

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE D'UN VARIANT FAUX-SENS DANS *BMS1*, GÈNE CANDIDAT POUR LE SYNDROME
D'ADAMS-OLIVER

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

SANDRA PATRICIA SANCHEZ MARTINEZ

NOVEMBRE 2024

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.12-2023). 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

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, Dr François Dragon. Je vous remercie sincèrement de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et pour votre soutien constant. Votre disponibilité pour répondre à mes questions, vos conseils avisés, vos orientations précieuses, ainsi que votre patience ont été d'une valeur inestimable. Travailler sous votre direction a été un immense privilège. Vos connaissances, votre expertise, et vos qualités humaines ont été une source d'inspiration et de motivation, m'ayant permis non seulement de surmonter les défis de ce projet, mais aussi d'enrichir profondément mon expérience académique et personnelle.

Je tiens adresser mes remerciements les plus sincères à la Dre Tatiana Scorza et au Dr. Benoît Barbeau pour l'honneur qu'ils me font en consacrant leur temps à l'évaluation de ce mémoire.

Je remercie également à tous mes collègues du laboratoire; un merci particulier à Sophie pour leurs enseignements, leurs conseils éclairés et leur guidance, qui m'ont permis de suivre la bonne direction dans mes recherches. Je tiens à exprimer ma gratitude à Nazim, Ismaël, Aniket et Mouloud pour les merveilleux moments que nous avons partagés; votre camaraderie et votre sens de l'humour ont rendu cette expérience bien plus agréable, et je vous remercie pour les éclats de rire et la bonne humeur que vous avez apportés au quotidien. Travailler à vos côtés a été un véritable plaisir. Je souhaite exprimer mes remerciements à Frédérique, même si nous n'avons pas eu l'occasion de partager beaucoup de temps ensemble. Ta gentillesse et ta disponibilité ont été grandement appréciées.

Je souhaite également exprimer toute ma reconnaissance au CERMO-FC pour son soutien grâce à l'octroi de sa bourse qui m'a encouragé à poursuivre mon parcours académique.

Un grand merci à ma famille, et tout particulièrement à ma mère, pour le soutien moral inébranlable et ses conseils tout au long de mes études. Finalement, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mon mari et meilleur ami, Hector. Merci d'avoir toujours été là pour moi, merci pour ton soutien pendant toutes les longues journées et soirées d'étude, merci pour ton amour, ton encouragement et ta patience pendant cette période. Tu m'as donné la force de surmonter

les défis et de persévérer dans ce parcours. Sans ton appui constant, ce travail n'aurait pas été possible. Merci du fond du cœur pour ton soutien précieux et ta présence dans ma vie.

DÉDICACE

À toi maman, et à toi, Hector.

Merci de m'avoir toujours épaulé et de m'avoir donné la force de persévérer.

« Il n'y a que deux façons de vivre sa vie : l'une en faisant comme si rien n'était un miracle,
l'autre en faisant comme si tout était un miracle ».

Albert Einstein

« Le monde est entre les mains de ceux qui ont le courage de rêver et prennent le risque de
vivre leurs rêves ».

Paulo Coelho

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Le nucléole.....	1
1.2 Le ribosome	3
1.3 La biogenèse des ribosomes.....	4
1.4 Le SSU processome	7
1.5 Le gène <i>BMS1</i>	9
1.6 Localisation nucléaire et localisation nucléolaire	10
1.7 La colocalisation subcellulaire	14
1.8 Les ribosomopathies	17
1.9 Le syndrome d'Adams-Oliver	18
1.10 La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.11 Hypothèses	21
1.12 Objectifs	22
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
2.1 Construction de plasmides	23
2.2 Souche bactérienne	28
2.3 Souches de levure	28
2.4 Construction des souches	30
2.5 Milieux de culture	31
2.6 Préparation et transformation de bactéries électro compétentes	31

2.7	Préparation et transformation de bactéries chimio-compétentes	32
2.8	Préparation et transformation de levures compétentes.....	32
2.9	Tests de complémentation sur géloses	33
2.10	Cinétique de déplétion en milieu liquide avec dextrose	33
2.11	Extraction de protéines des levures.....	34
2.12	Analyse des protéines par immunobuvardage.....	34
2.13	Northern blot	35
2.14	Préparation des extraits cellulaires de levure et gradients de densité de sucrose ..	36
2.15	Microscopie à immunofluorescence	36
2.16	Oligonucléotides.....	37
CHAPITRE 3 RÉSULTATS		39
3.1	Viabilité des cellules de levure portant la mutation R45T, homologue à R59T chez l'humain 39	
3.2	Analyse de l'expression de Bms1 mutée.....	42
3.3	Analyse de la maturation des pré-ARNr	43
3.4	Analyse de la production des ribosomes	45
3.5	Validation des séquences NLS et NoLS putatives fournies par les outils bio-informatiques.....	46
CHAPITRE 4 DISCUSSION		55
4.1	La souche YSP-R45T, porteuse de la mutation, est viable.....	56
4.2	La version mutée de Bms1 est capable de compléter la déplétion de Bms1 endogène lors de la cinétique de déplétion.....	57
4.3	La mutation R45T n'a pas d'impact négatif sur la fonctionnalité de Bms1	57
4.4	La mutation R45T n'affecte pas la maturation des ARNr	58
4.5	La mutation R45T n'a pas d'impact sur la biogenèse des ribosomes	59
4.6	La mutation R45T étudié dans la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
4.7	La séquence NoLS prédite en C-terminale de Bms1 est un vrai NoLS.....	61
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		65
ANNEXE A Coefficients de colocalisation calculés pour YSPN60		67
ANNEXE B Coefficients de colocalisation calculés pour YSPC89		68
ANNEXE C Coefficients de colocalisation calculés pour YSPC89KA		69
ANNEXE D Coefficients de colocalisation calculés pour YSPRPS3		70

RÉFÉRENCES.....71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Les coefficients de colocalisation.....	16
Tableau 2.1 Liste de plasmides.....	27
Tableau 2.2 Liste des souches.....	29
Tableau 2.3 Liste des oligonucléotides.....	37

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma du nucléole montrant ses principales couches.....	2
Figure 1.2 Structure cristallographique du ribosome 80S de <i>S. cerevisiae</i>	4
Figure 1.3 Voie de maturation du pré-ARNr chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Figure 1.4 Le SSU processome.....	7
Figure 1.5 Bms1 et le SSU processome	9
Figure 1.6 Alignement de séquences Bms1 (partie N-terminale) de plusieurs organismes eucaryotes.....	10
Figure 1.7 Schéma de l'importation nucléaire	13
Figure 1.8 Manifestations cliniques d'un ACC.....	19
Figure 1.9 Manifestation clinique d'une hypoplasie des doigts.....	20
Figure 2.1. Schéma de la mutagenèse dirigée réalisée pour introduire la mutation dans Bms1.	24
Figure 2.2 Représentation schématique de la construction des souches YSP-PV, YSP-WT et YSP-R45T.	30
Figure 3.1 Vérification de l'intégration génomique dans la levure.	40
Figure 3.2 Tests de complémentation sur géloses.....	41
Figure 3.3 Cinétique de déplétion à 30°C en milieu liquide	42
Figure 3.4 Analyse de l'expression de Bms1 endogène et d'origine plasmidique au fil du temps de déplétion.	43
Figure 3.5 Analyse de la maturation des pré-ARNr par hybridation Northern.....	44
Figure 3.6. Profils de polysomes des souches YSP-WT et YSP-R45T lors d'une expérience de déplétion.....	45
Figure 3.7 Prédiction du NLS et du NoLS dans Bms1	47
Figure 3.8 Représentation schématique de Bms1	48
Figure 3.9. Validation des séquences NLS et NoLS putatives des souches YSPN60 et YSPN60KA.....	50
Figure 3.10 Validation des séquences putatives NLS et NoLS des souches YSPC89 et YSPC89KA.....	52
Figure 3.11 Analyse quantitative de la colocalisation des fragments de BMS1 étudiés avec les souches YSPC89 et YSPC89KA.....	53
Figure 3.12 Analyse quantitative de la colocalisation subcellulaire de RPS3.	54
Figure 4.1 Prédiction de l'impact des mutations R59T et R45T	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACC	Aplasia cutis congenita
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
CAI	Cirrhose amérindienne infantile
CC	Coefficient de chevauchement
DBA	Anémie de Diamond-Blackfan
DC	Dyskératose congénitale
DFC	Composant fibrillaire dense ("Dense fibrillar component")
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique ("Ethylenediaminetetraacetic Acid")
ETS	Espaceur transcrit externe ("External transcribed spacer")
FC	Centres fibrillaires ("Fibrillar center")
GC	Composant granulaire ("Granular component")
GFP	Protéine fluorescente verte ("Green fluorescent protein")
Imp α	Importine α
Imp β	Importine β
ITS	Espaceur transcrit interne ("Internal transcribed spacer")
LB	Luria-Bertrani

LiAc	Acétate de lithium
LSU	Grande sous-unité ("Large subunit")
NLS	Signal de localisation nucléaire ("Nuclear localization signal")
NoLS	Signal de localisation nucléolaire ("Nucleolar localization signal")
NOR	Région d'organisation nucléolaire ("Nucleolar organizer region")
NPC	Complexes de pores nucléaires ("Nuclear Pore Complex")
ORF	Cadre de lecture ouvert ("Open reading frame")
PCC	Coefficient de corrélation de Pearson ("Pearson correlation coefficient")
PCR	Réaction en chaîne par polymérase ("Polymerase chain reaction")
Pré-ARN	ARN ribosomique précurseur
PVDF	"Polyvinylidene fluoride"
Rpm	Révolutions per minute
SAO	Syndrome d'Adams-Oliver
SDS-PAGE	"Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
snoARN	Petit ARN nucléolaire
snoRNP	Petite ribonucléoprotéine nucléolaire ("Small nucleolar ribonucleoprotein")
SSU	Petite sous-unité ("Small subunit")
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µL	Microlitre
kDa	KiloDalton
MDa	MégaDalton
mM	Milimolaire
ng	Nanogramme

RÉSUMÉ

Le syndrome d'Adams-Oliver est une maladie génétique rare caractérisée par une aplasie cutanée congénitale et des hypoplasies des doigts. Nous étudions un nouveau variant de *BMS1*, nommé R59T, identifié chez une patiente présentant une hypoplasie des doigts, afin d'évaluer son impact potentiel sur la manifestation de ce syndrome. *BMS1* encode la GTPase Bms1 qui fait partie du "*small subunit processome*", essentiel à la maturation des ARNr et à la production des ribosomes. La levure *S. cerevisiae* a été choisie comme modèle en raison de la conservation de Bms1 chez les eucaryotes. Ce travail visait à créer une souche de levure pour étudier la mutation, ses effets sur la biogenèse des ribosomes et valider les séquences NLS et NoLS prédites de Bms1. La mutation R45T (R59T chez l'humain), a été introduite dans le gène *BMS1* de levure par mutagenèse dirigée, et la protéine mutée a été exprimée sous contrôle du promoteur *GAL1* inductible au galactose. Les tests de complémentation n'ont révélé aucun effet sur la viabilité cellulaire ni sur l'expression fonctionnelle de Bms1. L'analyse des ARNr et des profils de sédimentation n'a révélé aucun défaut de maturation ou dans la biogenèse des ribosomes, indiquant l'absence d'impact délétère de cette mutation chez la levure. Il est proposé que l'impact du variant humain R59T pourrait être mieux exploré dans un modèle eucaryote supérieur et plus proche de la complexité tissulaire de l'humain. Les résultats de l'étude des séquences de NLS/NoLS putatifs de Bms1 montrent que seulement celles de la région C-terminale de Bms1 ont présenté une localisation majoritairement nucléolaire, confirmant la présence d'un NoLS dans cette région. Cette recherche a permis de valider expérimentalement l'existence d'un véritable NoLS dans la région C-terminale de Bms1, contribuant ainsi à la compréhension des mécanismes qui régulent la localisation subcellulaire de la protéine Bms1.

Mots-clés : Syndrome d'Adams Oliver, biogénèse des ribosomes, SSU Processome, *BMS1*, *S. cerevisiae*, Ribosomopathies.

ABSTRACT

The Adams-Oliver syndrome is a rare genetic disorder characterized by congenital scalp aplasia and finger hypoplasia. We are studying a new variant of *BMS1*, named R59T, identified in a patient with finger hypoplasia, to assess its potential impact on the manifestation of this syndrome. *BMS1* encodes the GTPase Bms1, which is part of the "small subunit processome", essential for rRNA maturation and ribosome production. The yeast *S. cerevisiae* was chosen as a model due to the conservation of Bms1 in eukaryotes. This study aimed to create a yeast strain to investigate the mutation, its effects on ribosome biogenesis, and validate the predicted NLS and NoLS sequences of Bms1. The R45T mutation (R59T in humans) was introduced into the yeast *BMS1* gene by site-directed mutagenesis, and the mutated protein was expressed under the *GAL1* promoter, inducible with galactose. Complementation tests revealed no effect on cell viability or functional expression of Bms1. Analysis of rRNA and sedimentation profiles showed no defects in maturation or ribosome biogenesis, indicating the absence of detrimental effects of this mutation in yeast. It is suggested that the impact of the human variant R59T could be better explored in a higher eukaryotic model, closer to the tissue complexity of humans. The results of the study on the predicted NLS/NoLS sequences of Bms1 show that only those from the C-terminal region of Bms1 displayed a predominantly nucleolar localization, confirming the presence of a NoLS in this region. This research experimentally validated the existence of a true NoLS in the C-terminal region of *BMS1*, contributing to the understanding of the mechanisms regulating the subcellular localization of the Bms1 protein.

Keywords: Adams-Oliver Syndrome, ribosome biogenesis, SSU Processome, *BMS1*, *S. cerevisiae*, Ribosomopathies.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Cette section présente un groupe de notions ayant pour but de mettre en contexte le lecteur sur les mécanismes moléculaires et cellulaires dans lesquels le gène *BMS1* est impliqué. Les sujets abordés incluent une description des structures et des processus cellulaires impliqués dans la biogenèse des ribosomes, ainsi que la description de maladies associées aux défauts dans la fabrication de ribosomes connues sous le nom de ribosomopathies.

1.1 Le nucléole

Parmi les différents composants nucléaires, le nucléole est la structure la plus visible, occupant environ un tiers du volume nucléaire (Taddei & Gasser, 2012). Son importance réside dans son rôle central dans la biogenèse des ribosomes : c'est le site principal où se déroule la biogenèse des sous-unités ribosomiques chez les eucaryotes (Scheer & Hock, 1999; Dubois & Boisvert, 2016).

Ce sous-compartiment cellulaire, dépourvu de membrane, prend la forme d'une zone en croissant située à côté de l'enveloppe nucléaire. Il se forme autour des régions organisatrices nucléolaires (NOR), des régions chromosomiques riches en ADN ribosomique (ADNr). Le nucléole est caractérisé par une structure en trois parties: les centres fibrillaires (FC), le composant fibrillaire dense (DFC) et le composant granulaire (GC) (Figure 1.1; Shaw and Brown (2012)). Ces sous-structures sont le siège d'activités biologiques cruciales pour la biogenèse des ribosomes et jouent également un rôle crucial dans la régulation de divers processus cellulaires, notamment la sénescence, la régulation du cycle cellulaire, la réponse aux stress cellulaires et la défense contre les infections virales (Boulon et al., 2010).

Le nucléole est formé d'un gros agrégat de macromolécules incluant les ARNr, produits dans cette structure, et constituant des éléments fondamentaux des ribosomes, les machines cellulaires de traduction protéique (Hernandez - Verdun et al., 2010). Il renferme également les petits ARN nucléolaires (snoARN) et des protéines nucléolaires;

ces protéines interagissent avec les ARNr et d'autres ARN pour former des complexes ribonucléoprotéiques, participant ainsi activement à la biogenèse des ribosomes.

Le rôle du nucléole dans les étapes initiales de la biogenèse des ribosomes comprend la transcription dirigée par l'ARN polymérase I (Pol I), le traitement et la modification de l'ARN ribosomique (ARNr), et l'assemblage de complexes contenant de l'ARNr : 18S, 5.8S et 25S (Shaw & Brown, 2012). Ces processus impliquent une coordination entre de nombreux facteurs protéiques et des snoARN qui agissent ensemble pour assurer la précision des modifications chimiques des ARNr, ainsi que pour faciliter le repliement et le clivage du pré-ARNr (Lafontaine et al., 2021).

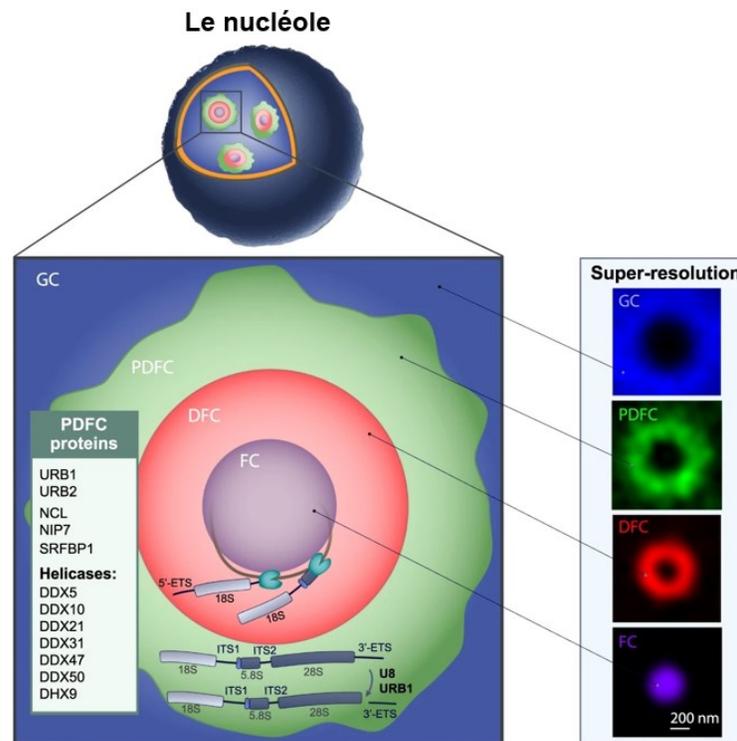


Figure 1.1 Schéma du nucléole montrant ses principales couches

Les centres fibrillaires (FC), le composant fibrillaire dense (DFC) et le composant granulaire (GC). La périphérie du composant fibrillaire dense (PDFC) est également montrée (image tirée de Lafontaine (2023)).

En raison de son importance vitale dans la synthèse des protéines et la régulation de la machinerie cellulaire, le nucléole est une cible d'étude majeure pour la compréhension

des processus biologiques fondamentaux et des maladies associées à des dysfonctionnements de la biogenèse des ribosomes.

1.2 Le ribosome

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique qui permet la traduction du code génétique contenu dans l'ARNm pour déclencher la synthèse de protéines fonctionnelles dans les organismes (Woolford Jr & Baserga, 2013).

Un ribosome eucaryote complet (Figure 1.2) possède un coefficient de sédimentation d'environ 80S et il est composé de deux sous-unités. La petite sous-unité (40S), possédant 33 protéines ribosomiques et l'ARNr 18S, fonctionne comme le centre de décodage, facilitant l'interaction entre l'ARNm et les ARNt aminoacylés. La grande sous-unité (60S) contient 46 protéines ribosomiques et trois ARNr, le 25S, le 5.8S et le 5S; elle héberge l'activité peptidyl transférase, qui catalyse la formation des liaisons peptidiques (de la Cruz et al., 2015). Des études utilisant la microscopie électronique cryogénique et la cristallographie à rayons X ont permis d'améliorer les connaissances sur l'assemblage et la fonction des ribosomes eucaryotes. Les structures montrent que l'ARN se trouve au centre de chaque partie du ribosome, avec des protéines ribosomiques attachées à la surface; les séquences d'ARNr 18S se plient en quatre domaines structuraux secondaires conservés tandis que les ARNr 5.8S et 25S dans la grande sous-unité (LSU) se plient en six domaines conservés de structure secondaire (Woolford Jr & Baserga, 2013)

La fonction principale du ribosome est la traduction de l'information génétique. La traduction est divisée en trois étapes majeures : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Ramakrishnan, 2002). Lors de l'étape d'initiation, la petite sous-unité 40S du ribosome reconnaît le codon d'initiation de l'ARNm, formant un complexe d'initiation avec des facteurs spécifiques. Ensuite, lors de l'élongation, le ribosome parcourt l'ARNm codon par codon, permettant l'appariement des ARN de transfert (ARNt) porteurs d'acides aminés spécifiques et la formation d'une chaîne polypeptidique croissante. Enfin, lors de la terminaison, le ribosome atteint un codon stop, libérant la protéine nouvellement synthétisée.

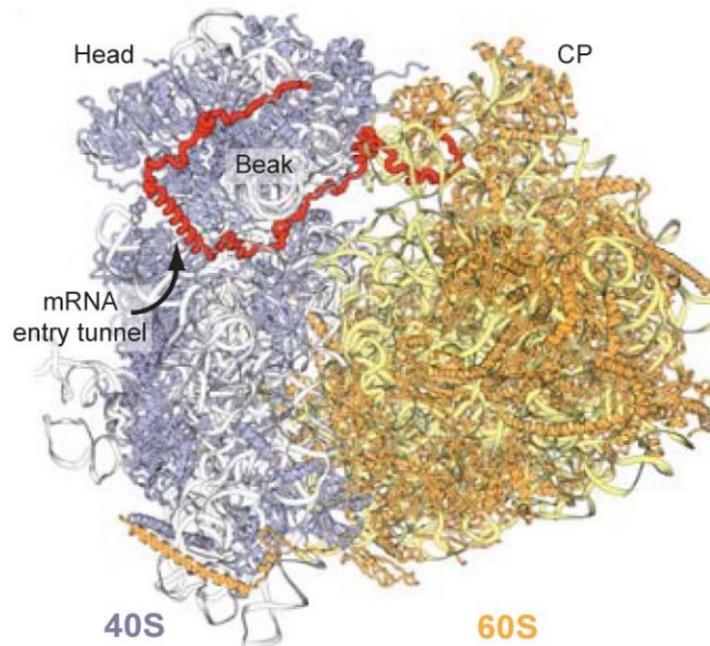


Figure 1.2 Structure cristallographique du ribosome 80S de *S. cerevisiae*

La figure illustre la structure du ribosome de *S. cerevisiae*, mettant en évidence ses deux sous-unités. La sous-unité 40S est identifiable par sa région appelée "tête", qui est orientée vers l'ARN messager (ARNm). On observe également le "tunnel de l'ARNm", un passage à travers lequel l'ARNm est guidé pendant la traduction. La région "bec" est située à l'extrémité de la tête de la sous-unité 40S, jouant un rôle crucial dans l'interaction avec l'ARNm. Enfin, la "protubérance centrale" (CP) de la sous-unité 60S est visible, un élément clé pour l'interaction avec les facteurs de traduction et l'ARN de transfert (ARNt) au sein du ribosome. Image tirée de Ben-Shem et al. (2011)

1.3 La biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes est un processus complexe et hautement régulé qui donne comme résultat la formation fonctionnelle des ribosomes. Ce processus comporte plusieurs étapes clés, allant de la transcription des ARN ribosomiques (ARNr) à leur maturation et à l'assemblage final des sous-unités ribosomiques.

Chez *S. cerevisiae*, la biogenèse des ribosomes commence avec la transcription du transcrite 35S primaire, qui se déroule dans le nucléole (Venema & Tollervey, 1999; Kressler et al., 1999). Ce transcrite contient le ARNr 18S nécessaire pour former la petite

sous-unité 40S, ainsi que les ARNr 5.8S et 25S qui vont être destinés à la formation de la grande sous-unité 60S (Figure 1.3A). Le transcrit contient également des séquences d'ARN appelées espaceurs transcrits internes (ITS) qui séparent les ARNr, et qui sont éliminées au cours de la maturation de l'ARNr. D'un autre côté, l'ARNr 5S qui fait partie de la grande sous-unité 60S est transcrit par l'ARN polymérase III (Woolford Jr & Baserga, 2013) .

Le processus de maturation de l'ARNr commence avec une série de réactions endonucléolytiques et exonucléolytiques auxquelles est soumis le pré-ARNr 35S (Figure 1.3B); ces réactions ou clivages ont lieu premièrement aux sites A_0 , A_1 et A_2 : L'espaceur externe transcrit (ETS) situé en 5' est coupé par des clivages aux sites A_0 pour former le pré-ARNr 33S, et puis au site A_1 pour former le pré-ARNr 32S. Ensuite, le clivage au site A_2 dans l'ITS1 sépare le pré-ARNr 20S, précurseur de l'ARNr 18S et le pré-ARNr 27SA₂, précurseur des ARNr 25S et 5.8S.

Le pré-ARNr 20S est ensuite exporté vers le cytoplasme où il subit un dernier clivage au site D dans l'ITS1 pour former l'ARNr 18S mature. Pour sa part, le traitement du pré-ARNr 27SA₂ peut suivre deux chemins alternatifs. Dans un premier chemin, le pré-ARNr 27SA₂ est coupé pour former l'intermédiaire 27SA₃ via un clivage au site A_3 fait par la RNase MRP dans l'ITS1. Un autre clivage est fait par les exonucléases 5'-3' Rat1 et Rrp17 au site B1_S pour former le 27SB_S. Le deuxième traitement alternatif du pré-ARNr 27SA₂ est constitué par un clivage au site B1_L pour former le pré-ARN 27SB_L (Venema & Tollervey, 1999). Le pré-ARNr 27SB_S et le pré-ARNr 27SB_L subissent un traitement identique par clivage endonucléolytique au site C₂ dans l'ITS2 pour générer les pré-ARNr 25.5S et 7S_S ou 7S_L. Finalement, le pré-ARNr 26S est clivé au site C₁ pour former le ARNr mature 25S tandis que le pré-ARN 7S_S ou 7S_L sont clivés au site E pour former les ARN matures 5.8S_S ou 5.8S_L.

Structure et traitement des pré-ARN

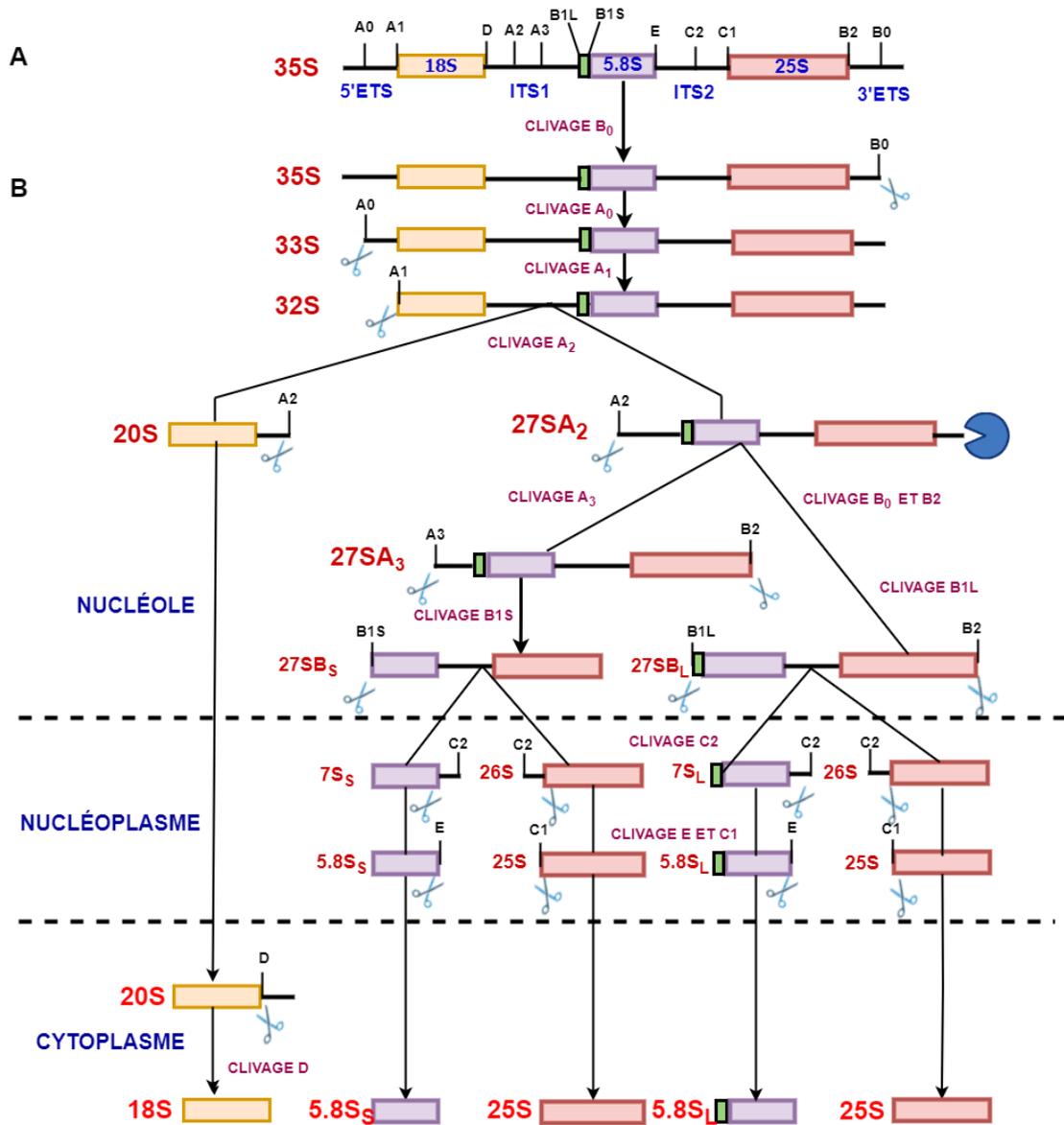


Figure 1.3 Voie de maturation du pré-ARNr chez *Saccharomyces cerevisiae*

(A) Schéma de la structure du transcrite primaire 35S. **(B)** La maturation des ARNr 18S, 5.8S et 25S implique une série de clivages pour enlever les espaceurs internes transcrits (ITS) et les espaceurs externes transcrits (ETS). Ce processus commence dans le nucléole et continue dans le nucléoplasme et le cytoplasme.

1.4 Le SSU processome

Le SSU processome est un complexe ribonucléoprotéique essentiel à la biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes, jouant un rôle déterminant dans l'assemblage de la petite sous-unité 40S du ribosome et dans la maturation de l'ARN ribosomique 18S (Dragon et al., 2002; Bernstein et al., 2004).

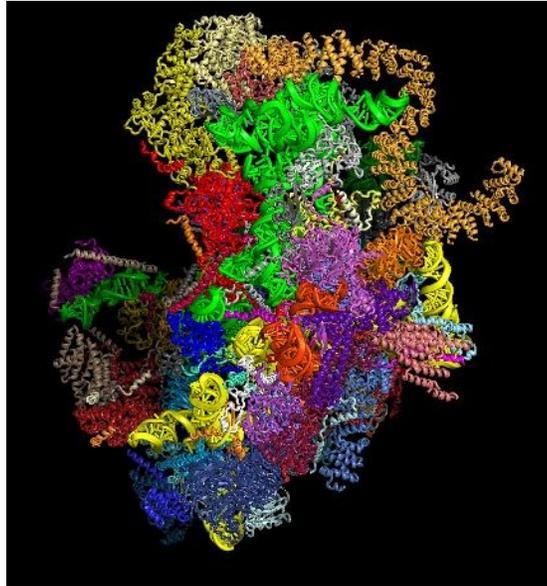


Figure 1.4 Le SSU processome

Bien que l'importance de ses complexes soit connue et que plusieurs facteurs d'assemblage aient été associés à des maladies, on connaît encore très peu la structure, la fonction et la maturation du SSU processome (image adaptée de Cheng et al. (2020)).

Le SSU processome agit comme une machine moléculaire complexe qui coordonne les différentes étapes de la maturation de l'ARNr 18S, y compris la transcription, la maturation et la modification post-transcriptionnelle. Il est composé du petit ARN nucléolaire U3 (U3 snoARN) et plus de 70 protéines ou facteurs d'assemblage (Dragon et al., 2002) qui sont réunis en 5 sous-complexes tUtp/UtpA, UtpB, UtpC, Mpp10, et le U3 snoRNP (Vincent et al., 2018).

Les composants protéiques du SSU processome incluent des facteurs de clivage de l'ARNr, des enzymes de modification, ainsi que des chaperons protéiques qui facilitent le

repliement correct des pré-ARNr (Kressler et al., 2010). Le SSU processome joue un rôle crucial dans la biogenèse des ribosomes en catalysant les étapes initiales du clivage du pré-ARNr 35S qui est une étape essentielle pour générer l'ARNr 18S mature, une composante indispensable de la petite sous-unité des ribosomes (Fatica & Tollervey, 2002). Le SSU processome participe de façon cruciale au traitement initial de l'ARN ribosomique précurseur (pré-ARNr), particulièrement pour les clivages aux sites A₀, A₁ et A₂ du pré-ARNr (Woolford Jr & Baserga, 2013). Ces clivages permettent de différencier les processus de formation de la petite sous-unité ribosomique (SSU) de ceux de la grande sous-unité (LSU). En effet, ces deux processus de formation prennent deux chemins différents à partir du clivage au site A₂, ce qui va permettre que la maturation de l'ARNr 18S et la maturation des ARNr 25S et 5.8S se fasse de façon séparée. L'ARNr 5S est synthétisé séparément par l'ARN polymérase III avant d'être incorporé à la grande sous-unité ribosomique (LSU). Après leur transport vers le cytoplasme, les sous-unités matures LSU et SSU s'associent pour constituer le ribosome complet de 80S (Vincent et al., 2018).

Le SSU processome coordonne non seulement le clivage, mais également la transcription, la modification chimique et l'assemblage du pré-ARNr. En se liant au pré-ARNr 35S, précurseur des ARNr 18S, 5.8S et 25S chez *S. cerevisiae*, le complexe facilite diverses modifications chimiques, telles que les méthylations et les pseudouridylation. Ces modifications sont souvent guidées par des snoARN spécifiques, qui jouent un rôle clé dans l'orientation des modifications nécessaires pour la maturation correcte de l'ARNr (Kornprobst et al., 2016).

Les dysfonctionnements du SSU processome ou des mutations dans ses composants peuvent entraîner des défauts dans la biogenèse des ribosomes, conduisant à des maladies appelées ribosomopathies. Ces conditions sont souvent caractérisées par des anomalies de croissance et des prédispositions à certains cancers, soulignant l'importance vitale du SSU processome dans la biologie cellulaire et la santé humaine (Narla & Ebert, 2010).

1.5 Le gène *BMS1*

BMS1 est un gène essentiel qui code pour la protéine Bms1, une GTPase nucléolaire hautement conservée chez les eucaryotes, qui joue un rôle crucial dans la biogenèse des ribosomes (Gelperin et al., 2001). Bms1 fait partie du SSU processome (Figure 1.5A) et est associée à Rcl1, une protéine également impliquée dans la biogenèse des ribosomes, pour former le complexe Rcl1-Bms1, où Bms1 agit comme un facteur de recrutement de Rcl1 sur la snoRNP U3 au sein des pré-ribosomes (Gelperin et al., 2001; Karbstein & Doudna, 2006; Wegierski et al., 2001).

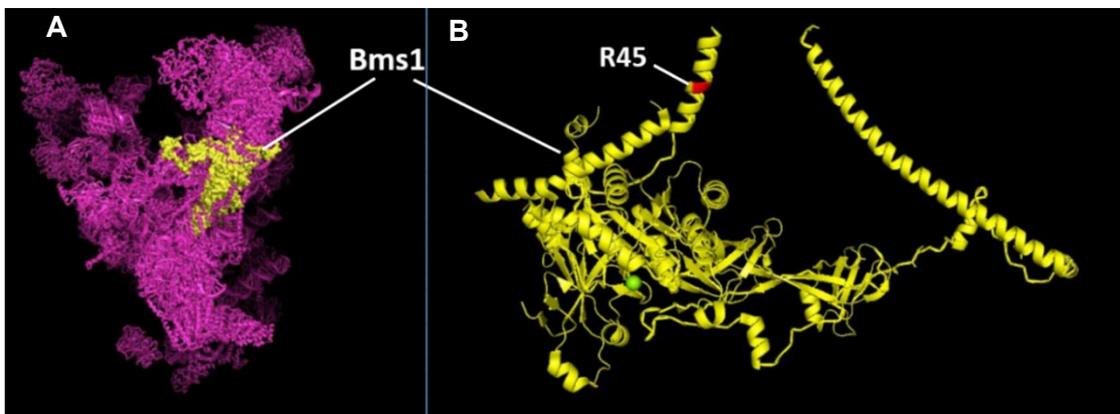


Figure 1.5 Bms1 et le SSU processome

(A) SSU processome, un méga-complexe nucléolaire de 6,6 MDa, essentiel à la maturation de l'ARNr et la production des ribosomes. La région colorée en jaune montre l'endroit où Bms1 est localisée dans ce complexe. **(B)** La GTPase Bms1. À titre indicatif, la position de l'arginine 45, sujet de cette étude, est indiquée en rouge. (Image adaptée de Cheng et al., 2020).

Les deux protéines sont requises pour le traitement du pré-ARNr aux sites de clivage A_0 , A_1 et A_2 nécessaires pour la maturation de l'ARNr 18S et la formation de la petite sous-unité 40S. En effet, la déplétion de Bms1 occasionne des défauts dans le traitement du pré-ARNr se traduisant dans la diminution du niveau d'ARNr 18S, de son précurseur immédiat 20S et en conséquence des sous-unités 40S (Wegierski et al., 2001). Des études effectués par Wang et al. (2012) suggèrent que *BMS1* est essentiel pour le développement du foie chez le poisson zèbre *Danio rerio* et des mutations dans le gène *shq1* (*BMS1*) de *D. rerio* entraînent une hypoplasie du foie.

petites protéines (<40 kDa) et le passage de plus grandes molécules qui contiennent un signal de ciblage approprié (Paine et al., 1975; Bonner, 1978). Ce système de transport est régulé par un mécanisme de reconnaissance de séquences d'acides aminés spécifiques. Ainsi, seules les protéines arborant ces séquences particulières sont acheminées vers leur destination. Les séquences les plus étudiées à ce jour sont les signaux de localisation nucléaire (NLS). L'existence des NLS a été mentionnée pour la première fois dans le cadre de l'analyse des mutants du virus simien 40 (SV40); la séquence NLS, composée de sept acides aminés Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val (PKKKRKV) a été identifiée dans l'antigène grand T du SV40 (Kalderon et al., 1984).

Les NLS classiques sont constitués des motifs d'acides aminés basiques et chargés positivement, contenant généralement de l'arginine (R) ou de la lysine (K) (Lu et al., 2021). Il existe deux types de NLS classiques : les NLS monopartites sont composés d'un seul groupe de 4 à 8 acides aminés ayant les caractéristiques précédemment mentionnées; la séquence NLS identifiée dans SV40 est un exemple d'un NLS classique. Les NLS bipartites se distinguent par la présence de deux groupes d'acides aminés basiques, chacun composé de 2 à 3 acides aminés chargés positivement, séparés par une région de liaison de 9 à 12 acides aminés comprenant plusieurs résidus de proline (P); un exemple de NLS bipartite est la séquence NLS de la nucléoplasmine (KRPAATKKAGQAKKKK) (Lange et al., 2007).

Il existe des NLS non classiques, moins couramment observés, qui se composent des séquences qui ne ressemblent pas aux NLS classiques et ne sont pas riches en résidus arginine ou lysine. Parmi cette catégorie se trouvent les NLS proline-tyrosine (PY-NLS) qui sont composés par 20-30 aa. Ce signal se caractérise par la présence de séquences riches en proline (P) et tyrosine (Y), disposées de manière particulière pour faciliter le transport nucléaire de certaines protéines.

D'autres types de NLS non classiques sont également connus, des séquences structurales complexes, ainsi que des interactions avec des partenaires protéiques qui favorisent le transport nucléaire (Lu et al., 2021). Le NLS putatif présente une séquence d'acides aminés basiques qui favorise l'importation nucléaire, même si certains de ces NLS putatifs ne possèdent pas cette fonction manquant de cette fonction. Les NLS

d'épitope spatial résultent de la contribution combinée de plusieurs sous-unités qui, une fois assemblées, forment une structure reconnue pour l'importation nucléaire. Les NLS cryptiques restent inactifs jusqu'à ce qu'un signal spécifique les rende accessibles, comme observé avec le facteur FGF2. Les NLS multiples, présents dans certaines protéines, agissent ensemble pour assurer une localisation nucléaire efficace, comme illustré par les protéines MSX1 et PML/RAR α .

Le transport actif médié par les NLS commence dans le cytoplasme où l'importine α (Imp α) reconnaît la séquence du NLS et se lie à la protéine qui la possède; Imp α se lie également avec l'importine β (Imp β) qui médie l'interaction avec les pores nucléaires (Figure 1.7A).

Ce complexe trimérique se déplace vers l'enveloppe nucléaire, qui constitue la barrière entourant le noyau de la cellule, et se lie au NPC pendant sa translocation dans le noyau. Une fois dans le noyau, Imp β se lie à la forme active de la GTPase Ran (RanGTP), provoquant un changement conformationnel qui entraîne sa dissociation d'Imp α . Après cette dissociation, la nucléoporine Nup50 catalyse la libération de la protéine porteuse du NLS dans le noyau (Lu et al., 2021).

Après la dissociation, Cse1/CAS en association avec RanGTP exportent Imp α vers le cytoplasme (voir Figure 1.7B), permettant ainsi de commencer un nouveau cycle de transport nucléaire (Lange et al. (2007), Lu et al. (2021)). Cette interaction spécifique permet de garantir un transfert efficace des protéines entre le cytoplasme et le noyau cellulaire, assurant ainsi la régulation précise des processus biologiques qui dépendent de cette dynamique de transport intracellulaire.

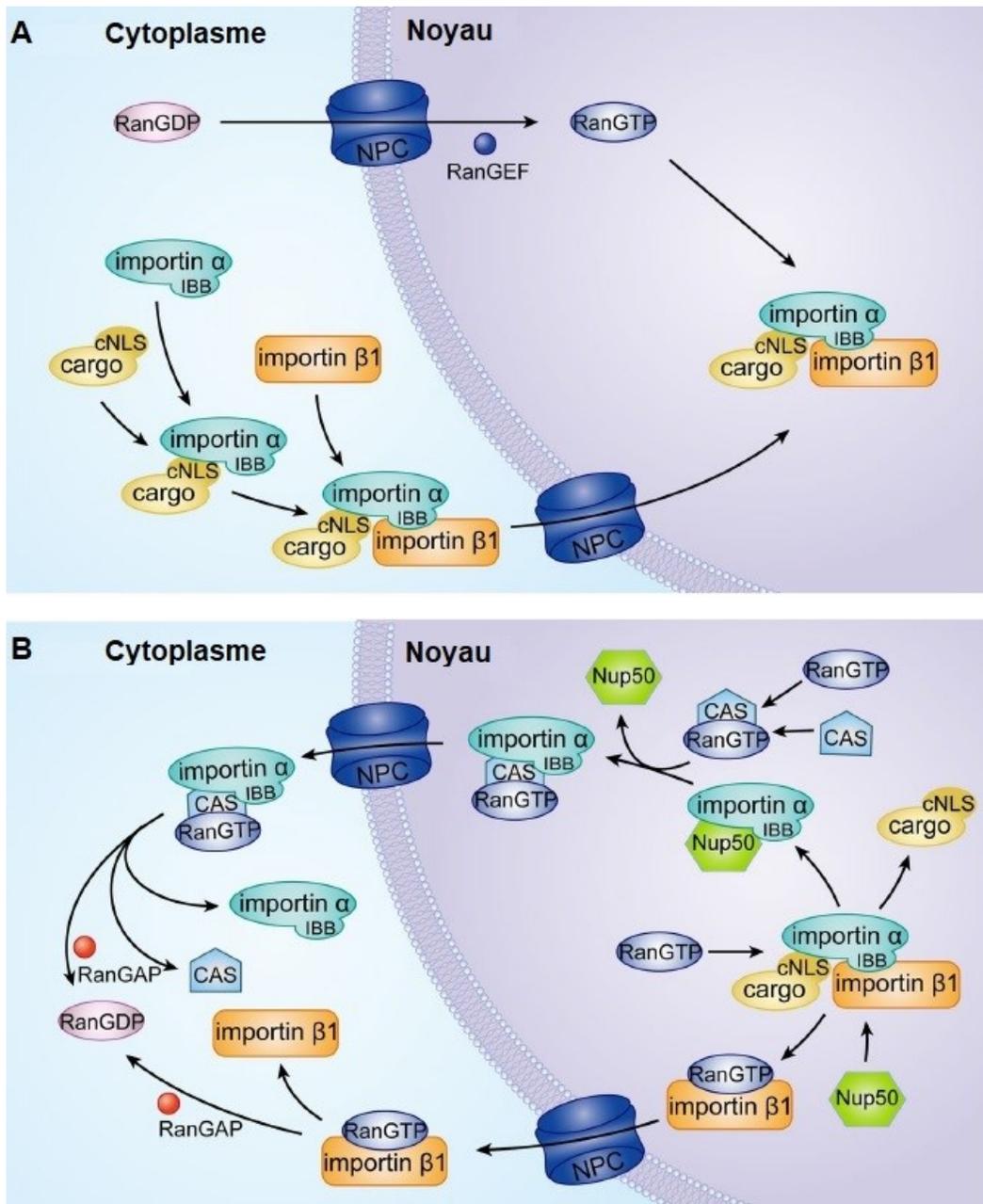


Figure 1.7 Schéma de l'importation nucléaire

Les protéines portant une séquence de localisation nucléaire (NLS) sont transportées du cytosol au noyau via les pores nucléaires (A). Une fois liée à l'importine, la protéine cargo passe à travers ces pores. À l'intérieur du noyau, le Ran-GTP libère la protéine cargo de l'importine. Ce complexe Ran-GTP-importine retourne alors au cytosol (B), où l'importine est libérée à la suite de l'hydrolyse du GTP en GDP (Image tirée de Lu et al. (2021)).

Les signaux de localisation nucléolaire (NoLS), sont des séquences d'acides aminés spécifiques qui dirigent les protéines nucléolaires vers le nucléole où elles exercent diverses fonctions essentielles tel que la transcription des gènes ribosomiques, la maturation des ARN ribosomiques, la formation des ribosomes et la régulation de l'activité enzymatique et de l'assemblage moléculaire au sein du nucléole.

Les NoLS ont été peu caractérisés, et des études reportent qu'ils sont également composés principalement d'arginines et lysines. La différenciation entre séquences NLS et NoLS semble parfois être difficile étant donné la diversité de la composition des NLS et le fait que certaines protéines possèdent de multiples signaux de localisation subcellulaire : donc elles peuvent être localisées à la fois dans le noyau, le nucléole ou le cytoplasme (Reed et al., 2006). Étant donné que le nucléole ne possède pas une barrière le séparant du nucléoplasme qui l'entoure, l'idée que la localisation nucléolaire d'une protéine est le résultat d'une interaction directe ou indirecte de la protéine avec l'un des composants du nucléole est actuellement acceptée (Carmo-Fonseca et al., 2000). En conséquence, les protéines portant un NLS pourraient aussi posséder des domaines de liaison responsables des interactions à haute affinité avec les composants du nucléole entraînant ainsi l'accumulation de ces protéines dans le nucléole (Emmott & Hiscox, 2009).

1.7 La colocalisation subcellulaire

D'un point de vue biologique, le terme colocalisation désigne la présence de deux ou plusieurs molécules distinctes au même emplacement physique dans une structure cellulaire (Zinchuk et al., 2007). La détermination de la colocalisation subcellulaire aide à mieux comprendre les interactions spatiales des protéines et les mécanismes sous-jacents régulant certaines fonctions cellulaires essentielles. Avec le marquage des protéines et des structures cellulaires avec des fluorochromes émettant un signal vert ou rouge, la colocalisation peut être observée en utilisant la microscopie à fluorescence. Cette technique repose d'abord sur une analyse visuelle des images superposées provenant généralement des canaux rouge et vert qui peuvent montrer des zones où les signaux des deux canaux se chevauchent et qui apparaissent généralement en couleur jaune (Zinchuk et al., 2007). Cependant, cette superposition visuelle, bien qu'utile, ne peut pas quantifier le degré de colocalisation ni distinguer entre une vraie colocalisation et une

coïncidence due au bruit de fond; de plus, l'œil humain est limité dans sa capacité à discerner les variations subtiles d'intensité et de distribution spatiale.

Plutôt que de s'appuyer seulement sur une couleur de colocalisation qui peut donner des résultats trompeurs, il est nécessaire d'obtenir des informations plus précises et fiables de la colocalisation, fournies par une analyse quantitative généralement effectuée avec des coefficients de colocalisation calculés par des algorithmes (Zinchuk et al., 2007). L'utilité de ces coefficients est de caractériser le degré de chevauchement entre deux canaux dans une image de microscopie en termes mathématiques.

Il y a deux types de colocalisation : *la co-occurrence* et *la corrélation*. La co-occurrence mesure si deux protéines et/ou structures cellulaires marquées avec des fluorophores apparaissent dans la même région de l'espace, un peu comme deux personnes se trouvant fréquemment dans la même pièce sans nécessairement interagir. Le coefficient de Manders est un exemple de co-occurrence, qui quantifie le chevauchement de deux images en tenant en compte de l'intensité des pixels (Manders et al., 1993).

En revanche, *la corrélation* évalue dans quelle mesure les variations d'abondance de deux fluorophores qui se chevauchent spatialement, sont liées (Aaron et al., 2018). Cette approche mesure la force de la relation linéaire entre les deux fluorophores qui se chevauchent, en vérifiant si l'intensité du signal rouge augmente ou diminue parallèlement à celle du signal vert. Le coefficient de corrélation de Pearson (PCC) est le plus couramment utilisé pour quantifier ce type de colocalisation; il évalue si, lorsqu'une variable augmente, l'autre a tendance à augmenter aussi (corrélation positive), à diminuer (corrélation négative) ou si elles n'ont pas de lien particulier (absence de corrélation). Ce coefficient varie de -1 à +1 : une valeur proche de +1 indique une forte corrélation positive, -1 indique une forte corrélation négative, et 0 signifie qu'il n'y a pas de relation linéaire.

Ces dernières années, le coefficient de Costes, basé sur le PCC, a également gagné en importance. Contrairement au coefficient de Pearson qui peut être affecté par le bruit de fond et les variations d'intensité dans l'image, le coefficient de Costes corrige automatiquement ces biais, offrant ainsi une estimation plus précise de la corrélation entre deux signaux, surtout lorsque la qualité de l'image est variable. Le Tableau 1.1 présente

une description de chacun des coefficients mentionnés ainsi que leur intervalle de valeurs, facilitant ainsi leur interprétation.

Tableau 1.1 Les coefficients de colocalisation

Coefficient	Description	Intervalle de valeurs
Pearson	Décrit la corrélation entre la distribution des intensités dans les deux canaux. Indique dans quelle mesure elles varient ensemble	Entre 0 et -1 : Corrélation négative. À partir de 0.5 : Corrélation positive Entre 0.7 et 1 : Forte corrélation
Manders, coefficients M1 et M2	Mesure le chevauchement de deux images tout en tenant en compte le l'intensité des pixels. Il représente la quantité totale ou l'abondance, de fluorophores qui se chevauchent sans tenir en compte le degré de corrélation. <i>Les coefficients M1 et M2</i> : indiquent la proportion de signal de chaque canal qui se superpose à l'autre, révélant la contribution spécifique de chaque canal aux pixels colocalisés.	Range de valeurs de 0 à 1.0 Une valeur de 0.5 indique que 50% des canaux sélectionnés colocalisent Ex. M1=1.0 (rouge) et M2=0,2 (vert). Signifie que tous les pixels rouges colocalisent avec le vert mais seulement 20% des pixels verts colocalisent dans le rouge
Costes	Détermine si la colocalisation observée entre deux canaux est significative ou due au hasard	Le coefficient de colocalisation est calculé pour des pixels choisis aléatoirement, répété plusieurs fois pour créer une distribution aléatoire de valeurs. Ensuite, on compare le coefficient de colocalisation de l'image originale à cette distribution aléatoire. Si le coefficient de l'image originale est significativement plus élevé, cela indique une colocalisation réelle plutôt qu'un hasard.

1.8 Les ribosomopathies

Les ribosomopathies sont un groupe de maladies génétiques rares qui sont principalement causées par des anomalies touchant les facteurs de biogenèse des ribosomes (Mills & Green, 2017). Ces anomalies peuvent résulter de mutations dans les gènes impliqués dans la synthèse et la maturation des sous-unités ribosomiques ou dans les voies de signalisation associées à la régulation de la biogenèse des ribosomes.

Les ribosomopathies sont caractérisées par une variété de symptômes qui peuvent affecter plusieurs systèmes d'organes, y compris les systèmes hématopoïétique, musculosquelettique, cutané, et génito-urinaire. Parmi les symptômes courants, on retrouve l'anémie, les troubles de la croissance, les anomalies faciales, les malformations congénitales, et les risques accrus de cancer (De Keersmaecker et al., 2015). Plusieurs gènes sont impliqués dans les ribosomopathies, y compris ceux codant pour les protéines ribosomiques, ainsi que pour les facteurs de la biogenèse des ribosomes.

À ce jour, huit maladies sont répertoriées dans la liste des ribosomopathies. L'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) est une maladie congénitale rare caractérisée par une anémie sévère qui entraîne une production réduite de globules rouges et une insuffisance de transport de l'oxygène. La DBA est associée à des mutations dans les gènes des protéines ribosomiques, principalement *RPS19* (Siva et al., 2019). Le syndrome 5q, se manifestant par une anémie macrocytaire, est lié à l'haploinsuffisance du gène *RPS14* (Nakhoul et al., 2014). Le syndrome de Schwachman-Diamond (SDS) est causé par des mutations dans le gène *SBDS* et se caractérise par une insuffisance pancréatique exocrine, des anomalies hématologiques, des problèmes neurocognitifs et un dysfonctionnement hépatique (Dror et al., 2011). Les mutations du gène *DKC1* provoquent la dyskératose congénitale (DC) liée à l'X, la forme la plus courante signalée de la DC avec des anomalies mucocutanées, une fibrose pulmonaire et une insuffisance médullaire (Mason & Bessler, 2011). L'hypoplasie du cartilage et des cheveux est une condition osseuse constitutionnelle due à des mutations du gène *RMRP*, se manifestant par une petite taille, des déformations osseuses et des anomalies de croissance des cheveux (Nakhoul et al., 2014). Le syndrome de Treacher-Collins est associé à des mutations dans le gène *TCOF1*, avec des anomalies crânio-faciales (Schlump et al., 2012) tandis que le syndrome de Bowen-Conradi est caractérisé par de graves problèmes de croissance dus

à des mutations dans le gène *EMG1* (Armistead et al., 2009). Enfin, la cirrhose amérindienne infantile (CAI) est une forme de cholestase non syndromique héréditaire à transmission autosomique récessive touchant spécifiquement les enfants amérindiens du Nord-Ouest du Québec, causée par une mutation du gène *UTP4* codant pour la protéine Cirhin, et se manifestant cliniquement par une cirrhose biliaire et une hypertension portale (Chagnon et al., 2002).

1.9 Le syndrome d'Adams-Oliver

Le syndrome d'Adams-Oliver (SAO) est une maladie congénitale rare, décrite pour la première fois en 1945 chez une famille de Minneapolis touchant trois générations. Ce syndrome se caractérise par une combinaison d'anomalies du développement du cuir chevelu, connues sous le nom d'aplasia cutis congenita (ACC), et des malformations des mains et des pieds (Adams and Oliver, 1945; Hased et al., 2017) et souvent associée à des anomalies cardiovasculaires congénitales (Meester et al., 2018). L'ACC est un défaut congénital où une partie de la peau, généralement au sommet du crâne, est absente à la naissance. Cette condition peut varier en gravité, allant de petites lésions cicatricielles à de larges zones dépourvues de peau. Dans certains cas, l'ACC peut affecter d'autres parties du corps, bien que cela soit moins fréquent. Les lésions caractéristiques de l'ACC se manifestent généralement dans les régions pariétales et occipitales (Figure 1.8), mais peuvent aussi apparaître au niveau des extrémités et l'abdomen (Lehman et al., 2016).

Dans le SAO, des anomalies des membres englobent diverses malformations, telles que l'hypoplasie des doigts (Figure 1.9) et des orteils, la brachydactylie et l'oligodactylie. Les membres supérieurs et inférieurs peuvent être asymétriquement affectés. Certains individus présentent des syndactylies ou des malformations plus sévères, comme l'absence totale de certains os longs. Les malformations des extrémités varient en gravité, allant de phalanges distales courtes unilatérales ou bilatérales à l'absence totale des doigts, orteils, mains ou pieds.

Actuellement, des mutations dans les gènes *ARHGAP31*, *DLL4*, *NOTCH1*, *RBPJ*, sous forme autosomique dominante et les gènes *DOCK6*, *EOGT* sous forme autosomique récessive, sont associées à l'origine du SAO (Meester et al., 2018). L'implication d'une

mutation dans le gène *BMS1*, un facteur essentiel à la biogenèse des ribosomes, a été documentée chez plusieurs membres d'une famille atteints d'ACC (Marneros, 2013), l'une des manifestations du SAO. Ces individus, portent la mutation hétérozygote c.2789G>A qui entraîne la substitution d'une arginine par une histidine. De plus, une autre mutation dans *BMS1* a été identifiée chez un patient du Dr. Philippe Campeau du CHU Sainte-Justine présentant une hypoplasie des doigts, l'autre manifestation clinique du SAO. Ces observations suggèrent l'implication potentielle des mutations dans *BMS1* dans le développement de cette maladie rare.



Figure 1.8 Manifestations cliniques d'un ACC

Les images montrent des exemples des manifestations cliniques d'un ACC sous la forme autosomique dominant chez les membres d'une famille. (Tiré de Marneros (2013))

Plus récemment, le Dr Philippe Campeau, médecin et chercheur en Santé musculosquelettique du Centre Hospitalier Universitaire Ste-Justine, a identifié une mutation ponctuelle dans le gène *BMS1* chez une patiente affectée par une hypoplasie des doigts, caractéristique du SAO. Il s'agit d'une variante hétérozygote rare dans *BMS1* c.176G>C qui cause une substitution d'une arginine pour une thréonine dans la GTPase Bms1. Les deux variantes de *BMS1* associées à une des manifestations cliniques différentes de SAO, suggèrent que les mutations de *BMS1* pourraient jouer un rôle important dans cette maladie.



Figure 1.9 Manifestation clinique d'une hypoplasie des doigts

L'image montre une hypoplasie de l'abduction du pouce droit où le pouce s'éloigne de la paume de la main, perpendiculairement aux autres doigts. L'abduction du pouce est un mouvement crucial pour la préhension et la manipulation des objets. Image tirée de Wang et al. (2021)

1.10 La levure *Saccharomyces cerevisiae*

La levure bourgeonnante *S. cerevisiae* est un organisme eucaryote largement étudié en tant que modèle expérimental en biologie moléculaire et cellulaire (Mohammadi et al., 2015). *S. cerevisiae* est caractérisée par des cellules rondes à ovoïdes, d'un diamètre de 5 à 10 μm , se reproduisant par bourgeonnement. Elle existe sous des formes diploïdes (deux paires de chromosomes) et haploïdes (une seule paire de chromosomes), facilitant ainsi les croisements et la visualisation directe des caractères phénotypiques (Prescott, 2013). Le cycle de vie de *S. cerevisiae* alterne entre les phases haploïde et diploïde, ce qui permet à la levure de s'adapter efficacement aux conditions environnementales. Les cellules haploïdes, de types sexuels α et a , peuvent se conjuguer pour former une cellule diploïde en conditions favorables. Cette cellule diploïde se divise alors par mitose pour croître et proliférer. En cas de stress, elle subit une méiose, produisant des spores haploïdes résistantes. Ces spores peuvent germer et se diviser indépendamment lorsqu'elles rencontrent un environnement favorable (Herskowitz, 1988)

S. cerevisiae est fréquemment utilisée comme modèle pour étudier les aspects fondamentaux de la biologie cellulaire chez les eucaryotes, principalement dû au fait que

son génome est facilement manipulable, son cycle de vie est court et sa croissance est rapide en comparaison avec d'autres modèles animaux.

L'homologie significative existant entre les protéines chez la levure et chez l'humain à également favorisé son utilisation pour l'étude de maladies génétiques humaines; de nombreux processus biologiques fondamentaux sont conservés entre ces organismes. Par exemple, les voies de signalisation, la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction des protéines sont des processus essentiels similaires dans les deux organismes (Mohammadi et al., 2015). C'est pourquoi *S. cerevisiae* a été utilisée comme un modèle eucaryote pour comprendre les mécanismes moléculaires fondamentaux qui sont conservés à travers l'évolution chez les eucaryotes.

Le génome de *S. cerevisiae* a été entièrement séquencé en 1996 (Goffeau et al., 1996), ce qui a facilité le développement d'une grande quantité d'outils de génomique fonctionnelle; la levure est donc devenue une plateforme privilégiée pour de nombreuses technologies à haut débit utilisées dans des études transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques (Mohammadi et al., 2015). Ces avancées ont été cruciales pour l'étude et l'identification précise de gènes impliqués dans des voies cellulaires spécifiques ainsi que pour la découverte de nouveaux mécanismes génétiques sous-jacents à diverses maladies humaines.

1.11 Hypothèses

Un nouveau variant de *BMS1*, désigné sous le nom de R59T, a été identifié par le Dr Philippe Campeau du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine chez une patiente présentant une hypoplasie des doigts. Le séquençage des exons chez la patiente et ses progéniteurs a mis en lumière que la mutation était présente chez la patiente ainsi que chez son père. Notre hypothèse est que ce variant pourrait causer une autre manifestation du SAO. Sachant que le gène *BMS1* code pour une GTPase qui joue un rôle essentiel dans la biogenèse des ribosomes (Gelperin et al., 2001), nous avons émis l'hypothèse que la mutation ponctuelle R59T de *BMS1* pourrait affecter l'expression ou la fonction de ce gène et, en conséquence, affecter la biogenèse des ribosomes. Étant donné que la protéine Bms1 est très conservée chez les eucaryotes (Wegierski et al., 2001), de même

que l'arginine touchée par la mutation, nous pensons que la levure *S. cerevisiae* serait un modèle adéquat pour évaluer l'effet de la mutation faux sens R59T du gène *BMS1* humain en utilisant son équivalent R45T chez la levure.

Comme deuxième hypothèse, nous pensons qu'il y a un possible NLS à l'extrémité C-terminale et un possible NoLS à l'extrémité N-terminale de l'enzyme Bms1. Des études indiquent que Bms1 de levure localise dans le nucléole (Wegierski et al., 2001); cependant il n'y a pas beaucoup d'études qui documentent la validation des NoLS ou NLS putatifs de Bms1. En utilisant les logiciels bio-informatiques (cNLS Mapper et NoD) qui prédissent les NLS et NoLS, nous avons obtenu des séquences putatives de NLS et NoLS pour Bms1 et je voudrais vérifier expérimentalement si ces séquences fonctionnent comme de véritables NLS et NoLS.

1.12 Objectifs

1. Créer une souche de levure pour caractériser et comprendre les effets de la mutation R45T dans le gène *BMS1*.
2. Déterminer l'existence des effets potentiels de R45T sur la biogenèse des ribosomes.
3. Valider les séquences NLS et NoLS putatives prédites pour Bms1.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Construction de plasmides

Le plasmide centromérique pCM188-FLAG (Sleiman et al., 2022) contenant un gène de résistance à l'ampicilline et un marqueur de sélection auxotrophe *URA3* pour levure a été utilisé pour cloner le gène *BMS1* de la levure (*yBMS1*) entre les sites BamHI et KpnI. Le plasmide pGAD-*yBMS1*, déjà disponible dans le laboratoire, a été utilisé pour amplifier le gène *BMS1* par PCR. Le milieu réactionnel contenait 100 ng de plasmide pGAD-*yBMS1* ainsi que les oligonucléotides FD1606 et FD1607 (voir Tableau 2.1) ; ces amorces ont permis également d'introduire les sites de restriction BamHI et KpnI au fragment d'intérêt. La réaction de PCR a été effectuée dans un volume de 50 µl avec l'enzyme Phusion High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific) en utilisant 1 cycle de 30 secondes de dénaturation initiale à 98°C suivi de 30 cycles composés de 10 secondes de dénaturation à 98°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et 1 minute 45 secondes d'extension à 72°C et un cycle de 10 minutes d'extension finale à 72°C. Le fragment amplifié a été digéré avec les enzymes de restriction BamHI et KpnI afin d'être cloné dans le plasmide pCM188-FLAG digéré également avec les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide ainsi obtenu a été nommé pCM-*yBMS1*-FLAG. Le plasmide portant la mutation R45T, pCM-*yBMS1M*-FLAG, a été généré par mutagenèse dirigée afin d'amplifier le fragment de *BMS1* possédant la mutation désirée à partir de l'ADN plasmidique de pCM-*yBMS1*-FLAG.

Trois réactions de PCR ont été nécessaires pour introduire la mutation dans *BMS1*, la première réaction avec les oligonucléotides FD0445 et FD1611, et la deuxième PCR avec les oligonucléotides FD1610 et FD0446; les deux PCR ont utilisé pGAD-*yBMS1*-FLAG comme gabarit d'ADN (Figure 2.1). Les deux amplicons obtenus avec ces réactions de PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1%, découpés et purifiés avec la trousse QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) selon les instructions du fabricant. L'ADN ainsi purifié a été utilisé pour une troisième PCR en présence des oligonucléotides FD0445 et FD0446, ce qui a permis d'obtenir l'amplicon au complet de *BMS1* portant la mutation ponctuelle (*BMS1*-R45T). Les deux premières réactions de PCR ont été faites dans une solution de 50 µL contenant 100 ng d'ADN plasmidique, avec l'enzyme Phusion High-Fidelity DNA

polymérase (Thermo Fisher Scientific). Les paramètres utilisés pour les réactions de PCR ont été : un cycle de 30 secondes pour la dénaturation initiale à 98°C, 30 cycles comprenant chacun une dénaturation à 98°C pour 10 secondes, une hybridation à 51°C pour 30 secondes et une extension à 72°C pour 1 minute 30 secondes. Il y a eu une extension finale à 72°C pendant 5 minutes. Le produit de cette PCR a été purifié avec le kit QIAquick PCR purification (QIAGEN). Le fragment complet de *BMS1* muté, ayant une taille de 3.5 kb, a été digéré avec les enzymes de restriction BamHI et KpnI afin d'être cloné dans le plasmide pCM188-FLAG. Le plasmide pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA (Longtine et al., 1998) a été utilisé pour la création de la souche conditionnelle GAL::HA-BMS1 par recombinaison homologue.

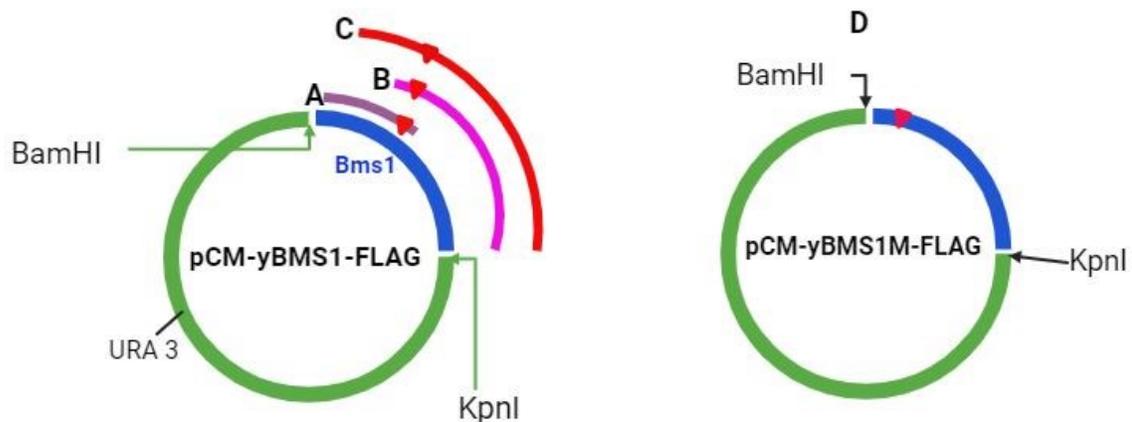


Figure 2.1. Schéma de la mutagenèse dirigée réalisée pour introduire la mutation dans *Bms1*.

La mutagenèse dirigée a été effectuée en utilisant le plasmide pCM-yBMS1-FLAG comme gabarit. Deux premières réactions de PCR produisent deux fragments d'ADN qui se chevauchent dans la région où la mutation, représentée par le triangle rouge, est introduite (**A et B**). Les deux fragments sont ensuite combinés pour servir de gabarits pour une autre PCR (**C**) afin d'obtenir le fragment complet de *Bms1* portant la mutation. La version mutée de *Bms1* a été clonée dans pCM188-FLAG, obtenant ainsi le plasmide pCM-yBMS1M-FLAG (**D**).

Le plasmide pADH111-3XyEGFP, a été fourni par Dre Brigitte Pertschy, (Institut de Biosciences Moléculaires, Université de Graz, Autriche). Il contient le promoteur *ADH1* pour permettre l'expression de la triple protéine fluorescente verte 3XGFP dans des

cellules de levure. Ce plasmide a été utilisé pour le clonage des fragments d'intérêt yBMS1-N60, yBMS1-N60-Mut, yBMS1-C89 et yBMS1-C89-Mut.

Le plasmide pN60, portant le fragment de yBMS1-N60, a été généré par clonage d'un fragment d'ADN de 186 pb correspondant aux acides-aminés 1 au 62 de la région N-terminale de *BMS1*; ce fragment a été amplifié par PCR avec l'enzyme DreamTaq Green Polymerase Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific) à partir de 100 ng d'ADN plasmidique de pCM-yBMS1-FLAG en utilisant les oligonucléotides FD1731 et FD1734. Ces amorces ont permis d'introduire les sites de restriction NdeI et BamHI à l'amplicon d'intérêt. Les paramètres de la réaction de PCR furent : 1 minute de dénaturation initiale à 95°C, 35 cycles comprenant 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 61°C et 1 minute d'extension à 72°C et un cycle d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Le produit de la PCR a été vérifié sur gel d'agarose 1% et postérieurement l'amplicon et le plasmide pADH111-3XyEGFP furent digérés avec les enzymes de restriction NdeI et BamHI (New England Biolabs). L'amplicon a été inséré dans le plasmide grâce à une réaction de ligation de 20 µl dans une proportion insert:vecteur de 6:1 effectuée à 16°C pendant la nuit.

Le plasmide pN60KA, contenant la version mutée de yBMS1-N60, a été construit par l'insertion d'une mutation aux positions 52 à 60 de yBMS1-N60 remplaçant ainsi trois lysines par trois alanines. Nous avons réalisé trois réactions de PCR à partir de 100 ng d'ADN plasmidique provenant de la construction yBMS1-N60; la première PCR a été effectuée avec les oligonucléotides FD1736 et FD1753. Ensuite, une autre PCR fut réalisée avec les amorces FD1750 et FD1731. Les deux amplicons obtenus dans ces deux réactions de PCR ont été utilisés pour la dernière PCR avec les oligonucléotides FD1736 et FD1731. Ces trois réactions de PCR ont été faites avec l'enzyme DreamTaq Green polymérase Master Mix 2x (ThermoFisher Scientific) en utilisant les paramètres suivants : une dénaturation initiale de 1 minute à 95°C, 35 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation à 62°C pour 30 secondes et 1 minute d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes. L'amplicon obtenu fut cloné dans le plasmide pADH111-3XyEGFP avec une réaction de ligation suivant les mêmes paramètres de la ligation mentionnés pour pN60.

Le plasmide pC89 fut construit par l'amplification de 266 pb de la région C-terminale de *BMS1* entre les positions 3283 et 3552 à partir de l'ADN plasmidique de pCM-yBMS1-FLAG. La réaction de PCR a été effectuée avec l'enzyme DreamTaq Green Polymerase Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific) avec les amorces FD1732 et FD1733 en introduisant les sites de restriction NdeI et BamHI au fragment amplifié. Les paramètres de la réaction furent : 1 minute de dénaturation initiale à 95°C, 35 cycles comprenant 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 58°C, 1 minute d'extension à 72°C et un cycle d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes. À la suite de la vérification de l'amplicon sur gel d'agarose 1%, le plasmide pADH111-3XyEGFP et l'amplicon obtenu ont été digérés avec les enzymes NdeI et BamHI (New England Biolabs).

Pour la construction du plasmide pC89KA, nous avons introduit une mutation dans les nucléotides localisés aux positions 3465 à 3473 de *BMS1* avec l'objectif de remplacer trois lysines par une combinaison alanine-glycine-alanine. D'abord, une réaction de PCR a été faite avec les oligonucléotides FD1736 et FD1752 à partir de 100 ng d'ADN de yBMS1-C89. Une autre réaction de PCR fut réalisée avec les amorces FD1751 et FD1733. Les deux amplicons obtenus dans ces deux réactions de PCR ont été purifiés et utilisés pour une dernière PCR avec les oligonucléotides FD1736 et FD1733. Ces trois PCR ont été faites avec l'enzyme DreamTaq Green polymérase Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific) en utilisant les paramètres suivants : une dénaturation initiale de 1 minute à 95°C, 35 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation à 62°C pour 30 secondes et 1 minute d'extension à 72°C et suivi d'un cycle d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Les amplicons obtenus pour yBMS1-C89 et yBMS1-C89-Mut ont été clonés chacun dans un plasmide pADH111-3XyEGFP grâce à une réaction de ligation de 20 µl utilisant un rapport de 6:1. Toutes les réactions de ligation ont été réalisées avec l'enzyme T4 DNA ligase (New England Biolabs)

Tous les plasmides recombinants furent vérifiés par séquençage au Centre d'expertise et de services Génome Québec en utilisant les oligonucléotides de vérification de chaque insert selon le Tableau 2.1 et postérieurement transformés dans la levure YSO23.

Tableau 2.1 Liste de plasmides

Nom	Description
pCM188-FLAG	Utilisé pour le clonage du gène <i>BMS1</i> entre les sites BamHI et KpnI
pGAD-yBMS1	Utilisé pour l'amplification du gène <i>BMS1</i>
pCM-yBMS1-FLAG	Plasmide contenant la version sauvage de <i>BMS1</i>
pCM-yBMS1M-FLAG	Plasmide contenant la version mutée de <i>BMS1</i>
pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA	Plasmide utilisé pour la création de la souche conditionnelle GAL::HA-BMS1
pADH111-3XyEGFP	Utilisé pour le clonage des fragments d'intérêt de <i>BMS1</i> pour la construction des souches YSPN60, YSPN60KA, YSPC89 et YSPC89KA
pRPS3	Construction de la souche YSPRPS3
pN60	Plasmide portant le fragment BMS1-N60
pN60KA	Plasmide portant le fragment BMS1-N60 mutant
pC89	Plasmide portant le fragment BMS1-C89
pC89KA	Plasmide portant le fragment BMS1-C89 mutant

2.2 Souche bactérienne

La souche DH10B d'*Escherichia coli* (*F*⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK* λ -*rpsL(StrR) nupG*) (Invitrogen) a été utilisée pour les clonages et pour la transformation des plasmides recombinants.*

2.3 Souches de levure

La souche haploïde de levure *S. cerevisiae* YPH499 (*MATa ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1*) (Sikorski & Hieter, 1989) a été utilisée comme modèle d'étude. Cette souche parentale a été modifiée pour générer la souche GAL::HA-BMS1 (Tableau 2.2). Les souches YSP-WT, YSP-R45T et YSP-PV (Tableau 2.2) ont été utilisées pour les tests de complémentation, la cinétique de déplétion, l'analyse des protéines, l'analyse de la maturation des ARNr et les gradients de sucrose.

La souche YSO23 (Tableau 2.2) qui exprime la protéine de fusion Nop1-mCherry (Sleiman & Dragon, 2022), a été utilisée pour la transformation de la levure avec les plasmides pN60, pN60KA, pC89, pC89KA et pADH111-3XyEGFP; c'est ainsi que nous avons obtenu les souches YSPN60, YSPN60KA, YSPC89, YSPC89KA, YSPRPS3 et YSPPV2 utilisées pour valider la fonctionnalité des signaux de colocalisation nucléaire ou nucléolaire (NLS ou NoLS) prédits par les logiciels bio-informatiques.

Tableau 2.2 Liste des souches

Nom	Description
YPH499	Souche haploïde de levure bourgeonnante <i>S. cerevisiae</i> . Utilisée pour générer la souche de levure conditionnelle GAL::HA-BMS1.
GAL::HA-BMS1	Souche de levure qui exprime HA-Bms1 sous le contrôle du promoteur <i>GAL1</i> inductible au galactose. Cette souche a été utilisée pour générer les souches destinées à l'étude des effets de la mutation R45T dans <i>BMS1</i> de levure.
YSO23	Souche de levure qui exprime la protéine de fusion Nop1-mCherry. Utilisée pour générer les souches portant les fragments d'intérêt de <i>BMS1</i> afin de valider la fonctionnalité des NLS/NoLS prédits.
YSP-WT	Souche conditionnelle de levure portant la version sauvage de Bms1. Construite à partir de la souche GAL::HA-BMS1.
YSP-R45T	Souche conditionnelle de levure portant la version mutée de Bms1. Construite à partir de la souche GAL::HA-BMS1.
YSP-PV	Souche conditionnelle de levure portant un plasmide vide. Construite à partir de la souche GAL::HA-BMS1.
YSPN60	Souche de levure portant le fragment Bms1-N60 et fusionné à la protéine GFP. Construite à partir de la souche YS023.
YSPN60KA	Souche de levure portant la version mutée du fragment Bms1-N60 et fusionné à la protéine GFP. Construite à partir de la souche YS023.
YSPC89	Souche de levure portant le fragment Bms1-C89 et fusionné à la protéine GFP. Construite à partir de la souche YS023.
YSPC89KA	Souche de levure portant la version mutée du fragment Bms1-C89 et fusionné à la protéine GFP. Construite à partir de la souche YS023.
YSPRPS3	Souche de levure portant <i>RPS3</i> fusionné à la protéine GFP. Construite à partir de la souche YS023.
YSPPV2	Souche de levure avec un plasmide vide marqué avec la protéine GFP. Construite à partir de la souche YS023.

2.4 Construction des souches

La souche de levure GAL::HA-BMS1 a été construite à partir de la souche parentale YPH499; le promoteur naturel en amont de l'ORF du gène *BMS1* a été remplacé par le promoteur *GAL1* inducible au galactose. La souche porte également un épitope 3xHA en N-terminale de *BMS1* et contenant le marqueur de sélection auxotrophe *HIS3*; cette modification a été faite par recombinaison homologue en utilisant le plasmide pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA selon la procédure de Longtine et al., (1998). Les souches YSP-WT, YSP-R45T et YSP-PV ont été générées respectivement par la transformation des plasmides pCM-yBMS1-FLAG, pCM-yBMS1M-FLAG et pCM188-FLAG dans la souche conditionnelle GAL::HA-BMS1 (Figure 2.2).

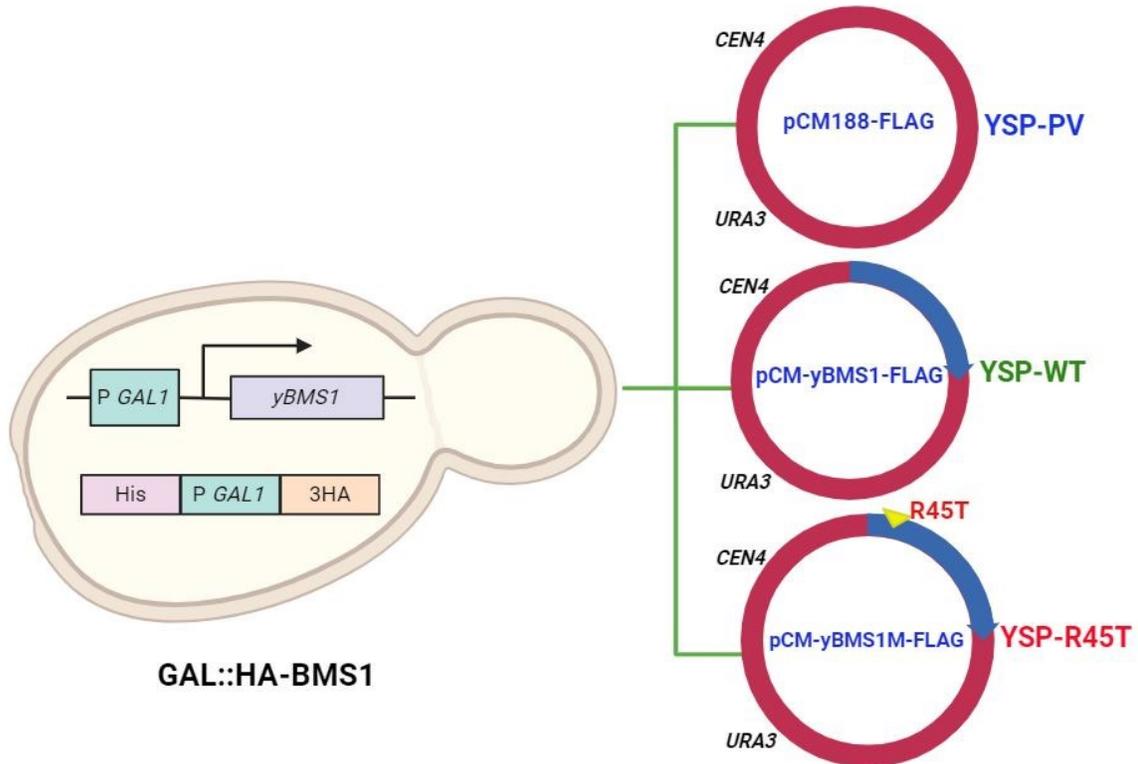


Figure 2.2 Représentation schématique de la construction des souches YSP-PV, YSP-WT et YSP-R45T.

La souche GAL::HA-BMS1 a été transformée avec les plasmides pCM188-FLAG, pCM-yBMS1-FLAG et pCM-yBMS1M-FLAG obtenant ainsi les souches YSP-PV, YSP-WT et YSP-R45T.

Les souches YSPN60, YSPN60KA, YSPC89, YSPC89KA, et YSPRPS3 ont été obtenues à partir de la transformation de la souche YSO23 avec les plasmides pN60, pN60KA, pC89, pC89KA et pRPS3.

2.5 Milieux de culture

Le milieu LB (Luria-Bertrani) (1% Bactotryptone, extrait de levure 0,5 % et 85.5 mM de NaCl) sous forme liquide et solide (1,5% agar) et supplémenté avec 100 µg/mL d'ampicilline, a été utilisé pour la culture des bactéries *E. coli*.

Les levures ont été cultivées dans le milieu de culture liquide YP (peptone 2%, extrait de levure 1%) ou solide (2% agar) contenant 2% de galactose (YPGal) ou 2% de dextrose (YPD) comme source de carbone et en ajoutant 20 mg/mL de généticine. Des milieux synthétiques de sélection liquides et solides SGal (nitrogen-base 0.17%, galactose 2%, (NH₄)₂SO₄, 0.5%) ou SDex (nitrogen-base 0.17%, dextrose 2%, (NH₄)₂SO₄, 0.5%) ont été enrichis avec un mélange d'acides aminés dépourvu de l'acide aminé nécessaire comme marqueur de sélection auxotrophe, histidine (-His), uracile (-Ura) et leucine (-Leu).

2.6 Préparation et transformation de bactéries électro compétentes

Une colonie de la souche DH10B a été inoculée dans milieu de culture LB et incubée à 37°C pendant la nuit, sous agitation à 250 rpm. Cinq mL de pré-culture ont été transférés dans 200 mL de milieu LB et incubés à 37°C sous agitation à 250 rpm jusqu'à ce que leur croissance atteigne la phase exponentielle (DO₆₀₀ 0,5 – 0,7); les cellules ont été mises sur glace pour 30 minutes puis centrifugées à 4000 x g pour 15 minutes à 4°C, ensuite le culot a été resuspendu dans 250 mL de glycérol 10% et centrifugé à 4000 x g pour 15 minutes à 4°C, le culot a été resuspendu dans 125 mL de glycérol 10% à 4000 x g pour 15 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu à nouveau dans 10 mL de glycérol 10% à 4000 x g pour 15 minutes à 4°C. Ce culot a été resuspendu dans un volume final de 2 mL de glycérol 10% avec lequel nous avons fait des aliquotes de 100 µL dans des micro-tubes et conservés à -80°C. Ensuite, 10 ng d'ADN plasmidique ont été mélangés avec 100 µL de bactéries électro-compétentes; le mélange a été transféré à une cuvette d'électroporation, placé dans un électroporateur (GenePulser Xcell, Bio-Rad) et soumis à un électrochoc de 2,5 kV sous conditions stériles et 1 mL de milieu LB a immédiatement été ajouté au mélange. Ce mélange a été incubé 1 heure à 37°C sous agitation à 250 rpm, puis 100 µL

du mélange ont été étalés sur une gélose LB agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline pour la sélection.

2.7 Préparation et transformation de bactéries chimio-compétentes

Pour préparer les bactéries chimio-compétentes, la souche DH10B a été cultivée dans 10 mL de milieu LB et incubée à 37°C sous agitation à 250 rpm pour la nuit. Une colonie isolée a été inoculée dans 2 mL de milieu LB dans un tube de culture afin d'être incubée à 37°C avec agitation pendant la nuit. Un prélèvement de 0,6 mL de la culture a été ajouté dans un flacon de 250 mL contenant 60 mL de milieu LB, puis incubée à 37°C avec agitation jusqu'à atteindre une DO_{600} entre 0.5 à 0.8. La culture a été refroidie sur glace, puis centrifugée à 2500 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 5 mL de solution TFB1 froide (KOAc 30 mM, KCl 100 mM, $MnCl_2$ 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, glycérol 15%). Une autre centrifugation a été effectuée, puis le culot a été resuspendu dans 2 mL de solution TFB2 froide (Na-MOPS 10 mM, pH 7.0, $CaCl_2$ 75 mM, KCl 10 mM, glycérol 15%). Des aliquotes de 100 µL, préparées dans du glycérol 50% (v/v), ont été congelées dans glace sèche, puis conservées à -80°C. Dix ng de plasmide ont été incorporés dans un tube contenant 100 µL de bactéries chimio-compétentes. Après une période de repos sur glace de 15 minutes, le tube a été exposé à un bain marie à 42°C pendant 45 secondes, puis immédiatement refroidi sur glace. Ensuite, du milieu LB a été ajouté au tube et ce mélange a été incubé 1 heure à 37°C sous agitation à 250 rpm; 100 µL ont été ensuite étalés sur des géloses LB-agar contenant 100 µg/µL d'ampicilline, puis incubés à 37°C pendant la nuit.

2.8 Préparation et transformation de levures compétentes

Des colonies d'environ 2-3 mm de diamètre des levures GAL::HA-BMS1 et YSO23 ont été inoculées dans 3 mL de YPGal ou YPD et passées au vortex; le tout a été transféré dans un erlenmeyer contenant 50 mL de YPGal ou YPD et incubé à 30°C sous agitation à 250 rpm jusqu'à obtenir une $DO_{600} > 1,5$. Ces cultures ont été diluées dans 50 ml de YPGal ou YPD jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0,25, puis incubées à 30°C sous agitation à une vitesse de 250 rpm. Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 1000 xg pendant 5 minutes à température pièce. Le culot de cellules a été resuspendu dans 7,5 mL d'eau stérile, mélangé au vortex et centrifugé à une vitesse de 1000 xg pendant 5 minutes à température pièce. Le culot obtenu a été resuspendu dans 500 µL de TE/LiAc.

Cent µg d'ADN « carrier » (*sheared herring sperm DNA*; Roche) ont été ajoutés à chacun des micro-tubes contenant 10 ng de chaque plasmide. Par la suite, 100 µL de levures compétentes ont été ajoutés à chaque micro-tube et ils ont été incubés sous agitation à 250 rpm à 30°C pendant 30 minutes. Après l'incubation, du DMSO a été mélangé à chaque micro-tube (10% final) et les cellules ont été soumises à un choc thermique à 42°C pendant 15 minutes, suivi de 10 minutes dans la glace. Après centrifugation, le culot de cellules a été resuspendu dans 500 µL de TE 1X et 100 µL du mélange ont été étalés sur milieu sélectif SGal-Ura ou SDex-Leu. Les géloses ont été incubées à 30°C jusqu'à ce que les colonies apparaissent.

2.9 Tests de complémentation sur géloses

Les souches de levures ont été inoculées dans un milieu liquide SGal-Ura et incubées à 30°C sous agitation à 250 rpm jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} entre 0,5 et 0,8. Par la suite, les cellules ont été centrifugées à une vitesse de 1000 xg pendant 10 min et le culot a été resuspendu et lavé trois fois avec de l'eau stérile. Le nombre des cellules a été égalisé par dilution avec de l'eau stérile jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600} = 1$, puis des dilutions en série 1/10 ont été faites. Finalement, 3 µL de chaque dilution ont été déposés sur une gélose SGal-Ura et sur une gélose SDex-Ura, puis incubés à des températures de 16°C, 23°C, 30°C et 37°C jusqu'à l'apparition de colonies.

2.10 Cinétique de déplétion en milieu liquide avec dextrose

Une préculture de chaque souche a été faite dans 50 mL de milieu SGal-Ura et mise sous agitation à 30°C pendant la nuit jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} entre 0,5 et 0,8 (phase exponentielle). Les cellules ont été centrifugées à 1000 xg pendant 5 minutes et le culot a été lavé 3 fois avec d'eau stérile, resuspendues à une DO_{600} de 0,1 dans 50 mL de milieu SDex-Ura préalablement chauffé à 30°C, puis incubées sous agitation de 250 rpm à 30°C. L'absorbance a été mesurée chaque 2 heures. Pendant l'expérience, les cultures ont été maintenues en phase exponentielle (DO_{600} inférieure à 0,8) en faisant des dilutions avec les milieux préchauffés.

2.11 Extraction de protéines des levures

L'extraction de protéines des levures a été effectuée selon la méthode de Kushnirov (2000). Les levures ont été cultivées dans un milieu liquide à 30°C pendant la nuit sous agitation à 250 rpm, puis 2.5 DO₆₀₀ de cellules ont été récupérées par centrifugation et resuspendus dans 200 µL d'eau nano pure. Un volume équivalent de NaOH 0,2N a été ajouté et le mélange a été incubé pendant 5 minutes à température pièce avant de le centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes; le culot a été resuspendu dans 50 µL de tampon Laemmli 2x (glycérol 5%, SDS 2%, Tris-HCl 0.06 M, pH 6,8, β-mercaptoéthanol 4% et bleu de bromophénol 0,0025%). Le tube a été mis au bain marie à 95°C pendant 3 minutes et les débris ont été éliminés par centrifugation pendant 5 minutes à 13000 rpm. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube aux fins d'analyse de protéines.

2.12 Analyse des protéines par immunobuvardage

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% (Tris-HCl 1.5 M pH 8,8, acrylamide/bis-acrylamide 8% (37.5:1), SDS 0.1%, ammonium persulfate 0.1%, et TEMED 0,06%) La migration s'est déroulée dans un tampon d'électrophorèse composé de Tris-base à une concentration de 25 mM, de glycine à 200 mM et de SDS à 3,5 mM. Le pH du tampon a été ajusté à 8,3. L'électrophorèse a été réalisée à une tension de 100 V pendant 90 minutes. Le standard Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Ensuite, les protéines du gel ont été transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF; Immobilon-P, Millipore) après traitement préalable avec du méthanol et en utilisant une méthode de transfert électrophorétique semi-sec à l'aide un appareil *Semi-dry blotter* (Bio-Rad). Après transfert, la membrane a été incubée 5 minutes dans une solution de rouge Ponceau S (0,1% de Ponceau S, 1% d'acide acétique) pour visualiser les protéines et évaluer la qualité du transfert. La membrane a été rincée à l'eau distillée puis incubée pendant une heure dans une solution de blocage composée de 5% de lait écrémé dissous dans du tampon TBS-T (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 154 mM, Tween-20 0,2%) et en utilisant l'anticorps primaire adapté : anti-FLAG M2 monoclonal de souris (MilliporeSigma), ou anti-HA polyclonal de lapin (Abcam) dilué à 1:70000. Ensuite, la membrane a été lavée trois fois avec du tampon TBS-Tween sur une durée totale de 15 minutes, avant d'être incubée pendant 1 heure dans la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire

approprié : anti-IgG de souris (Cytiva) dilué à 1:10000 ou anti-IgG de lapin (Abcam) couplés à l'enzyme HRP. Pour la détection, la membrane a été exposée à un substrat HRP (peroxydase de raifort) provenant de la trousse « Western Chemiluminescent HRP Substrate » (Immobilon), conformément aux instructions du fabricant et les signaux émis ont été visualisés avec un système d'imagerie Fusion FX7.

2.13 Northern blot

L'extraction des ARN totaux a été réalisée en utilisant la méthode d'extraction au phénol chaud décrit par Ausubel et al. (1992). Dix µg d'ARN de chaque échantillon ont été déposés par piste dans un gel d'agarose 1,2 % dénaturant (formaldéhyde) et la migration a été effectuée à 50 volts dans du tampon de migration MOPS 1X en circulation pendant 20 heures. À la suite de la migration, le gel a été trempé dans le NaOH 0.05 M pendant 20 minutes puis soumis à deux lavages successifs avec de l'eau pour 5 minutes et submergé dans une solution SSC 20X pour 45 minutes. Le transfert a été effectué par capillarité sur une membrane Hybond XL (GE Healthcare) mise dans du tampon SSC 20X pendant la nuit. Après le transfert, la membrane a été soumise aux rayons ultraviolets avec l'appareil Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics Corporation) à 5 joules/cm² pour ensuite être incubée avec acide acétique 5% pendant 5 minutes et incubée à nouveau avec bleu de méthylène pendant 10 minutes pour visualiser les ARNr 18S et 25S. La membrane a été pré-incubée à 37°C dans un tampon de pré-hybridation SSPE 5% (NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,7), solution Denhardt 5% (Ficoll 0,1 %, polyvinylpyrrolidone 0,1%, BSA 0,1%), 17.4 mM de SDS et 1 mg d'ARNt dénaturé à 95°C pour 3 minutes. L'hybridation Northern a été effectuée à 37°C avec des oligonucléotides antisens marqués au ³²P (PerkinElmer) par incubation avec la T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs); les séquences de oligonucléotides utilisées se trouvent dans le Tableau No. 2.1. L'incubation a été effectuée dans un four à hybridation pendant la nuit et la membrane a été rincée deux fois avec 50 mL de solution de lavage contenant SSPE 5 %, SDS 3,5 mM et un rinçage final avec 50 mL de solution de lavage composée de SSPE 0,5 %, SDS 3,5 mM. La membrane a été placée sur un écran au phosphore pour la nuit pour et analysée à l'aide d'un Storm 860 Molecular Imager (Amersham Biosciences).

2.14 Préparation des extraits cellulaires de levure et gradients de densité de sucrose

Les cultures de levure ont été incubées avec de la cycloheximide (100 µg/ml; MilliporeSigma) puis 30 DO₆₀₀ de cellules ont été récupérées par centrifugation, lavées avec de l'eau, puis réhydratées dans 0,5 mL de tampon TMK100 (Tris-HCl 25 mM pH 7.9, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, Nonidet P-40 0.1% and 1 mM DTT) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (Complete™; Roche) et de la cycloheximide (100 µg/mL). Par la suite, des billes de verre (MilliporeSigma) ont été ajoutées aux cellules avant de les soumettre à 7 cycles de 45 secondes d'agitation vigoureuse au vortex avec des pauses de 45 secondes sur glace; les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 4°C pendant 5 minutes à 5000 xg (14000 rpm). Sept DO₂₆₀ d'extrait ont été déposées sur des gradients linéaires de sucrose 7-47 % (p/v) préparés dans du TMK100. Les gradients ont été centrifugés dans un rotor SW41 à 39000 rpm pendant 2 heures 45 minutes. Un profil d'absorbance en continu a été obtenu à l'aide d'un système de fractionnement (ISCO Teledyne) avec une surveillance constante de l'absorbance à 254 nm afin d'établir les profils des polysomes.

2.15 Microscopie à immunofluorescence

Les cellules exprimant les protéines fluorescentes ont été cultivées jusqu'à la phase exponentielle; la culture a ensuite été récupérée par centrifugation, puis lavée une fois avec de l'eau stérile et trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS) enrichi en Ca²⁺ et Mg²⁺. Les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de PBS contenant 1 µg de Hoechst 33342 (Invitrogen), puis incubées à 30°C pendant 5 minutes avec agitation. Ensuite, les cellules ont été centrifugées à 1000 rpm pendant 30 secondes et les culots ont subi 3 lavages avec le PBS et resuspendues dans 500 µL de PBS. Cinquante µL de cellules ont été déposés sur des lames stériles µ-Slide Angiogenesis IbiTreat (ibidi) préalablement traitées au bromhydrate de poly-L-lysine (MilliporeSigma). Les lames ont ensuite été observées au microscope confocal Nikon A1 à un grossissement de 60x et 100x.

L'analyse visuelle des images a été réalisé par la superposition des images obtenues des canaux rouge (mCherry) et vert (Bms1-GFP) afin de déterminer la localisation subcellulaire des fragments d'intérêt de Bms1; les résultats de l'analyse visuelle ont été

complémentés par une analyse quantitative en utilisant des coefficients de corrélation et de co-occurrence, tels que les coefficients de Pearson, Manders et Costes. L'analyse visuelle des images et le calcul des coefficients ont été effectués avec le logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012)

2.16 Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans cette étude ont été synthétisés par la compagnie Invitrogen. La liste complète des oligonucléotides se trouve dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3 Liste des oligonucléotides

Nom	Séquence 5' - 3'	Détail
FD1606	CGGGATCCATGGAGCAGTCTAATA AACAGCACC	Amplification <i>BMS1</i> avec site de restriction BamHI
FD1607	GGGGTACCCCTCCTCATCTTACGT GGACG	Amplification <i>BMS1</i> avec site de restriction KpnI
FD1610	AGAACTATGCAAACGTCAAGTGAT GTG	Amplification <i>BMS1</i> avec la mutation R45T
FD1611	CACATCACTTGACGTTTGCATAGTT CT	Amplification <i>BMS1</i> avec la mutation R45T
FD0445	CCTTATACATTAGGTCCTTTGTAGC A	Amplification fragment <i>BMS1</i> à partir du plasmide pCMFLAG-yBMS1 et séquençage pCMFLAG-yBMS1-R45T
FD0446	CCTTCCTTTTCGGTTAGAGCGG	Amplification fragment <i>BMS1</i> à partir du plasmide pCMFLAG-yBMS1
FD1073	CTGAAGTGAAGCTTCAAAATTAAG GAAAGTATTTGCGCTGTTAAGGTA AAGAATTCGAGCTCGTTAAAC	Amplification cassette pFA6a-kanMX6-PGAL1-3HA
FD1612	GCTGTATTCTTCTCCTTCGCCTTAC GGTGCTGTTTATTAGACTGCTCAC CACCACCGCACTGAGCAGCGTAAT CTG	Amplification cassette pFA6a-kanMX6-PGAL1-3HA
FD1731	CGCGGATCCATCAACCATAAGAAC ATGCAGTTTTTC	Amplification 186 pb partie N terminale de <i>BMS1</i> avec site de restriction BamHI
FD1734	GAAATTCCATATGGAGCAGTCTAA TAAACAGCAC	Amplification 186 pb partie N terminale de <i>BMS1</i> avec site de restriction NdeI
FD1732	GAAATTCCATATGGCTAAAAGAGC CGTGGTGC	Amplification 287 pb partie C terminale de <i>BMS1</i> avec site de restriction NdeI
FD1733	CGCGGATCCCCTCCTCATCTTACG TGGACG	Amplification 287 pb partie C terminale de <i>BMS1</i> avec site de restriction BamHI
FD1750	AAGAATACAGCAGCAGCCGCGCTC CATACG	Amplification YSPN60KA
FD1753	CTGCGTATGGAGCGCGGCTGCTG CTGTATTC	Amplification YSPN60KA
FD1751	AGGGATAAGGAGGCTGCCGCAGA ATACTTC	Amplification YSPC89KA

Nom	Séquence 5' - 3'	Détail
FD1752	GGCGAAGTATTCTGCGGCAGCCTC CTTATC	Amplification YSPC89KA
FD1735	GTATACGGCCTTCCTTCCAGTTAC	Séquençage YSPN60, YSPN60KA, YSPC89, YSPC89KA et YSPPV
FD1737	ACCAGCTCCAGCTCCGGATCC	Amplification YSPN60 et YSPC89
FD1374	GGA CTAGTTTTGTTGTTTCCGGGT GTACAATATG	Amplification promoteur ADH1
FD1375	CCGGAATTCTGTATATGAGATAGTT GATTGTATGCTTGGTATAGCTTG	Amplification promoteur ADH1
FD0529	CGCTGCTCACCAATGG	Détection ARN 35S
FD0565	GCTCTCATGCTCTTGCC	Détection ARN 35S et 20S
FD0540	TTGTTACCTCTGGGCCC	Détection ARN 35S, 27SA2 et 23S

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Viabilité des cellules de levure portant la mutation R45T, homologue à R59T chez l'humain

Afin d'étudier les possibles altérations moléculaires tel que des défauts dans la biogénèse des ribosomes, nous avons introduit la mutation R45T par mutagenèse dirigée dans le gène *BMS1* de la levure *S. cerevisiae*, homologue à R59T chez l'humain. Pour ce faire, nous avons commencé notre étude avec la création d'une souche conditionnelle GAL::HA-BMS1 qui contient le promoteur inductible *GAL1*, qui permet l'expression de la protéine Bms1 avec une étiquette 3xHA en N-terminale lorsque cultivée en présence de galactose (Longtine et al., 1998).

Cette construction portant aussi le marqueur de sélection auxotrophe *HIS3* a transformée dans la levure YPH499 et l'amplicon a été intégré par recombinaison homologue. L'intégration génomique de la cassette a été vérifiée par PCR en utilisant les oligonucléotides FD1079 et FD1080 tel que le montre la Figure 3.1. Cette souche conditionnelle a été transformée avec les plasmides pCM-yBMS1-FLAG, pCM-yBMS1M-FLAG et pCM188-FLAG afin d'obtenir les souches YSP-WT, YSP-R45T et YSP-PV.

Les souches YSP-WT (contrôle positif), YSP-R45T (mutant) et YSP-PV (contrôle négatif, transformé avec le plasmide vide) ont été utilisées pour toute la démarche expérimentale. Dans un milieu avec galactose, l'expression de Bms1 endogène ayant une étiquette 3xHA en N-terminale est contrôlée par le promoteur inductible *GAL1*; lorsque la souche est transférée en milieu contenant du dextrose, la viabilité des cellules dépend de la complémentation par la Bms1-FLAG exprimée à partir d'un plasmide car l'expression de HA-Bms1 endogène est inhibée. Ces essais de complémentation ont été effectués sur milieux sélectifs (géloses SGal-Ura et SDex-Ura) en utilisant la méthode de "spot test" à des températures de 16°C, 23°C, 30°C, et 37°C. Lorsque les souches ont été incubées sur milieu SGal-Ura à 30°C (conditions optimales) les trois souches YSP-WT, YSP-R45T et YSP-PV, ont présenté une croissance normale (Figure 3.2A).

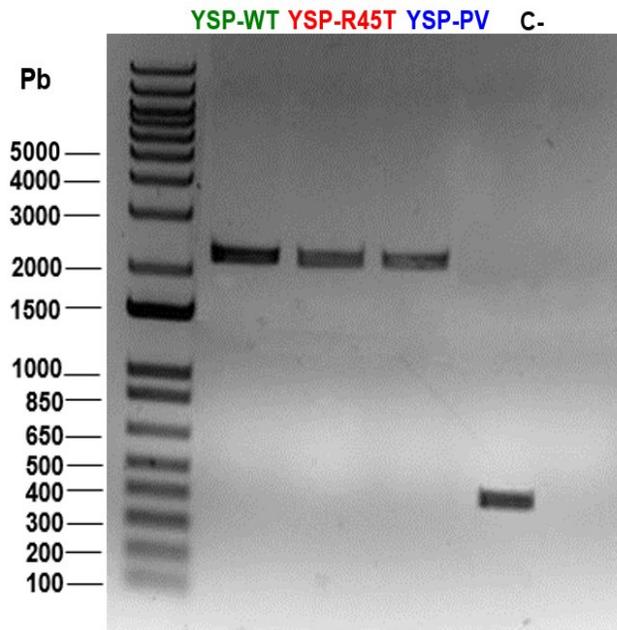


Figure 3.1 Vérification de l'intégration génomique dans la levure.

L'intégration de la cassette du plasmide pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA a été vérifiée par PCR à partir d'ADN génomique. Le gel d'agarose montre des bandes de 2400 pb pour les échantillons des 3 souches (YSP-WT, YSP-R45T et YSP-PV), ce qui correspond à la taille du produit de PCR estimé de 2451 pb (un fragment de 2045 pb pour la cassette plus 406 pb de *BMS1*). La souche YPH499, utilisée comme contrôle négatif (C-), montre une bande d'environ 406 pb dû à l'absence de la cassette.

Les souches YSP-WT et YSP-R45T ont réussi à croître en milieu SDex-Ura à des températures de 16°C, 23°C, 30°C et 37°C, ce qui suggère que la protéine Bms1-FLAG issue du plasmide complète la souche déplétée de HA-Bms1 endogène en présence de dextrose. Cependant, à 37°C on peut observer une croissance relativement plus faible et cela pourrait indiquer qu'il y a une légère thermo-sensibilité. La souche YSP-PV contenant le plasmide vide (contrôle négatif) n'a manifesté aucune croissance en SDex-Ura puisqu'elle était dépourvue de Bms1 d'origine plasmidique (voir Figure 3.2B).

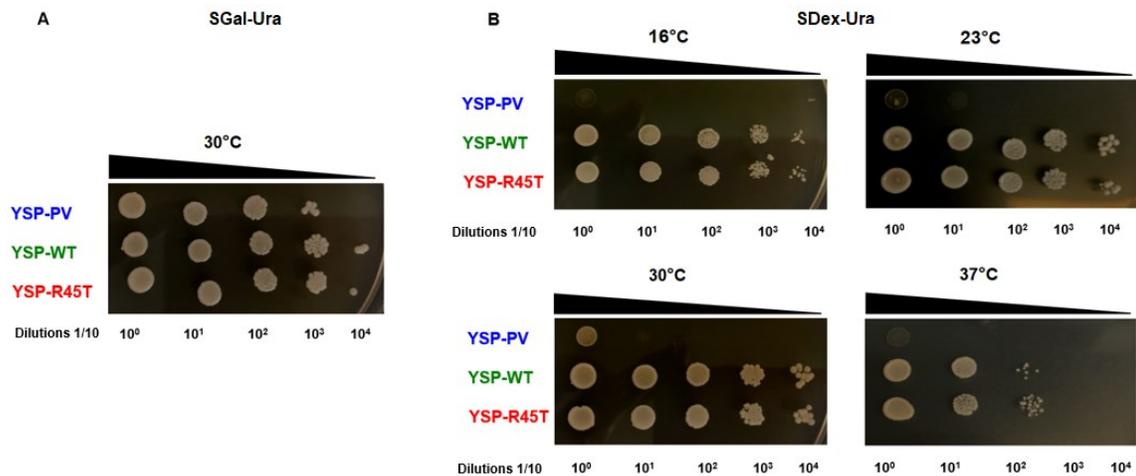


Figure 3.2 Tests de complémentation sur géloses

Des dilutions en série (1/10) ont été déposées sur des géloses SGal-Ura et SDex-Ura. **(A)** Les souches ont été cultivées en SGal-Ura, à 30°C. **(B)** Les cellules ont été placées également sur des géloses SDex-Ura (condition restrictive), et incubées à différentes températures (indiquées au-dessus des images).

Pour les tests de complémentation en milieu liquide (cinétique de déplétion), les souches YSP-WT, YSP-R45T et YSP-PV ont été cultivées dans SGal-Ura à 30°C. Ensuite, elles ont été transférées dans un milieu SDex-Ura, et incubées à 30°C. Les souches ont été maintenues en phase exponentielle tout au long de l'expérience et leur croissance a été suivie en mesurant la DO₆₀₀ chaque 2 heures pendant un total de 24 heures. Les souches YSP-WT et YSP-R45T exprimant respectivement la version sauvage et mutée de Bms1-FLAG ont manifesté une croissance normale durant toute la durée de l'expérience (Figure 3.3).

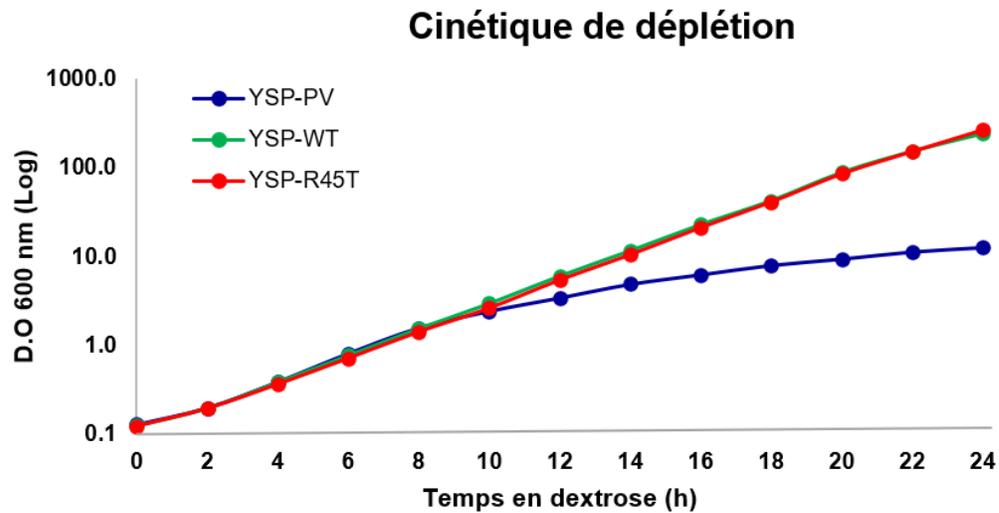


Figure 3.3 Cinétique de déplétion à 30°C en milieu liquide

Les souches ont été cultivées dans SGal-Ura à 30°C jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase exponentielle pour ensuite être transférées dans un milieu SDex-Ura et la croissance a été suivie en mesurant la DO_{600} à chaque deux heures.

La souche YSP-PV, sans la version plasmidique de Bms1, a montré un ralentissement marqué de sa croissance dès la dixième heure après le passage de SGal-Ura à SDex-Ura, et cette tendance a persisté jusqu'à la fin de l'expérience.

3.2 Analyse de l'expression de Bms1 mutée

Des cellules de levure YSP-WT et YSP-R45T soumises à une déplétion en milieu SDex-Ura ont été collectées aux temps 0, 10 et 24 h, puis les protéines ont été extraites et analysées par immunobuvardage en utilisant les anticorps anti-HA (Bms1 endogène) et anti-FLAG (Bms1 d'origine plasmidique). Au temps 0 les deux souches montrent une bande intense (Figure 3.4A), puisque HA-Bms1 est surexprimée en SGal-Ura. Le signal de la protéine HA-Bms1 endogène n'est plus visible à l'heure 10 ni à l'heure 24, ce qui démontre qu'il y a eu une déplétion de la protéine endogène. Cependant, l'expression de Bms1 d'origine plasmidique portant l'épitope FLAG en C-terminale est détectable tout au long des 24 heures et caractérisée par un signal plus fort à l'heure 10 et 24 (Figure 3.4B).

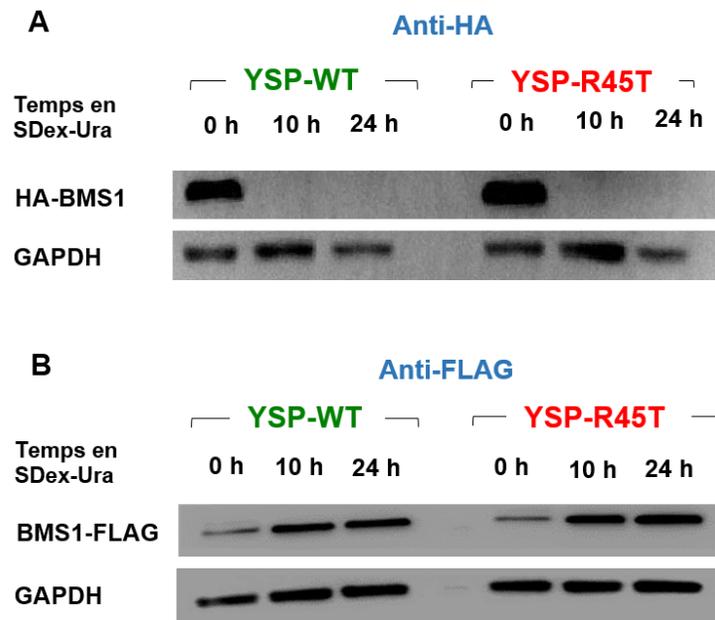


Figure 3.4 Analyse de l'expression de Bms1 endogène et d'origine plasmidique au fil du temps de déplétion.

Les souches des levures YSP-WT et YSP-R45T ont été soumises à des expériences de cinétique de déplétion de Bms1 endogène en milieu SDex-Ura. Des cellules ont été collectées aux temps 0 h, 10 h et 24 h, à partir desquelles les extraits protéiques ont été obtenus et analysés par immunobuvardage. **(A)** Immunodétection de Bms1 endogène marquée avec l'épitope HA, GAPDH a été utilisé comme contrôle de chargement. **(B)** Immunodétection de Bms1 d'origine plasmidique marquée avec l'épitope FLAG. GAPDH a été utilisé comme contrôle de chargement.

3.3 Analyse de la maturation des pré-ARNr

L'analyse de la maturation des ARNr a été réalisée par hybridation Northern en utilisant des ARN extraits des cellules des souches YSP-WT, YSP-R45T et YSP-PV, incubées en SDex-Ura pendant 0, 10 et 24 h. L'hybridation a été effectuée avec des sondes marquées à l'isotope ³²P, lesquelles se lient de manière complémentaire à différentes régions du précurseur 35S.

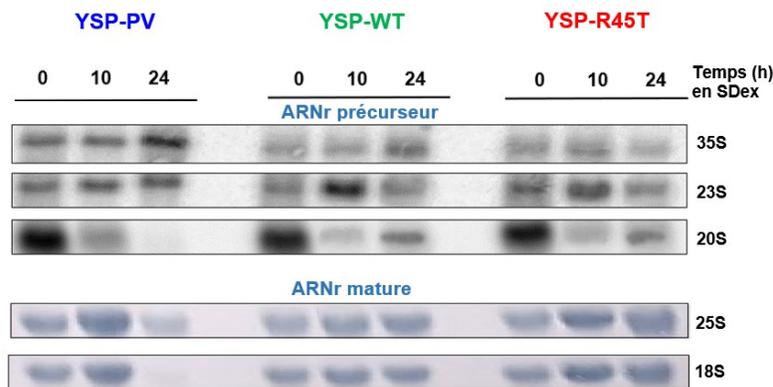


Figure 3.5 Analyse de la maturation des pré-ARNr par hybridation Northern

Les ARN ont été extraits des souches YSP-PV, YSP-WT et YSP-R45T soumises à la déplétion de Bms1 endogène en SDex-Ura à 30°C. L'hybridation a été réalisée avec des oligonucléotides marqués au ³²P ciblant différentes régions du précurseur 35S. Les ARNr matures ont été révélés par une coloration au bleu de méthylène.

Les souches YSP-WT et YSP-R45T ont montré des bandes de faible intensité au temps 0 heures pour le pré-ARNr 35S et le 23S ainsi que des bandes clairement visibles pour le pré-ARNr 20S et l'ARNr mature 18S; un peu d'accumulation de pré-ARNr 35S et une grande accumulation de 23S sont observées au temps 10 heures, accompagnées d'une réduction de l'intensité de la bande du pré-ARNr 20S tandis que la bande caractéristique à l'ARNr mature 18S est visible.

Après 24 heures en SDex-Ura, bien que les pré-ARNr 35S et 23S soient toujours visibles, le pré-ARNr 20S est détecté dans les souches YSP-WT et YSP-R45T, mais indétectable dans la souche YSP-PV qui sert de contrôle négatif, et parallèlement l'ARNr 18S mature n'est absent que dans la souche YSP-PV. On note aussi une augmentation du signal pour le 35S, ce qui est caractéristique d'un défaut de maturation précoce. Il n'y a pas eu de problèmes dans la maturation de l'ARNr 25S, sauf pour la souche YSP-PV qui contient un plasmide vide et ne peut pas compléter (Figure 3.5).

3.4 Analyse de la production des ribosomes

L'analyse des profils de polysomes a été effectuée avec les souches YSP-WT et YSP-R45T afin d'observer le statut de la traduction. Des extraits cellulaires ont été préparés à partir des souches mentionnées, collectées à différents moments lors d'une expérience de cinétique de déplétion de Bms1 endogène (0, 10 et 24 h en SDex-Ura). Après ultracentrifugation, les gradients ont été analysés avec un appareil ISCO Teledyne pour obtenir des profils de sédimentation en continu mesurés à une absorbance de 254 nm (Figure 3.6).

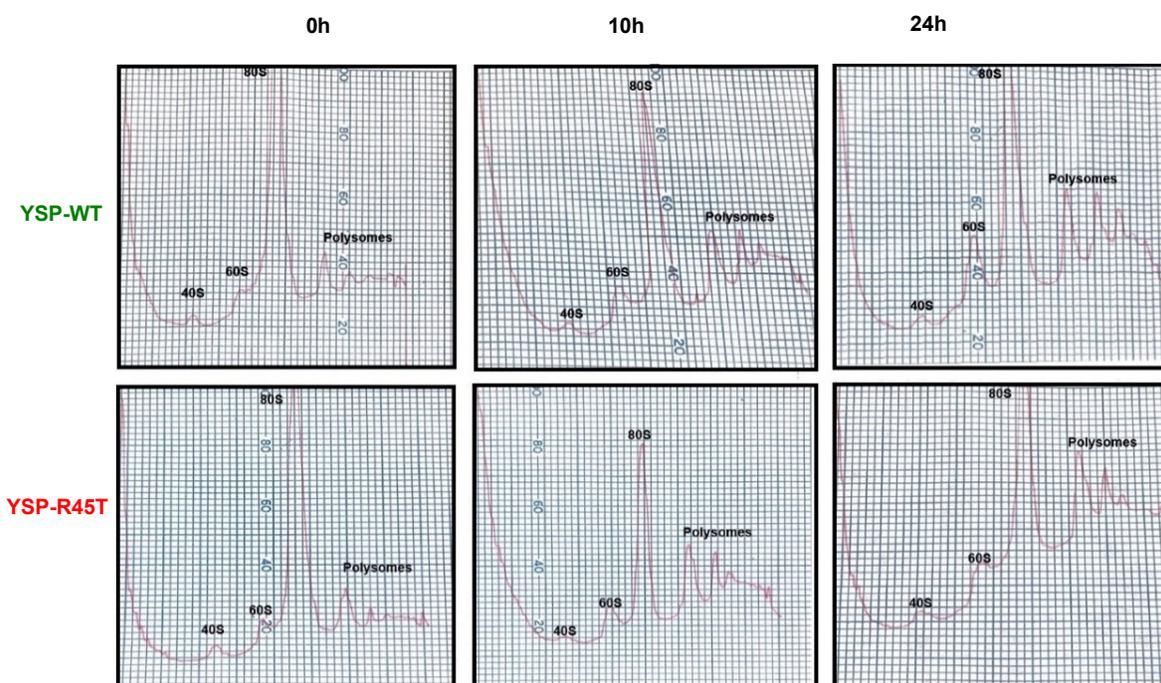


Figure 3.6. Profils de polysomes des souches YSP-WT et YSP-R45T lors d'une expérience de déplétion.

Les profils de polysomes ont été réalisés avec des extraits cellulaires obtenus à partir des souches YSP-WT et YSP-R45T lors d'une expérience de déplétion en milieu SDex-Ura. Les souches ont été collectés aux temps 0 h, 10 h et 24 h (indiqués en haut des profils) et les extraits cellulaires ont été fractionnés dans des gradients de sucrose. Les profils de sédimentation ont été obtenus par lecture en continu de l'absorbance de 254 nm.

Les profils de sédimentation obtenus avec les extraits de la souche YSP-WT sont normaux, c'est-à-dire que les pics correspondants aux sous-unités 40S et 60S et aux

ribosomes 80S montrent des proportions caractéristiques, tout comme les polysomes (Figure 3.6). La principale différence entre la croissance en SGal-Ura (temps 0 h) et en SDex-Ura (10 h et 24 h) réside dans la proportion de polysomes observés, qui est plus élevée en présence de dextrose. Cela indique que ce milieu favorise une croissance plus rapide. Ce même comportement a été constaté pour la souche YSP-R45T. Ceci met en évidence l'absence d'altération de la biogenèse des ribosomes dans la souche mutante R45T.

3.5 Validation des séquences NLS et NoLS putatives fournies par les outils bio-informatiques

En utilisant l'outil bio-informatique cNLS mapper (Kosugi et al., 2009) pour la prédiction de séquences NLS dans Bms1, un NLS monopartite et trois NLS bipartites putatifs ont été identifiés dans la région N-terminale entre les acides aminés 13 et 208. De plus, quatre NLS bipartites putatifs ont été trouvés dans la région C-terminale entre les acides aminés 1127 et 1170. Quant à la prédiction de NoLS avec l'outil *NoD Nucleolar Localization Sequence Detector* (Scott et al., 2011), cinq NoLS putatifs ont été identifiés : deux en N-terminale et trois en C-terminale. Les prédictions suggèrent qu'il y a des séquences NLS et NoLS qui se chevauchent entre les acides aminés 1 à 46 et 1075 à 1170 (Figure 3.7).

A partir de cette information, j'ai entrepris de valider ces motifs de localisation subcellulaire prédits pour Bms1. Pour le faire, j'ai généré quatre souches de levure qui expriment un fragment de Bms1 fusionné à la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) : ces plasmides ont été utilisés pour transformer la souche YSO23 qui exprime le marqueur nucléolaire Nop1-mCherry.

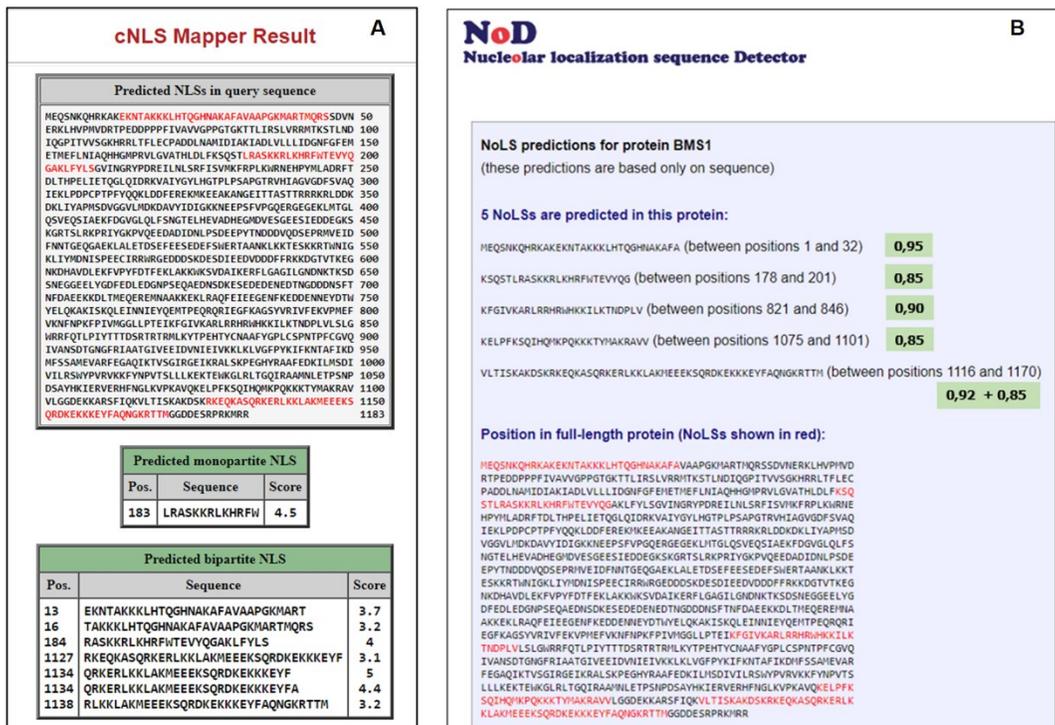


Figure 3.7 Prédiction du NLS et du NoLS dans Bms1

(A) Les scores de cNLS mapper peuvent être fractionnés : 9-10, localise dans le noyau, 7-8 localise partiellement dans le noyau; 3-5 localise à la fois dans le noyau et le cytoplasme et 1-2 localise dans le cytoplasme. (B) Selon le logiciel bio-informatique NoD les scores élevés indiquent une forte probabilité qu'une séquence soit un NoLS fonctionnel, dirigeant la protéine vers le nucléole. Les scores modérés suggèrent un possible NoLS, mais d'autres facteurs peuvent influencer la localisation. Les scores faibles signifient que la séquence est peu susceptible d'être un NoLS et de jouer un rôle majeur dans la localisation nucléolaire.

Les souches YSPN60 et YSPC89 possèdent donc les fragments d'intérêt de Bms1 correspondant aux régions N-terminale et C-terminale respectivement (Figure 3.8) et les souches YSPN60KA et YSPC89KA sont les versions avec des mutations ciblant les séquences putatives des NLS/NoLS prédits. La souche YSPRPS3 a été utilisée comme contrôle positif (Mitterer et al., 2016) tandis que la souche YSPPV2 contenant le plasmide vide fut utilisée comme contrôle négatif.

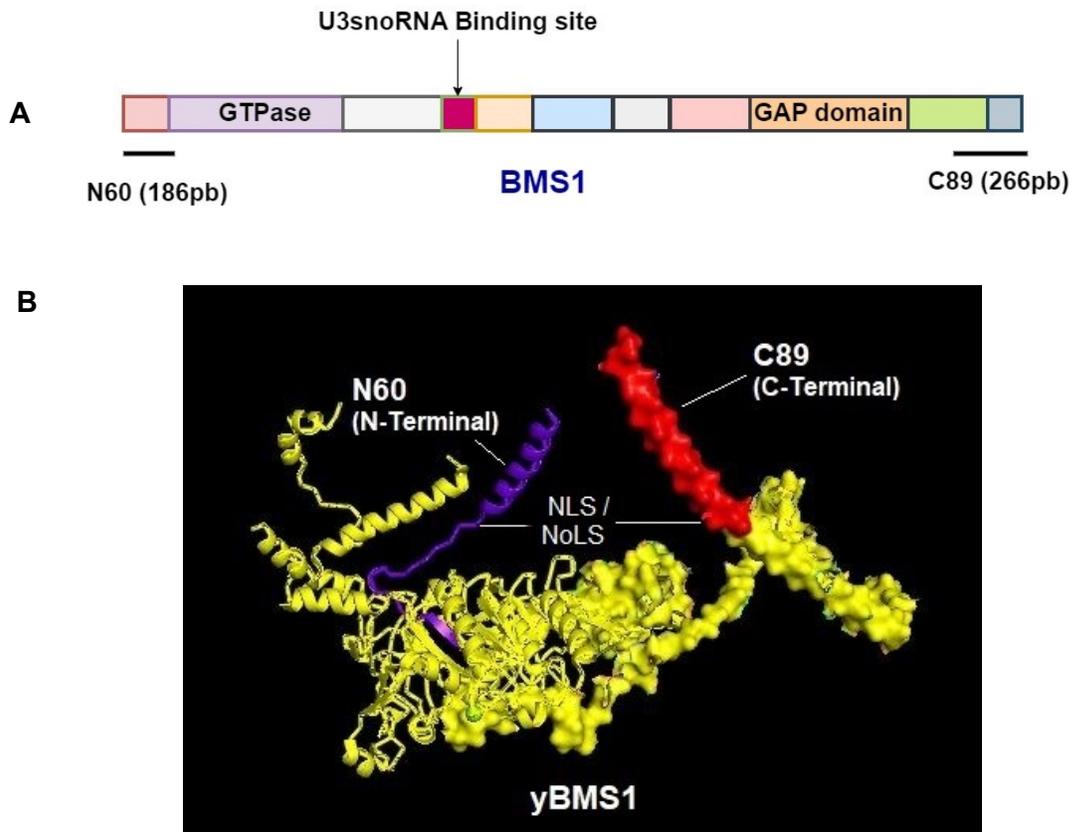


Figure 3.8 Représentation schématique de Bms1

(A) Schéma des domaines et de motifs de Bms1 montrant l'emplacement des fragments étudiés. **(B)** Structure 3D de Bms1 montrant les mêmes fragments. N60 (violet) et C89 (rouge) en N-terminale et C-terminale ont été utilisés pour la validation des séquences putatives des NLS / NoLS prédits. Image adaptée de Cheng et al. (2020).

L'utilisation de ces souches nous a permis de différencier le type de colocalisation des fragments de Bms1 étudiés lors de l'observation des images obtenues par microscopie confocale : dans la levure, le nucléole (rouge) est juxtaposé au nucléoplasme (bleu), si le fragment de Bms1 fusionné à la GFP localise exclusivement dans le nucléoplasme, le signal de GFP sera adjacent au nucléole, sans chevauchement, mais si le fragment localise au nucléole, il y aura chevauchement du signal rouge de Nop1-mCherry et ce chevauchement donnera une coloration jaune au niveau du nucléole. Si le fragment de Bms1 localise dans les deux sous-compartiments nucléaires, il sera possible d'observer un signal GFP en forme d'ovale plus grande et chevauchera partiellement le marqueur Nop1-mCherry (Steiner et al., 2023).

Après un traitement avec Hoechst 33342 pour colorer les noyaux, nous avons fait une analyse par microscopie confocale avec des cellules vivantes à un grossissement de 60X afin de déterminer la localisation subcellulaire des fragments de Bms1.

Dans la souche YSPN60, nous avons observé une dispersion du signal vert (yBMS1-N60-3XyEGFP) dans le cytoplasme, sans aucune concentration notable dans le noyau ou le nucléole (Figure 3.9A). Cette caractéristique est également observée chez la souche mutante YSPN60KA (fragment yBMS1-N60-Mut-3XyEGFP), de même qu'avec le contrôle négatif fait avec le plasmide vide (souche YSPPV2).

L'analyse quantitative des images de YSPN60 a donné comme résultat un très faible coefficient de Pearson PCC (0.127), ce qui indique une très faible corrélation entre les intensités de fluorescence de GFP et de mCherry. Les coefficients $M1 = 0.101$ et $M2 = 1.00$ indiquent qu'une très petite portion de YSPN60 colocalise dans le nucléole, ce qui coïncide avec le coefficient de chevauchement de 0.183 (annexe A).

Les coefficients de colocalisation obtenus pour la souche YSPN60 sont semblables à YSPN60KA (PCC 0.372, $M1 = 0.286$, $M2 = 1$, coefficient de chevauchement de 0,399) et à ceux de notre contrôle négatif YSPPV2 (PCC 0.336, $M1 = 0.238$, $M2 = 1$, coefficient de chevauchement de 0,38). Cela suggère que les fragments provenant de la région N-terminale de Bms1 ne contiennent pas de vraies NLS NoLS. Il convient de noter que la présence de petits points verts ou agrégats a été observée dans certaines cellules de ces souches et pourrait correspondre à des accumulations anormales de protéines mal repliées ou défectueuses.

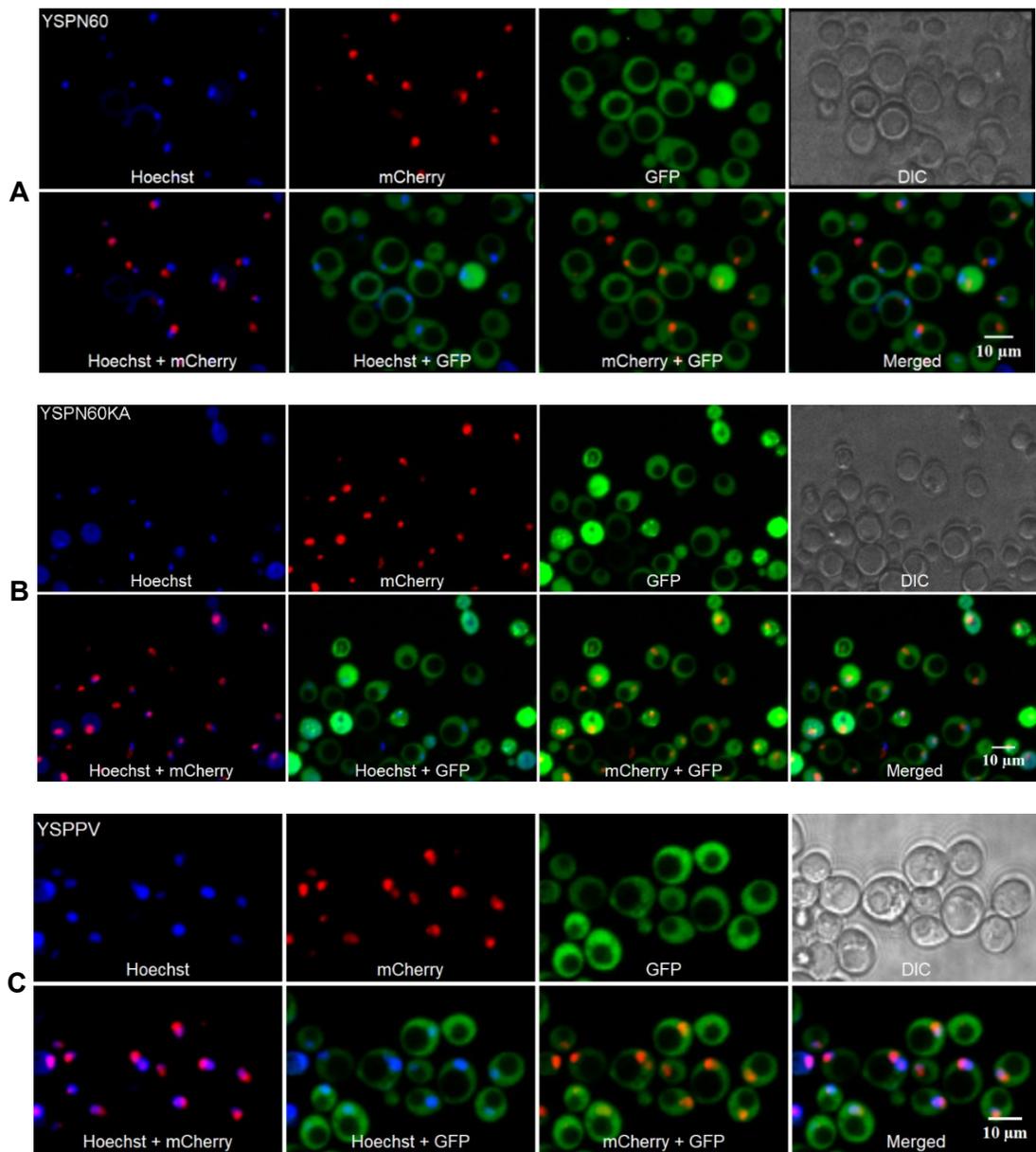


Figure 3.9. Validation des séquences NLS et NoLS putatives des souches YSPN60 et YSPN60KA.

Les observations en microscopie confocale montrent que les signaux des fragments d'intérêt de *BMS1* dans YSPN60 (**A**) et YSPN60KA (**B**) sont dispersés dans le cytoplasme sans localisation dans le noyau ou le nucléole. YSPPV2 (**C**) a été utilisé comme contrôle négatif. La rangée supérieure de chaque groupe d'images montre de façon individuelle les canaux Hoechst (bleu), mCherry (rouge), GFP (vert) et le contraste interférentiel différentiel (DIC); la rangée inférieure montre trois images superposant deux canaux et une image finale avec la superposition des trois canaux mentionnés.

Les observations effectuées sur les fragments de *BMS1* étudiés avec la souche YSPC89 et la souche mutante YSPC89KA (Figure 3.10) révèlent une coloration jaune couvrant la région du nucléole, similaire à celle observée dans notre contrôle positif, la souche YSPRPS3. De plus, un signal vert en forme d'ovale est particulièrement concentré dans le noyau et le nucléole, ce qui suggère que les fragments *yBMS1-C89-3XyEGFP* et *yBMS1-C89-Mut-3XyEGFP* localisent principalement dans le nucléole avec un léger signal dans le nucléoplasme. Les analyses quantitatives confirment ces observations (Figure 3.11). En effet, les résultats indiquent une forte colocalisation du signal GFP et mCherry dans le nucléole de la souche YSPC89. Un PPC de 0.7 montre une forte corrélation entre les intensités de GFP et mCherry, indiquant une présence simultanée significative dans les mêmes pixels. Le coefficient de Manders M1, avec une valeur de 0.859, révèle que 85.9% du signal GFP se trouve dans les mêmes régions que le signal mCherry. De même, le coefficient de Manders M2, avec une valeur de 0.935, indique que 93.5% du signal mCherry chevauche avec le signal GFP. Enfin, un coefficient de chevauchement de 0.718 confirme un bon niveau de chevauchement global des deux signaux fluorescents (annexe B). La souche mutante YSPC89KA, montre des coefficients semblables à YSPC89, PCC 0.738, M1 0.876, M2 0.95 et coefficient de chevauchement de 0.753 (annexe C). Malgré la mutation introduite dans le fragment d'intérêt porté par YSPC89KA, le mécanisme de transport de ce fragment de *Bms1* reste fonctionnel. La colocalisation basée sur la méthode de randomisation de Costes (Figure 3.11B et D) montre également une forte colocalisation de YSPC89 et YSPC89KA. D'autre part, l'analyse des images superposées des canaux rouge et vert de la souche YSPRPS3 montre une localisation apparente du signal de *RPS3* dans le nucléole, indiquée par la coloration jaune observée dans cette région (Figure 3.10C). Cependant, l'analyse des coefficients de colocalisation de Pearson (0.546) et Manders (M1=0.531 M2=0.652) montre plutôt des valeurs caractéristiques d'une faible localisation de *RPS3* dans le nucléole (Figure 3.12A et annexe D); de plus, la méthode de randomisation de Costes (Figure 3.12B) confirme également cette faible colocalisation de *RPS3* dans ce compartiment cellulaire.

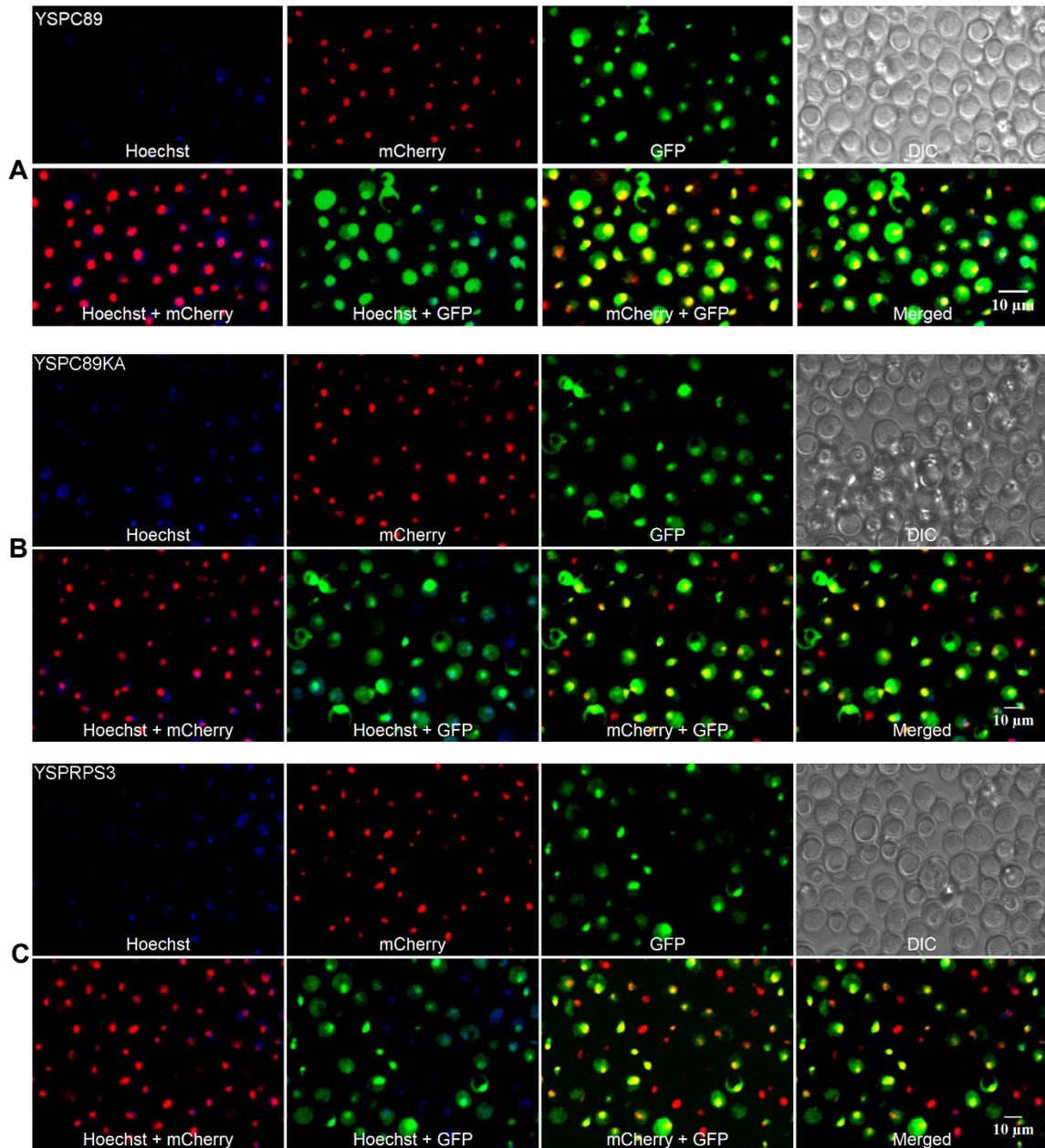


Figure 3.10 Validation des séquences putatives NLS et NoLS des souches YSPC89 et YSPC89KA

Les souches YSPC89 (A) et YSPC89KA (B) montrent des signaux de GFP en forme d'ovale sur le noyau et le nucléole ainsi qu'une coloration jaune (images superposées identifiées comme « *Merged* ») dans la région du nucléole indiquant la colocalisation des deux protéines de fusion dans cette région subcellulaire. La souche YSPRPS3 (C) utilisée comme contrôle semble montrer ces mêmes caractéristiques.

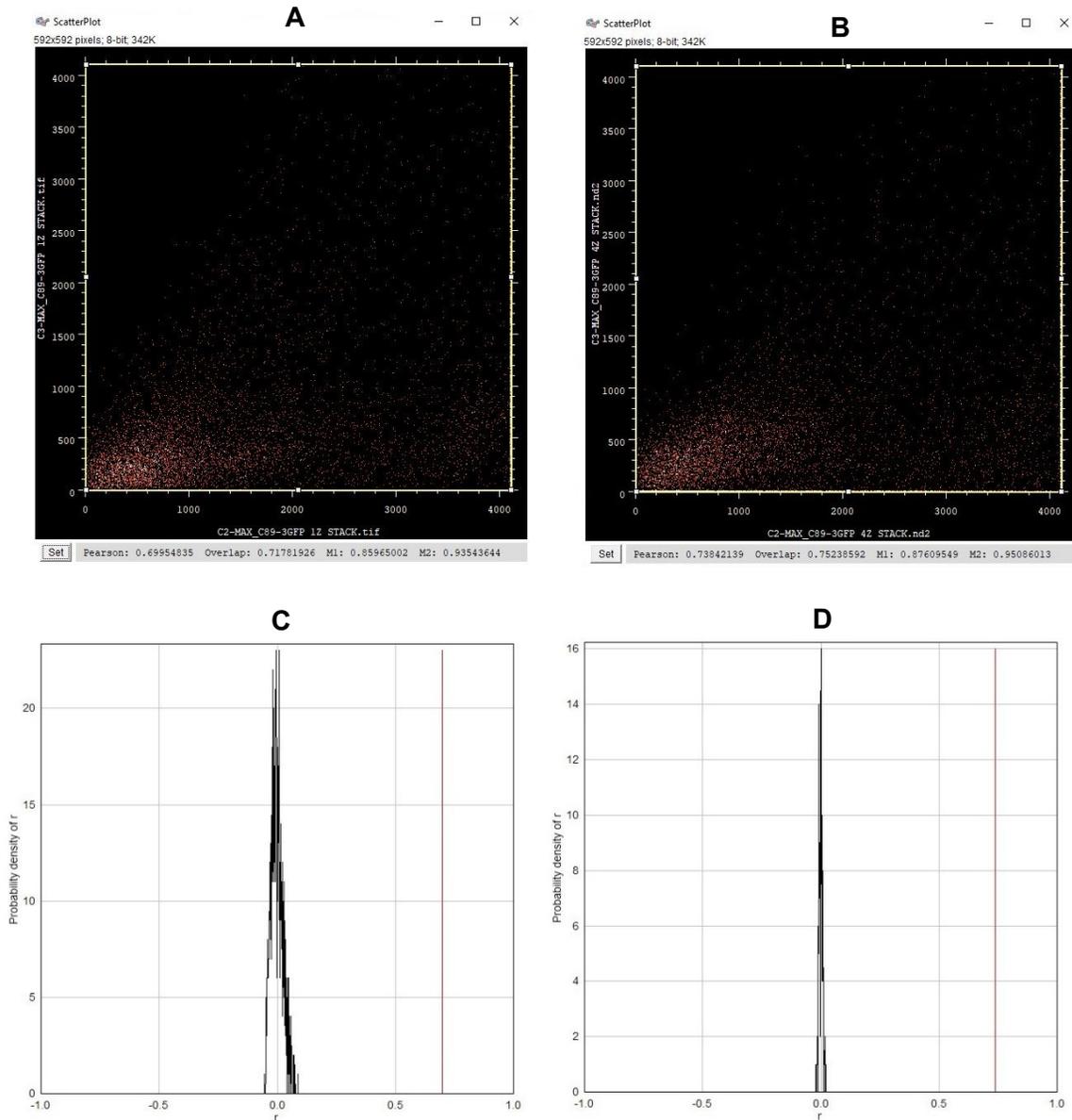


Figure 3.11 Analyse quantitative de la colocalisation des fragments de BMS1 étudiés avec les souches YSPC89 et YSPC89KA

(A) et (B) Scatter plots comparant les intensités des signaux de fluorescence des fragments yBMS1-C89-3XyEGFP et yBMS1-C89-Mut-3XyEGFP (canaux rouge et vert). Chaque point sur le graphique correspond à un pixel de l'image de microscopie confocale, avec l'intensité du signal GFP de yBMS1-C89-3XyEGFP et yBMS1-C89-Mut-3XyEGFP sur l'axe des abscisses (X) et l'intensité du signal mCherry sur l'axe des ordonnées (Y). (C) et (D) Des images montrant la colocalisation basée sur la randomisation de Costes pour les mêmes fragments. Ces graphiques comparent le coefficient de colocalisation de Pearson obtenu à partir des images réelles (indiqué par une ligne verticale rouge à droite) à une distribution de coefficients calculés à partir de plusieurs images aléatoires

(représentée par le courbe au centre de chaque graphique). L'analyse a été effectuée avec le logiciel Fiji, en utilisant les plugins *Colocalization finder* et JaCoP.

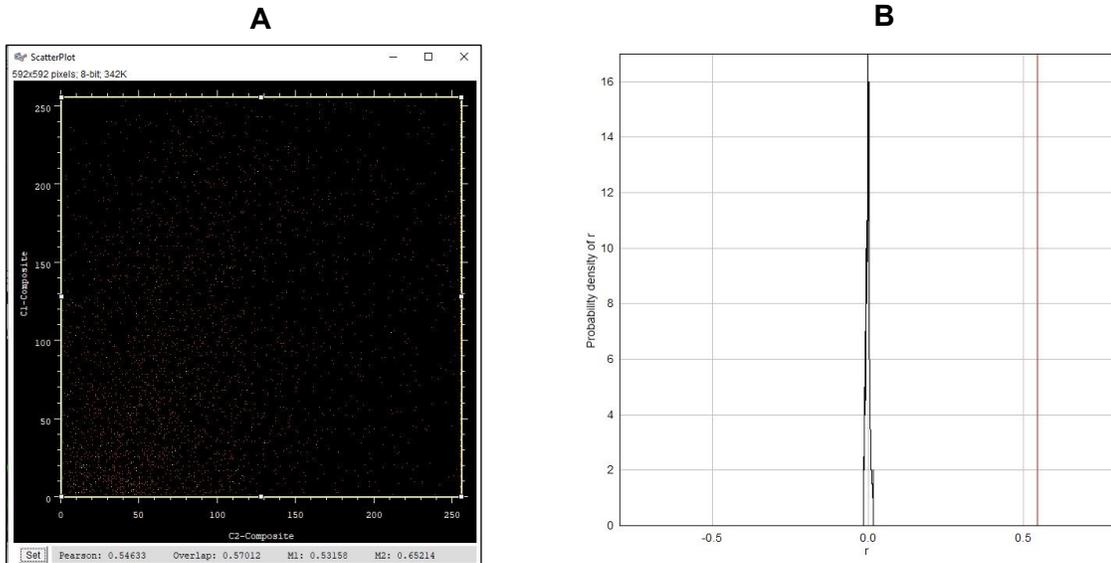


Figure 3.12 Analyse quantitative de la colocalisation subcellulaire de *RPS3*.

(A) Scatter plot montrant les intensités des pixels du canal vert (*RPS3* fusionnée à GFP) et rouge (nucléole marqué avec mCherry). La distribution des pixels est hors des axes et les valeurs coefficients de corrélation et de chevauchement (en bas de la figure) indiquent une localisation faible de *RPS3* dans le nucléole. **(B)**. Histogramme obtenu avec la randomisation de Costes pour *RPS3*; la valeur de PCC de l'image originale (indiquée par une ligne verticale rouge) n'est pas significativement élevée lorsqu'on la compare aux valeurs de PCC générées aléatoirement (représentées par la courbe).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Le syndrome d'Adams Oliver (SAO) est une maladie génétique rare, caractérisée par la présence concomitante de deux manifestations cliniques : l'aplasia cutis congénita (ACC) et des défauts de réduction transversale des membres terminaux (Hassed et al., 2017). La présence de ces deux signes cliniques est nécessaire pour confirmer le diagnostic du SAO. Les mutations génétiques responsables du SAO sont associées à des gènes tels que *ARHGAP31*, *DLL4*, *NOTCH1*, *RBPJ* sous la forme autosomique dominante, ainsi que *DOCK6* et *EOGT* sous la forme autosomique récessive (Meester et al., 2018). Une mutation faux-sens dans le gène *BMS1* a été identifiée comme responsable d'une forme autosomique dominante de ACC (Marneros, 2013). Plus récemment, un autre variant de *BMS1*, nommé R59T, a été découvert par le Dr Philippe Campeau (Hôpital Sainte-Justine) chez une patiente présentant une hypoplasie des doigts. On se demande alors si les mutations dans le gène *BMS1* pourraient être responsables du SAO. Le gène *BMS1* code pour la protéine Bms1, une GTPase nucléolaire essentielle pour la maturation de l'ARNr 18S et la formation de la sous-unité ribosomique 40S (Wegierski et al., 2001). La protéine Bms1 interagit avec diverses protéines et complexes protéiques, notamment Rcl1 (Delprato et al., 2014), pour coordonner le traitement précoce du pré-ARN ribosomique et l'assemblage des sous-unités ribosomiques (Zhu et al., 2021). Cette interaction est cruciale pour assurer la formation adéquate et fonctionnelle des ribosomes. En cas d'absence ou de dysfonctionnement du gène *BMS1*, le processus de biogenèse des ribosomes peut être altéré, ce qui engendre des anomalies dans la synthèse protéique et perturbe de manière significative le métabolisme et les fonctions cellulaires normales. Les anomalies touchant les composants ribosomiques ou les divers produits cellulaires influant sur la structure et la fonction du ribosome sont associées à une gamme variée de maladies regroupées sous le terme de ribosomopathies (Nakhoul et al., 2014). Si la mutation R59T de *BMS1* identifiée chez la patiente avec hypoplasie des doigts s'avère délétère, cela pourrait amener à inclure les mutations de *BMS1* dans la liste des gènes responsables du SAO, et par conséquent à classer le SAO parmi les ribosomopathies.

Afin d'effectuer notre étude de la mutation R45T *in vivo*, nous avons utilisé la levure *S. cerevisiae* comme modèle et nous avons généré une souche conditionnelle qui exprime la protéine Bms1 endogène sous contrôle du promoteur inductible *GAL1*.

Cette mutation a été introduite dans le gène *BMS1* de levure par mutagenèse dirigée et le gène muté a été cloné dans un plasmide centromérique (une copie par cellule) afin de l'exprimer dans la souche haploïde conditionnelle pour *BMS1*. Les plasmides portant soit la version sauvage et mutante de *BMS1* ainsi qu'un plasmide vide ont été utilisés pour transformer la souche conditionnelle et ainsi générer les souches YSP-WT YSP-R45T et YSP-PV.

Ces trois souches ont été utilisées pour les expériences visant à élucider la viabilité des cellules, analyser l'expression de *BMS1* muté, ainsi que le traitement des pré-ARNr pour la biogenèse des ribosomes.

4.1 La souche YSP-R45T, porteuse de la mutation, est viable

Les essais de complémentation sur milieu solide ont mis en évidence la capacité des souches YSP-WT et YSP-R45T à survivre lorsqu'elles sont transférées dans un milieu contenant du dextrose, tout en exhibant une croissance similaire à différentes températures. Bien que ces deux souches aient manifesté une légère thermo-sensibilité à 37°C, cette caractéristique n'a pas empêché leur capacité à être complémentées par la version plasmidique de *BMS1*. Cette thermo-sensibilité à 37°C a déjà été observée chez certaines souches mutantes de *S. cerevisiae* (Payea et al., 2018).

La survie de la souche YSP-R45T après le changement de la source de carbone démontre que la version mutée de *BMS1* exprimée à partir d'un plasmide n'a pas altéré la fonction de la protéine. En revanche, la souche YSP-PV, utilisée comme contrôle négatif (elle ne possède pas de version plasmidique de Bms1 pour compléter la perte de Bms1 endogène) a présenté une croissance très limitée après le passage du milieu SGal-Ura à SDex-Ura.

4.2 La version mutée de Bms1 est capable de compléter la déplétion de Bms1 endogène lors de la cinétique de déplétion

Les expériences de cinétique de déplétion ont été réalisées dans le but d'analyser la réponse des cellules lors de la déplétion de Bms1 endogène suite à un changement de milieu de culture sur une période de 24 heures. La croissance exponentielle observée chez les souches YSP-WT et YSP-R45T durant toute la durée de l'expérience a mis en évidence la complémentation efficace par la version plasmidique de *BMS1*, mutante ou sauvage, permettant aux souches de poursuivre leur croissance malgré l'épuisement de Bms1 endogène en un milieu contenant du dextrose. La souche YSP-R45T montre un comportement presque identique à celui de la souche YSP-WT et totalement différent à celui de YSP-PV dans les conditions étudiées; en effet, YSP-PV a présenté un ralentissement de croissance après 10 heures suivant le passage au dextrose en raison de son incapacité à compléter l'épuisement de Bms1 endogène.

Ces résultats confirment ceux obtenus avec les tests de complémentation en milieu solide où la similarité de la croissance entre les souches YSP-WT et YSP-R45T démontre une complémentation par Bms1 d'origine plasmidique. Bien que YSP-R45T porte la version mutée de *BMS1*, cette altération ne présente aucun phénotype et n'affecte pas la survie des cellules.

4.3 La mutation R45T n'a pas d'impact négatif sur la fonctionnalité de Bms1

L'expression de la protéine Bms1 a été évaluée à la fois dans sa forme endogène et dans une version génétiquement modifiée exprimée à partir d'un plasmide. Les tests ont été réalisés en utilisant des techniques d'immunobuvardage avec des anticorps anti-HA pour Bms1 endogène et anti-FLAG pour Bms1 d'origine plasmidique.

En ce qui concerne l'expression de Bms1 endogène marquée avec un épitope 3HA, les deux souches montrent une bande de grande intensité au temps 0 heures en SDex-Ura; ce signal plus intense est dû à une surexpression par le promoteur inductible *GAL1*, lorsque les cellules ont été cultivées en un milieu contenant du galactose. Aucune bande n'a été détectée après 10 heures, indiquant l'arrêt de l'expression de la protéine Bms1 endogène. En ce qui concerne les versions plasmidiques (WT et mutant), marquées avec

un épitope FLAG, leur expression a été constatée par l'observation des bandes distinctives pendant toute la durée de l'expérience. Le signal des bandes a été plus intense aux temps 10 et 24 heures. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la version plasmidique commence à compenser l'épuisement de Bms1 endogène vers l'heure 10, entraînant une accumulation de Bms1 d'origine plasmidique. Ces observations démontrent que, malgré la présence d'une mutation dans la version plasmidique de Bms1, les cellules ont exprimé une protéine Bms1 fonctionnelle, montrant que la mutation R45T n'a pas aucun effet sur son expression.

4.4 La mutation R45T n'affecte pas la maturation des ARNr

L'analyse de la maturation des ARNr réalisée par Northern blot a révélé que les souches YSP-R45T et YSP-WT présentent des patrons similaires : à l'heure 0, nous observons des niveaux normaux pour le pré-ARNr 20S et l'ARNr mature 18S; vers l'heure 10, la déplétion de Bms1 endogène occasionne une accumulation du pré-ARNr 35S, une forte accumulation du 23S et une diminution de l'intensité de la bande du pré-ARNr 20S. Cependant il est possible d'observer que Bms1 d'origine plasmidique est capable de suppléer l'épuisement de Bms1 endogène dans les deux souches, se traduisant par une diminution de l'accumulation des pré-ARNr 23S et 35S, une augmentation du signal du pré-ARNr 20S et la maturation en continu de l'ARNr 18S, ce qui a été observé jusqu'à l'heure 24.

En contraste, la souche YSP-PV, dépourvue d'une version plasmidique de Bms1 pour compenser l'épuisement de Bms1 endogène, montre une accumulation importante de pré-ARNr 35S et 23S (heures 10 et 24) et l'absence de bandes correspondant au pré-ARNr 20S et à l'ARNr mature 18S (heure 24) indique des défauts dans la maturation des pré-ARNr. Ces résultats démontrent l'importance de Bms1 dans les clivages précoces aux sites A_0 , A_1 et A_2 impliqués dans la maturation du pré-ARNr 35S. Par conséquent, un dysfonctionnement de l'expression de Bms1 perturberait sa fonction essentielle au sein de la biogenèse des ribosomes et l'échec de ces clivages conduirait à une incapacité à traiter intégralement le pré-ARNr 35S, se traduisant par l'accumulation de ce dernier ainsi que de l'ARNr 23S comme conséquence d'un clivage direct au site A_3 .

Étant donné que YSP-R45T, souche porteuse de la mutation dans *BMS1*, ne montre pas de défauts de maturation des pré-ARNr lors de la croissance en SDex-Ura, cela indique que la mutation n'a pas d'effet sur l'activité de Bms1 dans la maturation des pré-ARNr et corrobore les résultats obtenus dans les expériences antérieures.

4.5 La mutation R45T n'a pas d'impact sur la biogenèse des ribosomes

Les résultats de l'analyse de maturation des pré-ARNr permettent d'anticiper qu'en l'absence de défauts de maturation des ARNr 18S et 25S, il n'y aurait pas non plus de défauts de synthèse de ribosomes complets pour les souches YSP-WT et YSP-R45T. Pour approfondir cette étude, nous avons analysé les profils de sédimentation dans des gradients de sucrose afin de détecter d'éventuels défauts dans la production de particules ribosomiques. L'analyse des profils de polysomes a révélé des comportements similaires dans la maturation des pré-ARNr des souches YSP-WT et YSP-R45T malgré la présence de la mutation dans cette dernière. Ces observations suggèrent que cette mutation n'a pas d'effet majeur sur la formation et l'assemblage des ribosomes, du moins dans les conditions expérimentales étudiées.

Après 10 heures du transfert de SGal-Ura à SDex-Ura, les deux souches ont montré une légère accumulation des sous-unités 60S libres par rapport aux 40S et une réduction des ribosomes 80S indiquant un possible délai dans l'assemblage final des ribosomes. Nous avons cependant constaté une récupération postérieure du taux de production des 80S à l'heure 24, ce qui met en évidence la capacité des cellules à s'adapter à long terme au changement de source de carbone grâce à la complémentarité par Bms1 d'origine plasmidique.

4.6 La mutation R45T étudié dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

La sélection de *S. cerevisiae* comme modèle expérimental pour notre étude était supportée sur plusieurs éléments favorables à son utilisation. Il existe une homologie significative entre les protéines de la levure et celles de l'humain (Mohammadi et al., 2015) et la protéine Bms1 est fortement conservée parmi les eucaryotes (Gelperin et al., 2001). De plus, le cycle de vie de *S. cerevisiae* est relativement court et simple, ce qui facilite les études sur des processus biologiques, tels que la croissance et la division cellulaire.

L'alignement de la séquence de Bms1 humaine avec Bms1 de différentes espèces eucaryotes (*S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *D. rerio* et *M. musculus*) a été réalisé avec l'outil bio-informatique CLC Sequence Viewer. Ceci a révélé que l'arginine affectée par la mutation est hautement conservée à travers les eucaryotes suggérant que cet acide aminé est important pour la fonction ou la structure de Bms1.

Par ailleurs, les implications potentielles du changement de l'arginine par une thréonine dans *BMS1* chez la levure et chez l'homme ont été évalués avec l'algorithme de prédiction bio-informatique PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010), qui a prédit des effets nuisibles sur la structure et la fonction de *BMS1* chez l'humain et chez la levure (Figure 4.1).

Finalement, nos résultats ont révélé que la mutation R45T n'est pas nuisible. En effet, nous avons constaté que la viabilité de souche YSP-R45T, portant la mutation étudiée, n'a pas été affectée lors des expériences de complémentation en milieu solide ou liquide. Sa croissance a été très similaire à celle de la souche sauvage YSP-WT, ce qui indique que la version mutée de Bms1 exprimée par YSP-R45T est capable de compléter la fonction de Bms1 endogène en cas de déplétion. De plus, les processus de maturation des ARNr précurseurs et de synthèse des ribosomes ont été normalement réalisés dans les deux souches. Tous ces résultats convergent pour démontrer que la mutation R45T n'a pas d'effet délétère dans la levure. Il reste à déterminer si la mutation est délétère dans d'autres modèles d'étude comme les eucaryotes supérieurs.



Figure 4.1 Prédiction de l'impact des mutations R59T et R45T

(A) Le logiciel PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping V2) a prédit un effet délétère de la mutation R59T dans le gène *BMS1* humain accordant un score HumVar de 0.985. **(B)**. Un effet nocif a été aussi prédit pour la mutation R45T de *BMS1* chez la levure avec un score de 0.965. Le score HumVar est utilisé pour prédire les effets des mutations associées aux maladies humaines.

4.7 La séquence NoLS prédite en C-terminale de Bms1 est un vrai NoLS

L'identification et la validation des NLS ou NoLS revêtent une importance cruciale pour comprendre la localisation subcellulaire des protéines et les mécanismes impliqués dans leur transport vers le noyau et le nucléole. Les importines, connues également sous le nom de caryophérines, sont essentielles pour les échanges nucléaires des grandes molécules. L'entrée des protéines commence par la formation d'un complexe avec l'importine α , l'importine β et la molécule transportée (le cargo). L'importine α sert d'intermédiaire pour l'importine β et reconnaît les NLS présents dans la molécule cargo. Ce mécanisme garantit un transfert efficace des protéines entre le cytoplasme et le noyau

cellulaire (Nguyen Ba et al., 2009). Bien que diverses études aient postulé la nature nucléolaire de Bms1, (Gelperin et al., 2001; Wegierski et al., 2001; Zhu et al., 2021; Delprato et al., 2014), l'identification et la validation des NLS ou NoLS permettant le ciblage de cette protéine n'ont pas été approfondies.

Dans notre étude, nous avons utilisé des outils bio-informatiques pour prédire des séquences putatives de NLS/NoLS présentes dans la région N-terminale et C-terminale de Bms1, lesquelles ont été par la suite évaluées *in vivo*. La localisation subcellulaire de Bms1 a été analysée par microscopie confocale en utilisant des constructions telles que YSPN60, YSPN60KA, YSPC89 et YSPC89KA, lesquelles expriment des fragments de la région N-terminale et C-terminale de Bms1 fusionnés à la protéine GFP.

Nos résultats indiquent que les séquences étudiées avec les fragments portés par YSPN60 et sa version mutée YSPN60KA ne possèdent pas des NLS ou NoLS. En effet, aucune colocalisation de la protéine n'a été observée. La coloration verte dispersée dans le cytoplasme correspond à la protéine Bms1 fusionnée à GFP qui n'a pas été reconnue par les importines, impliquées dans le transport intracellulaire des protéines. Ces résultats concordent avec les travaux de Wegierski et al. (2001), Gelperin et al. (2001) qui n'ont pas mentionné la présence de séquences de localisation nucléaire (NLS) dans la région N-terminale de Bms1.

Les analyses quantitatives réalisées avec les coefficients de Pearson, Manders et le coefficient de chevauchement pour les fragments de Bms1 étudiés avec les souches YSPN60 (PCC 0.127, M1 0.1, M2 1.0, CC 0.183) et YSPN60KA (PCC 0.372, M1 0.286, M2 1.0, CC 0.399) indiquent une absence significative de colocalisation au nucléole. En effet, des valeurs de PCC et de CC inférieures à 0.5 sont généralement interprétées comme une absence de colocalisation notable. Ces résultats confirment les observations qualitatives obtenues par microscopie confocale. Il faut préciser que le fragment de Bms1 en N-terminale étudié avec les souches YSPN60 et YSPN60KA, correspond seulement aux 60 premiers acides aminés de la protéine Bms1; ce fragment a été choisi en raison de son contenu riche en lysines et arginines, des acides aminés caractéristiques des NLS. Même si les expériences n'ont pas montré d'incidence de ce fragment dans la localisation subcellulaire de Bms1, cette région pourrait être importante pour l'interaction de Bms1 avec

l'ARN. Il serait nécessaire d'effectuer d'autres études semblables à partir de l'amplification d'un fragment de Bms1 qui couvre également les acides aminés 183 à 208 (LRASKKRLKHRFWTEVYQGAKLFYLS) en N-terminale.

D'un autre côté, lors de notre analyse par microscopie, nous avons constaté la présence de petits points verts dans certaines cellules de ces souches qui peuvent correspondre à des agrégats. Étant donné que les fragments d'intérêt proviennent de l'amplification d'une petite partie de Bms1, ils peuvent avoir la tendance à se replier incorrectement. Lorsque cela se produit, ces protéines mal repliées s'accumulent dans les cellules sous la forme d'agrégats en attente de dégradation; ce type d'agrégats a été observé par Steiner et al. (2023) tandis que Katayama et al. (2008) les a identifiés dans des cellules de mammifères, les décrivant comme des lysosomes ayant accumulé des protéines de type GFP.

Dans le cas du fragment de Bms1 étudié avec la souche YSPC89, l'analyse par superposition des trois canaux (mCherry, GFP et Hoechst 33342) révèle un signal GFP significatif en forme d'ovale couvrant à la fois le noyau et le nucléole. Cette coloration verte est accompagnée d'une coloration jaune englobant la région du nucléole, résultant de la superposition des canaux GFP et mCherry.

La coloration jaune sur la région du nucléole suggère que YSPC89 présente principalement une localisation nucléolaire, indiquant ainsi que la séquence putative analysée en C-terminale de Bms1 est un véritable NoLS. D'autre part, la présence de la coloration verte en forme d'ovale qui recouvre le noyau indique également une localisation nucléaire de la protéine Bms1 indiquant la possible existence d'un NLS dans la même position de C-terminale. Le chevauchement des NLS et des NoLS a été constaté dans les études de Martin et al. (2015) suite à l'analyse systématique de plus de 46 séquences de NoLS reconnues. Les résultats obtenus à partir de la superposition des images des signaux GFP et mCherry ont été complétés avec des analyses quantitatives en calculant les coefficients de colocalisation; ces analyses montrent une forte localisation de yBMS1-C89-3XyEGFP au nucléole, indiquée par un coefficient de Pearson de 0.7 et des coefficients de Manders M1 et M2 de 0.859 et 0.935 respectivement, signifiant qu'une grande proportion des signaux GFP et mCherry coïncident et appuient fortement l'observation initiale de la localisation de ce fragment de Bms1 dans le nucléole. La

randomisation de Costes a été effectuée pour évaluer la fiabilité des résultats obtenus avec le PCC et Manders; cette approche possède une grande robustesse statistique capable d'écarter le bruit de fond et d'analyser des images complexes avec des signaux de colocalisation qui ne sont pas uniformément répartis. Les résultats obtenus pour YSPC89 montrent que la courbe de distribution des coefficients calculés pour les images aléatoires est inférieure au PCC de l'image réelle. Cela confirme que le PCC observé n'est pas dû au hasard et valide la localisation du fragment yBMS1-C89-3XyEGFP au le nucléole.

Étant donné que Bms1 est une protéine nucléolaire, il est également plausible de suggérer que le signal GFP observée dans le noyau pourrait correspondre au transport actif de la protéine Bms1 entre le cytoplasme et le nucléole.

La séquence putative étudiée avec le fragment de Bms1 contenu dans la souche YSPC89 est composée principalement d'arginines et de lysines; ces acides aminés basiques sont généralement présents dans les séquences des NLS et NoLS typiques (Lu et al., 2021). Ils confèrent une charge positive à ces régions, favorisant ainsi leur interaction avec les importines et facilitant leur transport actif du cytoplasme vers le noyau. De même, cette charge positive favorise l'accumulation de peptides dans le nucléole, un compartiment riche en ARN et doté d'une charge négative.

Concernant le fragment de Bms1 de la souche YSPC89KA, qui porte une mutation dans un emplacement présentant le plus grand nombre d'acides aminés basiques consécutifs, les images superposées de GFP et Nop1-mCherry révèlent une forte localisation de ce fragment dans le nucléole. Ce résultat est corroboré par les coefficients de colocalisation calculés pour les images de YSPC89KA (PCC 0.738, M1 0.876, M2 0.95 et CC 0.753), confirmant la présence significative de ce fragment dans le nucléole. Le fait que la mutation n'ait aucun effet sur le transport du fragment yBMS1-C89-Mut-3XyEGFP vers le nucléole indiquerait que ces acides aminés basiques ne sont pas essentiels pour la reconnaissance de la séquence putative du NLS/NoLS par les importines. Cela suggère que ce sont les acides aminés situés dans le premier groupe du NLS/NoLS bipartite qui sont essentiels pour la reconnaissance et le transport médié par les importines.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Bien que les résultats de notre étude indiquent que la mutation R45T n'est pas nocive, il est important de prendre en compte que les observations faites chez la levure peuvent différer de celles obtenues dans les cellules humaines. En effet, malgré un code génétique similaire, les différents tissus humains présentent des propriétés anatomiques et physiologiques distinctes, et les mécanismes cellulaires peuvent varier considérablement entre la levure et les cellules humaines (Mohammadi et al., 2015). Également, les interactions entre les protéines qui sont spécifiques aux humains et les façons dont elles sont régulées peuvent ne pas être bien reproduites par la levure, ce qui rend difficile l'étude des effets des mutations génétiques dans un cadre qui est propre aux humains (Kachroo et al., 2022). Étant donné que la levure est un organisme unicellulaire qui ne présente pas la complexité des structures tissulaires observées chez l'humain, nous pouvons affirmer que la levure *S. cerevisiae* n'est pas un bon modèle pour étudier la mutation R59T de *BMS1* humaine. Il serait recommandable d'approfondir l'analyse de la mutation en menant des recherches similaires à l'aide d'un organisme modèle plus complexe (eucaryote supérieur) pour déterminer si l'expression du variant R59T peut être délétère.

Un modèle murin pourrait être utilisé à cet effet car ce sont des mammifères qui présentent des membres transversaux facilitant l'observation des manifestations phénotypiques d'une maladie comme l'hypoplasie des doigts. Les souris partagent une grande similarité génétique avec l'humain (Dutta et Sengupta, 2016). De plus, ce modèle a été largement utilisé dans l'étude des maladies humaines en raison de la possibilité de manipuler génétiquement les souris pour reproduire les pathologies dans des conditions spécifiques, ce qui permet d'étudier les effets et les implications pour la santé humaine (Domínguez-Oliva et al., 2023). Également, le modèle murin s'est révélé être d'une grande utilité dans les recherches menées par Marneros (2013) lors de l'étude de la mutation de *BMS1* associée à l'ACC; dans cette étude, la souris a été employée avec succès pour observer les manifestations phénotypiques de la mutation au niveau des sections embryonnaires murines.

Dans cette optique, nous considérons que, malgré les résultats indiquant la non-létalité de la mutation humaine R59T dans le modèle de levure, le modèle murin représente une option prometteuse lors de futures études à mener sur la mutation R59T de *BMS1* humain.

Dans cette étude, nous avons également cherché à comprendre la localisation subcellulaire de la protéine Bms1 en identifiant et en validant ses NLS et NoLS. Nos résultats montrent que les séquences étudiées dans le fragment porté par YSPN60 ne possèdent pas de NLS ou NoLS, ce qui a été confirmé par l'absence de colocalisation de la protéine hybride (fusion GFP) avec le marqueur nucléaire (ADN coloré au Hoechst) et nucléolaire (Nop-mCherry).

Nous avons également confirmé l'existence d'un vrai NoLS dans le fragment correspondant à la partie C-terminale de Bms1 exprimé dans la souche YSPC89. Cela a été confirmé par microscopie confocale *in vivo*, qui a montré la localisation du fragment étudié avec YSPC89 dans le nucléole. L'analyse par microscopie a également révélé que la mutation introduite dans le fragment de la souche YSPC89KA n'a pas altéré la localisation de Bms1, ce qui suggère que la mutation n'affecte pas la reconnaissance du NoLS putatif et permet donc l'accumulation de Bms1 dans le nucléole.

Tel que mentionné précédemment, il semble que ce soit le premier groupement d'acides aminés, et non le deuxième de la séquence putative, qui soit essentiel pour la reconnaissance du NLS de Bms1. Étant donné que notre étude a seulement introduit une mutation dans le deuxième regroupement de la séquence putative du NLS, il serait nécessaire de mener des recherches supplémentaires en introduisant des mutations qui touchent les acides aminés basiques du premier regroupement du NLS bipartite afin de valider le caractère essentiel des acides aminés basiques qui le composent.

ANNEXE A

Coefficients de colocalisation calculés pour YSPN60

Image A: N60WT_MAX_Stack (green)
Image B :N60WT_MAX_Stack (red)

Microscope type: Confocal
NA: 1.4 & IR: 1.518
Calibrations: xy=67 nm/pixel & z=200 nm/pixel
Wavelengths: A=519 nm & B=565 nm

Resolution: dxy=148.28 nm (2 pixels) & dz=370.71 nm (1 pixels)

Threshold: A=143 & B=115

Pearson's Coefficient:
r=0.127

Overlap Coefficient:
r=0.183

$r^2=k1 \times k2$:
k1=0.084
k2=0.397

Manders' Coefficients (original):
M1=0.1 (fraction of A overlapping B)
M2=1.0 (fraction of B overlapping A)

Manders' Coefficients (using thresholds):
M1=0.021 (fraction of A overlapping B)
M2=0.073 (fraction of B overlapping A)

Costes' randomization based colocalization:
Parameters: Nb of randomization rounds: 200, Resolution (bin width): 0.001
r (original)=0.128
r (randomized)=-0.001±0.229
P-value=100.0%

Distance based colocalization:
% of positive A thresholded pixels=23
% of positive B thresholded pixels=11

ANNEXE B

Coefficients de colocalisation calculés pour YSPC89

Image A: C2-MAX_C89-3GFP 1Z STACK.tif

Image B :C3-MAX_C89-3GFP 1Z STACK.tif

Microscope type: Confocal

NA: 1.4 & IR: 1.518

Calibrations: xy=67 nm/pixel & z=200 nm/pixel

Wavelengths: A=519 nm & B=565 nm

Resolution: dxy=148.28 nm (2 pixels) & dz=370.71 nm (1 pixels)

Threshold: A=1937 & B=1849

|

Pearson's Coefficient:

r=0.7

Overlap Coefficient:

r=0.718

r²=k1xk2:

k1=0.368

k2=1.4

Manders' Coefficients (original):

M1=0.859 (fraction of A overlapping B)

M2=0.935 (fraction of B overlapping A)

Manders' Coefficients (using thresholds):

M1=0.193 (fraction of A overlapping B)

M2=0.604 (fraction of B overlapping A)

Costes' randomization based colocalization:

Parameters: Nb of randomization rounds: 200, Resolution (bin width): 0.001

r (original)=0.7

r (randomized)=0.001±0.214

P-value=100.0%

Distance based colocalization:

% of positive A thresholded pixels=47

% of positive B thresholded pixels=99

ANNEXE C

Coefficients de colocalisation calculés pour YSPC89KA

Image A: C2-MAX_C89 Mut-3GFP 4Z STACK.nd2

Image B :C3-MAX_C89 Mut-3GFP 4Z STACK.nd2

Microscope type: Confocal

NA: 1.4 & IR: 1.518

Calibrations: xy=67 nm/pixel & z=200 nm/pixel

Wavelengths: A=519 nm & B=565 nm

Resolution: dxy=148.28 nm (2 pixels) & dz=370.71 nm (1 pixels)

Threshold: A=3214 & B=2510

Pearson's Coefficient:

r=0.738

Overlap Coefficient:

r=0.753

$r^2=k1 \times k2$:

k1=0.401

k2=1.414

Manders' Coefficients (original):

M1=0.876 (fraction of A overlapping B)

M2=0.95 (fraction of B overlapping A)

Manders' Coefficients (using thresholds):

M1=0.163 (fraction of A overlapping B)

M2=0.514 (fraction of B overlapping A)

Costes' randomization based colocalization:

Parameters: Nb of randomization rounds: 200, Resolution (bin width): 0.001

r (original)=0.738

r (randomized)=0.0±0.063

P-value=100.0%

Distance based colocalization:

% of positive A thresholded pixels=64

% of positive B thresholded pixels=99

ANNEXE D

Coefficients de colocalisation calculés pour YSPRPS3

Image A: C2-RPS3-Composite

Image B :C1-RPS3-Composite

Microscope type: Confocal

NA: 1.4 & IR: 1.518

Calibrations: xy=67 nm/pixel & z=200 nm/pixel

Wavelengths: A=519 nm & B=565 nm

Resolution: dxy=148.28 nm (2 pixels) & dz=370.71 nm (1 pixels)

Threshold: A=203 & B=132

Pearson's Coefficient:

r=0.546

Overlap Coefficient:

r=0.57

$r^2=k1 \times k2$:

k1=0.615

k2=0.528

Manders' Coefficients (original):

M1=0.531 (fraction of A overlapping B)

M2=0.652 (fraction of B overlapping A)

Manders' Coefficients (using thresholds):

M1=0.292 (fraction of A overlapping B)

M2=0.208 (fraction of B overlapping A)

Costes' randomization based colocalization:

Parameters: Nb of randomization rounds: 200, Resolution (bin width): 0.001

r (original)=0.547

r (randomized)=0.0±0.026

P-value=100.0%

Distance based colocalization:

% of positive A thresholded pixels=90

% of positive B thresholded pixels=35

RÉFÉRENCES

- Aaron, J. S., Taylor, A. B., & Chew, T.-L. (2018). Image co-localization–co-occurrence versus correlation. *Journal of cell science*, 131(3), jcs211847.
- Adams, F. H., & Oliver, C. (1945). Hereditary deformities in man: due to arrested development. *Journal of Heredity*, 36(1), 3-7.
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4), 248-249.
- Armistead, J., Khatkar, S., Meyer, B., Mark, B. L., Patel, N., Coghlan, G., Lamont, R. E., Liu, S., Wiechert, J., & Cattini, P. A. (2009). Mutation of a gene essential for ribosome biogenesis, EMG1, causes Bowen-Conradi syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 84(6), 728-739.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., & Seidman, J. (1992). *Short protocols in molecular biology*.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6062), 1524-1529.
<https://doi.org/10.1126/science.1212642>
- Bernstein, K. A., Gallagher, J. E., Mitchell, B. M., Granneman, S., & Baserga, S. J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryotic cell*, 3(6), 1619-1626.
- Bonner, W. (1978). Protein migration and accumulation in nuclei. *The cell nucleus*, 6(part C), 97-148.
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F.-M., & Lamond, A. I. (2010). The nucleolus under stress. *Molecular cell*, 40(2), 216-227.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., & Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nature cell biology*, 2(6), E107-E112.
- Chagnon, P., Michaud, J., Mitchell, G., Mercier, J., Marion, J.-F., Drouin, E., Rasquin-Weber, A., Hudson, T. J., & Richter, A. (2002). A missense mutation (R565W) in cirhin (FLJ14728) in North American Indian childhood cirrhosis. *The American Journal of Human Genetics*, 71(6), 1443-1449.
- Cheng, J., Lau, B., La Venuta, G., Ameisemeier, M., Berninghausen, O., Hurt, E., & Beckmann, R. (2020). 90 S pre-ribosome transformation into the primordial 40 S subunit. *Science*, 369(6510), 1470-1476.
- Davis, L. I. (1995). The nuclear pore complex. *Annual review of biochemistry*, 64, 865-896.

- De Keersmaecker, K., Sulima, S. O., & Dinman, J. D. (2015). Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo-to hyperproliferation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *125*(9), 1377-1382.
- de la Cruz, J., Karbstein, K., & Woolford Jr, J. L. (2015). Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annual review of biochemistry*, *84*(1), 93-129.
- Delprato, A., Kadri, Y. A., Pérébaskine, N., Monfoulet, C., Henry, Y., Henras, A. K., & Fribourg, S. (2014). Crucial role of the Rcl1p–Bms1p interaction for yeast pre-ribosomal RNA processing. *Nucleic acids research*, *42*(15), 10161-10172.
- Domínguez-Oliva, A., Hernández-Ávalos, I., Martínez-Burnes, J., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., & Mota-Rojas, D. (2023). The importance of animal models in biomedical research: current insights and applications. *Animals*, *13*(7), 1223.
- Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlege, R. E., Shabanowitz, J., & Osheim, Y. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, *417*(6892), 967-970.
- Dror, Y., Donadieu, J., Koglmeier, J., Dodge, J., Toiviainen - Salo, S., Makitie, O., Kerr, E., Zeidler, C., Shimamura, A., & Shah, N. (2011). Draft consensus guidelines for diagnosis and treatment of Shwachman - Diamond syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1242*(1), 40-55.
- Dubois, M.-L., & Boisvert, F.-M. (2016). The nucleolus: structure and function. *The Functional Nucleus*, 29-49.
- Emmott, E., & Hiscox, J. A. (2009). Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO reports*, *10*(3), 231-238.
- Fatica, A., & Tollervy, D. (2002). Making ribosomes. *Current opinion in cell biology*, *14*(3), 313-318.
- Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., & Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline - regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *13*(9), 837-848.
- Gelperin, D., Horton, L., Beckman, J., Hensold, J., & Lemmon, S. K. (2001). Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *Rna*, *7*(9), 1268-1283.
<https://doi.org/10.1017/s1355838201013073>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., & Johnston, M. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, *274*(5287), 546-567.

- Görlich, D., & Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), 607-660.
- Hassed, S., Li, S., Mulvihill, J., Aston, C., & Palmer, S. (2017). Adams–Oliver syndrome review of the literature: refining the diagnostic phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 173(3), 790-800.
- Hernandez - Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V., & Lafontaine, D. L. (2010). The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1(3), 415-431.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536–553.
- Kachroo, A. H., Vandelloo, M., Greco, B. M., & Abdullah, M. (2022). Humanized yeast to model human biology, disease and evolution. *Disease models & mechanisms*, 15(6), dmm049309.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39(3), 499-509.
- Karbstein, K., & Doudna, J. A. (2006). GTP-dependent formation of a ribonucleoprotein subcomplex required for ribosome biogenesis. *Journal of molecular biology*, 356(2), 432-443.
- Katayama, H., Yamamoto, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., & Miyawaki, A. (2008). GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell structure and function*, 33(1), 1-12.
- Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Koš-Braun, I., Koš, M., Thoms, M., Berninghausen, O., & Beckmann, R. (2016). Architecture of the 90S pre-ribosome: a structural view on the birth of the eukaryotic ribosome. *Cell*, 166(2), 380-393.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10171-10176.
- Kressler, D., Hurt, E., & Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(6), 673-683.
- Kressler, D., Linder, P., & de la Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*.
- Kushnirov, V. V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 16(9), 857-860.
- Lafontaine, D. L. (2023). In phase with the nucleolus. *Cell Research*, 33(8), 579-580.

- Lafontaine, D. L., Riback, J. A., Bascetin, R., & Brangwynne, C. P. (2021). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature reviews Molecular cell biology*, 22(3), 165-182.
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5101-5105.
- Lehman, A., Wuyts, W., & Patel, M. S. Adams-Oliver Syndrome, synonym: Aplasia Cutis Congenita with Terminal Transverse Limb Defects. *GeneReviews* 2016.
- Longtine, M. S., Mckenzie III, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., & Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR - based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), 953-961.
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell communication and signaling*, 19(1), 60.
- Manders, E. M., Verbeek, F., & Aten, J. (1993). Measurement of co - localization of objects in dual - colour confocal images. *Journal of microscopy*, 169(3), 375-382.
- Marneros, A. G. (2013). BMS1 is mutated in aplasia cutis congenita. *PLoS genetics*, 9(6), e1003573.
- Mason, P. J., & Bessler, M. (2011). The genetics of dyskeratosis congenita. *Cancer genetics*, 204(12), 635-645.
- Meester, J. A., Sukalo, M., Schröder, K. C., Schanze, D., Baynam, G., Borck, G., Bramswig, N. C., Duman, D., Gilbert - Dussardier, B., & Holder - Espinasse, M. (2018). Elucidating the genetic architecture of Adams–Oliver syndrome in a large European cohort. *Human mutation*, 39(9), 1246-1261.
- Mills, E. W., & Green, R. (2017). Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science*, 358(6363), eaan2755.
- Mitterer, V., Gantenbein, N., Birner-Gruenberger, R., Murat, G., Bergler, H., Kressler, D., & Pertschy, B. (2016). Nuclear import of dimerized ribosomal protein Rps3 in complex with its chaperone Yar1. *Scientific reports*, 6(1), 36714.
- Mohammadi, S., Saberidokht, B., Subramaniam, S., & Grama, A. (2015). Scope and limitations of yeast as a model organism for studying human tissue-specific pathways. *BMC systems biology*, 9, 1-22.
- Nakhoul, H., Ke, J., Zhou, X., Liao, W., Zeng, S. X., & Lu, H. (2014). Ribosomopathies: mechanisms of disease. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 7, CMBD.S16952.

- Narla, A., & Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *115*(16), 3196-3205.
- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N., & Moses, A. M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC bioinformatics*, *10*, 1-11.
- Paine, P. L., Moore, L. C., & Horowitz, S. B. (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature*, *254*(5496), 109-114.
- Payea, M. J., Sloma, M. F., Kon, Y., Young, D. L., Guy, M. P., Zhang, X., De Zoysa, T., Fields, S., Mathews, D. H., & Phizicky, E. M. (2018). Widespread temperature sensitivity and tRNA decay due to mutations in a yeast tRNA. *Rna*, *24*(3), 410-422.
- Prescott, L. M. (2013). *Microbiologie* (4e éd ed.). De Boeck.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, *108*(4), 557-572.
- Reed, M. L., Dove, B. K., Jackson, R. M., Collins, R., Brooks, G., & Hiscox, J. A. (2006). Delineation and modelling of a nucleolar retention signal in the coronavirus nucleocapsid protein. *Traffic*, *7*(7), 833-848.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., & Chait, B. T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *The Journal of cell biology*, *148*(4), 635-652.
- Scheer, U., & Hock, R. (1999). Structure and function of the nucleolus. *Current opinion in cell biology*, *11*(3), 385-390.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., & Schmid, B. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 676-682.
- Schlump, J.-U., Stein, A., Hehr, U., Karen, T., Möller-Hartmann, C., Elcioglu, N. H., Bogdanova, N., Woike, H. F., Lohmann, D. R., & Felderhoff-Mueser, U. (2012). Treacher Collins syndrome: clinical implications for the paediatrician—a new mutation in a severely affected newborn and comparison with three further patients with the same mutation, and review of the literature. *European journal of pediatrics*, *171*, 1611-1618.
- Scott, M. S., Troshin, P. V., & Barton, G. J. (2011). NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC bioinformatics*, *12*, 1-7.
- Shaw, P., & Brown, J. (2012). Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant physiology*, *158*(1), 44-51.

- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *122*(1), 19-27.
- Siva, K., Ek, F., Chen, J., Ghani Alattar, A., Sigmundsson, K., Olsson, R., Wlodarski, M., Lundbäck, T., & Flygare, J. (2019). A phenotypic screening assay identifies modulators of Diamond Blackfan anemia. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, *24*(3), 304-313.
- Sleiman, S., & Dragon, F. (2022). Analyse fonctionnelle et structurale de facteurs phylogénétiquement conservés impliqués dans la biogenèse des ribosomes [Dissertation, Université du Québec à Montréal]. <http://www.archipel.uqam.ca>.
- Sleiman, S., Marshall, A. E., Dong, X., Mhanni, A., Alidou-D'Anjou, I., Frosk, P., Marin, S. E., Stark, Z., Del Bigio, M. R., & McBride, A. (2022). Compound heterozygous variants in SHQ1 are associated with a spectrum of neurological features, including early-onset dystonia. *Human Molecular Genetics*, *31*(4), 614-624.
- Steiner, A., Favre, S., Mack, M., Hausharter, A., Pillet, B., Hafner, J., Mitterer, V., Kressler, D., Pertschy, B., & Zierler, I. (2023). Dissecting the Nuclear Import of the Ribosomal Protein Rps2 (uS5). *Biomolecules*, *13*(7), 1127.
- Taddei, A., & Gasser, S. M. (2012). Structure and function in the budding yeast nucleus. *Genetics*, *192*(1), 107-129.
- Venema, J., & Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics*, *33*(1), 261-311.
- Vincent, N. G., Charette, J. M., & Baserga, S. J. (2018). The SSU processome interactome in *Saccharomyces cerevisiae* reveals novel protein subcomplexes. *Rna*, *24*(1), 77-89.
- Wang, W., Dai, C., & Zhang, L. (2021). Classification of congenital thumb hypoplasia and deformity. *Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, *3*(4), 181-188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cjprs.2021.12.002>
- Wang, Y., Luo, Y., Hong, Y., Peng, J., & Lo, L. (2012). Ribosome biogenesis factor Bms1-like is essential for liver development in zebrafish. *Journal of Genetics and Genomics*, *39*(9), 451-462.
- Wegierski, T., Billy, E., Nasr, F., & Filipowicz, W. (2001). Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast. *Rna*, *7*(9), 1254-1267. <https://doi.org/10.1017/s1355838201012079>
- Woolford Jr, J. L., & Baserga, S. J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *195*(3), 643-681.
- Zhu, Y., Wang, Y., Tao, B., Han, J., Chen, H., Zhu, Q., Huang, L., He, Y., Hong, J., & Li, Y. (2021). Nucleolar GTPase Bms1 displaces Ttf1 from RFB-sites to balance

progression of rDNA transcription and replication. *Journal of Molecular Cell Biology*, 13(12), 902-917.

Zinchuk, V., Zinchuk, O., & Okada, T. (2007). Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta histochemica et cytochemica*, 40(4), 101-111.