l'ac4C a été caractérisée portent un seul gène d'ARN acétyltransférase (Thomas *et al.*, 2019). Le fait que Tan1 ne contienne pas de motif acétyltransférase a suggéré qu'une autre protéine pourrait être impliquée catalytiquement (Johansson et Byström, 2004). Tan1 se lie à l'ARNt *in vitro* et est strictement requise pour l'acétylation des ARNt *in vivo*. Comme mentionné précédemment, Kre33 est responsable de cette acétylation et interagit avec Tan1 et NAT10 avec THUMPD1 (Sharma *et al.*, 2015). Kre33/NAT10 portent un domaine acétyltransférase et Tan1/THUMPD1 abritent un motif de liaison à l'ARN, et tous sont impliqués dans l'acétylation des ARNt de la levure et de l'humain, respectivement. Ceci a suggéré que Kre33 et Tan1 chez la levure, et NAT10 et THUMPD1 chez l'homme, pourraient agir ensemble dans un complexe.

Il a aussi été démontré que Kre33 et Tan1 interagissent en utilisant le système double hybride (Y2H) dans des cellules de levure (Sharma *et al.*, 2015). Le domaine THUMP de la protéine Tan1 est considéré comme un motif de liaison à l'ARN, commun à plusieurs enzymes de modification (Aravind et Koonin, 2001; Johansson et Byström, 2004). Le domaine THUMP tire son nom de sa présence dans les synthèses de thiouridine, les méthylases d'ARN et les synthèses de pseudouridine dans tous les règnes du vivant (Aravind et Koonin, 2001).

Après l'identification initiale d'une seule personne, 13 individus de 8 familles atteints de retard mental syndromique ont été étudiés pour évaluer le rôle du gène THUMPD1. Les résultats ont montré que des variants bi-alléliques dans THUMPD1 provoquent une perte de fonction du gène, entraînant une perte de la modification ac4C dans les ARNt<sup>Ser</sup> individuellement purifié. Par exemple, la mutation p.Pro164Ser située dans le domaine THUMP, altère la stabilité de la protéine et sa capacité de liaison aux ARNt<sup>Ser</sup>. En outre, l'étude a montré que la perte de fonction de THUMPD1 entraîne un manque d'acétylation de l'ARNt, ce qui est lié au développement du retard mental syndromique. Cette conclusion a été renforcée par l'utilisation de deux lignées cellulaires THUMPD1 KO générées par CRISPR-Cas9 qui ont également montré une perte d'acétylation (Broly *et al.*, 2022; Maddirevula *et al.*, 2019).

### 1.7 Les ribosomopathies

Les ribosomopathies sont des maladies causées par des défauts dans les constituants ribosomiques ou dans des facteurs possédant un rôle dans l'assemblage des ribosomes. Un seul composant défectueux peut avoir un impact majeur sur la fonction cellulaire. Ces ribosomopathies sont caractérisées par des défauts dans les protéines ribosomiques, les facteurs d'assemblage des ribosomes ou la maturation de l'ARNr. Compte tenu de la fonction cellulaire importante des ribosomes en tant qu'usines pour produire les protéines, des altérations non létales de l'assemblage ou de la fonction des ribosomes devraient provoquer des dysfonctionnements cellulaires et potentiellement des maladies (Kampen *et al.*, 2020). Par exemple, la cirrhose infantile chez les Amérindiens d'Amérique du Nord est due à une mutation ponctuelle dans le gène *UTP4/CIRH1A*. Chez les hommes en développement, des mutations de

UTP14c, un composant spécifique du SSU processome, peuvent entraîner une infertilité. Il y a aussi le syndrome de Bowen-Conradi, qui est causé par une mutation ponctuelle dans le gène *EMG1* (Sondalle et Baserga, 2014).

Les lamines nucléaires sont des protéines fibreuses qui fournissent des propriétés fonctionnelles et structurelles importantes pour la réplication de l'ADN. Plusieurs maladies qu'on nomme laminopathies sont liées à des mutations du gène *LMNA*. La plus grave de ces maladies est le syndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS). C'est une maladie rare qui touche un nouveau-né sur quatre millions et provoque un vieillissement accéléré. Le HGPS est dû à une seule mutation nucléotidique, C1824T, au niveau de l'exon 11 du gène *LMNA*.

La Remodeline est un composé chimique qui permet la réorganisation des microtubules. Ce réarrangement conduit à rétablir la forme nucléaire dans les cellules touchées par les laminopathies. NAT10 est liée au HGPS car elle a été identifiée comme étant la cible chimique de la Remodeline (Larrieu *et al.*, 2014). THUMPD1 a récemment été proposé comme un gène causal pour la déficience intellectuelle autosomique récessive. Les phénotypes courants sont une dysmorphie faciale, un retard d'élocution et de développement global et une déficience intellectuelle. Il a été rapporté que le manque d'acétylation de l'ARNt dû à la perte de fonction de THUMPD1 est associé à une déficience intellectuelle, une perte auditive et des anomalies comportementales (Broly *et al.*, 2022).

## 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Dans le cadre de cette étude, nous utilisons l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae* qui a été utilisé pour l'identification de nombreux acteurs protéiques et ARN impliqués dans la biogenèse des ribosomes, dont la majorité sont à la fois nucléolaires et essentiels à la croissance (Phipps *et al.*, 2011). Les travaux de notre laboratoire sur Kre33 nous ont conduit à considérer l'étude de la protéine Tan1, car Kre33 nécessite cette protéine adaptatrice de liaison à l'ARNt pour l'activité ARNt acétyltransférase mais pas pour l'acétylation de l'ARNr 18S (Sharma *et al.*, 2015). Le compartiment cellulaire dans lequel se fait l'interaction entre Tan1 et Kre33 et l'acétylation des ARNt est encore inconnu. Le but de notre étude est donc de déterminer la

localisation de cette interaction afin de mieux cerner le rôle de Tan1 et Kre33 chez la levure et mieux comprendre leur fonctionnement au niveau moléculaire. Ainsi, nos hypothèses sont les suivantes :

Hypothèse #1 : Tan1 est nucléolaire.

Hypothèse #2 : Kre33 et Tan1 interagissent dans le nucléole.

Hypothèse #3 : Les mutations  $\Delta\text{NoLS}/\Delta\text{NLS}$  empêchent Tan1 de se localiser au nucléole/noyau.

Hypothèse #4 : Les ARNt<sup>Ser</sup> des souches de levures contenant les mutants  $\Delta\text{NoLS}$  et  $\Delta\text{NLS}$  ne contiennent plus de marque d'acétylation.

Pour répondre à ces hypothèses, des immunoprécipitations ont permis d'évaluer l'effet des mutations  $\Delta\text{NoLS}$  et  $\Delta\text{NLS}$  sur l'interaction de Tan1 avec son partenaire Kre33. Des constructions ont été générées par mutagenèse dirigée puis analysées avec le Y2H pour confirmer l'interaction Kre33/Tan1 et démontrer que les mutations effectuées n'altèrent pas la capacité de Tan1 à lier Kre33. Des expériences de microscopie confocale ont été réalisées pour déterminer la localisation de Kre33, de Tan1 ainsi que des mutants. Enfin, un essai de ligature de proximité a été utilisé pour démontrer le lieu de l'interaction Kre33/Tan1.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Souches bactériennes et souches de levures

Pour la transformation bactérienne, la souche de bactéries électrocompétentes utilisée est DH10B (*F*<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK*  $\lambda$ - *rpsL*(*StrR*) *nupG*/pMON14272/pMON7214) (Invitrogen) dérivée de la souche K-12 MG1655 d'*Escherichia coli* (Durfée *et al.*, 2008). Cette souche présente des modifications génétiques, telles que l'élimination de *mcrA*. Ceci améliore sa capacité à absorber l'ADN étranger, un élément essentiel de notre expérience.

La souche de levure AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 $\Delta$* , *gal80 $\Delta$* , *LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3*, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*, *URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ MEL1*) a été utilisée pour les expériences de Y2H. Les cassettes GAL de la souche de levure AH109 régulent l'expression des gènes en réponse au galactose ou au mélibiose, contrôlant des gènes spécifiques (*HIS3*, *ADE2* et *lacZ*).

La souche de levure YPH499 (*MATa* *ura3-52* *lys2-80* *ade2-101*, *trp1- $\Delta$ 63* *his3- $\Delta$ 200* *leu2- $\Delta$ 11*) (Sikorski et Hieter, 1989) est une souche Tan1 positive qui a été utilisée pour la construction de la souche KRE33-MYC $\Delta$ TAN1.

La souche de levure KRE33-MYC $\Delta$ TAN1 est utilisée pour les expériences de transformation de levures. Elle a été obtenue après avoir introduit un épitope 9xMYC fusionné avec le marqueur de sélection auxotrophe *TRP1* (MYC/TRP1) (Knop *et al.*, 1999). Cette souche a aussi été utilisée comme contrôle négatif pour les expériences d'immunoprécipitation. Cette souche était disponible au laboratoire.

Les souches YNR1, YNR2, YNR3, YNR4 ont été obtenues par transformation de la souche KRE33-MYCΔTAN1 avec les plasmides, pCM188, pCM-FLAG-TAN1, pCM-FLAG-TAN1ΔNoLS et pCM-FLAG-TAN1ΔNLS respectivement.

Nous avons utilisé une souche de levure dérivée de la souche YPH499, que nous avons désignée NOP1-mCherry. Cette souche modifiée présente l'intégration du gène de la protéine fluorescente mCherry en conjonction avec le locus *NOP1*.

Les souches YNR5, YNR6, YNR7, YNR8 ont été obtenues par transformation de la souche NOP1-mCherry avec les plasmides, pCM188, pCM-FLAG-TAN1, pCM-FLAG-TAN1ΔNoLS et pCM-FLAG-TAN1ΔNLS respectivement.

Les souches YNR9, YNR10, YNR11 correspondent à la souche AH109 transformée avec le plasmide pGADT7-KRE33 et avec pGBKT7-TAN1, pGBKT7-TAN1ΔNoLS et pGBKT7-TAN1ΔNLS (en ordre). Le plasmide pGBKT7 est utilisé pour introduire la protéine Tan1 fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN (BD) de Gal4, servant d'appât. Le plasmide pGADT7 est utilisé pour introduire la protéine Kre33 fusionnée avec le domaine d'activation (AD) de Gal4, fonctionnant comme proie. Le plasmide pGBKT7 porte le marqueur -Trp (tryptophane) et le plasmide pGADT7 contient le marqueur -Leu (leucine).

## 2.2 Milieux de culture

Les bactéries ont été maintenues dans du milieu LB (Luria-Bertani) (NaCl 85,5 mM, tryptone 1%, extrait de levure 0,5%), supplémenté d'ampicilline (100 µg/mL). La croissance des levures a été réalisée dans du milieu YPD (2 % de dextrose, 2 % de peptone, 1 % d'extrait de levure). Des milieux sélectifs SD (« yeast nitrogen base » à 0,67%, dextrose à 2%) avec ou sans tryptophane (-Trp), histidine (-His), leucine (-Leu) ou uracile (-Ura) ont été utilisés selon les besoins. Des milieux solides ont été obtenus en ajoutant de l'agar à une concentration finale de 2%, et les levures ont été cultivées.

### 2.3 Prédictions bio-informatiques et analyses statistiques

La prédiction du signal de localisation nucléaire pour réaliser les constructions est faite avec cNLS Mapper (Kosugi *et al.*, 2009) avec un score *cut-off* de 6.0. Les prédictions des signaux de localisation nucléaire ont été accomplies avec NLStradamus (Nguyen Ba *et al.*, 2009). La prédiction du signal de localisation nucléolaire a été réalisée avec NoD (Scott *et al.*, 2011). La prédiction des superhélices a été faite avec Parcoil (Berger *et al.*, 1995). En raison de la forte similarité dans la composition en acides aminés, notamment une prévalence élevée de résidus basiques, le logiciel NoD peut erronément classer un NLS comme un NoLS. (Scott *et al.*, 2011).

### 2.4 Plasmides et oligonucléotides

Le plasmide pGEX-4T-2-TAN1 $\Delta$ intron (Johansson et Byström, 2004) a été utilisé lors des expériences de mutagenèse par PCR. Le plasmide pCM188 (Gari *et al.*, 1997) a été utilisé afin de réaliser les constructions pCM-FLAG-TAN1, pCM-FLAG-TAN1 $\Delta$ NoLS et pCM-FLAG-TAN1 $\Delta$ NLS. Le plasmide pCM188 possède un marqueur *URA3*.  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS font référence à des délétions d'acides aminés réalisées par PCR selon des prédictions bio-informatiques sur les signaux de localisation nucléolaire et nucléaire. Les acides aminés délétés sont présentés à la Figure 3.3.

Les oligonucléotides utilisés dans notre étude ont été synthétisés par Integrated DNA Technologies (IDT). Les oligonucléotides pCM-FLAG-TAN1-KpnI-F et pCM-FLAG-TAN1-PstI-R ont été utilisés pour la mutagenèse par PCR afin de réaliser ensuite la construction pCM-FLAG-TAN1. Les oligonucléotides pCM-FLAG-TAN1-NoLS-KpnI-F et pCM-FLAG-TAN1-PstI-R ont été utilisés pour la mutagenèse par PCR afin de réaliser ensuite la construction pCM-FLAG-TAN1 $\Delta$ NoLS. Les oligonucléotides pCM-FLAG-TAN1-NLS-KpnI-F et pCM-FLAG-TAN1-PstI-R ont été utilisés pour la mutagenèse par PCR afin de réaliser ensuite la construction pCM-FLAG-TAN1 $\Delta$ NLS.

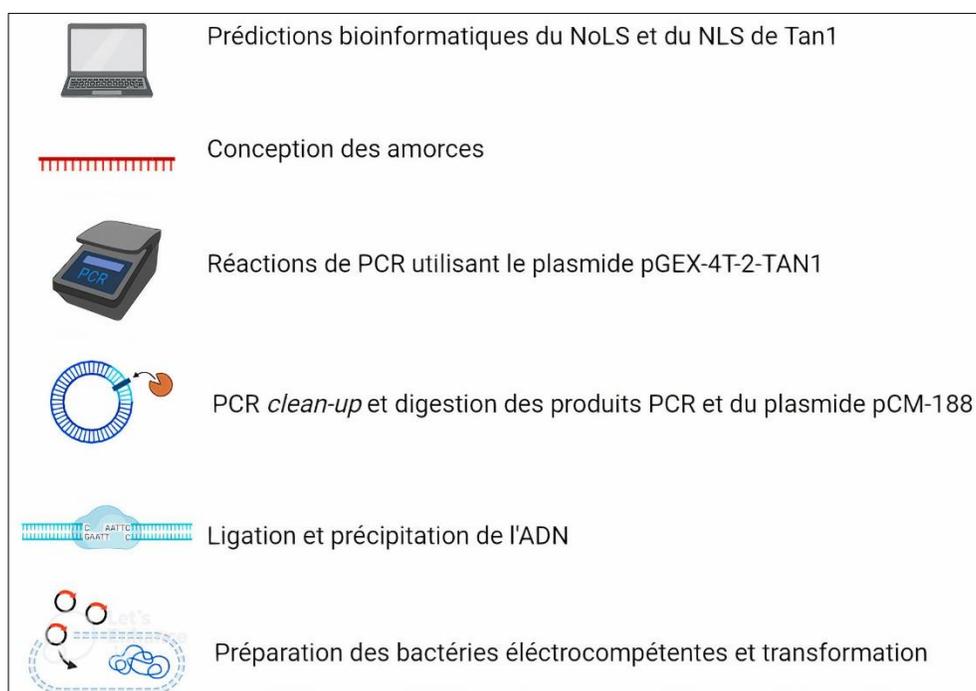
Les oligonucléotides pCM188for et pCM188rev qui s'hybrident de part et d'autre du MCS de pCM188 ont été utilisés lors des PCR sur colonies afin de vérifier que les colonies résultantes de la transformation bactérienne contiennent l'insert.

## 2.5 Clonage moléculaire et transformation des bactéries compétentes

Afin de réaliser les constructions pCM-FLAG-TAN1, pCM-FLAG-TAN1 $\Delta$ NoLS et pCM-FLAG-TAN1 $\Delta$ NLS, 3 réactions PCR ont été faites. Chaque réaction a été préparée dans 50  $\mu$ L de volume final avec 10 ng de plasmide pGEX-4T-2-TAN1, 0.5  $\mu$ M de chaque nucléotide et la polymérase Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase à une concentration 1X (Thermo Fisher Scientific). Pour toutes les PCR, un programme de PCR de 30 cycles a été utilisé avec une étape de dénaturation initiale d'une durée de 30 secondes à 98°C, une dénaturation de 10 secondes à 98°C, une hybridation de 30 secondes à (59°C pour la construction du type sauvage, 58,3°C pour le mutant  $\Delta$ NoLS et 49°C pour le mutant  $\Delta$ NLS), 20 secondes d'extension à 72°C et enfin une extension finale de 7 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été vérifiés sur un gel d'agarose 1% préparé dans un tampon TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8.0, acide acétique 20 mM, EDTA 1 mM), en utilisant un marqueur de poids moléculaire 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Le produit PCR a été nettoyé avec un PCR *clean-up* à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Les produits de PCR ainsi que le vecteur pCM-188 ont été digérés pendant 2 h à 37°C dans des réactions de 50  $\mu$ L. Les enzymes de restriction utilisées étaient KpnI ainsi que PstI. Le produit de digestion a été nettoyé et la ligation a été par la suite réalisée dans des réactions de 10  $\mu$ L. Cent nanogrammes de vecteur pCM-188 ont été utilisés ainsi que 32 ng de chacun des inserts, 1 U de ADN ligase T4 (New England Biolabs) a été ajouté avec 1  $\mu$ L de tampon de réaction ADN ligase T4 10X. Les produits de ligation ont été par la suite vérifiés par électrophorèse avec un gel d'agarose 1%. Le produit de ligation a ensuite été précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, 40  $\mu$ g de glycogène et 2 volumes d'éthanol 100% froid. Le culot a été dissous dans 10  $\mu$ L d'eau. La précipitation à l'éthanol a été exécutée afin d'augmenter l'efficacité de transformation pour que les composants du mélange de ligation n'interfèrent pas avec la transformation.

Pour préparer les bactéries électrocompétentes, la souche *Escherichia coli* DH10B a été incubée la nuit en préculture à 37°C. Cette préculture a été diluée puis incubée jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm ( $A_{600}$ ) de 0.6. Les cultures ont été centrifugées à 4000  $\times$ g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 500 mL de glycérol 10% puis centrifugé à 4000  $\times$ g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot a ensuite été resuspendu dans 250 mL de glycérol 10%

puis centrifugé une nouvelle fois à 4000 ×g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot a encore été resuspendu dans 20 mL de glycérol 10%, transféré dans un tube Oakridge stérile puis centrifugé encore une fois à 4000 ×g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 2 mL de glycérol 10%. Pour les transformations, 10 ng de chacun des trois ADN plasmidiques construits ont été mélangés avec 50 µL de bactéries DH10B. Le mélange a été transféré dans des cuvettes Gene Pulser Electroporation (BioRad) de 2 mm, et le tout a été soumis à un courant de 2500 V puis incubé pendant 1 heure à 37°C dans 1 mL de milieu LB. Ensuite, 100 µL ont été étalés sur une gélose LB avec ampicilline puis incubés la nuit à 37°C.



**Figure 2.1** Liste des étapes de clonage moléculaire et de transformation des bactéries compétentes.

Après les prédictions bioinformatiques et la conception des amorces, les réactions de PCR sont effectuées. Par la suite, la digestion et ligation sont réalisées. Après la préparation des bactéries électrocompétentes, la transformation des bactéries est faite par électroporation.

## 2.6 PCR sur colonies et séquençage

Après croissance, des réactions de PCR sur colonies ont été réalisées pour vérification. Dix colonies ont été sélectionnées pour chacune des trois expériences, et ces colonies ont été utilisées comme source d'ADN pour la réaction de PCR. Chaque réaction de 12.5 µL contenait :

un mélange de dNTP à une concentration finale de 200  $\mu$ M, 0.625 U de ZmTech Taq polymérase (ZmTech Scientifique) et 0.2  $\mu$ M des amorces pCM188for et pCM188rev. Un cycle de 5 minutes à 95°C a été utilisé en premier lieu, puis 35 cycles de dénaturation, appariement et extension ont été exécutés. La dénaturation a été programmée pour une durée de 30 secondes à une température de 95°C. La durée de l'appariement a été fixée à 30 secondes à une température de 51°C. L'extension a duré 1 minute à une température de 72°C. Le produit PCR a été vérifié sur un gel d'agarose 1%. Les colonies ayant un plasmide contenant l'insert ont été inoculées dans 3 mL de LB contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline puis incubées pour la nuit à 37°C, et des minipréparations d'ADN plasmidique bactérien ont été réalisées avec le QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du manufacturier. Une digestion avec l'enzyme de restriction EcoRV qui coupe au niveau de l'insert et du plasmide a été réalisée afin de confirmer l'obtention de l'insert adéquat. Des réactions de 50  $\mu$ L ont été utilisées et une incubation de 2 heures a été faite. La digestion a été vérifiée avec un gel d'agarose 1%. Les constructions obtenues ont été vérifiées par séquençage au centre d'expertise et de services Génome Québec, en utilisant les oligonucléotides pCM188for et pCM188rev.

## 2.7 Préparation de levures compétentes et transformation

La préparation et la transformation des levures compétentes ont été exécutées avec la méthode au LiOAc (Gietz *et al.*, 1992). Cinquante millilitres d'une culture de levure en phase exponentielle ont été centrifugés à une vitesse de 1000  $\times$ g pendant une durée de 5 minutes. Le culot a été resuspendu dans 1.5 mL de TE-LiAc (100 mM acétate de lithium pH 7.5, 10 mM Tris HCl pH 7.5 et 1 mM EDTA) fraîchement préparé. Puis 100 ng d'ADN plasmidique ont été mélangés avec 0.1 mg d'ADN « carrier » (il s'agit d'ADN de sperme de poisson concassé) et 100  $\mu$ L de cellules compétentes. Après l'ajout de 600  $\mu$ L d'une solution stérile de PEG-LiOAc (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, PEG 40%, LiOAc 100 mM), le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 30°C avec agitation. Juste avant de procéder à la transformation, le DMSO a été ajouté à une concentration finale de 10%. Le mélange a ensuite été soumis à un choc thermique à 42°C pendant 15 min puis mis sur glace pendant 10 minutes. Le tout a été centrifugé pendant 30 secondes à vitesse maximum puis le culot a été dissout dans 500  $\mu$ L de TE 1X. Finalement, 100  $\mu$ L du mélange ont été étalés sur un milieu sélectif auxotrophe SD-URA contenant du dextrose. Les boîtes de pétri ont été incubées à 30 °C jusqu'à l'apparition de

colonies. La liste des étapes de clonage moléculaire et de transformation bactérienne est illustrée sur la Figure 2.1.

## 2.8 Extraction des protéines de levures et analyse par « Western blotting »

Les protéines des levures ont été extraites par la méthode de Kushnirov (2000), à partir de cultures sur milieu solide. Une anse d'inoculation est utilisée pour extraire un fragment d'une colonie de la taille d'une tête d'allumette. Le fragment est resuspendu dans 200 µL d'eau Milli-Q avec une brève étape de vortexage. Dans ce mélange cellulaire remis en suspension, 200 µL de NaOH 0.2N sont introduits. Le mélange a été incubé 5 minutes à température pièce. Une centrifugation a été réalisée pendant une minute, et le surnageant a été éliminé et le culot a été dissout dans 50 µL de tampon SDS 2X (2% de SDS, 0.06 M de Tris-HCl, pH 6.8, 5% de glycérol, 4% de β-mercaptoéthanol et 0.0025% de bleu de bromophénol). Une ébullition durant 5 minutes à 95°C et une centrifugation d'une minute à 14000 rpm sont effectuées. Puis, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. Les extraits protéiques ont été analysés sur gel d'acrylamide 12% comme suit : le montage d'électrophorèse a été préparé ainsi que le gel de migration à 12% (Tris-HCl 380 mM, pH 8.8, acrylamide/bisacrylamide (37.5:1) 12%, SDS 0.1%, persulfate d'ammonium 0.1% et TEMED 0.05%). La migration a été réalisée à 50 V pendant 5 minutes, puis à 150 V jusqu'à ce que le colorant bleu de bromophénol ait migré hors du gel. La migration a été exécutée en utilisant un tampon Tris-glycine (SDS 0.1 %, Tris-base 25 mM, glycine 200 mM, pH 8.3), et en utilisant le standard Precision Plus Protein™ All Blue de Bio-Rad comme marqueur de poids moléculaire. Puis, le transfert a été réalisé sur membrane de PVDF (Immobilon-P, Millipore) préalablement traitée au méthanol. Le transfert a été entrepris dans un appareil de transfert électrophorétique *semi-dry* (Bio-Rad) contenant du tampon Towbin (Tris-base 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%, pH 8.3), à 100 V pendant 30 minutes. Le blocage a été effectué en incubant la membrane dans du TBS-Tween (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 154 mM, Tween-20 0,2%) avec 5 % de lait écrémé à 4°C pendant la nuit. La détection est conduite en incubant la membrane avec l'anticorps monoclonal anti-FLAG® M2-Peroxydase (HRP) antibody (Sigma Aldrich) dilué à 1:1000 pendant 1 heure. La membrane a été lavée 3 fois avec le TBS-Tween et incubée pendant 5 min dans une solution de luminol/péroxyde suivi de la révélation à l'aide du système d'imagerie par chimiluminescence Fusion FX (Vilber).

## 2.9 Extraction de protéines et co-immunoprécipitation

Cent millilitres d'une culture  $A_{600}=0.5$  ont été centrifugés à  $1000 \times g$  pendant 5 minutes, puis lavés avec de l'eau MilliQ et resuspendus dans 1 mL de solution TMN100 (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 100 mM,  $MgCl_2$  10 mM, DTT 1 mM, NP-40 0.1 % et une tablette d'inhibiteur de protéase cOmplete (Roche) par 50 mL). Par la suite, l'équivalent de trois cents microlitres de billes de verre (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés au mélange et la lyse cellulaire a été conduite en alternant 45 secondes de vortex et 1 minute dans la glace 7 fois. Les débris cellulaires ont été éliminés après une centrifugation de 5 minutes à vitesse maximale. Le surnageant a été récupéré et maintenu dans la glace jusqu'à son utilisation pour les expériences d'immunoprécipitation. Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford.

Des billes anti-FLAG ainsi que des billes anti-Myc ont été utilisées pour les immunoprécipitations. Les billes anti-FLAG utilisées étaient les anti-FLAG ® M2 Beads (Sigma Aldrich). Les billes anti-Myc ont été préparées en retirant pour chaque IP 50  $\mu L$  (équivalent à 25  $\mu L$  de billes) de protéine A-agarose (Roche) et en centrifugeant à  $500 \times g$  à  $4^\circ C$ . Les billes ont été lavées 3 fois avec du TMN100, et 400  $\mu L$  d'anticorps anti-Myc 9E10 (ATCC) ont été ajoutés pour chaque IP. Le tout a été incubé la nuit à  $4^\circ C$  et les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec du TMN100. Puis, toutes les étapes ont été réalisées à  $4^\circ C$ . Cinquante microlitres de billes ont été retirées pour chaque réaction, et les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec du TMN100 (avec inhibiteur de protéase). Les échantillons ont ensuite été normalisés à la même concentration et incubés avec les billes pendant 2 heures à  $4^\circ C$ . Après une centrifugation de 35 secondes à  $5000 \times g$ , les billes ont été lavées 6 fois avec du TMN100 puis l'élution a été faite en ajoutant 25  $\mu L$  de tampon SDS 2X. Les échantillons totaux ainsi que les IP ont été bouillis pendant 3 minutes à  $95^\circ C$ , et une centrifugation de 30 secondes à  $8000 \times g$  a été exécutée en récupérant le surnageant. Les protéines immunoprécipitées ont été détectées par immunobuvardage. Pour l'expérience visant à identifier Kre33, un blot pour Kre33 a été réalisé avec un gel d'acrylamide 8%. Pour l'incubation avec l'anticorps anti-Myc, une première incubation de 1 heure a été conduite avec une dilution 1:200; L'anticorps secondaire quant à lui est le mouse IgG HRP Linked Whole Antibody (Sigma Aldrich) dilué à 1:20000. Pour l'expérience visant à identifier Tan1 ainsi que les mutants, un blot a été réalisé avec un gel

d'acrylamide 12%. L'incubation a été effectuée avec l'anticorps monoclonal anti-FLAG® M2-Peroxidase HRP antibody dilué à 1:1000. La révélation a été faite à l'aide du système d'imagerie par chimiluminescence Fusion FX.

## 2.10 Microscopie à immunofluorescence

Les levures ont été préparées selon le protocole de Gêrus *et al.* (2010). Une culture en phase exponentielle de croissance contenant autour de  $2 \times 10^8$  cellules a été réalisée. Pour la fixation des cellules, une solution de paraformaldéhyde à une concentration finale de 4% a été utilisée. Puis, les cellules ont été maintenues à 30°C avec agitation à 250 rpm pendant 30 min. Après une centrifugation à 1000 rpm pendant 3 minutes, le culot de cellules a été lavé avec un tampon B ( $K_2HPO_4$  8.6 mM,  $KH_2PO_4$  1.3 mM et sorbitol 1.2 M). Puis le tout a été resuspendu dans 500  $\mu$ L de solution de digestion composée de tampon B dilué 11 fois avec l'eau stérile et avec du vanadium ribonucléoside 181.8  $\mu$ M,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2.6 mM, et 50 unités/mL de lyticase (Sigma) avec des inhibiteurs de protéases (Roche). Après 45 min d'incubation à 30°C avec agitation, l'efficacité de digestion des parois a été vérifiée avec un microscope à contraste de phase. Une cellule qui reflète la lumière n'est pas perméabilisée et une cellule qui arbore une couleur noire démontre que celle-ci est perméabilisée. Après la perméabilisation de 80% des cellules, une centrifugation a été exécutée et le culot a été resuspendu dans 500  $\mu$ L de tampon B. Une goutte de chaque culture a été déposée sur des lamelles enduites de poly-L-lysine (Sigma) afin de faire adhérer les levures. Après 1 heure, l'excès de cellules a été aspiré et les lamelles ont été incubées avec la solution de blocage contenant 0.1% de BSA dilué dans un tampon PBS afin de bloquer les sites non spécifiques de fixation de l'anticorps. Une comparaison a été réalisée entre la localisation du signal de Tan1 et de Nop1. Cette dernière est une protéine nucléolaire étiquetée avec la protéine mCherry, qui devient fluorescente suite à une irradiation avec de la lumière violette à 550 nm (Subach *et al.*, 2009). Pour pouvoir observer FLAG-Tan1 ainsi que les mutants FLAG-Tan1 $\Delta$ NLS et FLAG-Tan1 $\Delta$ NoLS, l'anticorps utilisé est l'anti-FLAG M2 de souris (Sigma Aldrich) dilué à 1:500 dans la solution de blocage pour 2 heures à température ambiante. L'incubation avec l'anticorps secondaire a été effectuée avec l'anti-IgG de souris couplé au fluorochrome vert Alexa Fluor 488 (Invitrogen) dilué à 1:1000 dans la solution de blocage pendant 45 minutes à température pièce. Les lamelles ont été

séchées puis déposées sur des gouttes de glycérol 70% placées sur la lame. Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope confocal à un grossissement de 60x.

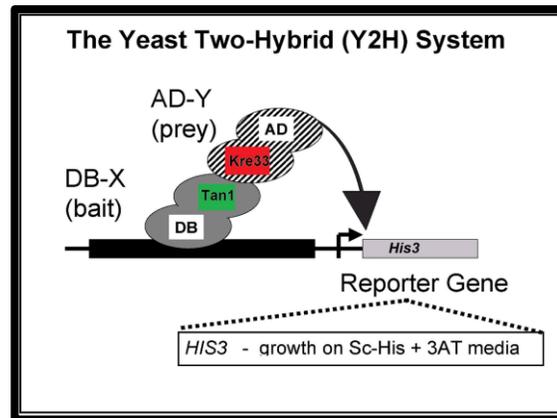
### 2.11 Système double hybride

Le Y2H est une technique utilisée pour étudier les interactions protéine-protéine. Dans cette méthode, une protéine d'intérêt, dans ce cas Tan1, est fusionnée à un domaine de transcription (protéine "appât" ou bait), tandis qu'une autre protéine, Kre33, est fusionnée à un autre domaine de transcription (protéine "proie" ou prey). Ces protéines fusionnées sont exprimées dans des levures, AH109 dans ce cas. Si Tan1 et Kre33 interagissent, les domaines de transcription se rapprochent, activant ainsi la transcription de gènes rapporteurs. Les oligonucléotides pCM-FLAG-TAN1-KpnI-F et pCM-FLAG-TAN1-PstI-R ont été utilisés pour amplifier la séquence qui code pour la protéine Tan1. L'amplification a été réalisée par PCR comme mentionné précédemment. La séquence a ensuite été digérée avec les enzymes NcoI et PstI puis clonée dans le vecteur pGBKT7 (Clontech). La vérification a été effectuée par PCR de colonies. Le vecteur recombinant obtenu a été nommé pGBKT7-TAN1. La même méthode a été employée pour générer les autres vecteurs recombinants en utilisant les oligonucléotides et les sites de restrictions correspondants (Brückner *et al.*, 2009). (Voir Tableau 1.1).

**Tableau 1.1 Liste des oligonucléotides utilisés.**

Nom de l'oligonucléotide	Séquence de l'oligonucléotide
pCM-FLAG-TAN1-KpnI-F	5'- CGGGGTACCATGGGTGACTACAAAGACGA TGACGATAAAGGTGGAGGTGAAAAACGTA ACCGTAATGGTAAG-3'
pCM-FLAG-TAN1-PstI-R	5'- AAAACACTGCAGTTATTGTTTTACTCTTATC TTCATCCTT-3'
pCM-FLAG-TAN1-NoLS-KpnI-F	5'- CGGGGTACCATGGGTGACTACAAAGACGAT GACGATAA AGGTGGAGGTGATGCAAATTCCCAAACAG GAAGA-3'

pCM-FLAG-TAN1-NLS-KpnI-F	5'-GGGGTACCATGGGTGAC TACAAAGAC GATGACGATAAAGGTGGAGGTTTAGACCCT GGTACGTCTGGA-3'
pCM188for	5'- CCTTATACATTAGGTCCTTTGTAGCA-3'
pCM188rev	5'-CCTTCCTTTTCGGTTAGAGCGG-3'



**Figure 2.2** Représentation schématique du Y2H utilisé pour l'étude des interactions protéine-protéine entre Kre33 et Tan1 ainsi que ses mutants. La protéine *bait* ou appât utilisée est Tan1 tandis que la protéine *prey* ou proie est Kre33 (Girard *et al.*, 2007).

Les vecteurs recombinants pGBKT7-TAN1 ont été co-transformés avec le plasmide pGADT7-KRE33 (disponible au laboratoire) dans la souche de levure AH109. Des combinaisons entre chacun de ces vecteurs recombinants et les vecteurs pGBKT7/pGADT7 vides ont été utilisées comme contrôles négatifs. Les levures ont ensuite été étalées sur géloses SD-Trp-Leu puis sur des géloses SD-Trp-Leu-His sans 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT), puis sur des géloses supplémentées avec des concentrations de 2 mM, 5 mM et 10 mM de 3-AT. Une représentation schématique du Y2H utilisé est illustré sur la Figure 2.2.

## 2.12 Expérience de PLA « Proximity ligation assay »

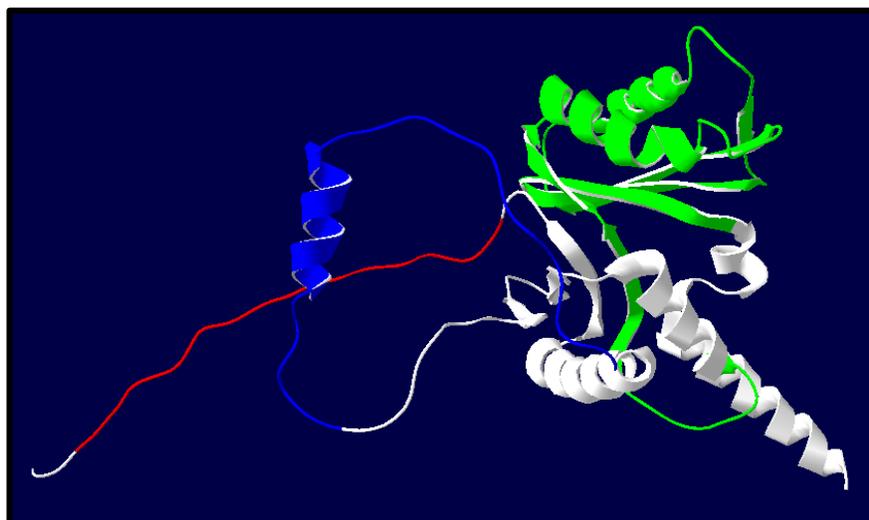
Pour l'expérience de ligature de proximité ou PLA, le Duolink PLA far-red kit (Sigma) a été utilisé. Après préparation des cellules suivant le protocole de microscopie à immunofluorescence jusqu'à l'étape de blocage, les cellules ont été incubées avec 40 µL de solution d'anticorps anti-FLAG de lapin (Sigma Aldrich) ainsi qu'avec un anticorps anti-Myc

de souris (ATCC) pendant 1 heure à 37°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec la solution A (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) et les cellules ont été incubées avec 40 µL de sondes PLA anti-lapin PLUS et anti-souris MOINS pendant 1 heure à 37°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec la solution A, et 40 µL de la solution de ligation (8 µL de tampon de ligation 5X, 32 µL d'eau) ont été ajoutés pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec la solution A pendant 2 minutes et 40 µL de solution d'amplification ont été ajoutés en mélangeant 8 µL de tampon d'amplification 5x (inclus dans le kit) avec 31,5 µL d'eau et 0,5 µL de la polymérase fournie. Ensuite, une incubation de 100 minutes à 37°C a été effectuée suivie de deux lavages de 5 minutes avec la solution de lavage B (Tris 200 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). L'assemblage a été réalisé comme décrit précédemment et les cellules ont été observées au microscope confocal avec un laser à 640 nm (Alberts *et al.*, 2019).

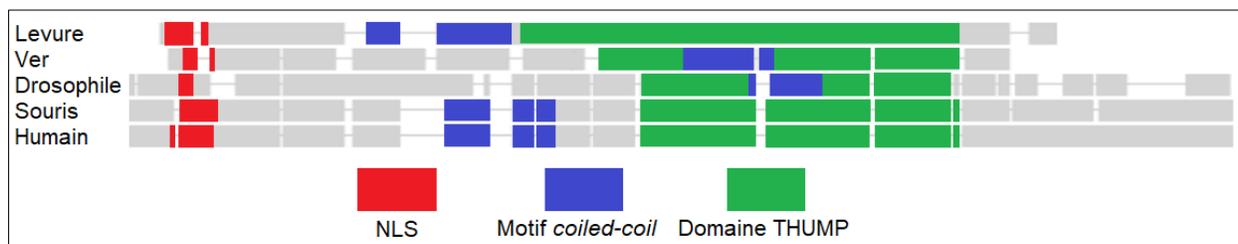
## CHAPITRE III RÉSULTATS

### 3.1 La protéine Tan1 contient un NLS, une superhélice et un domaine THUMP.

Afin d'avoir une compréhension approfondie de la protéine Tan1, nous avons effectué une analyse structurale, qui impliquait la génération d'un modèle tridimensionnel (3D) à l'aide de l'algorithme AlfaFold (Figure 3.1) et un alignement des séquences de Tan1 et de ses homologues chez diverses espèces (Figure 3.2).



**Figure 3.1 Modélisation de Tan1.** Illustration des différents domaines protéiques de Tan1. En rouge (acide aminé 4 à 27), le signal de localisation nucléaire prédit par NLStradamus. En bleu (acide aminé 64 à 100), le domaine d'interaction avec Kre33 supposé qui est une superhélice dont la prédiction a été faite avec Parcoil. En vert (acide aminé 146 à 259), le domaine THUMP de liaison aux ARNt.

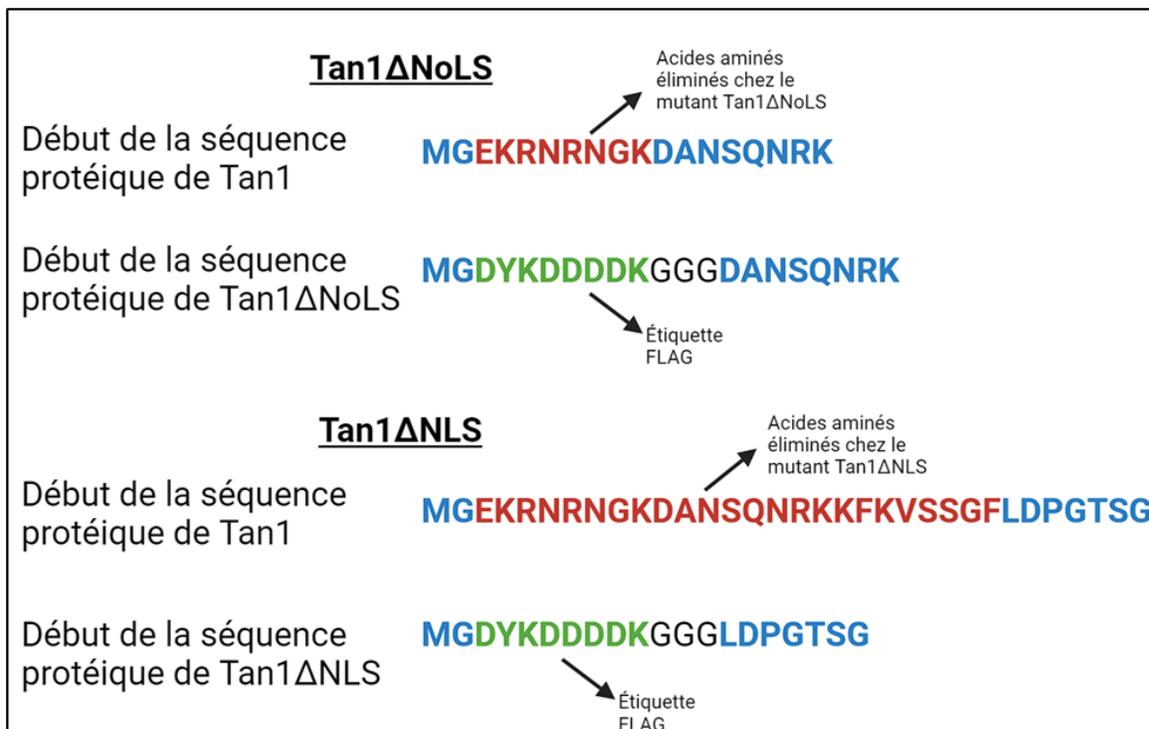


**Figure 3.2 Alignement des séquences protéiques de Tan1 et de ses homologues chez diverses espèces.** En rouge les NLS prédits avec NLStradamus. En bleu, les superhélices (*coiled coil*) prédites

par Parcoil. En vert, les domaines THUMP de liaison avec les ARNt (Berger et al., 1995; Nguyen Ba et al., 2009).

### 3.2 Les mutations $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS n'empêchent pas l'interaction Kre33/Tan1.

Afin d'étudier l'interaction entre les protéines Kre33 et Tan1, des délétions de signaux de localisation nucléaire NLS et nucléolaire NoLS de la protéine Tan1 ont été effectuées. Les délétions ont été réalisées via mutagenèse par PCR à partir des prédictions bio-informatiques réalisées avec cNLS Mapper et NoD. Les acides aminés éliminés sont illustrés sur la Figure 3.3.



**Figure 3.3 Illustration des acides aminés éliminés chez les mutants Tan1 $\Delta$ NoLS et Tan1 $\Delta$ NLS.** Les délétions de signaux nucléaires et nucléolaires ont été faites selon les prédictions bio-informatiques réalisées avec cNLS Mapper et NoD. Les acides aminés de Tan1 sont illustrés en bleu. Les acides aminés éliminés chez les mutants sont illustrés en rouge. L'étiquette FLAG est illustrée en vert.

Des expériences de Y2H ont été effectués pour étudier l'effet des mutations  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS sur l'interaction entre Kre33 et Tan1. La souche de levure AH109 a été transformée avec pGADT7-KRE33 et pGBKT7-TAN1, pGADT7-KRE33 et pGBKT7-TAN1 $\Delta$ NoLS, ainsi que

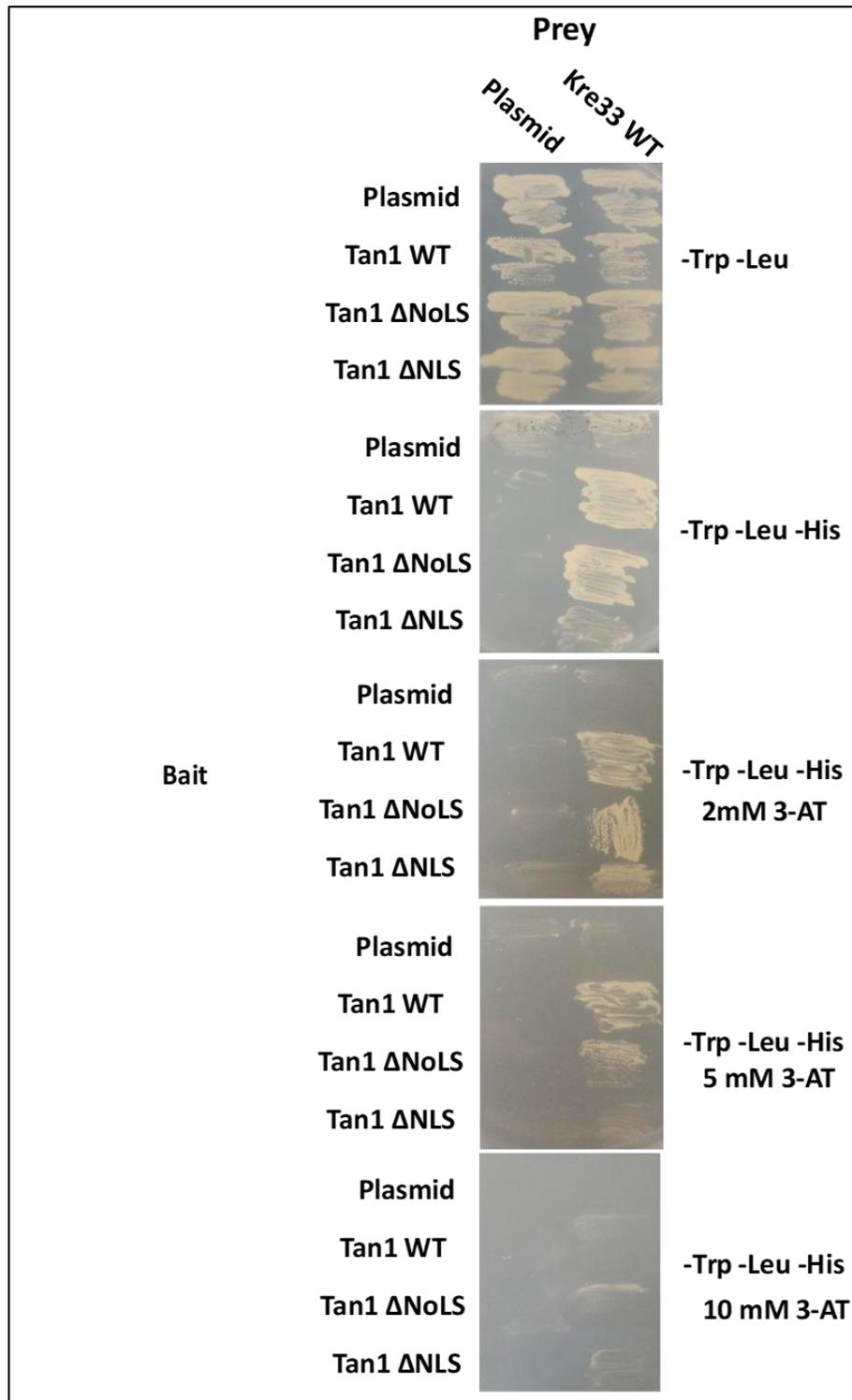
pGADT7-KRE33 et pGBKT7-TAN1 $\Delta$ NLS. Les colonies ont ensuite été étalées sur des géloses SD-Trp-Leu, suivi de géloses SD-Trp-Leu-His sans 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT), et enfin sur des géloses contenant des concentrations de 2 mM, 5 mM et 10 mM de 3-AT.

L'utilisation du milieu SD-Trp-Leu dans notre conception expérimentale est cruciale. Ce milieu manque de tryptophane (Trp) et de leucine (Leu), qui sont des acides aminés essentiels. Dans notre expérience, les cellules de levure ne peuvent croître que si elles possèdent deux plasmides, l'un avec un marqueur Trp et l'autre avec un marqueur Leu. Par conséquent, le milieu SD-Trp-Leu garantit que les cellules de levure sélectionnent la présence des plasmides pGADT7-KRE33 et pGBKT7-TAN1 (ainsi que les mutants de Tan1). Il sert de condition sélective initiale pour assurer la rétention des plasmides dans les cellules de levure.

L'inclusion du milieu SD-Trp-Leu-His dans notre conception expérimentale est aussi significative. Plus précisément, Le manque d'histidine est essentiel car il permet l'activation d'un gène rapporteur uniquement en présence d'une interaction protéine-protéine. Il s'agit d'une caractéristique clé du système de facteurs de transcription GAL4. Par conséquent, l'utilisation du milieu sans histidine a servi de condition sélective permettant la détection et l'évaluation des interactions entre Kre33 et Tan1, y compris celles avec les mutations  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS (Brückner *et al.*, 2009).

De plus, l'inclusion de 3-AT à différentes concentrations (2 mM, 5 mM et 10 mM) vise à créer une gamme d'inhibition compétitive. Dans les expériences de double hybride, le 3-AT est utilisé comme agent sélectif pour évaluer la force des interactions protéine-protéine. Il est ajouté au milieu de croissance pour inhiber la biosynthèse de l'histidine dans les cellules de levure. L'histidine est un acide aminé essentiel à la croissance des levures. Lorsque le 3-AT est présent, les cellules de levure ne peuvent se développer que s'il existe une forte interaction protéine-protéine, car cette interaction peut surmonter l'effet inhibiteur de la 3-AT et activer le gène rapporteur (Brückner *et al.*, 2009).

La Figure 3.4 montre les résultats des tests double-hybride. On a observé que les interactions entre Kre33 avec Tan1, Tan1 $\Delta$ NoLS et Tan1 $\Delta$ NLS persistaient malgré l'ajout de concentrations accrues de l'inhibiteur compétitif 3-AT. Ces résultats suggèrent que les mutations  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS ne perturbent pas l'interaction directe entre les protéines Kre33 et Tan1.

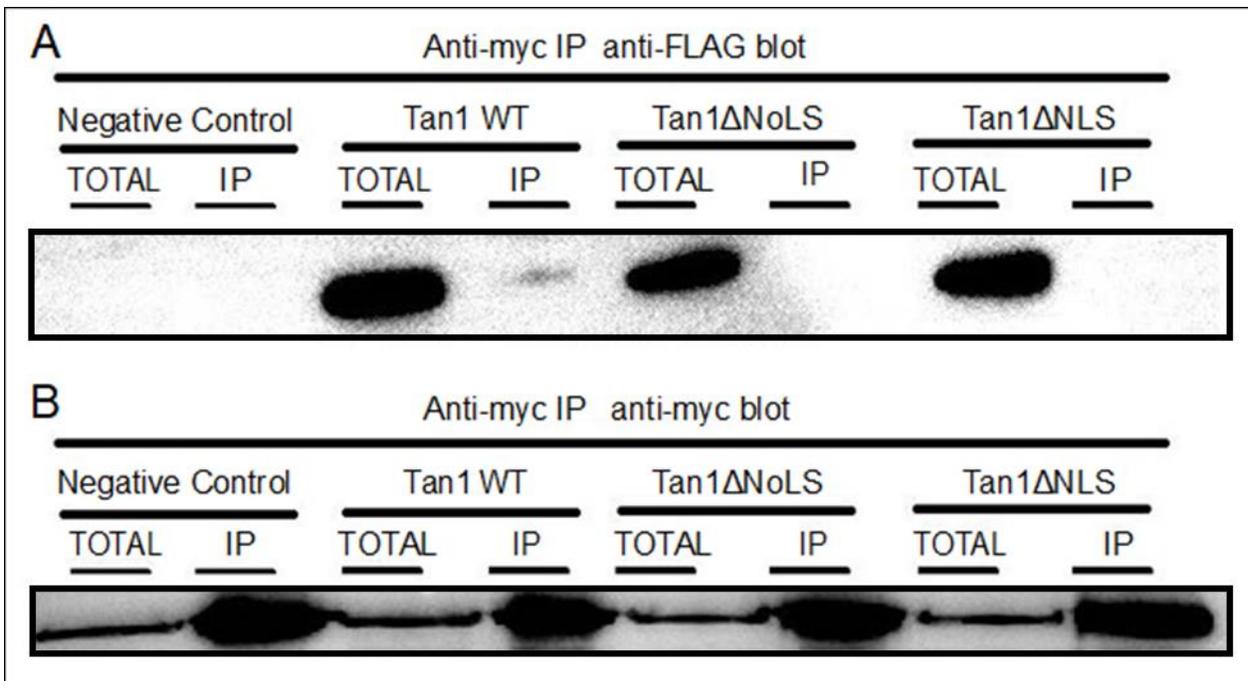


**Figure 3.4** Les mutants  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS peuvent interagir avec Kre33. La protéine appât utilisée est Tan1 (ainsi que ses mutants). Le protéine proie utilisée est Kre33. Des concentrations de 3-AT de 2 mM, 5 mM et 10 mM ont été utilisées.

### 3.3 Kre33 co-précipite avec la protéine Tan1 mais pas avec les mutants $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS

Le SSU processome est un complexe ribonucléoprotéique nécessaire au traitement des précurseurs d'ARN ribosomiques et à l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique dans le nucléole (Phipps *et al.*, 2011). L'acétyltransférase Kre33 fait partie de ce complexe. En plus de son rôle essentiel dans le traitement du pré-ARNr, Kre33 acétyle des cytidines spécifiques dans les ARNt Ser et Leu. Cependant, la formation de N4-acétylcytidine (ac4C) dans les ARNt nécessite la protéine adaptatrice Tan1. On ne sait pas dans quel compartiment Tan1 et Kre33 interagissent pour acétyler les ARNt.

Pour éclaircir cette question, des expériences d'immunoprécipitation (IP) ont été faites. Les immunoprécipitations ont été réalisées à l'aide d'un anticorps anti-Myc afin d'isoler la protéine Kre33 marquée avec une étiquette Myc (Kre33-Myc). Le but de l'IP était d'étudier l'interaction protéique *in vivo* entre Kre33-Myc et FLAG-Tan1, ainsi que ses mutants. Pour confirmer l'isolement réussi des protéines et pour détecter les interactions protéine-protéine, une analyse *western blot* a été effectuée sur les échantillons immunoprécipités. Deux anticorps primaires spécifiques contre les étiquettes Myc et FLAG ont permis la détection des protéines cibles, suivis d'anticorps secondaires conjugués à l'enzyme de détection peroxydase de raifort (HRP). Les bandes résultantes ont ensuite été visualisées par chimiluminescence. Le témoin négatif utilisé était la souche de levure YNR1 qui exprime Kre33-Myc, mais qui n'exprime pas Tan1. Tan1 WT fait référence à la souche YNR2 qui exprime FLAG-Tan1 de façon constitutive. Tan1 $\Delta$ NoLS et Tan1 $\Delta$ NLS désignent les souches YNR3 et YNR4 (portant l'épitope FLAG dans chacun des cas). L'immunobuvardage a révélé une bande correspondant à la protéine Tan1 qui a co-précipité avec Kre33 (Figure 3.5A, piste IP de Tan1). L'absence de bande chez le contrôle négatif (Figure 3.5A, piste IP de *Negative control*) exclut la possibilité d'une interaction non spécifique. Aucune bande n'a été détectée au niveau des pistes IP de Tan1 $\Delta$ NoLS et Tan1 $\Delta$ NLS. Ainsi, cette expérience d'immunoprécipitation démontre que le transit de Tan1 à travers le nucléole et/ou le noyau est nécessaire pour une interaction avec Kre33.



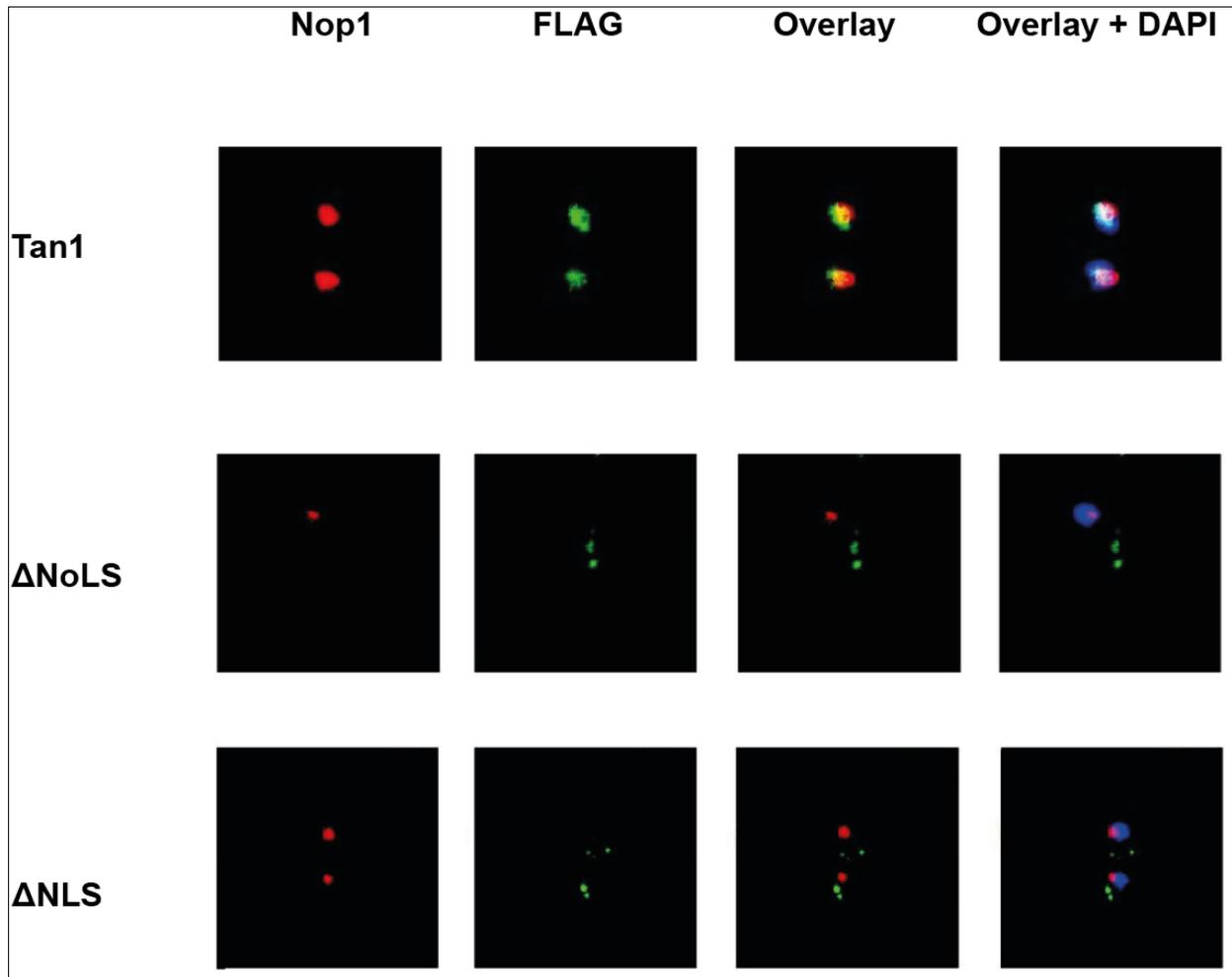
**Figure 3.5** Co-immunopécipitations illustrant les immunobuvardages anti-FLAG et anti-Myc. Les extraits cellulaires des souches YNR1 à YNR4 ont été incubés avec des billes de protéine A-agarose couplées à des anticorps anti-Myc. Les protéines ont été détectées par western blot avec des anticorps anti-FLAG (A) ou anti-Myc (B). TOTAL : surnageant de départ (5% de l'extrait cellulaire), IP : protéines immunoprécipitées.

### 3.4 Tan1 est nucléolaire et les mutations $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS empêchent Tan1 de se localiser au noyau

Pour confirmer nos précédents résultats et dans le but d'observer la localisation de Tan1 et ses mutants, nous avons procédé à des expériences de microscopie. Nous avons réalisé des immunofluorescences (IF) de cellules de levure où Nop1 a été étiquetée avec la protéine fluorescente mCherry. Les souches utilisées sont YNR5, YNR6, YNR7 et YNR8. Nous avons utilisé le fluorophore Alexa Fluor 488 pour la détection de FLAG-Tan1, et la coloration au DAPI a été utilisée pour colorer le noyau des levures. La Figure 3.6 illustre les résultats des expériences d'IF effectuées.

Les résultats ont montré une colocalisation entre Tan1 et la protéine nucléolaire Nop1. Cela indique que Tan1 est également localisée dans le nucléole. Cependant les protéines mutées

FLAG-Tan1 $\Delta$ NoLS et FLAG-Tan1 $\Delta$ NLS n'étaient pas localisées au nucléole, ni au noyau, ce qui suggère que les mutations  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS empêchent la protéine Tan1 de se localiser au noyau.

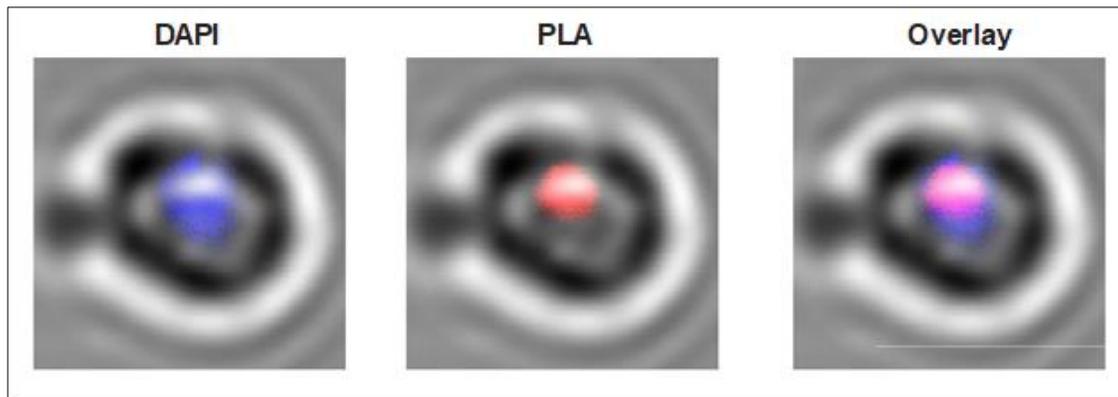


**Figure 3.6 Localisation de Tan1 et des mutants  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS par microscopie à immunofluorescence.** La souche de levure NOP1-mCherry a été transformée avec les vecteurs pCM-FLAG-Tan1, pCM-FLAG-Tan1 $\Delta$ NoLS et pCM-FLAG-Tan1 $\Delta$ NLS. Nop1 (rouge) est un marqueur du nucléole. La protéine Tan1 (vert) est visualisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-FLAG et d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 488. Le noyau (bleu) est identifiable grâce à la coloration au DAPI.

### 3.5 Kre33 et Tan1 interagissent dans le nucléole

Le PLA, une méthode hautement sensible et spécifique pour détecter les interactions protéine-protéine à des niveaux endogènes. Cette technique repose sur l'utilisation de paires d'anticorps primaires provenant de différentes espèces pour cibler les protéines d'intérêt, ainsi que de paires d'anticorps secondaires appelées sondes PLA. Ces sondes contiennent une séquence d'ADN unique qui, en cas d'interaction des protéines ciblées, permet la formation d'ADN circulaire. La détection du signal PLA s'opère ensuite grâce à des sondes d'oligonucléotides complémentaires marquées par des fluorochromes. Lorsque ces sondes se lient à l'ADN circulaire, elles émettent une fluorescence visible sous microscope, facilitant ainsi la quantification des interactions protéine-protéine dans les cellules (Alam, 2018).

Pour confirmer nos précédents résultats et déterminer la localisation de l'interaction Kre33/Tan1, nous avons effectué un PLA. Après une étape d'hybridation et une amplification PCR avec des sondes fluorescentes anti-lapin PLUS et anti-souris MINUS, nous avons pu visualiser des taches rouges par microscopie IF (Figure 3.7). Ce résultat suggère que Kre33 et Tan1 interagissent ensemble au niveau du nucléole.



**Figure 3.7 Visualisation de l'interaction nucléolaire Kre33/Tan1 par PLA.** La souche de levure utilisée pour cette expérience est la souche KRE33-MYC/TAN1 transformée avec le plasmide pCM-FLAG-Tan1. Les anticorps utilisés pour Kre33 étaient l'anticorps primaire de souris anti-Myc et la sonde PLA MINUS anti-souris comme anticorps secondaire. Les anticorps utilisés pour Tan1 étaient l'anticorps primaire de lapin anti-FLAG et la sonde PLA PLUS anti-lapin. Le signal rouge résulte d'une

interaction à une distance inférieure à 40 nm entre Kre33 et Tan1. Une coloration au DAPI pendant 5 minutes a été effectuée.

Cependant, il est important de préciser que nous n'avons pas effectué le test PLA sur les mutants  $\Delta$ NLS et  $\Delta$ NoLS. Cette décision a été influencée par l'incertitude inhérente associée à une potentielle absence de signal chez les mutants. Dans les cas où aucun signal n'est observé, cela ne confirme pas de manière concluante l'absence d'interaction. Plusieurs variables, telles que la sensibilité du test, les conditions expérimentales ou des problèmes techniques, peuvent affecter le résultat. Compte tenu de cette incertitude, nous avons donné la priorité à la confirmation des interactions dans leur forme native. De futures recherches pourraient envisager d'explorer l'interaction des mutants.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

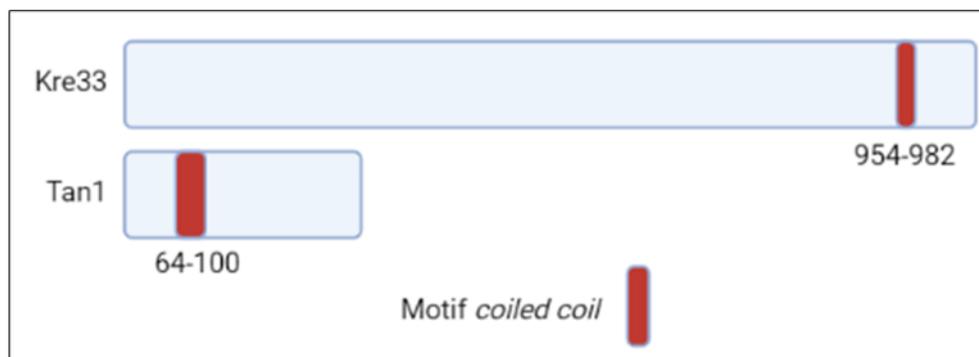
#### 4.1 Tan1 co-précipite avec Kre33 mais pas les mutants $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS.

Kre33 est une protéine qui possède un domaine acétyltransférase pour acétyler l'ARN. Pour l'acétylation de l'ARN ribosomique, l'homodimère Kre33 et la protéine Enp2 interagiraient ensemble dans le nucléole via leurs superhélices C-terminales, avant de rejoindre le SSU processome où Kre33 catalyse l'acétylation de deux cytosines d'ARNr 18S. Toutefois, cette interprétation implique une interaction entre superhélices dont la preuve empirique reste à être établie de manière définitive (Sharma *et al.*, 2015; Sleiman et Dragon, 2019). Pour l'acétylation des ARNt, on sait que Kre33 doit interagir avec la protéine adaptatrice de liaison à l'ARNt Tan1 pour son activité acétyltransférase (Sharma *et al.*, 2015). Cependant, le mécanisme n'est pas encore totalement compris. Par exemple, le lieu de l'interaction entre Kre33 et Tan1 est encore inconnu. L'enzyme nucléolaire Kre33 acétyle les ARNt Ser et Leu avec l'aide de l'adaptateur Tan1, et notre hypothèse est que Tan1 est nucléolaire et que l'interaction Kre33/Tan1 se fait au nucléole. Aussi, l'acétylation des ARNt pourrait avoir lieu dans le nucléole car des ARNt ont déjà été détectés dans ce compartiment. En effet, bien que mieux connu pour son rôle dans la transcription de l'ARNr, le traitement du pré-ARNr et l'assemblage des ribosomes, le nucléole est également le site du traitement de l'extrémité 5' des pré-ARNt chez de nombreux organismes (Phizicky et Hopper, 2010). D'autres études ont montré que certains ARNt interagissent avec des protéines du SSU processome, telles que Utp8 (Strub *et al.*, 2007). Afin de déterminer la localisation de l'interaction entre les deux protéines, nous avons effectué des délétions au niveau des signaux de localisation nucléaire NLS et nucléolaire NoLS de la protéine Tan1. Les délétions ont été faites à partir de nos prédictions bio-informatiques effectuées avec cNLS Mapper et NOD. Les prédictions sont illustrées sur la Figure 3.3. Par la suite, nous avons effectué des expériences d'immunoprécipitation. Le témoin négatif utilisé exprime Kre33 avec un épitope Myc, et n'exprime pas Tan1. Les résultats de l'analyse *western blot* (Figure 3.5) ont montré qu'il y avait une interaction entre Kre33 et Tan1, ce qui est cohérent avec des résultats précédemment publiés (Sharma *et al.*, 2015). L'analyse a aussi montré qu'il n'y avait pas d'interaction entre Kre33 et l'un ou l'autre des mutants  $\Delta$ NLS et  $\Delta$ NOLS. L'absence de bande pour les deux mutants sur le *western blot* suggère qu'ils n'ont pas co-

immunoprécipité avec Kre33, indiquant que l'interaction entre Kre33 et Tan1 est dépendante de la présence des signaux NLS et NoLS. Les expériences de microscopie vont permettre d'utiliser ce résultat afin d'effectuer des déductions relatives à la localisation de l'interaction Kre33/Tan1. Les paramètres d'exposition ont été méticuleusement optimisés pour garantir une représentation précise du signal. Les signaux plus faibles observés dans les extraits totaux des mutants Tan1 peuvent être attribués aux effets potentiels de la mutation sur l'expression des protéines.

#### 4.2 Les mutations $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS ne perturbent pas l'interaction des protéines Kre33 et Tan1.

Pour montrer que l'absence d'interaction entre Kre33 et les mutants de Tan1 dans nos résultats d'immunoprécipitation était due à la localisation et non à une absence d'interaction causée par les mutations, nous avons utilisé le Y2H chez la levure (Figure 3.4). C'est une méthode qui permet d'étudier les interactions protéine-protéine *in vivo*. Elle utilise le facteur de transcription Gal4 de la levure pour détecter ces interactions. Les séquences d'ADN codant pour les protéines d'intérêt sont clonées dans des vecteurs GAL4-DBD et GAL4-AD pour former l'appât et la cible du piège d'interaction. Des cellules hôtes sélectionnées permettent de détecter et de confirmer les interactions. Cette méthode est flexible et peut être adaptée à différentes applications (Osman, 2004).



**Figure 4.1** Représentation visuelle des protéines Kre33 et Tan1 avec leurs motifs superhélices. Les superhélices (motif *coiled coil*) prédites dans les deux protéines sont indiqués par les cylindres rouges.

Les résultats des expériences double hybride (Figure 3.4) ont indiqué que les mutations  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS n'affectent pas l'interaction entre les protéines Kre33 et Tan1. Les interactions persistantes observées à différentes concentrations de 3-aminotriazole suggèrent que les mutations dans les signaux de localisation nucléolaire et nucléaire ne jouent pas un rôle critique dans la liaison entre ces protéines. Les résultats confirment aussi l'interaction entre Kre33 et Tan1, ce qui est cohérent avec des résultats d'expériences double hybride réalisées antérieurement (Sharma *et al.*, 2015). Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que l'interaction Kre33/Tan1 n'est pas affectée par l'absence des signaux de localisation nucléolaire et nucléaire sur Tan1.

Il se peut que d'autres domaines ou motifs présents dans ces protéines puissent faciliter leur interaction. En effet, il est possible que l'interaction entre Kre33 et Tan1 soit médiée par leurs superhélices. Les hélices alpha entrelacées fournissent des sites d'interaction protéine-protéine pour permettre l'assemblage et le désassemblage dynamiques de complexes protéiques (Strauss et Keller, 2008). La présence d'une superhélice dans Kre33 a été signalée. Pour vérifier la présence d'une superhélice dans Tan1, le logiciel de prédiction Parcoil a été utilisé. Ce dernier a prédit la présence d'un motif dans Tan1. Une représentation visuelle de Kre33 et Tan1 avec leurs superhélices, est présentée sur la Figure 4.1 (Sleiman et Dragon, 2019; Strauss et Keller, 2008).

#### 4.3 Tan1 est une protéine nucléolaire et les mutations $\Delta$ NoLS et $\Delta$ NLS empêchent la localisation nucléaire de Tan1

La protéine nucléolaire Kre33 doit interagir avec la protéine adaptatrice Tan1 afin d'acétyler les ARNt (Sharma *et al.*, 2015). Cependant, comme mentionné précédemment, la localisation de la protéine Tan1 est encore inconnue. Pour tester notre hypothèse que Tan1 est nucléolaire, nous avons réalisé des expériences de microscopie à immunofluorescence dans lesquelles nous avons comparé la localisation de Tan1 et les mutants  $\Delta$ NLS et  $\Delta$ NoLS avec celle de la protéine nucléolaire Nop1 (Schimmang *et al.*, 1989).

Les résultats ont montré une colocalisation entre Nop1 et Tan1 (Figure 3.6), ce qui démontre que Tan1 est une protéine nucléolaire. Nous observons également que pour le mutant  $\Delta$ NLS, le signal vert de Tan1 est localisé en dehors du noyau comme nous l'attendions. La délétion du signal de localisation nucléaire empêche donc effectivement Tan1 de se localiser au noyau. En ce qui concerne le mutant  $\Delta$ NoLS, le signal vert de Tan1 ne se trouve plus au nucléole, mais il se trouve aussi à l'extérieur de noyau.

Bien que la prédiction bioinformatique puisse être un outil puissant pour guider la conception expérimentale, il est important de reconnaître ses limites. Une limitation est que le logiciel utilisé pour la prédiction peut ne pas toujours être précis pour prédire les effets des mutations. Dans notre étude, nous avons utilisé le logiciel Nucleolar localisation sequence Detector (NOD) pour prédire les effets de la suppression du NoLS de la protéine Tan1. NOD est un outil bioinformatique spécifiquement conçu pour identifier les signaux de localisation nucléolaire dans les séquences protéiques. Il utilise une approche basée sur les séquences pour prédire la présence de NoLS, ce qui peut aider à guider la conception expérimentale en identifiant les mutations potentielles qui pourraient affecter la localisation des protéines (Scott *et al.*, 2011). Cependant, il est possible que le logiciel NOD ait commis une erreur dans l'identification de la région NoLS de Tan1, ce qui a conduit à la localisation inattendue du mutant  $\Delta$ NoLS en dehors du noyau. Une explication possible est que les NoLS et les NLS ont des compositions en acides aminés très similaires (une forte prévalence de résidus basiques), ce qui peut avoir conduit le logiciel à l'identifier à tort comme un NoLS (Scott *et al.*, 2010). Cela pourrait être dû aux limites de l'algorithme utilisé par le logiciel ou au fait que l'approche basée sur la séquence utilisée par NOD n'a peut-être pas été en mesure de capturer pleinement les caractéristiques structurelles de la protéine Tan1 qui déterminent sa localisation.

De plus, il est plausible que la délétion introduite dans le mutant  $\Delta$ NoLS, bien que conçue pour cibler le signal de localisation nucléolaire (NoLS), ait pu affecter dans une certaine mesure le signal de localisation nucléaire (NLS). Bien que la délétion n'ait pas entièrement englobé l'ensemble du NLS, il est possible que l'intégrité structurelle ou l'accessibilité de la région du NLS ait été compromise, conduisant à l'absence observée de localisation nucléaire. De tels signaux complexes de localisation de protéines reposent sur des séquences d'acides aminés

spécifiques et leur disposition spatiale au sein de la structure de la protéine. Même des altérations subtiles de ces séquences, provoquées par des mutations telles que la mutation  $\Delta$ NoLS, peuvent potentiellement interférer avec la fonctionnalité du signal de localisation.

De plus, les mutants Tan1 $\Delta$ NoLS et Tan1 $\Delta$ NLS ne présentent pas de localisation diffuse dans le cytosol, mais forment plutôt de petits amas en dehors du noyau. Ce phénomène pourrait être attribué à des mécanismes proches de ceux impliqués dans la formation des granules de stress. Les granules de stress (SG) sont des foyers cytoplasmiques qui représentent une réponse cellulaire à divers facteurs de stress. Ils servent de compartiments sans membrane où convergent les composants cellulaires critiques, notamment les ARNm, les facteurs de traduction et d'autres protéines (Aulas *et al.*, 2017; Marcelo *et al.*, 2021). Des mutations au niveau du NLS d'une protéine ont été précédemment associées à l'incorporation de la protéine mutée dans des granules de stress cytoplasmiques (Notaro *et al.*, 2021). Ainsi, l'incorporation des mutants  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS dans des granules de stress pourrait expliquer leur distribution en amas observée dans le cytoplasme. Cet alignement de nos découvertes avec les processus cellulaires connus met en lumière les modèles de localisation intrigants présentés par ces mutants. Cette observation met aussi l'accent sur la relation complexe entre les mutations au sein des signaux de localisation et leur implication dans les réponses liées au stress, soulignant la nécessité d'une exploration plus approfondie de ce lien intrigant.

Dans l'ensemble, nos résultats de microscopie concordent avec nos résultats d'immunoprécipitation et confirment que les mutants  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS sont incapables de lier Kre33 car ils ne se trouvent plus au noyau. L'interaction Kre33/Tan1 est donc dépendante de la présence de Tan1 au noyau.

#### 4.4 L'interaction Kre33/Tan1 se fait dans le nucléole

Afin de confirmer la localisation de l'interaction Kre33/Tan1 *in vivo*, nous avons utilisé un essai de ligature de proximité ou PLA (Figure 3.7). Le PLA a un avantage sur des techniques telles que la co-immunoprécipitation (co-IP) en termes de spécificité. Alors que la co-IP peut détecter les interactions entre les protéines qui ne sont pas nécessairement en contact direct, le PLA ne

détecte que les interactions entre deux protéines qui sont à proximité l'une de l'autre, généralement à quelques nanomètres. Cela permet une détection plus spécifique des interactions protéine-protéine *in situ*, car les anticorps conjugués aux oligonucléotides utilisés dans le PLA ne peuvent se lier qu'aux protéines qui sont en contact direct. Le PLA permet aussi de révéler les interactions transitoires et la distribution des protéines en interaction au sein des cellules individuelles. En conséquence, le PLA peut réduire le risque de résultats faussement positifs et fournir une évaluation plus précise des interactions protéiques. Dans l'ensemble, le PLA est une technique puissante pour étudier les interactions protéine-protéine et les modifications protéiques dans les cellules (Alam, 2018; Söderberg *et al.*, 2006).

Les résultats de PLA ont d'abord fourni une confirmation de l'interaction entre Tan1 et Kre33. Cela corrobore nos résultats d'immunoprécipitation (IP), dans lesquels nous avons observé, entre autres interactions, la présence de l'interaction Kre33 et Tan1. Notamment, cette interaction avait déjà été rapportée dans l'étude de Sharma *et al.* (2015). En second lieu, le PLA a confirmé que les deux protéines interagissent au sein du nucléole, confirmant ainsi notre hypothèse de départ.

On peut supposer que l'avantage d'avoir l'ARNt acétyltransférase Kre33 et sa protéine adaptatrice Tan1 dans le même compartiment pourrait permettre une acétylation efficace et plus spécifique des ARNt sérine et leucine. La colocalisation pourrait garantir éventuellement que l'enzyme et la protéine adaptatrice sont à proximité des molécules d'ARNt cibles, ce qui augmenterait l'efficacité du processus de modification. De plus, il est possible que ceci empêcherait la modification de molécules d'ARNt non ciblées, qui pourraient potentiellement être délétères pour la cellule. Étant donné que certaines études chez la levure ont lié l'acétylation de l'ARNt à un rôle dans la stabilité de l'ARNt, nous pourrions supposer que ce mécanisme de colocalisation aurait fourni un avantage évolutif significatif aux cellules.

## CHAPITRE V

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, cette étude a fourni des informations importantes sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'interaction entre Tan1 et Kre33 dans la biologie des ARNt. Un signal de localisation nucléaire de Tan1 a été prédit par analyses bio-informatiques puis confirmé par microscopie à immunofluorescence. Ensuite, les résultats des tests de co-IP ont montré que Kre33 interagit avec Tan1 mais pas avec les mutants  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS. Les tests double hybride ont confirmé que les mutations  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS n'empêchent pas l'interaction avec Kre33. Les résultats de la microscopie et du PLA ont ensuite validé l'interaction entre Tan1 et Kre33 dans le nucléole.

De plus, cette étude ouvre la voie à des pistes potentielles pour de futures investigations. Les immunofluorescences ont montré que la délétion du NoLS prédit de Tan1 excluait Tan1 du nucléole mais du noyau aussi, indiquant qu'il s'agissait probablement d'un NLS, ou que la délétion a affecté la fonctionnalité du NLS de Tan1. Pour caractériser de manière exhaustive le NoLS de Tan1, il serait intéressant d'effectuer une mutagenèse par PCR supplémentaire avec des mutations plus courtes que celle réalisée précédemment. Ceci minimisera ainsi la perturbation potentielle de la fonctionnalité du NLS de Tan1. Ces mutations doivent évidemment être faites après analyse bioinformatique avec NOD ou un autre logiciel de préférence. Effectuer une analyse bioinformatique avec plusieurs outils logiciels améliore la robustesse et la fiabilité des résultats en atténuant les biais potentiels ou les limitations inhérentes à une plate-forme logicielle unique. Par exemple : aucun NoLS n'est détecté par NOD lorsque la séquence de Tan1 est entrée avec une délétion des acides aminés EKRNRNG au début de la séquence. Une construction avec une telle délétion posséderait donc une lysine en plus de celle réalisée dans le cadre de cette étude. Les lysines jouent un rôle crucial au niveau des NLS. Leur charge positive confère aux NLS l'habilité d'interagir avec d'autres molécules impliquées dans le processus d'import nucléaire comme les importines (Lu, J. *et al.*, 2021). Ainsi, avec cette lysine, ce nouveau mutant Tan1 $\Delta$ NoLS pourrait avoir un NLS encore fonctionnel. Une telle mutation ne devrait pas affecter différemment les ARNt<sup>Ser</sup> et les ARNt<sup>Leu</sup>

car la mutation ne se trouve pas au niveau du domaine THUMP, qui est le domaine de liaison des ARNt (Aravind et Koonin, 2001).

Dans le cadre de cette étude, nous avons généré des constructions de *TANI* comportant des mutations au niveau de la séquence codante pour la superhélice, qui serait le motif de Tan1 permettant l'interaction Kre33/Tan1. La mutation E83P chez Tan1 a diminué significativement le score de la prédiction de la superhélice selon l'analyse bio-informatique. Un fragment portant cette mutation a été construit et vérifié par séquençage. Ainsi, l'expression et la fonctionnalité de la mutation pourront éventuellement être évaluées par des tests double hybride pour tester son effet sur l'interaction avec Kre33. D'autres constructions comportant des délétions plus longues ont aussi été effectuées. Ces délétions sont aussi basées sur des prédictions de superhélice de Tan1. Si certaines mutations de superhélice dans ces constructions perturbent l'interaction entre Kre33 et Tan1, il serait intéressant d'y examiner les profils d'acétylation des ARNt<sup>Ser</sup> et ARNt<sup>Leu</sup>.

À la lumière des découvertes récentes concernant des individus présentant des mutations du gène *THUMPD1*, analogue à *TANI* chez la levure, qui entraînent de graves anomalies du développement neurologique, il est impératif d'envisager les perspectives de nos recherches dans ce contexte. Dans une approche de recherche globale, nous envisageons de générer des souches de levure présentant des mutations de *TANI* reflétant les variantes bi-alléliques de perte de fonction observées dans le gène *THUMPD1*. Nous évaluerons les caractéristiques de croissance des souches de levure mutantes, en surveillant de près leurs taux de croissance, leur morphologie cellulaire et leurs différences phénotypiques observables par rapport aux souches de type sauvage. La spectrométrie de masse à haute résolution sera utilisée pour analyser les profils de modification de l'ARNt, avec un accent particulier sur les modifications ac4C dans l'ARNt<sup>Ser</sup> et l'ARNt<sup>Leu</sup>. Les expériences de réponse au stress examineront l'impact de ces mutations sur *Saccharomyces cerevisiae* dans des conditions de stress, révélant potentiellement des effets dépendants du stade de développement. En outre, le séquençage du génome entier et l'analyse transcriptomique seront utilisés pour découvrir les effets potentiels en aval de ces mutations sur l'expression génique et les réseaux de régulation de la levure. Il est important de noter que nos résultats seront soumis à une analyse comparative avec des observations

humaines, mettant en évidence à la fois les similitudes et les distinctions. Nous mettrons en lumière les conséquences fonctionnelles des mutations *TANI* chez la levure et leur pertinence pour les troubles du développement neurologique associés aux mutations *THUMPD1*, tout en contribuant également à une vision plus large afin d'avoir une compréhension de la dynamique de modification de l'ARNt dans les processus cellulaires (Broly *et al.*, 2022).

De plus, des expériences supplémentaires ont été réalisées (Résultats non présentés) afin de déterminer le compartiment dans lequel l'acétylation des ARNt se fait. Pour ce faire, nous avons d'abord analysé l'impact des mutations  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS sur l'interaction Tan1/ARNt<sup>Ser</sup> par *Northern blotting*. Puis, nous avons analysé l'impact des mutations  $\Delta$ NoLS et  $\Delta$ NLS sur l'acétylation des ARNt<sup>Leu</sup> et ARNt<sup>Ser</sup>, pour éventuellement tirer des conclusions sur le compartiment dans lequel se fait cette acétylation. Pour réaliser ceci, nous avons utilisé une approche d'*Immuno-northern blotting* en utilisant un anticorps anti-ac4C. Cependant, des problèmes techniques ainsi que des résultats contradictoires ont empêché la formulation de conclusions définitives. De plus, nous avons également tenté des expériences d'ultracentrifugation sur gradient de densité de sucrose, mais celles-ci ont aussi échoué en raison de défis techniques. Ainsi, il serait très pertinent de réitérer toutes ces expériences.

En résumé, cette étude a fourni des informations précieuses sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'interaction Tan1/Kre33, et a identifié des pistes potentielles pour de futures investigations qui pourraient élucider davantage le rôle de Kre33 et Tan1 dans la biologie des ARNt. Bien que les implications thérapeutiques de ces découvertes puissent être incertaines à ce stade, elles suggèrent des orientations prometteuses pour les recherches futures qui pourraient éventuellement conduire à de nouvelles approches thérapeutiques liées aux ribosomopathies impliquant Kre33 et Tan1.

## RÉFÉRENCES

- Ahmad, Y., Boisvert, F. M., Gregor, P., Cobley, A. et Lamond, A. I. (2009, Jan). NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D181-184. doi: 10.1093/nar/gkn804
- Alam, M. S. (2018, Nov). Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol*, 123(1), e58. doi: 10.1002/cpim.58
- Alberts, N., Mathangasinghe, Y. et Nillegoda, N. B. (2019, Sep 2). In Situ Monitoring of Transiently Formed Molecular Chaperone Assemblies in Bacteria, Yeast, and Human Cells. *J Vis Exp*, (151). doi: 10.3791/60172
- Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I. et Mann, M. (2005, Jan 6). Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, 433(7021), 77-83. doi: 10.1038/nature03207
- Aravind, L. et Koonin, E. V. (2001, Apr). THUMP--a predicted RNA-binding domain shared by 4-thiouridine, pseudouridine synthases and RNA methylases. *Trends Biochem Sci*, 26(4), 215-217. doi: 10.1016/s0968-0004(01)01826-6
- Aulas, A., Fay, M. M., Lyons, S. M., Achorn, C. A., Kedersha, N., Anderson, P. et Ivanov, P. (2017, Mar 1). Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci. *J Cell Sci*, 130(5), 927-937. doi: 10.1242/jcs.199240
- Barandun, J., Hunziker, M. et Klinge, S. (2018, Apr). Assembly and structure of the SSU processome--a nucleolar precursor of the small ribosomal subunit. *Curr Opin Struct Biol*, 49, 85-93. doi: 10.1016/j.sbi.2018.01.008
- Berger, B., Wilson, D. B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M. et Kim, P. S. (1995, Aug 29). Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(18), 8259-8263. doi: 10.1073/pnas.92.18.8259
- Bertrand, E., Houser-Scott, F., Kendall, A., Singer, R. H. et Engelke, D. R. (1998, Aug 15). Nucleolar localization of early tRNA processing. *Genes Dev*, 12(16), 2463-2468. doi: 10.1101/gad.12.16.2463
- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J. et Lamond, A. I. (2007, Jul). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 574-585. doi: 10.1038/nrm2184

- Boulikas, T. (1993). Nuclear localization signals (NLS). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 3(3), 193-227.
- Bradley, K. J., Bowl, M. R., Williams, S. E., Ahmad, B. N., Partridge, C. J., Patmanidi, A. L., . . . Thakker, R. V. (2007, Feb 22). Parafibromin is a nuclear protein with a functional monopartite nuclear localization signal. *Oncogene*, 26(8), 1213-1221. doi: 10.1038/sj.onc.1209893
- Broly, M., Polevoda, B. V., Awayda, K. M., Tong, N., Lentini, J., Besnard, T., . . . O'Connell, M. R. (2022, Apr 7). THUMPD1 bi-allelic variants cause loss of tRNA acetylation and a syndromic neurodevelopmental disorder. *Am J Hum Genet*, 109(4), 587-600. doi: 10.1016/j.ajhg.2022.02.001
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. et Schlattner, U. (2009, Jun 18). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci*, 10(6), 2763-2788. doi: 10.3390/ijms10062763
- Burkhard, P., Stetefeld, J. et Strelkov, S. V. (2001, Feb). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*, 11(2), 82-88. doi: 10.1016/s0962-8924(00)01898-5
- Bussey, H. (1991, Oct). K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol*, 5(10), 2339-2343. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02079.x
- Bystricky, K., Laroche, T., van Houwe, G., Blaszczyk, M. et Gasser, S. M. (2005, Jan 31). Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization. *J Cell Biol*, 168(3), 375-387. doi: 10.1083/jcb.200409091
- Cautain, B., Hill, R., de Pedro, N. et Link, W. (2015, Feb). Components and regulation of nuclear transport processes. *Febs j*, 282(3), 445-462. doi: 10.1111/febs.13163
- Cheng, J., Baßler, J., Fischer, P., Lau, B., Kellner, N., Kunze, R., . . . Hurt, E. (2019, Sep 19). Thermophile 90S Pre-ribosome Structures Reveal the Reverse Order of Co-transcriptional 18S rRNA Subdomain Integration. *Mol Cell*, 75(6), 1256-1269.e1257. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.032
- Cmarko, D., Smigova, J., Minichova, L. et Popov, A. (2008, Oct). Nucleolus: the ribosome factory. *Histol Histopathol*, 23(10), 1291-1298. doi: 10.14670/hh-23.1291
- Cokol, M., Nair, R. et Rost, B. (2000, Nov). Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep*, 1(5), 411-415. doi: 10.1093/embo-reports/kvd092

- Dewe, J. M., Whipple, J. M., Chernyakov, I., Jaramillo, L. N. et Phizicky, E. M. (2012, Oct). The yeast rapid tRNA decay pathway competes with elongation factor 1A for substrate tRNAs and acts on tRNAs lacking one or more of several modifications. *Rna*, 18(10), 1886-1896. doi: 10.1261/rna.033654.112
- Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., . . . Baserga, S. J. (2002, Jun 27). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 417(6892), 967-970. doi: 10.1038/nature00769
- Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R. et Jin, D. J. (2008, Feb). Transcription profiling of the stringent response in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 190(3), 1084-1096. doi: 10.1128/jb.01092-07
- Feng, J. M., Sun, J. et Wen, J. F. (2012, Dec). [Advances in the study of the nucleolus]. *Dongwuxue Yanjiu*, 33(6), 549-556. doi: 10.3724/sp.J.1141.2012.06549
- Feng, J. M., Tian, H. F. et Wen, J. F. (2013). Origin and evolution of the eukaryotic SSU processome revealed by a comprehensive genomic analysis and implications for the origin of the nucleolus. *Genome Biol Evol*, 5(12), 2255-2267. doi: 10.1093/gbe/evt173
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. et Fasiolo, F. (2003, Aug 14). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313, 17-42. doi: 10.1016/s0378-1119(03)00629-2
- Fu, X., Liang, C., Li, F., Wang, L., Wu, X., Lu, A., . . . Zhang, G. (2018, May 12). The Rules and Functions of Nucleocytoplasmic Shuttling Proteins. *Int J Mol Sci*, 19(5). doi: 10.3390/ijms19051445
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. et Herrero, E. (1997, Jul). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(9), 837-848. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(199707)13:9<837::Aid-yea145>3.0.Co;2-t
- Gérus, M., Bonnart, C., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y. et Henras, A. K. (2010, Mar). Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol*, 30(5), 1130-1144. doi: 10.1128/mcb.00999-09
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. et Schiestl, R. H. (1992, Mar 25). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, 20(6), 1425. doi: 10.1093/nar/20.6.1425

- Girard, L. R., Fiedler, T. J., Harris, T. W., Carvalho, F., Antoshechkin, I., Han, M., . . . Chalfie, M. (2007, Jan). WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology. *Nucleic Acids Res*, 35(Database issue), D472-475. doi: 10.1093/nar/gkl894
- Girke, P. et Seufert, W. (2019, Mar 1). Compositional reorganization of the nucleolus in budding yeast mitosis. *Mol Biol Cell*, 30(5), 591-606. doi: 10.1091/mbc.E18-08-0524
- Goodenbour, J. M. et Pan, T. (2006). Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 34(21), 6137-6146. doi: 10.1093/nar/gkl725
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., . . . Hurt, E. (2002, Jul). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell*, 10(1), 105-115. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00579-8
- Greber, B. J. (2016, Nov). Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *Rna*, 22(11), 1643-1662. doi: 10.1261/rna.057927.116
- Gu, Y., Hinnerwisch, J., Fredricks, R., Kalepu, S., Mishra, R. S. et Singh, N. (2003, Mar). Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. *Neurobiol Dis*, 12(2), 133-149. doi: 10.1016/s0969-9961(02)00014-1
- Hodel, M. R., Corbett, A. H. et Hodel, A. E. (2001, Jan 12). Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem*, 276(2), 1317-1325. doi: 10.1074/jbc.M008522200
- Huang, Z. H., Du, Y. P., Wen, J. T., Lu, B. F. et Zhao, Y. (2022, May 12). snoRNAs: functions and mechanisms in biological processes, and roles in tumor pathophysiology. *Cell Death Discov*, 8(1), 259. doi: 10.1038/s41420-022-01056-8
- Ikeuchi, Y., Kitahara, K. et Suzuki, T. (2008, Aug 20). The RNA acetyltransferase driven by ATP hydrolysis synthesizes N4-acetylcytidine of tRNA anticodon. *Embo j*, 27(16), 2194-2203. doi: 10.1038/emboj.2008.154
- Imai, K. et Mitaku, S. (2005). Mechanisms of secondary structure breakers in soluble proteins. *Biophysics (Nagoya-shi)*, 1, 55-65. doi: 10.2142/biophysics.1.55
- Ito, S., Horikawa, S., Suzuki, T., Kawauchi, H., Tanaka, Y., Suzuki, T. et Suzuki, T. (2014, Dec 26). Human NAT10 is an ATP-dependent RNA acetyltransferase responsible for N4-acetylcytidine formation in 18 S ribosomal RNA (rRNA). *J Biol Chem*, 289(52), 35724-35730. doi: 10.1074/jbc.C114.602698

- Johansson, M. J. et Byström, A. S. (2004, Apr). The *Saccharomyces cerevisiae* TAN1 gene is required for N4-acetylcytidine formation in tRNA. *Rna*, *10*(4), 712-719. doi: 10.1261/rna.5198204
- Kampen, K. R., Sulima, S. O., Vereecke, S. et De Keersmaecker, K. (2020, Feb 20). Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res*, *48*(3), 1013-1028. doi: 10.1093/nar/gkz637
- Kapinos, L. E., Huang, B., Rencurel, C. et Lim, R. Y. H. (2017, Nov 6). Karyopherins regulate nuclear pore complex barrier and transport function. *J Cell Biol*, *216*(11), 3609-3624. doi: 10.1083/jcb.201702092
- Kim, J., Kim, S., Lee, K. et Kwon, Y. (2009, 2009/02/28/). Entropy analysis in yeast DNA. *Chaos, Solitons & Fractals*, *39*(4), 1565-1571. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chaos.2007.06.036>
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. et Schiebel, E. (1999, Jul). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, *15*(10b), 963-972. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(199907)15:10b<963::Aid-yea399>3.0.Co;2-w
- Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Koš-Braun, I., . . . Hurt, E. (2016, Jul 14). Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell*, *166*(2), 380-393. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.014
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. et Yanagawa, H. (2009, Jun 23). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(25), 10171-10176. doi: 10.1073/pnas.0900604106
- Kushnirov, V. V. (2000, Jun 30). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, *16*(9), 857-860. doi: 10.1002/1097-0061(20000630)16:9<857::Aid-yea561>3.0.Co;2-b
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E. et Corbett, A. H. (2007, Feb 23). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*, *282*(8), 5101-5105. doi: 10.1074/jbc.R600026200
- Larrieu, D., Britton, S., Demir, M., Rodriguez, R. et Jackson, S. P. (2014, May 2). Chemical inhibition of NAT10 corrects defects of laminopathic cells. *Science*, *344*(6183), 527-532. doi: 10.1126/science.1252651

- Li, Z., Lee, I., Moradi, E., Hung, N. J., Johnson, A. W. et Marcotte, E. M. (2009, Oct). Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics. *PLoS Biol*, 7(10), e1000213. doi: 10.1371/journal.pbio.1000213
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J. et Ruan, H. (2021, May 22). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Commun Signal*, 19(1), 60. doi: 10.1186/s12964-021-00741-y
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J. et Ruan, H. (2021, 2021/05/22). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 60. doi: 10.1186/s12964-021-00741-y
- Maddirevula, S., Alzahrani, F., Al-Owain, M., Al Muhaizea, M. A., Kayyali, H. R., AlHashem, A., . . . Alkuraya, F. S. (2019, Mar). Autozygome and high throughput confirmation of disease genes candidacy. *Genet Med*, 21(3), 736-742. doi: 10.1038/s41436-018-0138-x
- Mallet, P. L. et Bachand, F. (2013, Mar). A proline-tyrosine nuclear localization signal (PY-NLS) is required for the nuclear import of fission yeast PAB2, but not of human PABPN1. *Traffic*, 14(3), 282-294. doi: 10.1111/tra.12036
- Marcelo, A., Koppenol, R., de Almeida, L. P., Matos, C. A. et Nóbrega, C. (2021, Jun 8). Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? *Cell Death Dis*, 12(6), 592. doi: 10.1038/s41419-021-03873-8
- Martin, R. M., Ter-Avetisyan, G., Herce, H. D., Ludwig, A. K., Lättig-Tünnemann, G. et Cardoso, M. C. (2015). Principles of protein targeting to the nucleolus. *Nucleus*, 6(4), 314-325. doi: 10.1080/19491034.2015.1079680
- Mason, J. M. et Arndt, K. M. (2004, Feb 6). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem*, 5(2), 170-176. doi: 10.1002/cbic.200300781
- McStay, B. (2016, Jul 15). Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *Genes Dev*, 30(14), 1598-1610. doi: 10.1101/gad.283838.116
- Melnikov, S., Manakongtreecheep, K. et Söll, D. (2018, Jul 1). Revising the Structural Diversity of Ribosomal Proteins Across the Three Domains of Life. *Mol Biol Evol*, 35(7), 1588-1598. doi: 10.1093/molbev/msy021
- Meyer, T. et Vinkemeier, U. (2004, Dec). Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem*, 271(23-24), 4606-4612. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04423.x

- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N. et Moses, A. M. (2009, 2009/06/29). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, *10*(1), 202. doi: 10.1186/1471-2105-10-202
- Notaro, A., Messina, A. et La Bella, V. (2021). A Deletion of the Nuclear Localization Signal Domain in the Fus Protein Induces Stable Post-stress Cytoplasmic Inclusions in SH-SY5Y Cells. *Front Neurosci*, *15*, 759659. doi: 10.3389/fnins.2021.759659
- Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M. W. et Nomura, M. (1993, Apr). Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol Cell Biol*, *13*(4), 2441-2455. doi: 10.1128/mcb.13.4.2441-2455.1993
- Oka, M. et Yoneda, Y. (2018). Importin  $\alpha$ : functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, *94*(7), 259-274. doi: 10.2183/pjab.94.018
- Olson, M. O. (2011). Dans S. S. B. Media (dir.), *The nucleolus* (vol. 15). New York :.
- Olson, M. O., Dundr, M. et Szebeni, A. (2000, May). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol*, *10*(5), 189-196. doi: 10.1016/s0962-8924(00)01738-4
- Osman, A. (2004). Yeast two-hybrid assay for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, *270*, 403-422. doi: 10.1385/1-59259-793-9:403
- Pagé, N., Gérard-Vincent, M., Ménard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G. J., . . . Bussey, H. (2003, Mar). A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*, *163*(3), 875-894. doi: 10.1093/genetics/163.3.875
- Phipps, K. R., Charette, J. et Baserga, S. J. (2011, Jan-Feb). The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *2*(1), 1-21. doi: 10.1002/wrna.57
- Phizicky, E. M. et Hopper, A. K. (2010, Sep 1). tRNA biology charges to the front. *Genes Dev*, *24*(17), 1832-1860. doi: 10.1101/gad.1956510
- Powers, T. et Walter, P. (1999, Apr). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, *10*(4), 987-1000. doi: 10.1091/mbc.10.4.987
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R. et Hurt, E. C. (1989, Dec 20). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA

- and is essential for viability. *Embo j*, 8(13), 4015-4024. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08584.x
- Scott, M. S., Boisvert, F. M., McDowall, M. D., Lamond, A. I. et Barton, G. J. (2010, Nov). Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res*, 38(21), 7388-7399. doi: 10.1093/nar/gkq653
- Scott, M. S., Troshin, P. V. et Barton, G. J. (2011, Aug 3). NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics*, 12, 317. doi: 10.1186/1471-2105-12-317
- Sharma, S., Langhendries, J. L., Watzinger, P., Kötter, P., Entian, K. D. et Lafontaine, D. L. (2015, Feb 27). Yeast Kre33 and human NAT10 are conserved 18S rRNA cytosine acetyltransferases that modify tRNAs assisted by the adaptor Tan1/THUMP1. *Nucleic Acids Res*, 43(4), 2242-2258. doi: 10.1093/nar/gkv075
- Sharma, S., Sourirajan, A. et Dev, K. (2017, Jul). Role of *Saccharomyces cerevisiae* TAN1 (tRNA acetyltransferase) in eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B)-mediated translation control and stress response. *3 Biotech*, 7(3), 223. doi: 10.1007/s13205-017-0857-8
- Sikorski, R. S. et Hieter, P. (1989, May). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19-27. doi: 10.1093/genetics/122.1.19
- Singh, S., Vanden Broeck, A., Miller, L., Chaker-Margot, M. et Klinge, S. (2021, Sep 10). Nucleolar maturation of the human small subunit processome. *Science*, 373(6560), eabj5338. doi: 10.1126/science.abj5338
- Sleiman, S. et Dragon, F. (2019, Sep 5). Recent Advances on the Structure and Function of RNA Acetyltransferase Kre33/NAT10. *Cells*, 8(9). doi: 10.3390/cells8091035
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K. J., Jarvius, J., . . . Landegren, U. (2006, Dec). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*, 3(12), 995-1000. doi: 10.1038/nmeth947
- Sondalle, S. B. et Baserga, S. J. (2014, Jun). Human diseases of the SSU processome. *Biochim Biophys Acta*, 1842(6), 758-764. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.11.004
- Stewart, M. (2007, Mar). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3), 195-208. doi: 10.1038/nrm2114

- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M. et Rout, M. P. (2010, Jul). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(7), 490-501. doi: 10.1038/nrm2928
- Strauss, H. M. et Keller, S. (2008). Pharmacological interference with protein-protein interactions mediated by coiled-coil motifs. *Handb Exp Pharmacol*, (186), 461-482. doi: 10.1007/978-3-540-72843-6\_19
- Strub, B. R., Eswara, M. B., Pierce, J. B. et Mangroo, D. (2007, Oct). Utp8p is a nucleolar tRNA-binding protein that forms a complex with components of the nuclear tRNA export machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 18(10), 3845-3859. doi: 10.1091/mbc.e06-11-1016
- Subach, F. V., Patterson, G. H., Manley, S., Gillette, J. M., Lippincott-Schwartz, J. et Verkhusa, V. V. (2009, Feb). Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 6(2), 153-159. doi: 10.1038/nmeth.1298
- Suzuki, T. (2021, Jun). The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(6), 375-392. doi: 10.1038/s41580-021-00342-0
- Taddei, A. et Gasser, S. M. (2012, Sep). Structure and function in the budding yeast nucleus. *Genetics*, 192(1), 107-129. doi: 10.1534/genetics.112.140608
- Taddei, A., Schober, H. et Gasser, S. M. (2010, Aug). The budding yeast nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(8), a000612. doi: 10.1101/cshperspect.a000612
- Taniguchi, T., Miyauchi, K., Sakaguchi, Y., Yamashita, S., Soma, A., Tomita, K. et Suzuki, T. (2018, Nov). Acetate-dependent tRNA acetylation required for decoding fidelity in protein synthesis. *Nat Chem Biol*, 14(11), 1010-1020. doi: 10.1038/s41589-018-0119-z
- Terry, L. J. et Wentz, S. R. (2009, Dec). Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryot Cell*, 8(12), 1814-1827. doi: 10.1128/ec.00225-09
- Thiry, M. et Lafontaine, D. L. (2005, Apr). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol*, 15(4), 194-199. doi: 10.1016/j.tcb.2005.02.007
- Thomas, J. M., Bryson, K. M. et Meier, J. L. (2019). Nucleotide resolution sequencing of N4-acetylcytidine in RNA. *Methods Enzymol*, 621, 31-51. doi: 10.1016/bs.mie.2019.02.022
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S. et Hurt, E. (2013, Nov 1). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J Cell Sci*, 126(Pt 21), 4815-4821. doi: 10.1242/jcs.111948

- Vincent, N. G., Charette, J. M. et Baserga, S. J. (2018, Jan). The SSU processome interactome in *Saccharomyces cerevisiae* reveals novel protein subcomplexes. *Rna*, 24(1), 77-89. doi: 10.1261/rna.062927.117
- Wang, Y., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Y., Huang, H., Dong, X., . . . Jiang, T. (2012, Oct). Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery. *Mol Biol Cell*, 23(19), 3911-3922. doi: 10.1091/mbc.E12-05-0396
- Warner, J. R. (1999, Nov). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, 24(11), 437-440. doi: 10.1016/s0968-0004(99)01460-7
- Watkins, A. M., Wuo, M. G. et Arora, P. S. (2015, Sep 16). Protein-Protein Interactions Mediated by Helical Tertiary Structure Motifs. *J Am Chem Soc*, 137(36), 11622-11630. doi: 10.1021/jacs.5b05527
- Wilson, D. N. et Doudna Cate, J. H. (2012, May 1). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5). doi: 10.1101/cshperspect.a011536
- Woolford, J. L., Jr. et Baserga, S. J. (2013, Nov). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643-681. doi: 10.1534/genetics.113.153197
- Wysoczański, P., Schneider, C., Xiang, S., Munari, F., Trowitzsch, S., Wahl, M. C., . . . Zweckstetter, M. (2014, Oct). Cooperative structure of the heterotrimeric pre-mRNA retention and splicing complex. *Nat Struct Mol Biol*, 21(10), 911-918. doi: 10.1038/nsmb.2889
- Yang, C. H., Lambie, E. J., Hardin, J., Craft, J. et Snyder, M. (1989, Aug). Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body. *Chromosoma*, 98(2), 123-128. doi: 10.1007/bf00291048
- Zhou, Y., Chen, C. et Johansson, M. J. (2013, Jun). The pre-mRNA retention and splicing complex controls tRNA maturation by promoting TAN1 expression. *Nucleic Acids Res*, 41(11), 5669-5678. doi: 10.1093/nar/gkt269