UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE FONCTIONNELLE DE DEUX ARN MÉTHYLTRANSFÉRASES NUCLÉOLAIRES CHEZ LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR HAFIZA HEBBACHI

JANVIER 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

<u>Avertissement</u>

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.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr François Dragon, pour son support tout au long de ma maitrise, pour tous les conseils, l'encouragement et surtout pour sa compréhension et pour le choix de sujet qui m'a appris beaucoup de choses en science.

Un grand merci pour mes collègues au laboratoire, Sophie, Kevin, Chiraz, Samaneh, Diane, Sabrina et Carine. Je remercie aussi tous les membres du Département des sciences biologiques, Département de chimie, et les techniciens qui m'ont aidé particulièrement Denis Flipo.

Je remercie très profondément les membres du comité d'évaluation, Dr Claire Bénard et Dr Jean Danyluk, pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

De si loin, mais qui pensent à moi en tout moment, mes chers parents, frères et sœurs et toute la grande famille, merci.

Enfin, un profond remerciement pour ma petite famille, mon conjoint pour le soutien continu et l'encouragement permanent et mes enfants pour les beaux sourires, source de mon énergie.

DÉDICACE

-

À mes êtres les plus chers,

mes parents et mon conjoint.

TABLES DES MATIÈRES

LIS	TE DES	S FIGURES	vii
LIS	TE DES	S TABLEAUX	ix
LIS	TE DES	S ABRÉVIATIONS	x
RÉS	SUMÉ		xi
CH	APITRE	E I INTRODUCTION	1
1.1	La mo	éthylation	1
1.2	Struct	ture des MTases	1
1.3	Méca	nisme de la méthylation	2
1.4	Class	ification des MTases	3
	1.4.1 1.4.2 1.4.3	La famille des <i>Rossman-like fold</i> MTases (RFM) ou classe I La famille des MTases avec un domaine SET ou classe V Les MTases de la famille SPOUT ou classe IV	5 5 6
1.5	Fonct	tions biologiques de la méthylation	9
	1.5.1 1.5.2 1.5.3	La méthylation des protéines La méthylation de l'ADN La méthylation de l'ARN	9 10 11
1.6	La me	éthylation pendant la biogénèse des ribosomes	12
	1.6.1 1.6.2	Rôles de la méthylation pendant la biogénèse des ribosomes Pathologies liées à la méthylation des ribosomes	13 14
1.7	Le tra	ansport nucléaire et la localisation nucléolaire	15
1.8	Les p	protéines Ygr283c et Ymr310c	19
1.9	Нуро	othèses et objectifs	24
СН	APITRI	E II MATÉRIEL ET MÉTHODES	25
2.1	Souc	hes bactériennes et souches de levures	25

2.2	Milieux de culture			
2.3	Oligonucléotides et plasmides			
2.4	Manip	pulations des bactéries	29	
	2.4.1 2.4.2	Préparation et transformation des bactéries chimio-compétentes Préparation et transformation des bactéries électro-compétentes	29 30	
2.5	Extra	ction de l'ADN plasmidique des bactéries	30	
2.6	Préparation et transformation des levures compétentes			
2.7	Répli	Réplica		
2.8	Extra	ction de l'ADN génomique des levures	32	
2.9	Extra	ction des protéines de levures	33	
2.10	Analy	se des protéines par immunobuvardage	34	
2.11	Tests	de croissance cellulaire	35	
	2.11.1 2.11.2	Test de croissance en milieu liquide (courbe de croissance) Test de croissance sur milieu solide	35 35	
2.12	Micro	oscopie confocale	35	
	2.12.1 2.12.2	Observation des constructions GFP Immunofluorescence indirecte	35 36	
2.13	Cribl	age génétique synthétique létal	37	
CHAPITRE III RÉSULTATS				
3.1	La so	uche $ygr\Delta ymr\Delta$ est viable	39	
3.2	Cour	bes de croissances en milieu liquide	42	
3.3	Les in	nteractions génétiques de YGR et YMR	44	
3.4	La dé	élétion de YMR diminue légèrement le taux d'expression de YGR	49	
3.5	YGR	et YMR se localisent au nucléole	51	
CH	APITR	E IV DISCUSSION	54	
4.1	La so	suche $ygr\Delta ymr\Delta$ est viable	54	
4.2	La de	élétion de YGR ralentit légèrement la croissance des levures	55	
4.3	La de	élétion de YMR diminue légèrement le taux d'expression de YGR	57	
4.4	YGR	et YMR se localisent au nucléole	58	

 \mathbf{v}

		vi
4.5	Conclusions et perspectives	59
ANN	VEXE A	61
ANI	NEXE B	62
BIB	LIOGRAPHIE	.64

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	L'expression des MTases périodiques pendant le YMC	4
1.2	Diagramme topologique représentatif de la structure générale caractéristique des trois principaux groupes de MTases	6
1.3	Structure topologique des domaines catalytiques de la protéine TrmH (SpoU) et TrmD	7
1.4	Sites de méthylation de l'ARNr chez la levure	14
1.5	Le NPC	16
1.6	Le nucléole : site de transcription de l'ADNr et de la biogénèse des ribosomes	18
1.7	Alignement multiples de la séquence protéique du nœud α/β des protéines YGR, YMR et MT1	21
1.8	Représentation schématique des domaines fonctionnels des protéines YGR, YMR, leur homologue l'humain C9orf114 et leur homologue chez les archéobactéries (MT1)	22
2.1	Les épitopes TAP et HTP	26
3.1	Construction des souches ygr Δ , ymr Δ et ygr Δ ymr Δ	41
3.2	La souche de double délétion (ygr Δ ymr Δ) est viable	42

3.3	Vérification de l'effet des délétions sur la croissance des levures en milieu liquide	44
3.4	Mutagénèse aléatoire et sélection par ADE2	47
3.5	Les étapes de criblage génétique synthétique létal	48
3.6	La délétion de YMR diminue le niveau de l'expression de la protéine YGR	51
3.7	Constructions utilisées pour l'observation microscopique des fusions GFP	53
3.8	Les protéines YGR et YMR se localisent au nucléole	54
4.1	Modèle de la structure des protéines MT1, YGR et YMR	57
4.2	Différents dimères : différentes fonctions	59

viii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		
3.1	Tableau récapitulatif pour les résultats des cribles génétiques	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNr	ADN ribosomique
AdoHcy	S-adénosyl-L-homocystéine
AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
LB	Milieu Luria-Bertani
miARN	MicroARN
MTase	Méthyltransférase
NLS	Nuclear localization signal
NoLS	Nucleolar localization sequences
PBS	Polar body spindle
RE	Réticulum endoplasmique
RFM	Rossman-like fold methyltransferase
RRB	Ribosomal RNA and ribosome biosynthesis regulon
siARN	small interfering ARN
snoARN	Small nucleolar ARN
WGD	Whole genome duplication
YMC	Yeast metabolic cycle

RÉSUMÉ

Les gènes YGR283C et YMR310C codent pour deux enzymes paralogues de la levure bourgeonnante Saccharomyces cerevisiae, Ces enzymes que nous appelons YGR et YMR sont conservées des archéobactéries aux mammifères, mais elles ne sont pas essentielles à la survie chez la levure. YGR et YMR appartiennent à la superfamille SPOUT d'ARN méthyltransférases. Elles ont chacune un domaine catalytique SPOUT responsable de l'activité ARN méthyltransférase qui contient un nœud α/β et un domaine OB-fold pour l'interaction avec les acides nucléiques.

Dans mon projet de recherche, j'ai montré que la souche de double délétion $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ est viable et que cette délétion n'affecte pas la croissance des levures. Cependant seule la simple délétion $ygr\Delta$ ralentit légèrement la croissance des levures. L'observation microscopique des protéines YGR et YMR fusionnées à la protéine GFP a montré que les deux paralogues colocalisent avec la protéine Gar1, un marqueur du nucléole. La vérification de l'expression des protéines par immunobuvardage montre une légère diminution du taux d'expression de YGR en absence de YMR. De plus, j'ai effectué un criblage génétique synthétique létal, dans le but d'isoler des mutants qui deviennent dépendants du gène YGR283C ou YMR310C. Le criblage génétique nous permettra d'élaborer de nouvelles recherches pour mieux comprendre la fonction de ces enzymes.

Mots clés : nucléole, S. cerevisiae, ARN méthyltransférase, criblage génétique synthétique létal.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La méthylation

La méthylation est l'une des modifications biochimiques covalentes les plus courantes chez les organismes vivants. Elle consiste au transfert d'un groupe méthyle d'un donneur à un substrat par l'intervention d'une enzyme méthyltransférase (MTase). Les substrats de la méthylation varient des plus petites molécules (comme l'arsénite et la glycine) aux macromolécules (ADN, ARN, lipides et protéines).

1.2 Structure des MTases

La première structure d'une MTase dépendante de S-adénosyl-méthionine (AdoMet) a été publiée en 1993 pour M.HhaI, une ADN MTase qui catalyse la méthylation d'une cytosine en C5. Depuis, avec la mise en évidence d'autres structures de MTases il était évident que toutes les MTases partagent la même structure de base. En effet, les MTases partagent une structure commune de sept brins β mixtes ($6\downarrow 7\uparrow 5\downarrow 4\downarrow 1\downarrow$ $2\downarrow 3\downarrow$) connue sous le nom de « repliement de MTases dépendant de AdoMet », à l'exception d'une arginine MTase qui contient un repliement consensus compact où il manque les deux brins antiparallèles ($6\downarrow 7\uparrow$). La même structure existe dans les différentes classes de MTases qui agissent sur des petites molécules (glycine ou arsénite) ou sur des macromolécules (ADN, ARN et protéines), que leur cible atomique soit un carbone, oxygène, azote, sulfure ou même un halogénure de métal (Schubert *et al.*, 2003).

Malgré leur similarité, les MTases, comme la plupart des enzymes, présentent une promiscuité enzymatique, cela veut dire qu'elles présentent une analogie de structure et donc différentes structures du domaine catalytique peuvent effectuer une même réaction. En même temps, elles peuvent être pluripotentes et donc une même structure peut être impliquée dans des réactions catalytiques différentes. Cette flexibilité peut être due à la nécessité d'un cofacteur commun, AdoMet dans ce cas.

1.3 Mécanisme de la méthylation

AdoMet est le substrat le plus utilisé par les enzymes après l'ATP (adénosine triphosphate). AdoMet est le plus souvent utilisé par les MTases comme donneur du groupe méthyle, cela en résulte S-adénosyl-homocystéine (AdoHcy) (Schubert *et al.*, 2003). La méthylation est souvent accomplie par un mécanisme du transfert direct d'un groupe méthyle au substrat après l'attaque d'un nucléophile actif sur le groupe méthyle d'AdoMet avec une libération concomitante d'AdoHcy. Certaines réactions de méthylation effectuées sur des carbones électrophiles, et non nucléophiles, nécessitent une étape intermédiaire de formation d'un radical 5'-dA• produit d'un clivage d'une deuxième molécule AdoMet (Grove *et al.*, 2011) (Schubert *et al.*, 2003). Le mécanisme du transfert direct est le plus répandu, mais, selon la polarisabilité de l'atome cible, l'activation du nucléophile diffère même dans la même classe de MTases (Schubert *et al.*, 2003).

Le mécanisme d'action des MTases de l'ADN était un mystère, car ce n'était pas clair comment la MTase pouvait agir sur le nucléotide. Étant positionné dans le duplex d'ADN par l'appariement de bases, le nucléotide semble inaccessible pour le site actif de l'enzyme. L'étude de la structure de l'ADN MTase M.HhaI liée à l'ADN synthétique cible a montré que l'enzyme effectue une rotation de ~180° sur la base cible sur ce qui permet à la base d'être placée dans le site catalytique (Cheng et Roberts, 2001).

1.4 Classification des MTases

Les MTases peuvent être classées selon plusieurs paramètres : la structure du domaine catalytique, leurs points isoélectriques, leur profil d'expression et la nature de leurs substrats. Tous ces paramètres sont reliés et permettent de définir chaque groupe de MTases. En fait, l'étude de la relation entre le profil d'expression pendant le cycle métabolique de levure (YMC pour *yeast metabolic cycle*), le point isoélectrique maximal (max PI), la localisation subcellulaire, la structure du domaine catalytique et le type du substrat pour les MTases avec un substrat connu montre une bonne corrélation ce qui a permit l'élaboration d'une nouvelle approche de prédiction de substrat des MTases inconnu (Wlodarski *et al.*, 2011).

La nature du substrat est liée au point isoélectrique de la MTases. En effet, environ 96% des MTases d'ARN ont un point isoélectrique maximal élevé parce que leurs domaines de liaison à l'acide nucléique sont riches en acides aminés chargés positivement; au contraire, les MTases de protéines ont un point isoélectrique maximal faible (Włodarski *et al.*, 2011). La localisation cellulaire permet de déterminer si deux protéines, qui peuvent, potentiellement, interagir, ont la possibilité d'être à proximité (dans le même organite) *in vivo*. Cela a pour exemple les MTases de lipides qui se localisent au réticulum endoplasmique (RE).

Le profil d'expression aussi peut donner des indications sur la possibilité d'interaction entre deux protéines, car les gènes avec une fonction similaires s'expriment en même temps pendant le cycle métabolique. En fait, plus de la moitié des gènes (~3552) de la levure *S. cerevisiae* présentent un profil d'expression synchronisé au cours du cycle métabolique des levures (en saturation avec des concentrations limitées de glucose). Le YMC dure ~300 min et commence par une

phase réductive non-respiratoire suivie d'une phase oxydative respiratoire synchronisée avec une consommation rapide d'oxygène par les levures (Tu *et al.*, 2005). Les MTases de la levure présentent généralement une expression périodique au cours du YMC (Figure 1.1), à l'exception de cinq MTases.



Figure 1.1. L'expression des MTases périodiques pendant le cycle métabolique de la levure *S. cerevisiae*. Chaque MTase est placée au moment du pic d'expression de son gène pendant le YMC. Les MTases sont indiquées selon leur spécificité du substrat. On distingue les MTases de protéines (bleu), d'ARN (rouge) de petites molécules (vert), de lipides (jaune) ou de spécificité inconnu (blanc). Adaptée de Wlodarski *et al.* (2011).

Ici, je vais me concentrer sur des classes de MTases trouvées chez la levure *S. cerevisiae.* L'équipe de Ginalski, en comparant les différentes structures chez les homologues, a trouvé que le méthyltransférome de la levure *S. cerevisiae* contient 86 MTases (53 bien identifiées et 33 putatives avec des substrats inconnus) (Wlodarski

et al., 2011). Les MTases de la levure *S. cerevisiae* peuvent être classées en neuf grandes catégories. La plus répandue est RFM (pour *Rossman-like fold MTases*) qui regroupe 56 MTases, puis les MTases avec un domaine SET (12 MTases), SPOUT (7 MTases), *TIM \beta/a-barrel* (3 MTases), transmembranaires (3 MTases), tétrapyrrole méthylase (2 MTases), *DNA/RNA-binding 3-helical bundle* (1 MTase), SS00622-like (1 MTase) et thymidylate synthétase (1 MTase) (Wlodarski *et al.*, 2011).

1.4.1 La famille des Rossman-like fold MTases (RFM) ou classe I

Les protéines de cette famille ressemblent dans leurs structures aux protéines avec le domaine NAD (P)-*binding Rossman fold domain*, à l'exception du brin β 7. Dans les deux familles, le point de changement topologique central forme un creux pour la fixation d'AdoMet ou de NAD(P) (Figure 1.2.a). La nomination par classe (I-V) a été utilisée selon l'ordre de découverte des MTases (Schubert *et al.*, 2003). Cependant, cette nomenclature n'est pas couramment utilisée. Les MTases RFM sont caractérisés par le motif GxFxG (ou au moins GxG) à l'extrémité du premier brin β 1 et d'un résidu acide à la fin du deuxième brin β 2 qui forme des liaisons hydrogène avec les deux groupes hydroxyles d'AdoMet. Les protéines de cette famille peuvent former des homodimères ou des tétramères, mais la plupart sont des monomères (Schubert *et al.*, 2003). Certaines protéines de la famille RFM n'ont pas d'activité MTase, mais plutôt une activité méthylène transférase, spermidine synthase, nicotianamine synthase ou une activité hydroxylase (Kozbial et Mushegian, 2005).

1.4.2 La famille des MTases avec un domaine SET ou classe V

Nommée, famille SET, d'après une protéine de la drosophile où elle a été identifié la première fois (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax). À ce jour, les membres de cette famille sont des MTases de protéines qui catalysent, essentiellement, la méthylation de lysine dans l'extrémité flexible des histones. Ces enzymes sont

caractérisées par trois petits feuillets β (Figure 1.2.c) qui forment un petit creux où se fixe le cofacteur d'AdoMet.



Figure 1.2. Diagramme topologique représentatif de la structure générale caractéristique des trois principaux groupes de MTases. (a) Classe I : la famille RFM : la plupart des structures déjà étudiées présentent un feuillet β avec sept brins et des hélices α de chaque côté. (b) Classe IV: la famille SPOUT qui contient un nœud α/β du côté C-terminal dans le domaine MTase. (c) Classe V : la famille SET caractérisée par la combinaison des trois feuillets β de petite taille (Schubert *et al.*, 2003).

1.4.3 Les MTases de la famille SPOUT ou classe IV

La superfamille SPOUT d'ARN MTases est la fusion de deux familles connues d'ARN MTases qui sont représentées par la protéine SpoU (TrmH) et la protéine TrmD de la bactérie *E. coli*. Selon la nomenclature des gènes, le nom du gène *SpoU* est remplacé par *trmH* (la huitième ARNt MTase identifiée chez la bactérie) et SpoU est utilisé seulement comme le nom de la famille. La protéine TrmH catalyse le

transfert d'un groupe méthyle à partir d'AdoMet au ribose de G18 en position 2'-OH (Gm18) chez la bactérie *E. coli* et la levure *S. cerevisiae*. Alors que les enzymes de la famille TrmD sont responsables de la méthylation d'ARNt N¹-methylguanosine à la position 37 (m¹G37) spécifique des bactéries.



Figure 1.3. Structure topologique des domaines catalytique de la protéine TrmH (SpoU) et TrmD. Les cercles, triangles et AdoMet représentent les hélices α , le feuillet β et le site de liaison d'AdoMet, respectivement. Les motifs conservés sont présentés en vert (motifs 1, 2, 3) et le site de liaison d'AdoMet en rouge (Hori, 2017).

En 1996, Gustafsson *et al.* ont comparé la séquence d'acide aminé de la protéine TrmH de la bactérie *E. coli* avec deux autres MTases d'une bactérie et de levure et ils ont remarqué la présence de trois motifs conservés (Gustafsson *et al.*, 1996; Hori, 2017). En 2002, des analyses bio-informatiques ont démontré que les enzymes de la famille SpoU partagent des séquences homologues avec les enzymes de la famille TrmD et depuis, les deux familles ont été réunies en une seule superfamille appelée SPOUT (Anantharaman *et al.*, 2002). Avec d'autres enzymes qui ont été ajoutées, la superfamille de SPOUT méthyltransférase est divisée en quatre familles, SpoU, TrmD, YbeA et AF2226. De ces familles, la famille AF2226 spécifique des archéobactéries peut être liée aux adaptations particulières à la température. Les

7

eucaryotes ne possèdent que des MTases de la famille SpoU; cela pourrait être dû à un transfert horizontal par les bactéries (Anantharaman *et al.*, 2002).

Les enzymes de la superfamille SPOUT sont caractérisées par les motifs de leurs séquences protéiques et la formation d'un nœud topologique au niveau du domaine catalytique; ce nœud est formé par l'enfilage des chaines de polypeptide à travers une boucle et il est communément appelé nœud α/β (Hori, 2017).

La sous-classification des enzymes de la superfamille SPOUT en plusieurs familles est basée sur le nucléoside cible modifié et sa position sur l'ARN. Ainsi, la structure du site de modification reflète le site catalytique et le mécanisme de la réaction catalytique et l'organisation des domaines et/ou des sous-unités. Cela a permis de distinguer cinq familles; 2'-*O*-méthyltransférases, m¹G37 MTase, m¹Ψ54 MTase, m¹G9 MTase et m¹A9/m¹G9 MTase (ou m¹A9 MTase). La première famille de 2'-Ométhyltransférases peut être sous-divisée en 4 groupes TrmH, TrmJ, TrmL et Trm56 (Tkaczuk *et al.*, 2007).

1.4.3.1 Le groupe 2'-O-ribose MTases

La 2'-O-méthylation est la conversion du groupement 2'-OH à un groupement 2'-Ométhyle sur le ribose de l'ARN. Ce groupe est représenté par Mrm1 et Trm3 chez les levures. La structure cristalline de la protéine RrmA de *Thermus thermophilus* montre que deux des trois résidus catalytiques conservés dans ce groupe sont situés au niveau du nœud, sur la chaine de nouage et sur l'extrémité C-terminale nouée (Nureki *et al.*, 2002). Leur extrémité N-terminale est géométriquement similaire aux protéines ribosomiques qui interagissent avec une boucle interne d'ARN.

1.4.3.2 Le groupe COG2428

Ce groupe est représenté par la protéine Yor021c de la levure, la première SPOUT MTase connue pour méthyler une protéine. Elle catalyse la méthylation au niveau de l'arginine-146 de la protéine Rps3 de la petite sous-unité du ribosome (Young *et al.*, 2012). En fait, la protéine Yor0211c (appelée SFM1, pour SPOUT *family methyltransferase 1*) est la seule MTase avec un substrat connu parmi les membres de ce groupe. Ce groupe a des similarités avec le groupe qui contient la protéine Trm10, qui catalyse la méthylation d'ARNt sur une guanine en position N1. L'azote en position 1 de la guanine modifiée par Trm10 est structurellement similaire à l'azote sur le groupe guanidine de l'arginine. Cette variabilité de substrat est aussi observée dans la famille HemK de sept brins β (SPOUT) MTases qui comprend des enzymes qui catalysent la méthylation des atomes d'azote similaires dans l'adénine et la glutamine (Young *et al.*, 2012).

1.4.3.3 Le groupe COG2106

Dans ce groupe, on peut classer les MTases Ygr283c et Ymr310c de la levure. Tous les membres de ce groupe ont une fonction inconnue. Ces MTases sont caractérisées par l'insertion d'un domaine *OB-fold* dans le domaine SPOUT. Comme cela a été montré par l'étude de la structure cristalline de la protéine MT1 de l'archéobactérie Methanothermobacter thermautotrophicus (Zarembinski et al., 2003), ces protéines dimérisent d'une façon perpendiculaire comme les 2'-*O*-MTases. Il y a aussi une Arg commune comme l'Arg catalytique des 2'-*O* MTases et le résidu T243 qui est similaire au résidu catalytique (S150) de TrmH, et donc la méthylation du ribose peut être la fonction de MT1 et des autres membres de COG2106.

1.5 Fonctions biologiques de la méthylation

1.5.1 La méthylation des protéines

La méthylation des protéines est catalysée généralement sur les résidus lysine, arginine, histidine ou sur le groupe carboxyle. Mais on peut aussi trouver la méthylation des isoaspartates convertis des résidus aspartates qui a pour rôle de renverser la conversion isoaspartates en aspartates due au vieillissement (Stallcup, 2001)

La méthylation la plus étudiée est la méthylation des histones, connue pour son rôle dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes. On trouve la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4), H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 et H4K20 et les méthylations d'arginine H3R2, H3R8 et H4R3. L'effet de la méthylation varie selon le site, le résidu méthylé et le nombre de groupe méthyles transférés (me1, me2 ou me3). Par exemple, la méthylation H3K4me3 augmente l'expression des gènes, alors que la méthylation H3K27me3 qui est associée à la répression de l'expression génique et la méthylation H3K4me1 est associée à la fonction *enhancer* pour amplifier l'expression des gènes (Greer et Shi, 2012). La méthylation et la déméthylation des histones régule le profil d'expression des gènes, mais cela n'est qu'une pièce parmi plusieurs autres impliquées dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes (Dimitrova *et al.*, 2015).

1.5.2 La méthylation de l'ADN

La méthylation d'ADN a été décrite la première fois par Hotchkiss (1948) et les groupes méthyles étaient considérés comme des bases « mineures » alors que les MTases n'ont été observées qu'en 1963 chez les bactéries, puis, chez les animaux et chez les plantes (1968). Le rôle de la méthylation dans la régulation de l'ADN a été suggéré la première fois en 1964 par Sirinivasan et Borek (Razin *et al.*, 1984).

La méthylation de l'ADN fait partie des mécanismes épigénétiques de la régulation de l'expression des gènes. Plusieurs sites de méthylation existent, la plus fréquente est la méthylation en position 5 de la cytosine (5mC) dans les ilots CpG, mais elle peut aussi arriver à d'autres sites (CpA, CpT et CpC). On trouve aussi la méthylation 6mA. Ces modifications ont pour but la régulation de l'expression des gènes par le recrutement des protéines impliquées dans l'expression d'un gène ou en empêchant le recrutement des facteurs de transcription. La méthylation au niveau des promoteurs

de gènes est associée à la répression de l'expression des gènes cibles et le profil de méthylation est conservé dans une même lignée cellulaire par la méthylation *de novo* après duplication de matériel génétique. La méthylation de l'ADN peut aussi être induite sous certaines conditions comme dans la réponse au stress abiotique qui induit un changement du profil de méthylation parmi d'autres mécanismes de régulation de l'expression de gènes chez le maïs (Waters *et al.*, 2017).

1.5.3 La méthylation de l'ARN

Les modifications d'ARN contribuent à la diversité de structure et de fonction des ARN. Cette modification post-transcriptionnelle est l'une des plus courantes, similaire à la pseudouridylation et la thiouridylation. Ainsi, à partir des quatre ribonucléosides de base qui constituent l'ARN (adénosine, guanosine, cytidine et uridine), plus de 100 formes ont été identifiées dans plusieurs organismes (Grosjean, 2005; Limbach *et al.*, 1994). Parmi les modifications d'ARNr, la 2'-O-méthylation est la plus répandue, elle est effectuée au moment de la transcription sur des cibles spécifiques reconnues par les snoRNA (*small nucleolar* ARN) de type à boîte C/D, qui peuvent reconnaitre plus que deux cibles grâce à leur flexibilités (Watkins et Bohnsack, 2012; Yang *et al.*, 2015).

Aussi, l'introduction des groupes 2'-O-méthyle dans les siARN (pour *small interfering* ARN) stabilise les siARN dans le sérum sans affecter leurs activités dans les cellules de mammifères. Chez les plantes, la méthylation de miARN au niveau du ribose du dernier nucléotide protège les miARN des exonucléases et facilite la reconnaissance du miARN pour l'assemblage du complexe RISC (pour *RNA-induced silencing complex*) (Yu *et al.*, 2005). On trouve aussi la méthylation de l'ARNm en position 6 de l'adénosine (m6A) impliquée dans la traduction et la dégradation de l'ARNm après liaison à des protéines « *readers* » d'une façon directe ou indirecte (m6A altère la structure de l'ARNm pour le rendre accessible). La méthylation m6A est associée à la prolifération non contrôlée des cellules cancéreuses et à leur résistance à la chimio et radiothérapie (Dai *et al.*, 2018).

Les ARNt, aussi, sont méthylés surtout au niveau de la région de l'anticodon de base flottante en position 34 ou sur le coté, en position 37 (3' de l'anticodon), alors que la tige acceptrice de l'acide aminé est dépourvue de méthylation. La méthylation au niveau de l'anticodon est nécessaire pour le renforcement de l'interaction codonanticodon et la prévention du décalage de l'appariement (Hori, 2014).

1.6 La méthylation pendant la biogénèse des ribosomes

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique dont la principale fonction est la traduction des ARNm et la synthèse des protéines. Chez la levure *S. cerevisiae*, le ribosome est constitué de l'assemblage de deux sous-unités : la petite sous-unité 40S et la grande sous-unité 60S. La biogénèse des ribosomes est un processus complexe qui comporte plusieurs évènements de modifications, clivages et assemblages des différents composants du ribosome. Plusieurs modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles sont effectuées sur les ARNr ou les protéines constituants le ribosome, mais souvent la fonction de ces modifications n'est pas connue. Certaines ont pour rôle de stabiliser la structure ou de faciliter l'assemblage du ribosome ou bien pour augmenter la fiabilité de traduction (Chow *et al.*, 2007).

Les enzymes qui interviennent dans la maturation du ribosome sont, essentiellement, des ribonucléases qui clivent les précurseurs d'ARNr, des kinases ou des MTases qui modifient l'ARNr et les protéines du ribosome. L'analyse du profil de transcription, sous différentes conditions, a montré que ces protéines sont co-régulées avec les protéines ribosomiques et les ARNr et ensemble forment un régulon de la biosynthèse des ribosomes et d'ARNr (RRB pour *rRNA and ribosome biosynthesis regulon*) (Wade *et al.*, 2006).

1.6.1 Rôles de la méthylation pendant la biogénèse des ribosomes

La méthylation de l'ADNr est impliquée dans la régulation de l'expression des ARNr et des protéines ribosomiques qui sont cruciales pour la biogénèse des ribosomes. La méthylation des ARNr est importante pour leur structure (figure 1.4), notamment la prévention de la formation de liaisons hydrogènes entre les nucléotides complémentaires, mais aussi pour leur fonction. En effet, la plupart des modifications sont regroupées principalement autour des domaines fonctionnels, tel que l'ARNr du centre peptidyltransférase de la grande sous-unité du ribosome et l'ARNr du centre de décodage de la petite sous-unité. Cela souligne un rôle important de la méthylation d'ARNr pour la fidélité et l'efficacité de la traduction de l'ARNm par le ribosome de même que les méthylations au niveau de la région de l'anticodon sur l'ARNt (Motorin et Helm, 2011). Une autre méthylation importante de l'ARNr est la diméthylation des adénines près de l'extrémité 3' du pré-ARNr 20S. Cette modification est indispensable pour la formation de l'ARN 18S de la petite sous-unité 40S du ribosome (Schäfer *et al.*, 2003).

La protéine Rps3 de la petite sous-unité 40S est méthylée par la protéine Yor021c (famille SPOUT), au niveau de l'arginine 146. Cette modification est située dans le site d'interaction de la protéine Rps3 avec l'ARNr 18S. Cependant cette méthylation n'a pas été associée à ses fonctions au niveau du ribosome (fiabilité de la traduction et transport cytoplasmique du ribosome) ou en dehors du ribosome (tel que son activité endonucléase sur l'ADN abasique) (Young *et al.*, 2012).



Figure 1.4. Sites de méthylation de l'ARNr chez la levure. L'étude de la structure du ribosome a révélé la distribution spatiale des méthylations de l'ARNr dans la petite (gauche) et la grande (droite) sous-unité du ribosome (Figure tirée de Sergiev *et al.* (2018)).

Un autre exemple de la méthylation des protéines ribosomique, la protéine Rps27a, une protéine non-essentielle du ribosome impliquée dans la synthèse de l'ARNr 18S, est méthylée en position 39 du résidu cystéine (Baudin-Baillieu *et al.*, 1997). La protéine Rps27a possède une structure au doigt de zinc similaire à celle de la protéine Ada chez la bactérie *E. coli* qui répare les dommages au niveau des liaisons phosphodiester de l'ADN avec la fixation d'un groupe méthyle. La méthylation de la protéine Rps27a pourrait être impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN (Young *et al.*, 2012).

1.6.2 Pathologies liées à la méthylation des ribosomes

La dérégulation de la méthylation de l'ADNr est associée à plusieurs pathologies. L'hyperméthylation des promoteurs de l'ADNr déstabilise le génome et elle est associée au vieillissement et à la maladie d'Alzheimer (Pietrzak *et al.*, 2011). Aussi, l'hyperméthylation des îlots CpG de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs, mais

14

aussi jusqu'à 50% d'hypométhylation des oncogènes cellulaires est associée à plusieurs cancers (Bacalini *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2005; Durso *et al.*, 2017; Gumy-Pause *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2015). Curieusement, tandis que la croissance des cellules tumorales nécessite une activité élevée des ribosomes, certaines tumeurs sont associées à une hyperméthylation de l'ADNr alors que d'autres tumeurs sont associés à une hypométhylation de l'ADNr (Bacalini *et al.*, 2014).

1.7 Le transport nucléaire et la localisation nucléolaire

Les protéines ribosomiques et les protéines impliquées dans la maturation des ribosomes sont traduites et maturées dans le cytoplasme puis transportées vers le noyau à travers le pore nucléaire.

Grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS pour *nuclear localisation signal*), les protéines cytoplasmiques sont reconnues par les importines dans le cytoplasme pour être transportées à travers le complex du pore nucléaire (NPC pour *nuclear pore complex*) vers le noyau (Figure 1.5). Une fois dans l'intérieur du noyau, les protéines nucléolaires doivent être dirigées vers le nucléole, la structure la plus proéminente du noyau eucaryote qui constitue le site de biogénèse et d'assemblage des ribosomes (Figure 1.6).



Figure 1.5. Le NPC. À (gauche) : tomographie cryo-électronique de sections effectuées sur des NPC des cellules HeLa. L'endroit de la section est indiqué par une ligne pointillée rouge. À (droite) : Schéma d'une section verticale au niveau du NPC. Le pore est constitué de plusieurs couches, de l'extérieur vers l'intérieur, le manteau de nucléoporines (jaune), l'adaptateur (vert), le canal de nucléoporines et les nucléoporines adaptatrices (rouge). Sur le côté cytoplasmique, des filaments cytoplasmiques sont émis vers l'extérieur et les peptides riches en répétition de phénylalanine-glycine émis au centre du pore. Sur le côté nucléaire du pore, des filaments sont regroupés pour former une structure en forme de panier. Les deux groupes de fibrilles sont impliqués dans l'import et l'export des protéines. Figure tirée de Dannheisig (2017).

Au contraire du noyau, le nucléole n'est pas un organite entouré par une membrane, mais plutôt une structure qui est formée par plusieurs molécules d'ARN et de protéines regroupées autour des organisateurs nucléolaires (NOR pour *nucleolar organizer regions*) qui consiste en des tandems de l'ADNr. Chez la levure *S. cerevisiae*, les gènes de l'ARNr sont portés par le bras droit du chromosome XII en tandem de 150-200 copies (Tsekrekou *et al.*, 2017). Pour que les complexes protéiques du nucléole soient stables, des protéines *hub* sont chargées d'interagir avec

16

plusieurs protéines en même temps. On peut distinguer les protéines *hub* dynamiques, qui peuvent agir à différents moments à plusieurs localisations, et les protéines *hub* statiques, qui peuvent interagir avec plusieurs protéines en même temps.

L'ADNr est transcrit dans le nucléole par l'ARN polymérase I pour donner l'ARNr qui sera assemblé avec les protéines ribosomiques pour former le ribosome. Les gènes qui codent pour les 274 ARNt, distribués sur les 16 chromosomes de la levure, sont regroupés à proximité du nucléole et transcrits par l'ARN polymérase III. L'hétérochromatine, tel que l'ADN télomérique, se regroupe dans des régions du noyau lié à des protéines SIR (pour *Silent Information Regulator*). Les gènes fortement exprimés sont localisés au pore nucléaire, cela augmente l'efficacité de transcription et d'exportation des ARNm au cytoplasme pour la traduction. Les isolateurs permettent la répression de certains gènes dans un site à un taux d'expression élevé ou, au contraire, l'expression d'un gène dans un site de répression de l'expression (Ishii *et al.*, 2002).

Plusieurs motifs NoLS nécessaires ou suffisants pour la localisation nucléolaire de protéines ont été identifiés. Ils sont composés principalement des résidus chargés positivement, Arg et Lys, et leur taille peut varier de sept à huit acides aminés jusqu'à trente résidus. À cause de ces observations, les chercheurs pensaient que les motifs NoLS permettent l'interaction avec l'ADNr et par conséquent la localisation nucléolaire de la protéine. D'autres observations plus récentes sur l'importance fonctionnelle de certains résidus, Trp ou Pro, et aussi de certaines modifications, (phosphorylation ou SUMOylation à proximité des motifs NoLS), ont aidé à la compréhension du rôle des interactions protéiques dans la localisation nucléolaire, surtout les interactions avec les protéines *hub* nucléolaires (Emmott et Hiscox, 2009).



Figure 1.6. Le nucléole : site de transcription de l'ADNr et de la biogénèse des ribosomes. A. Les sous-compartiments de la transcription dans le noyau des levures. NPC : *nuclear pore complex*, SPB (*spindle pole body* ou corps à pole-fuseau). Figure adaptée de Taddei et Gasser (2012). B : Organisation du locus de l'ADNr chez la levure. L'ADNr est transcrit par l'ARN polymérase I pour donner le pré-ARNr qui sera clivé pour donner l'ARN mature 18S, 5.8S et 25S (flèche dirigée vers la droite). L'ARN polymérase III (flèche dirigée vers la gauche) synthétise l'ARN 5S. NTS (*nontranscribed spacer*), ETS (*external transcribed spacer*) Figure tirée de Woolford et Baserga (2013).

Souvent, les motifs NLS et NoLS se chevauchent sur l'extrémité de la protéine, mais ils peuvent aussi être indépendants ou localisés dans un autre domaine fonctionnel tel que le domaine d'interaction avec l'ADN (Emmott et Hiscox, 2009; Meder *et al.*, 2005).

1.8 Les protéines Ygr283c et Ymr310c

Chez la levure *S. cerevisiae*, Ygr283c et Ymr310c sont deux ARN MTases putatives (Wlodarski *et al.*, 2011). Les gènes *YGR283C* et *YMR310C* sont deux paralogues issus de la duplication du génome (Byrne et Wolfe, 2005). Malgré qu'elles soient des paralogues, les protéines Ygr283c et Ymr310c (qu'on appelle ici YGR et YMR) présentent seulement 34% d'identité et 51% de similarité au niveau de leurs séquences protéiques.

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer le phénomène de la duplication du génome ainsi que la divergence de structure entre les paralogues et la raison pour laquelle seulement certains paralogues sont retenus. En effet, le génome des levures a subi plusieurs duplications suivi d'un réarrangement qui a causé la délétion de la plupart des gènes en double pour restaurer la fertilité des levures. On pense que les séquences des paralogues les plus divergentes sont issues des duplications les plus anciennes. Une autre théorie suppose que la dernière duplication du génome a été précédée par la conjugaison, ce qui implique, selon cette théorie que les paralogues étaient plutôt des homologues dans deux espèces différentes de levure et que leur existence dans une cellule a fait d'eux des paralogues qui ont été conservés après la duplication et le réarrangement. Les chercheurs pensent que le réarrangement avait pour but de restaurer la fertilité car la duplication a été précédée d'une fusion entre deux espèces de levures, ce qui a causé l'accumulation de quatre copies du génome et la cellule a réorganisé le génome en éliminant une grande partie de gènes pour restaurer la fertilité (Marcet-Houben et Gabaldon, 2015; Wolfe, 2015).

YGR et YMR sont deux ARN MTases paralogues non essentielles à la survie des levures (Giaever *et al.*, 2002). La délétion du gène *YGR283C* induit une résistance au fluconazole (Anderson *et al.*, 2003), une sensibilité à la streptomycine, la paromomycine (Alamgir *et al.*, 2010) et à l'acide borique (Schmidt *et al.*, 2012; Uluisik *et al.*, 2011) ainsi qu'une légère perturbation dans le processus de fragmentation de la vacuole (Michaillat et Mayer, 2013). La délétion de YMR perturbe la croissance dans des conditions d'anaérobie (Samanfar *et al.*, 2013) et diminue le taux de mortalité cellulaire (Teng *et al.*, 2011). La délétion de YGR confère un phénotype résistant au fluconazole pour les levures (Anderson *et al.*, 2003). Une des choses qui reflètent la divergence entre YGR et YMR est leur localisation subcellulaire. Alors que la protéine YGR fusionnée à la protéine GFP se localise au nucléole (Huh *et al.*, 2003) et interagit avec les protéines ribosomiques (Fleischer *et al.*, 2006), la protéine YMR se localise au noyau (Huh *et al.*, 2003). Toutefois, YGR et YMR font toutes les deux partie du RRB (Wade *et al.*, 2006).

Le substrat de méthylation de YGR et YMR est inconnu, mais des prédictions basées sur la séquence et les propriétés physicochimiques des protéines montrent que YGR et YMR sont des ARN MTases de la famille SPOUT (Wlodarski *et al.*, 2011). Dans un essai *in vitro*, les protéines YGR et YMR ont été incapables de méthyler des protéines ce qui suggère que leurs substrats soit des acides nucléiques (Szczepinska *et al.*, 2014). Par rapport aux SPOUT MTases, la séquence de YMR est plus divergente que celle de YGR, ce qui peut être dû à une autre fonction catalytique ou à une fonction de régulation pour la protéine YMR (Figure 1.7) (Tkaczuk *et al.*, 2007).

Les protéines YGR et YMR, comme les MTases de la famille SPOUT, possèdent le domaine SPOUT constitué du nœud α/β et d'un domaine *OB fold*. En plus, l'analyse bioinformatique de la séquence protéique indique la présence d'une séquence NLS et d'un motif NoLS dans l'extrémité N-terminale des protéines YGR et YMR (Figure 1.8).

YGR283C	DFHYD <mark>EELSKYH-KVET-KLPYIAK</mark> LKKSNILLIFGKW-GHLKRCFRRSD-LESSSLHHYFSGQLQFP
YMR310C	TQSVY <mark>VPLTTRDTSIPE-LSSLPT</mark> AETNPHILLV <u>FS</u> TW-DTLAR <mark>AFKL</mark> DQDQFVDCQGPQEFFD <u>A</u> QL-PCP
MT1	DVV <mark>VATSRNASP-ITSILDEV</mark> KTRMRGAREAAILFGGPYKGLPEID-AD-IWVNTLP
cons	
YGR283C	AS <mark>V</mark> PQGN <u>I</u> PIQDSLPIALTMFQRWAS
YMR310C	VSN <u>S</u> DVADAIPMTLTTLSTVF-
MT1H	GQ-CTET <u>VRTEEAVLATLSVFNMLTQ</u>
cons	

Figure 1.7. Alignement multiple de la séquence du nœud α/β des protéines YGR, YMR et MT1. Les résidus typiques de la fixation d'AdoMet sont soulignés. Les résidus catalytiques typiques sont indiqués en vert. Le site catalytique conservé Thr (mais pas invariant) est indiqué en vert et en caractère gras. L'alignement a été effectué par T-Coffee Homology extension (PCI-COFFEE); (Di Tommaso *et al.*, 2011).

C9orf114 (appelé aussi CENP-32), l'homologue humain de YGR et YMR est une MTase putative qui interagit avec l'ARNm (Castello *et al.*, 2012) et le miR-145 (Treiber *et al.*, 2017). Des études effectuées sur des cellules HEK montrent que C9orf114 est important pour la maturation post-transcriptionelle de mi-R145 mais pas pour la régulation de la traduction par miR-145 qui est un anti-oncomiARN (Ye *et al.*, 2018). C9orf114 n'a pa été testé pour son activité putative MTase sur miR-145, mais cette modification a été étudiée pour son rôle important dans la maturation de miR-145. En effet, une autre MTase, BCDIN3D, catalyse la diméthylation de pre-miR145 à son extrémité 5'-monophosphate et cela résulte en une perte de la charge négative du pré-miARN. Cette charge négative est nécessaire pour l'interaction, et par conséquent, la modification par Dicer. L'inhibition, *in vitro*, de la protéine BCDIN3D dans les cellules MCF-7 du cancer de sein induit la diminution du taux de pré-miR-145, l'augmentation du taux de miR-145 et la perte de la capacité des cellules à croitre indépendamment de l'ancrage (Xhemalce *et al.*, 2012).

21



Figure 1.8. Représentation schématique des domaines fonctionnels des protéines YGR, YMR, leur homologue humain C9orf114 et leur homologue chez les archéobactéries MT1. Le domaine catalytique SPOUT (ligne grise) est caractérisé par le nœud α/β (rouge), et le domaine *OB-fold* (bleu) qui lie l'acide nucléique (ARN). Le motif NLS (jaune), et le motif de localisation nucléolaire NoLS est en vert (pour YGR et YMR, le motif NoLS est prédit par NOD (*Nucleolar localization sequence detector*) (Scott *et al.*, 2011). Le schéma est construit par DOG 1.0 (Ren *et al.*, 2009).

La protéine C9orf114 a été localisée au kinétocore à côté de CLASP1 et CLASP2, deux paralogues impliqués dans la régulation de la dynamique des microtubules, et l'inhibition de C9orf114 par des siARN cause des problèmes d'alignement des chromosomes et le détachement des centrosomes du fuseau mitotique. Ce phénotype est similaire à la perturbation du fuseau induit par la déplétion de l'homologue de CLASP chez *Drosophila* (Ohta *et al.*, 2010). Dans une autre étude, le traitement à froid des cellules, avec l'inhibition de C9orf114, accentue l'instabilité des centrosomes, ce qui induit la formation des fuseaux mitotiques acentrosomiques fragmentés, non concentrés ou robustes, contrairement aux cellules normales qui ne présentent qu'une petite partie des cellules avec des centrosomes fragmentés (Ohta *et al.*, 2015).

1.9 Hypothèses et objectifs

Les protéines YGR et YMR sont deux ARN MTases non essentielles à la survie des levures. Bien qu'elles soient deux paralogues, la protéine YGR se localise au nucléole alors que YMR se localise au noyau.

Hypothèse #1 : L'absence des deux gènes est létale.

Objectifs :

- Vérifier si la double délétion est viable.
- Vérifier l'effet des délétions sur la croissance des levures.

Hypothèse #2 : Les fonctions de YGR et YMR sont reliées

Objectifs :

- Déterminer l'effet de la délétion du paralogue sur le taux d'expression de la protéine YGR ou YMR.
- Déterminer l'effet de la délétion du paralogue sur la localisation de la protéine YGR ou YMR.

Hypothèse #3 : D'autres gènes peuvent remplacer YGR et YMR.

Objectif :

• Isoler un mutant dépendant de YGR et YMR.
CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches bactériennes et souches de levures

Les souches bactériennes DH10B (*FmcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ 80*lacZ* Δ .*M15* Δ *lacX74 recAl end.Al araDJ39* Δ (*ara, leu*) 7697 galU galK λ - rpsL nupG/ pMON14272/ pMON7124) et DH5 α (*F- endAl, hsdR17, (He-, mk-), supE44, thi-1, /-, recAl, gyrA96, relAl, laclqZ-M15 (lacproAB)*), dérivées de la souche *Escherichia coli* (Durfee *et al.*, 2008), ont été utilisées pour le clonage et la réplication des plasmides recombinants.

L'organisme utilisé comme modèle dans cette étude est la levure bourgeonnante Saccharomyces cerevisiae YPH499 (MATa ura3-52 lys2-801_amber ade2- $101_ochre trp1-\Delta 63 his3-\Delta 200 leu2-\Delta 1$) (Sikorski et Hieter, 1989).

La souche $ygr\Delta$ a été obtenue à partir de la souche parentale YPH499 dont on a délété le gène YGR283C par recombinaison homologue avec le gène de sélection TRP1 porté par le plasmide pFA6a-TRP1. Après transformation, les levures étaient étalées sur un milieu sélectif dépourvu de tryptophane (Longtine *et al.*, 1998).

La souche $ymr\Delta$ a été obtenue par insertion de la séquence qui code pour le marqueur de sélection *HIS3*, codé par le plasmide pFA6a-His3MX6 (Longtine *et al.*, 1998), dans l'ORF (pour *open reading frame*) en aval du gène *YMR310C* pour le déléter et permettre la sélection des cellules $ymr\Delta$ sur un milieu sélectif dépourvu d'histidine.

La souche de double délétion $ygr\Delta ymr\Delta$ a été obtenue par remplacement des gènes YGR283C et YMR310C par les marques de sélection TRP1 et HIS3, respectivement, en utilisant les plasmides pFA6a-TRP1 et pFA6a-His3MX6 (Annexe A). La souche GAR1-CH a été obtenue suite à l'introduction d'une protéine mCherry fusionnée en C-terminal au marqueur de sélection KanMX6 amplifié à partir d'une souche BY4741 *GAR1-mCherry-kanMX6 (kan^r)* qui a été gracieusement fournie par Dr Vikram Panse (ETH Zurich). Et pour ajouter la protéine GFP aux protéines YGR et YMR dans la souche GAR1-CH, le gène *yEGFP* a été fusionné en aval du gène *YGR283C* et *YMR310C* pour obtenir les souches GAR1-CH YGR-GFP et GAR1-CH YMR-GFP, respectivement. Le plasmide utilisé pour la fusion GFP est pFA6a-GFP(S65T)-TRP1 (Longtine *et al.*, 1998).

Pour la vérification de l'expression des protéines YGR et YMR par immunobuvardage, les protéines ont été modifiées par l'ajout d'un épitope HTP (His6-TEV-ProtA) en C-terminal par recombinaison homologue de la séquence codante pour l'épitope HTP-tag avec le marqueur de sélection *URA3*, porté par le plasmide pBS1539-HTP-URA3, en aval du gène *YGR283C* ou *YMR310C* dans la souche parentales YPH499 pour obtenir des souches YGR-HTP et YMR-HTP, respectivement (Annexe A). L'épitope HTP est dérivé de l'épitope TAP où la séquence codante pour le site de fixation de calmoduline (CBP pour *Calmodulin Binding Peptide*) a été remplacée par une séquence codante pour six histidines (His6) (Granneman *et al.*, 2009).



Figure 2.1. Les épitopes HTP et TAP. Représentation schématique d'une protéine fusionnée soit à un HTP-tag (en haut) ou TAP-tag (en bas). Prot A: domaine A de *Staphylococcus aureus*, qui sert comme domaine de fixation d'IgG. Figure tirée de Granneman *et al.* (2009).

2.2 Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des bactéries est le LB (Luria-Bertani) constitué de tryptone 1%, d'extrait de levure 0.5% et de NaCl 85.5 mM. Le milieu sélectif contient de l'ampicilline à une concentration finale de 50-100 μ g/ml; pour les géloses solides, l'agar est ajouté à une concentration finale 2%. Afin de faciliter l'identification des colonies porteuses d'insert dans le vecteur après transformation d'un produit de ligation, le X-gal est ajouté au milieu solide à une concentration finale de 2%.

Les levures ont été cultivées dans le milieu riche YP (peptone 2%, extrait de levure 1%) ou un milieu minimal synthétique (*Yeast Nitrogen Base without amino acids* (Wisent) à 0,67% complémenté avec un mélange d'acides aminés complet pour le milieu minimum complet SC ou dépourvu de l'acide aminé utilisé comme marqueur de sélection pour les milieux sélectifs -Hís, -Trp, -Ura, -Leu et -Lys selon le protocole de Ausubel *et al.* (Ausubel *et al.*, 1999). Le milieu de culture est supplémenté avec une source de carbone dextrose ou galactose à 2%. À moins d'indication contraire, la température optimale de croissance des levures est 30°C. Les cultures en milieu liquide ont été incubées avec agitation à 250 rpm.

Les souches porteuses d'un marqueur de sélection autotrophe (*TRP1, HIS3, URA3, LEU2, LYS2* ou *ADE2*) ont été maintenues sur un milieu synthétique minimum dépourvu de l'acide aminé de sélection.

La souche GAR1-CH, porteuse du gène de sélection KanMX6, est sélectionnée sur milieu YPD supplémenté avec la généticine (G418) à une concentration finale de 200 µg/mL.

Le milieu minimum de sélection contre *URA3* contient du 5-FOA (acide 5fluoroorotique de GoldBio) à 1mg/ml ainsi que 16 mg/mL uracile sans ajuster le pH, car le NaOH désactive le 5-FOA. Pour la sélection négative contre LYS2, des géloses α -AA (α -aminoadipic acid) ont été utilisées (YNB-AA/AS pour yeast nitrogen base without amino acid without ammonium sulfate 0.17 % (w/v), 2% dextrose, 2% agar, 0,2% α -AA (Sigma). La poudre de α -AA est dissoute avec YNB-AA/AS et les acides aminés nécessaires pour la souche utilisés et le pH est ajusté à ~6 avec du KOH 1 M. La solution filtrée est ajoutée à l'agar stérilisé par autoclave quand sa température descend à ~60°C pour ne pas dégrader le α -AA. Les acides aminés nécessaires ont été ajoutés à partir des préparations à une concentration 100x pour chaque acide aminé. La présence des acides aminés à des concentrations élevées dans le milieu falsifie les résultats, car la plupart des acides aminés peuvent être utilisés comme sources alternatives d'azote.

2.3 Oligonucléotides et plasmides

Les oligonucléotides utilisés dans cette étude ont été synthétisés par la compagnie Integrated DNA Technologies (IDT).

Pour la délétion du gène YGR283C dans la souche YPH499, la partie codante du gène (ORF) a été remplacée par un marqueur TRP1 par recombinaison homologue en utilisant une cassette amplifiée par les oligonucléotides A (Annexe B) à partir du plasmide pFA6a-TRP1. L'intégration de la cassette a été vérifiée par PCR (*polymerase chain reaction*) en utilisant les oligonucléotides J (Annexe B). La cassette utilisée pour la délétion du gène YMR310C a été amplifiée par les oligonucléotides B à partir du plasmide pFA6a-His3MX6 et l'intégration de la cassette a été vérifiée avec les oligonucléotides K.

La séquence codante pour la protéine fluorescente mCherry a été amplifiée à partir d'une souche BY4741 GAR1-mCherry::KanMX6 (Fischer *et al.*, 2015) en utilisant les oligonucléotides C (Annexe B). Après transformation dans la souche YPH499, l'intégration de la cassette est vérifiée par les oligonucléotides L. L'amplification de la cassette qui code pour la protéine GFP utilisé dans le marquage des protéines YGR et YMR à partir du plasmide pFA6a-GFP(S65T)-TRP1 a été éffectuée en utilisant les oligonucléotides D et E, respectivement. L'intégration des cassettes a été vérifiée par les oligonucléotides J et K, respectivement.

L'amplification de l'épitopes HTP pour le marquage des protéines YGR et YMR a été effectuée par les oligonucléotides des catégories F et G, respectivement. La vérification de l'intégration des cassettes YGR-HTP et YMR-HTP a été effectuée par les oligonucléotides J et K.

Pour le clonage des gènes YGR283C et YMR310C dans les plasmides YCplac33GFP et YCplac111GFP, respectivement, l'amplification des gènes YGR283C et YMR310C avec 500 pb en amont du gène a été effectuée par les oligonucléotides H et I, respectivement. Les gènes YGR283C et YMR310C ont été clonés dans les sites KpnI-SalI et SacI-SalI, respectivement.

2.4 Manipulations des bactéries

2.4.1 Préparation et transformation des bactéries chimio-compétentes

Pour la préparation des bactéries chimio-compétentes, le protocole d'Ausubel *et al.* (1999), a été utilisé. Brièvement, environ 400 mL de culture de bactéries DH10B, qui a été incubée à 37°C avec agitation jusqu'à une $A_{600} \sim 0.6$, a été centrifugée et les cellules ont été resuspendues dans 10 mL de TFB1 froid (KOAc 30 mM, MnCl₂ 50 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, glycérol 15% (v/v)). Après une autre centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 2 mL TFBII froid (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, glycérol 15% (v/v)). Les cellules sont distribuées dans des tubes pour être conservées à -80°C.

Pour la transformation des bactéries, 50 μ L de bactéries chimio-compétentes ont été mélangés avec 10 ng d'ADN plasmidique ou 50-100 ng de produit de ligation. Le mélange a été incubé sur glace pendant 20 min, puis à 42°C pendant 1 min et par la

suite sur glace pendant 10 min. Après refroidissement, 1 mL de milieu de culture LB a été ajouté au mélange, le tout est incubé 1h à 37°C avec agitation. Les bactéries transformées ont été par la suite étalées sur des géloses avec ampicilline 100 μ g/mL et incubés pendant la nuit à 37°C.

2.4.2 Préparation et transformation des bactéries électro-compétentes

Pour la préparation des bactéries électro-compétentes, une préculture de DH5 α a été incubée à 37°C avec agitation à 250 rpm pendant la nuit. La préculture a été ensuite inoculée à 500 mL de milieu LB et incubé dans les mêmes conditions jusqu'à l'obtention d'une A₆₀₀ = 0.5-0.7, puis incubée pendant 20 min sur glace. La culture est ensuite centrifugée à 4000xg pendant 15 min à 4°C et le culot a été soumis à une série de resupension/centrifugation dans différents volumes de glycérol 10% préalablement refroidi. Le culot a été finalement resuspendu dans 2 mL de glycérol 10% et aliquoté dans des tubes puis conservé à -80°C.

Pour l'éléctroporation, 40 μ L de bactéries électro-compétentes dégelées sur glace puis mélangées avec 1-5 ng d'ADN plasmidique. Le mélange a été incubé sur glace pendant 1 min puis transféré dans une cuvette à électroporation de 0.2 cm et exposé à un choc électrique de 3000 volts pendant 5 millisecondes. Après le choc électrique, les bactéries ont été diluées avec 1 mL de SOC (tryptone 2%, *yeast extract* 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, et glucose 20 mM) puis incubées à 37°C pendant 1h avec agitation. Le mélange a été finalement étalé sur des géloses contenant de l'ampicilline (100 μ g/mL).

2.5 Extraction de l'ADN plasmidique des bactéries

L'ADN plasmidiques a été extrait soit en utilisant le kit de Mini-prep (QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN) en suivant les recommandations du fournisseur, soit par la méthode de mini-prep à la terre diatomée. Une culture de bactéries, incubée pendant la nuit à 37°C avec agitation, a été centrifugée puis le culot a été resuspendu dans 100 μ L de tampon P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM et RNase A 100 μ g/mL). Ensuite, 100 μ L du tampon P2 (NaOH 0.2 M et SDS 1% (w/v)) ont été ajoutés et les tubes ont été mélangés par inversion puis incubées 5 min. Ensuite. 100 μ L du tampon P3 (acétate de potassium 3 M et acide acétique glacial 2 M) a été ajouté et les tubes incubés à -20°C pendant 10 min. Les tubes ont été centrifugés à vitesse maximale pendant 10 min et le surnagent est mélangé à 300 μ L du tampon de liaison (Tris-HCl 500 mM, EDTA 200 mM et guanidine-HCl 6 M) avant d'être déposé sur des colonnes de terre diatomée. Les colonnes ont été incubées à température ambiante pour permettre l'adhésion de l'ADN à la terre. Après centrifugation à vitesse maximale, le surnagent a été jeté et les colonnes ont été lavées avec une solution de lavage (Tris-HCl 14.28 mM pH 7.5, EDTA 3.57 mM pH 8.0, NaCl 142.8 mM et éthanol 58% (v/v)). Finalement, le tampon TE a été ajouté sur les colonnes, et les tubes ont été centrifugés pour récupérer l'ADN plasmidique.

2.6 Préparation et transformation des levures compétentes

Le protocole utilisé pour la transformation des levures est la méthode au LiOAc développé par Gietz *et al.* (1992). Pour chaque transformation, un volume correspondant à 10 A_{600} d'une culture de levure en phase exponentielle a été centrifugé. Le culot a été lavé dans l'eau ultrapure stérile puis resuspendu dans 500-1000 µL d'une solution TE/LiOAc (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, LiOAc 10 mM). Puis, 100 µL de ce mélange de cellules compétentes a été ajouté à un tube contenant 100 ng de l'ADN à transformer, 100 µg d'ADN de sperme de hareng concassé (10 mg/mL) préalablement bouilli pendant 3 min. Puis 600 µL de PEG/LiOAc (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, et le mélange a été incubé à 30°C pendant 30 min avec agitation. Du DMSO a été ajouté à une concentration finale de 10%, puis les cellules ont été incubées à 42°C pendant 15 min et ensuite transférées sur glace pendant 10 min. Le mélange a été centrifugé et

les cellules transformées ont été resuspendues dans 500 μ L de TE stérile (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) pour être étalées sur un milieu sélectif. Finalement, les géloses ont été incubées à 30°C jusqu'à l'apparition des colonies.

2.7 Réplica

Le réplica est utilisé afin de produire une copie d'une gélose. Cela permet de vérifier les colonies porteuses de gènes de sélection négative (*URA3* ou *LYS2*). Il est aussi utilisé après la transformation de cellules de levures par des cassettes portant le gène de sélection *KANMX6* codant pour un gène de résistance à l'antibiotique généticine G418 parce que l'étalement sur des géloses G418 directement après la transformation donne un faible rendement, car les cellules ont besoin de temps pour exprimer le gène de la résistance à la généticine (Scorer *et al.*, 1994).

Pour faire un réplica, la plaque qui contient les colonies à tester est transférée sur un tissu de velours stérilisé par autoclave, puis la gélose de sélection (5-FOA, α -AA ou G418) est appliquée sur le velours pour produire une copie de la gélose initiale. Les géloses ont été incubées à 30°C jusqu'à l'apparition des colonies et chaque réplica est ensuite comparé avec la gélose originale.

2.8 Extraction de l'ADN génomique des levures

L'ADN génomique des levures a été extrait selon le protocole de Hoffman et Winston (1987). Une culture de levure dans un milieu YPD ou milieu sélectif en phase stationnaire a été centrifugée à température ambiante pendant 5 min à 1200xg. Le culot a été lavé dans l'eau ultrapure stérile, puis resuspendu dans 400 μ L tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM pH 7.8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, SDS à 1%, Trion X-100 2%). Le mélange est ajouté à 300 μ g de billes de verre de 425-600 μ m de diamètre lavées à l'acide (Sigma) et 400 μ L d'une solution de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). Le mélange a été agité au vortex pendant 3 min puis

centrifugé à vitesse maximale pendant 5 min et la phase aqueuse a été transférée dans un autre tube pour mélanger de nouveau avec le phénol-chloroforme-alcool isoamylique. L'étape de vortex et de centrifugation est répétée, puis la phase aqueuse a été mélangée à une solution chloroforme-alcool isoamylique (24:1) pour éliminer les traces de phénol. Après agitation au vortex et centrifugation, la phase aqueuse est mélangée à 1 mL d'éthanol 100% et centrifugée. Le culot a été resuspendu dans 400 µL du TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) puis 30 µg de RNase A ont été ajouté et le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min. Après la dégradation de l'ARN, 1 mL d'éthanol 100% et acétate d'ammonium 0.04 mM ont été ajouté et le mélange a été centrifugé à vitesse maximale pendant 3 min. Le culot a été lavé avec l'éthanol 70% puis séché et resuspendu dans 400 µL de tampon TE. L'ADN a été dosé à l'aide d'un NanoDrop OneC (Thermo Fischer Scientific).

2.9 Extraction des protéines de levures

Pour l'extraction des protéines de levures, quelques colonies de la souche de levure ont été inoculées et incubées à 37°C avec agitation à 250 rpm jusqu'à l'obtention d'une culture en phase exponentielle ($OD_{600} = 0.5$ -0.8). La culture a été centrifugée et le culot a été lavé deux fois avec 5 mL d'eau ultrapure froide. Le culot est resuspendu dans 300 µL de TMN150 (Tris 25 mM pH 7.6, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, 1 µL NP-40 supplémenté des inhibiteurs de protéases cOmpleteTM de Roche) et 300 µL de microbilles de verre de 426-600 µm de diamètre lavées à l'acide (Sigma). Le mélange a été soumis à une agitation à vitesse maximale pendant 45 secondes puis incubé 45 secondes sur glace, puis l'étape de vortex et incubation sur glace a été répétée cinq fois. Après centrifugation à vitesse maximale pendant 5 minutes à température ambiante, la phase soluble contenant l'extrait de protéines a été récupérée et quantifiée par la méthode de Bradford (Bio-Rad) et tous les échantillons ont été dilués à une concentration finale de 2 µg/µl.

2.10 Analyse des protéines par immunobuvardage

De 20 à 50 μ g d'extraits protéiques de levure ont été mélangés avec un volume équivalent du tampon Laemmli 2x (SDS 2%, glycérol 16% (v/v), Tris-HCl 60 mM pH 6.8, β -mercaptoéthanol 0.57 M, bleu de bromophénol 1%) et chauffés à 95°C pendant 3 min pour dénaturer les protéines.

Les échantillons de protéines ont été chargés sur gel d'acrylamide 8% (Tris-HCl 380 mM pH 8.8, acrylamide:bis-acarylamide (37.5:1) 8%, SDS 0.1 %, APS (pour Ammonium persulfate) 0.1 % et TEMED 0.06%) avec le marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein All Blue de Bio-Rad, et migrées dans un tampon d'électrophorèse SDS-PAGE (Tris-base 25mM, glycine 200 mM, SDS 0.1 % pH 8.3) à 100 V pendants 15 min puis à 120 V pendant 60 min. Les protéines du gel ont été transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene Difluoride) dans un tampon Towbin (Tris-base 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%) à 100 V pendant 60 min ou à 16 V pendant 16h à 4°C. Après le transfert, la membrane a été incubée avec une solution de Ponceau S (Ponceau S 0.1%, acide acétique 2%) pendant 5 min, puis l'excès de Ponceau S a été lavé pour vérifier la qualité du transfert. La membrane a été incubée pendant la nuit à 4°C dans une solution de blocage (lait 5% dans du tampon TBS-Tween (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 154 mM, Tween-20 0.2%)). La membrane a été incubée pendant 1h avec les anticorps primaire PAP (pour peroxidase anti-peroxidase) de Sigma dilué à 1:200 ou l'anticorps anti-GAPDH (MédiMabs) dilué à 1:2000, dans la solution de blocage puis lavée par incubation cinq fois pendant 5 min avec du tampon TBS-Tween. Ensuite, la membrane a été incubée pendant 1h avec les anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRP, soit un anti-IgG de lapin (Sigma; dilué 1:1000) ou un anti-IgG de souris (GE Healthcare; dilué à 1:10000). Un deuxième lavage a été effectué pour enlever l'excès d'anticorps non liés. Finalement, la membrane a été traitée pendant 3 min avec un mélange de péroxydase/luminol (1:1) et le signal chimioluminescent a été détecté avec le système Fusion FX7, puis l'intensité des bandes a été quantifiée par FIJI (Schindelin *et al.*, 2012).

2.11 Tests de croissance cellulaire

2.11.1 Test de croissance en milieu liquide (courbe de croissance)

Cinquante mL de chaque culture de levure ont été incubés dans un milieu riche YPD à 30°C avec agitation à 250 rpm jusqu'à obtention d'une A_{600} de 0.5. Les cultures ont été diluées à une A_{600} de 0.1 puis incubées de nouveau à 30°C avec agitation. La densité optique est mesurée chaque 2h et les cultures ont été maintenu à une $A_{600} = 0.1$ -0.6 pendant 30h en faisant, périodiquement, des dilutions dans du milieu frais pré-incubé à 30°C.

2.11.2 Test de croissance sur milieu solide

Les souches à tester ont été inoculées dans un milieu riche YPD et incubées à 30° C avec agitation à 250 rpm jusqu'à phase exponentielle de croissance A₆₀₀ de 0.5. Un volume correspondant à 10 A₆₀₀ est centrifugé et le culot est lavé puis ajouté de l'eau ultrapure stérile pour obtenir une dilution correspondant à 0.1 A₆₀₀. Des dilutions en série 1:19 ont été effectuées et une goutte de 5 µL de chaque échantillon est déposée sur des plaques YPD ou YPGal puis incubée à 37° C, 30° C et 16° C jusqu'à l'apparition des colonies.

2.12 Microscopie confocale

2.12.1 Observation des constructions GFP

Les souches GAR1-CH YGR-GFP et GAR1-CH YMR-GFP, exprimant des protéines fusionnées aux protéines autofluorescentes mCherry et GFP, ont été incubées jusqu'à phase exponentielle dans un milieu riche YPD. La culture est centrifugée puis lavée

avec l'eau ultrapure stérile et resuspendue dans un milieu SC Dex pendant 3h pour diminuer le bruit de fond causé par le milieu riche YPD. Le paraformaldéhyde (Electron Microscopy Science) est ajouté à 3-5 mL de culture en phase exponentielle à une concentration finale de 4% et les cultures ont été réincubées à 30°C avec agitation 250 rpm pendant 30 min. Les cultures ont été lavées dans du PBS (*Phosphate-buffered saline*) puis resuspendues avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 2.5 µg/ml dilué dans du PBS. Après une incubation de 30 min avec agitation à 30°C, les cultures ont été centrifugées puis resuspendues dans du glycérol dilué avec du PBS à une concentration finale 70% de glycérol pour être déposées sur la lame. Les lamelles ont été déposées par-dessus puis scellées et conservées à 4°C avant de les observer au microscope confocal.

2.12.2 Immunofluorescence indirecte

Les levures ont été préparées selon le protocole de (Gérus *et al.*, 2010). Une culture de cellule en phase exponentielle de croissance a été ajoutée de paraformaldéhyde à une concentration finale à 4% puis maintenu aux conditions optimales de croissance (30°C avec agitation à 250 rpm) pendant 30 min. La culture a été ensuite centrifugée à 1000 rpm pendant 3 minutes puis lavée avec un tampon B (K₂HPO₄ 8.6 mM, KH₂PO₄ 1.3 mM et sorbitol 1.2 M) et le culot est resuspendu dans 500 μ l de la solution de digestion (tampon B dilué jusqu'à 11x avec l'eau ultrapure stérile et ajouté de vanadium ribonucléoside 181.8 μ M, 2.6 mM β-mercaptoéthanol, et 50 unités/mL lyticase (Sigma) ajouté d'inhibiteurs de protéases) et incubé pendant 45 min à 30°C avec agitation. L'efficacité de la digestion des parois a été vérifiée au microscope à contraste de phase; les cellules perméabilisées sont noires ou grises translucides, alors que les cellules éclatantes qui reflètent la lumière ne sont pas perméabilisées. Une fois que 80% des cellules sont perméabilisées, les cultures ont été centrifugées et le culot a été resuspendu dans 500 μ L tampon B, puis une goutte de chaque culture est déposée sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine (Sigma)

pour permettre l'adhésion des levures. L'excès de cellules a été aspiré après 1h et les cellules ont été incubées avec du BSA 0.1% dilué dans du tampon PBS pour bloquer les sites non spécifiques de fixation de l'anticorps. Pour marquer le nucléole, un anticorps monoclonal anti-fibrillarine de souris 17C12 (Yang *et al.*, 2001) a été utilisé à une dilution 1:9 pendant 1h à température ambiante. Les lamelles ont été lavées par la solution de BSA 0.1% trois fois pendant 5 min, puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris Alexa Fluor 568 (Invitrogen) dilué à 1:1000 pendant 1h à température ambiante. Les lamelles ont été lavées 5 min avec le DAPI (1 μ g/ml). Les lamelles ont été lavées ont été déposées sur des gouttes de glycérol 70% préalablement placées sur la lame, et l'excès de glycérol a été enlevé pour sceller les lamelles. Finalement, les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope confocal à un grossissement de 60 x.

2.13 Criblage génétique synthétique létal

Le criblage génétique synthétique létal a pour but de rendre la cellule dépendante à un gène non essentiel après mutation d'un autre gène par mutagenèse aléatoire. Les cellules mutées ont été testées pour leur dépendance au gène étudié (*YGR283C* et *YMR310C*). Le mutant dépendant est finalement transformé par une banque génomique pour identifier le gène muté.

Dans mon projet, j'ai effectué un criblage génétique de YGR et de YMR dans la souche double $ygr\Delta ymr\Delta$. Ici, je résume les étapes du crible génétique pour le gène YGR seulement, mais les même étapes s'appliquent au criblage génétique du gène YMR. La souche double mutée $ygr\Delta ymr\Delta$ a été transformée par un plasmide pAD13 URA3-ADE2-YGR (appelé ici pADG) qui a été irradiée aux rayons UV (100 j/m²). Seules 20-25% des cellules survivent à cette irradiation. Après irradiation, trois types de colonies ont été observées sur les géloses; les colonies blanches, les colonies rouges et les colonies avec secteurs rouges/blancs. La pigmentation rouge est due à la polymérisation de phosphoribosylamino-imidazole (un intermédiaire dans la

biosynthèse d'adénine qui s'accumule en absence de la phosphoribosylaminoimidazole-carboxylase, l'enzyme codé par le gène *ADE2*). Cela permet de distinguer les colonies rouges, non-dépendantes du plasmide pADG, des colonies blanches, porteuses du plasmide. Lors de la première étape de sélection, les colonies blanches sont repiquées sur des plaques SC Dex.

Pour la deuxième sélection, un réplica est effectué sur des plaques contenant du 5-FOA. En présence du gène *URA3*, le 5-FOA est converti en un produit toxique, la 5fluorodésoxyuridine, et les levures doivent se débarrasser du plasmide pADG pour survivre. Les colonies qui ne poussent pas sur les plaques 5-FOA sont dépendantes du plasmide. Les colonies sélectionnées sont transformées par un autre plasmide pRS317-YGR (appelé ici pRSG) puis repiquées sur des plaques 5-FOA pour les forcer à perdre plasmide pADG. La troisième sélection est effectuée sur milieu α -AA contre le gène *LYS2* porté par le plasmide pRSG. Les levures utilisent α -AA comme sources alternatives d'azote en absence de sulfate d'ammonium et d'acides aminés, mais son accumulation en grande quantité dans les souches *LYS2* est toxique. Les colonies dépendantes du plasmide pRSG, ne pousseront pas sur milieu α -AA. Après les étapes de sélection, la colonie de levures dépendantes du gène *YGR283C* est transformée par une banque génomique et le plasmide de la banque qui restaure la viabilité en absence du plasmide pADG est séquencé pour identifier le gène qui complémente la perte de *YGR283C*.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 La souche $ygr\Delta ymr\Delta$ est viable

YGR283C et *YMR310C* sont des paralogues dont chacun n'est pas essentiel à la survie des levures (Giaever *et al.*, 2002). Comme ce sont deux copies d'un seul gène qui sont conservées, j'ai voulu tester si la délétion des deux gènes dans une seule souche est létale pour la croissance des levures.

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai construit une souche de double délétion $(ygr\Delta ymr\Delta)$ en remplaçant d'abord l'ORF YGR283C et YMR310C par un gène de sélection TRP1 et HIS3 pour construire la souche $ygr\Delta$, et la souche $ymr\Delta$, respectivement. Par la suite, dans la souche $ygr\Delta$, j'ai remplacé l'ORF YMR310C par le gène de sélection HIS3 pour obtenir la souche $ygr\Delta ymr\Delta$ (Figure 3.1).

Les colonies transformées, capables de pousser sur le milieu de sélection, ont été testés par PCR pour vérifier l'intégration des cassettes de délétion *TRP1* et *HIS3* dans l'ORF *YGR283C* et *YMR310C*, respectivement. Pour la vérification de l'intégration de la cassette de délétion *TRP1* de 1036 pb inséré par recombinaison homologue pour remplacer le gène *YGR* de 1026 pb, j'ai utilisé les oligonucléotides du groupe K, (414, 406) puis (414, 432). Comme la cassette de délétion a presque la même taille que le gène, les oligonucléotides (414, 406) ont révélé une bande de la même taille.



Figure 3.1. Construction des souches $ygr\Delta$, $ymr\Delta$ et $ymr\Delta$ $ygr\Delta$. A. Les délétions ont été effectuées par recombinaison homologue en remplaçant les ORF YGR283C et YMR310C par le gène de sélection TRP1 et HIS3, respectivement. B. sites d'hybridation des oligonucléotides utilisés pour la vérification de l'intégration des cassettes de délétion dans l'ADN génomique. C. Vérification de l'intégration de la cassette de délétion TRP1 au niveau de l'ORF de YGR. Comme l'insert (TRP1) possède la même taille que le gène YGR283C, un oligonucléotide interne du gène YGR (432) a été utilisé pour vérifier la délétion du gène YGR. D. Vérification de la délétion du gène YMR. Les paires d'oligonucléotides utilisés pour l'amplification de l'ADN génomique sont indiquées sous les pistes.

Les oligonucléotides 414 et 432 ont été utilisés, car (432) s'hybride dans la région codante du gène YGR avant le codon STOP. Dans les souches transformées, le gène

40

YGR est remplacé par *TRP1* et l'oligonucléotide 432 ne peut pas s'hybrider dans le génome. Donc, l'absence d'une bande indique la délétion du gène (Figure 3.1).





Les souches de délétion simple $(ygr\Delta \text{ et } ymr\Delta)$ et la souche de délétion double $(ygr\Delta ymr\Delta)$ ont été soumises à un test de viabilité sur milieu YP additionné de dextrose ou de galactose et incubées à différentes température pour tester l'effet des mutations sur la survie des levures. L'incubation à différentes températures peut révéler une thermo-sensibilité alors que l'incubation avec du galactose peut révéler des létalités dues au phénotype de croissance ralentie causée par le galactose par rapport au dextrose, qui représente la source de carbone optimale pour la croissance des levures.

Dans ce test de viabilité, les colonies des souches $ygr\Delta$, $ymr\Delta$ et $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ ont été similaires aux colonies de la souche parentale YPH499 utilisée comme contrôle. Ce

résultat confirme que $ygr\Delta$ et $ymr\Delta$ sont viables (Giaever *et al*, 2002) et montre que la délétion double ($ygr\Delta ymr\Delta$) est également viable. De plus, cette expérience montre que le changement de source de carbone ainsi que l'augmentation (37°C) ou la diminution (16°C) de la température n'affecte pas la croissance des différentes souches de levures mutantes (Figure 3.2).

3.2 Courbes de croissances en milieu liquide

Comme le test de viabilité sur milieu solide n'a montré aucun phénotype létal (taille de colonies et nombres de colonies) (Fig 3.2), j'ai évalué la croissance en milieu liquide car les courbes de croissance ont l'avantage d'être faites sur une longue période, en diluant à chaque fois les cultures pour garder les levures en phase exponentielle continue, ce qui permet l'observation des différences de croissances mineures qu'on ne peut détecter avec le test de viabilité sur gélose. Pour tracer les courbes de croissance de chaque souche, les cultures sont incubées dans les conditions optimales de croissance et la densité optique (A_{600}) des cultures est mesurée à des intervalles réguliers de temps.

Les résultats des courbes de croissances montrent que les souches $ygr\Delta$, $ymr\Delta$ et la souche $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ poussent de la même façon que la souche parentale YPH499, alors que la souche $ygr\Delta$ présente un léger retard de croissance (Figure 3.3).



A.

Β.

Courbe de tendance exponentielle

$$y = A * e^{B*x}$$

Durée de cycle : $Dt = \frac{\ln(2)}{B}$

Figure 3.3. Vérification de l'effet des délétions sur la croissance des levures en milieu liquide. Pour tracer la courbe de croissance, les

Souches	Durée de cycle (min)	
YPH499	110 ±4	
$ygr\Delta$	132 ±15	
$ymr\Delta$	104 ±3	
$ygr\Delta ymr\Delta$	110 ±2	

cultures ont été maintenues en phase exponentielle de croissance pendant 28 h à 30° C pour stimuler la division continue de levure. B. La durée de cycle (Dt pour *doubling time*) est calculée à partir de l'équation de la courbe de tendance exponentielle. La courbe de croissance est effectuée à partir de deux expériences indépendantes (n = 2).

43

3.3 Les interactions génétiques de YGR et YMR

Le criblage génétique synthétique létal est utilisé pour l'étude des gènes non essentiels. Il a pour but de rendre les cellules dépendantes au gène étudié et de révéler des gènes qui interagissent génétiquement avec le gène étudié. Les gènes identifiés après le criblage génétique sont généralement impliqués dans le même processus biologique que le gène délété. Brièvement, le criblage génétique synthétique létal consiste à introduire des mutations aléatoires dans le génome d'une souche délétée pour le gène à étudier (mais qui le porte sur un plasmide). La souche est mutée aléatoirement pour la rendre dépendante au gène étudié. Après l'isolement une souche mutante dépendante du gène à l'étude, cette dernière est transformée par une banque génomique ou une banque d'ADNc (ADN complémentaire) et les plasmides de la banque qui restaurent l'indépendance de la souche au gène étudié sont séquencés pour identifier les gènes qui interagissent génétiquement avec le gène étudié.

Dans mon projet j'ai commencé par une souche délétée pour les deux gènes YGR et *YMR*, car je supposais qu'ils sont reliés fonctionnellement et je souhaitais identifier d'autres gènes. La souche $ygr\Delta ymr\Delta$ a été transformée par un plasmide pADG ou pADM contenant le gène *YGR* ou *YMR*, respectivement, et portant deux gènes de sélection *ADE2* et *URA3* (Figure 3.5). Les souches obtenues $ygr\Delta ymr\Delta$ pADG et $ygr\Delta ymr\Delta$ pADM ont été utilisées pour effectuer un criblage génétique pour des interacteurs des gènes *YGR* et *YMR*, respectivement. Afin de simplifier le texte je mentionnerai les étapes du cible génétique pour le gène *YGR* seulement, mais les mêmes étapes ont été effectuées pour le crible génétique du gène *YMR* aussi.

La souche $ygr\Delta ymr\Delta$ pADG a subit des mutations aléatoires en l'exposant aux rayons UV (100 j/m²). Dans ces conditions d'irradiation, seulement 20 à 25% des levures survivent (Figure 3.4). Après la mutagenèse aléatoire, j'ai effectué trois étapes de sélection pour chercher un mutant dépendant de YGR. La sélection par *ADE2* est basée sur la couleur de colonies (seulement les colonies blanches sont dépendantes du plasmide qui contient *ADE2*). La sélection par *URA3* nécessite l'utilisation de 5-FOA dans le milieu de culture pour la contre sélection. L'enzyme codée par le gène *URA3* convertit le 5-FOA à un métabolite toxique, ce qui force les cellules à dégrader le plasmide pour croître sur milieu 5-FOA. Les cellules mutées qui sont devenues dépendantes du gène YGR ne peuvent pas croître sur milieu 5-FOA (Figure 3.5). Comme c'est une contre sélection, les réplicas sont utilisés pour produire une copie des géloses SC Dex sur des géloses 5-FOA; les colonies qui poussent sur milieu SC Dex et ne poussent pas sur milieu 5-FOA sont les colonies dépendantes du plasmide pADG, et elles seront utilisées pour le reste du crible génétique (Boeke *et al.*, 1987).

Après les deux premières sélections par ADE2 et URA3 qui sont portés par le plasmide pADG, j'ai fait une troisième sélection en utilisant un autre plasmide pRSG pour éviter des problèmes qui peuvent survenir à cause des éventuelles mutations qui peuvent altérer la séquence du plasmide. Le plasmide pRSG porte la séquence codante pour le gène YGR ainsi qu'un marqueur de sélection LYS2 qui a la particularité de permettre la sélection négative sur milieu a-AA (Winston et Bhattacharjee, 1982). Après la transformation des cellules avec le plasmide pRSG, les cellules sont étalées sur milieu 5-FOA pour dégrader le plasmide pADG, puis les cellules sont testées sur milieu α -AA pour leur dépendance au plasmide pRSG. Seules les souches non dépendantes du plasmide pRSG peuvent pousser sur milieu α -AA (Winston et Bhattacharjee, 1982). Les cellules qui ne poussent pas sur α -AA sont utilisées pour la suite de l'expérimentation qui consiste à les transformer avec une banque génomique (Figure 3.5). Dans ce projet, j'ai choisi une banque génomique et pas une banque d'ADNc, car cette dernière contient seulement les gènes transcrit en ARNm alors que la banque génomique comprend tout le génome et peut révéler une relation fonctionnelle avec des ARN non codants (Yoo et Wolin, 1997).



colonies non-irradiées

B.





Figure 3.4. Mutagenèse aléatoire et sélection par ADE2. A. Environ 500 cellules sont étalées sur chaque gélose, la gélose non irradiée (gauche) et les géloses irradiées (droite) sont incubées jusqu'à l'apparition des colonies. B. Le gène de sélection ADE2 code pour la phosphoribosylamino-imidazole-carboxylase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'adénine. Les colonies ade2 qui n'ont pas gardé le plasmide pADG ont une pigmentation rouge due par la polymérisation d'un intermédiaire 5'-phosphoribosyl-aminoimidazole (ex. colonie 1). Les cellules qui gardent le plasmide sont blanches (ex. colonie 3). Les colonies qui forment des secteurs rouges/blancs comportent une partie de cellules qui ont gardé le plasmide et d'autres cellules qui l'ont perdu (ex. colonie 2).

46



Sélection 1 par ADE2. Seulement les colonies blanches sont repiquées



La souche dépendante du gène *YGR* ou *YMR* est transformée par une banque génomique et le plasmide est séquencé pour identifier le gène qui complémente la souche mutée.

47

Figure 3.5. Les étapes de criblage génétique synthétique létal. Une souche de double délétion $ygr\Delta ymr\Delta$ est transformée par un plasmide pADG puis irradiée à 100 j/m² pour muter aléatoirement son génome. Les colonies blanches son repiquées et un réplica est effectué sur milieu 5-FOA, qui est converti en un métabolite toxique en présence du gène *URA3* présent sur le plasmide pADG, pour forcer les cellules à perdre le plasmide. Les cellules qui ne poussent pas sur 5-FOA sont dépendantes du plasmide. Elles ont été par la suite transformées par un deuxième plasmide pRSG et le plasmide pADG a été dégradé sur milieu 5-FOA, puis un autre réplica a été effectué sur milieu α -AA qui permet la sélection négative contre le marqueur de sélection *LYS2* porté par le plasmide pRSG. Seulement les colonies qui ne peuvent pas pousser sur α -AA sont récupérées pour être transformées par la banque génomique et le gène de la banque qui restaure l'indépendance au gène *YGR* (en permettant à la cellule de croître sur milieu α -AA) est séquencé pour identifier le gène qui, une fois muté, induit la dépendance au *YGR*.

Tableau 3.1. Tableau récapitulatif pour les résultats des cribles génétiques. Après irradiation par UV, environ 36000 colonies $ygr\Delta ymr\Delta$ pADG et 20500 colonies $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ pADM ont été testées pour leur dépendance aux plasmides en trois étapes.

	Criblage YGR	Criblage YMR
Après irradiation UV à 20-25% survie	~ 36000	~ 20500
Sélection (1) par ADE2	1314	954
Sélection (2) par 5-FOA	6	8
Sélection (3) par LYS2	1	N.D

Dans mon projet, j'ai effectué le crible YGR et YMR et la colonie dépendante de YGR a été isolée. Pour le criblage génétique de YMR, huit colonies ont été isolées, mais elles n'ont pas été sélectionnées contre le marqueur *LYS2* (étape de sélection 3) (Tableau 3.1).

3.4 La délétion de YMR diminue légèrement le taux d'expression de YGR

La présence d'une relation fonctionnelle entre YGR et son paralogue YMR peut impliquer un mécanisme de régulation au niveau de l'expression des protéines YGR et YMR qui soit dépendante du paralogue. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai voulu vérifier le taux de l'expression des protéines YGR et YMR en présence et en absence de YMR et YGR, respectivement. Pour cela, j'ai introduit par recombinaison homologue la séquence codante pour l'épitope HTP (dérivé de l'épitope TAP) fusionnée au marqueur de sélection *URA3* en aval des gènes *YGR* et *YMR* pour obtenir des souches YGR-HTP et YMR-HTP, respectivement. Les souches YGR-HTP et YMR-HTP ont été, par la suite, délétées pour le paralogue du gène marqué dans chaque souche pour obtenir des souches YGR-HTP *ymr* Δ et YMR-HTP *ygr* Δ . Les souches YGR-HTP et YGR-HTP *ymr* Δ ont été utilisées pour la vérification de l'expression de YGR. Les souches YMR-HTP et YMR-HTP *ygr* Δ ont été utilisées pour la vérification de l'expression de YMR.

L'expression des protéines recombinantes a été vérifiée par immunobuvardage avec des anticorps PAP et l'anticorps anti-GAPDH a été utilisé pour détecter la présence de la protéine GAPDH comme contrôle (Fig. 3.6). Les bandes détectées d'environ 58.5 kDa et 35 kDa correspondent aux protéines YGR-HTP et GAPDH, respectivement. L'analyse quantitative de l'intensité des bandes montre une légère diminution au niveau de l'expression de la protéine YGR en absence de son paralogue YMR.

Des problèmes avec les constructions YMR-HTP et YMR-HTP $ygr\Delta$ ont empêchés d'avoir des résultats concluants sur l'effet de la délétion du gène YGR sur le taux d'expression de la protéine YMR.



Figure 3.6. La délétion de *YMR* diminue le niveau d'expression de la protéine YGR. A. Construction des souches YGR-HTP et YGR-HTP *ymr* Δ . B. Vérification de l'expression de la protéine YGR par immunobuvardage en présence et en absence de son paralogue, YMR. C. La variation de l'expression est présentée en histogramme par rapport à l'expression de GAPDH (n = 4; p = 0.007).

3.5 YGR et YMR se localisent au nucléole

Des études de localisation subcellulaire des protéines couplées à la protéine GFP ont montré que la protéine YGR se localise au nucléole tandis que YMR se localise au noyau (Huh *et al.*, 2003). Cependant, l'analyse bioinformatique de la séquence des protéines YGR et YMR (Fig. 1.5) montre que la protéine YGR possède un motif NoLS (79-100 aa) au niveau du nœud α/β , alors que YMR possède elle aussi un motif NoLS (1-21 aa). De plus, des études des interactions protéiques de la levure à haut débit ont révélé des interactions physiques de la protéine YMR avec les protéines nucléolaires Garl (Krogan *et al.*, 2006) (Krogan *et al.*, 2004), Cbf5 (Schwer *et al.*, 2011) (Gavin *et al.*, 2006) ainsi que la protéine Hek2 qui peut être nucléaire ou cytoplasmique (Gavin *et al.*, 2006; Hasegawa *et al.*, 2008). En se basant sur ces données, j'ai posé l'hypothèse que la protéine YMR pourrait être localisée au nucléole et j'ai voulu vérifier la localisation des protéines YGR et YMR, et aussi vérifier si la délétion du gène *YGR* induit la localisation de YMR au nucléole, et si la protéine YGR peut changer de localisation en absence de son paralogue *YMR*.

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai construit des souches GAR1-CH YGR-GFP et GAR1-CH YMR-GFP (section 2.1 et Annexe A) où les protéines YGR et YMR sont fusionnées à la protéine GFP en C-terminal. La protéine Gar1 est un composant du complexe de la pseudouridylation d'ARNr utilisée pour le marquage du nucléole des levures. D'autres constructions, utilisant des souches $ygr\Delta$ et $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ transformées par le plasmide YCplac33 GFP-YGR (avec le promoteur génomique de YGR, -500 pb) ou les souches $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ et $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ transformées par le plasmide YCplac111 GFP-YMR (avec le promoteur génomique de YMR, -500pb), ont été utilisées pour vérifier la localisation des protéines YGR et YMR en absence du paralogue (Section 2.1 et Annexe A).

Les souches ont été cultivées sur YPD pour favoriser l'expression des protéines YGR et YMR (Waern et Snyder, 2013). Comme le milieu YPD cause un niveau élevé de

bruit de fond en microscopie à fluorescence, les cultures sont lavées avec de l'eau ultrapure stérile puis resuspendues dans un milieu minimum contenant du dextrose et incubées pendant 3h avant la préparation à l'observation microscopique des levures.



Figure 3.7. Constructions utilisées pour l'observation microscopique des fusions GFP. Le plasmide YCplac33 GFP-YGR (abrégé YGR-GFP) a été transformé dans les souches $ygr\Delta$ et $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ pour permettre l'observation de la protéine YGR en présence et en absence de YMR, respectivement. Le plasmide YCplac111 GFP-YMR (abrégé YMR-GFP) a été transformé dans les souches $ymr\Delta$ et $ygr\Delta$ $ymr\Delta$ pour permettre l'observation de la protéine YMR en présence et en absence de YGR, respectivement.



Figure 3.8. Les protéines YGR et YMR se localisent au nucléole. L'observation au microscope confocal (60x) montre que la protéine YGR (A) ainsi que YMR (B), fusionnées à la protéine eGFP (vert), se localisent au nucléole marqué ici par la protéine nucléolaire Gar1 fusionnée en C-terminal avec la protéine mCherry (rouge).

53

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 La souche $ygr\Delta ymr\Delta$ est viable

YGR et YMR sont deux ARN MTases de la levure *S. cerevisiae*. Bien que les gènes *YGR* et *YMR* soient conservés dans l'évolution et que le génome de la levure en comprend deux copies, *YGR* et *YMR* ne sont pas essentielles à la survie des levures. Dans ce projet, j'ai montré que même la délétion simultanée des deux gènes dans la même souche n'affecte pas la viabilité des levures. Le niveau de divergence élevé au niveau de la séquence génomique des paralogues peut refléter une duplication plus ancienne que la dernière WGD des levures ou, selon l'hypothèse de allopolyploidisation, une fusion entre deux espèces différentes de levures a précédé la WGD et le réarrangement du génome, et ainsi, *YGR* et *YMR* auraient une origine différente (Marcet-Houben et Gabaldon, 2015; Wolfe, 2015).

Le fait que les protéines YGR et YMR ne sont pas essentielles à la survie des levures suscite certaines questions : pourquoi deux copies du gène? Pourtant, YGR et YMR font partie du RRB; seraient-elles impliquées dans la maturation des ribosomes? Ou peut-être dans d'autres fonctions extra-ribosomique du nucléole? *YGR* et *YMR* sont issus d'un seul gène, mais leur divergence au niveau de la séquence, la structure et les phénotypes associés à la délétion de chaque protéine peuvent refléter (1) différentes fonctions ou (2) des fonctions en commun avec quelques particularités pour chaque protéine (tel que le lieu d'action, le substrat d'action ou le moment/contexte d'action).

Quant à la viabilité des cellules, on définit un gène essentiel quand sa délétion est létale. Mais les cellules montrent une capacité d'adaptation élevée aux aberrations génétiques. La perturbation du nucléole étant un bon exemple, en effet, même l'absence de l'organisation en tandem de l'ADNr, considérée comme la structure primordiale pour la construction du nucléole, n'affecte que partiellement les fonctions du nucléole même si ça a changé complètement la structure du nucléole (Trumtel *et al.*, 2000).

4.2 La délétion de YGR ralentit légèrement la croissance des levures

Dans ce projet j'ai montré aussi que la double délétion n'affecte pas la croissance des levures et que seulement la simple délétion ralentit légèrement la croissance des levures et par conséquent augmente la durée de cycle cellulaire. Cependant l'écart type est très grand entre seulement deux expériences indépendantes effectuées et c'est donc important d'effectuer d'autres expériences pour vérifier si le résultat est reproductif et statistiquement significatif.

Le ralentissement de croissance en absence de YGR pourrait être expliqué par (1) une effet toxique de la protéine YMR en absence de son paralogue YGR ou (2) si on suppose que YMR est une protéine qui régule la fonction de la protéine YGR de façon négative. Un mécanisme d'inhibition par la dimérisation avec le paralogue non-fonctionnel (ici YMR) a été proposé par Tkaczuk et al. (2007) notamment en formant un hétérodimère YGR-YMR, qui empêche l'homodimère fonctionnel (YGR-YGR) d'agir sur les substrats (Figure 4.2) (Tkaczuk *et al.*, 2007).

On pense que YGR est la protéine fonctionnelle, car la séquence de YMR est la plus divergente dans la sous-famille COG2106 de SPOUT MTases. YMR est phosphorylée sur S190, au début de son domaine *OB-fold* (Figure 4.1) (Albuquerque *et al.*, 2008). Cette phosphorylation peut jouer un rôle (1) d'inhibition de la liaison avec le substrat ou (2) de changement du substrat cible de la modification.



Figure 4.1. Modèle de la structure des protéines MT1, YGR et YMR. A. La structure cristalline d'un homodimère MT1 (Zarembinski *et al.*, 2003). Les brins β des nœuds α/β (rouge) illustrent le mode de dimérisation (MT1) et la structure en sandwich du nœud α/β . Les brins β du domaine *OB-fold* (bleu) constituent le site de reconnaissance du substrat. B. Prédiction de la structure tridimensionnelle de YGR. C. Prédiction de la structure tridimensionnelle de YGR. Les vinde en jaune. Les structures tridimensionnelles de YGR et YMR (S190) est indiqué en jaune. Les structures tridimensionnelles de YGR et YMR ont été prédites par Phyre2 en se basant sur la structure de MT1 et de l'homologue chez l'humain C9orf114 (Kelley *et al.*, 2015). PyMOL a été utilisé pour la modélisation des structures.

La phosphorylation de Ser au niveau du domaine de liaison de l'acide nucléique n'est pas courante. Un exemple décrit dans la littérature est celui de la phosphorylation

56

S111 de la protéine télomérique TPP1 chez l'humain. Cette phosphorylation induit le recrutement de la télomérase pendant la phase S du cycle cellulaire pour favoriser la prolongation des télomères (Hirai *et al.*, 2016).

4.3 La délétion de YMR diminue légèrement le taux d'expression de YGR

Mes résultats montrent aussi que la délétion du gène *YMR* diminue légèrement le taux d'expression de la protéine YGR. Ce résultat mène à conclure que YMR ne régule pas négativement l'expression du gène *YGR* pour inhiber sa fonction MTase putative. De plus, si YMR inhibe la méthylation des substrats par YGR, cela sera seulement une inhibition au niveau de la dimérisation de la protéine. D'un autre côté, ce résultat combiné aux données sur le taux d'expression de l'ARNm peut être expliqué par une corégulation de YGR et YMR pendant la phase M qui peut signifier une augmentation d'expression des deux protéines pour former un hétérodimère responsable de la méthylation d'un substrat autre que le substrat méthylé par l'homodimère YGR-YGR pendant G2/M (Figure 4.2).

Le pic d'expression de l'ARNm de YGR est observé pendant la transition G2/M, mais YGR est aussi exprimé pendant la phase M en même temps que le pic d'expression de l'ARNm de YMR (Santos *et al.*, 2015). L'expression du gène YGR en transition G2/M peut donc donner la protéine homodimère YGR-YGR, tandis que pendant la phase M la protéine YGR se dimérise avec son paralogue YMR pour former un hétérodimère inhibiteur (Fig 4.2). Cependant, ces résultats montrent le taux d'expression d'ARNm qui peut avoir ou pas une corrélation avec le taux des protéines exprimées et donc ces informations ne peuvent pas être utilisées pour expliquer la variation de l'expression de la protéine YMR en absence de son paralogue YGR.



Figure 4.2. Différents dimères : différentes fonctions. L'homodimère YGR-YGR peut être le dimère fonctionnel. La formation d'hétérodimère YGR-YMR peut inhiber la méthylation par YGR-YGR ou changer la spécificité du substrat grâce au domaine *OB-fold* de YMR. La phosphorylation de S190 pourrait aussi être impliquée dans l'interaction avec le substrat. À ce jour, l'homodimère YMR-YMR n'a pas été détecté.

4.4 YGR et YMR se localisent au nucléole

J'ai montré que YGR et YMR se localisent au nucléole, site de la biogenèse des ribosomes, qui est aussi impliqué dans la réponse au stress, la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération cellulaire. En plus des protéines impliquées dans la biogénèse des ribosomes et des protéines nucléolaires, d'autres protéines peuvent être localisées au nucléole transitoirement, comme dans les mécanismes utilisés par le nucléole dans la régulation de différents processus par la séquestration des protéines effectrices (Thoms *et al.*, 2007), ceci indique que c'est de plus en plus difficile d'associer la localisation nucléolaire à une fonction précise. Curieusement, YGR et

58

YMR font tous deux partie du RRB et interagissent avec la protéine nucléolaire Gar1 et la protéine Cbf5 qui peut se localiser au nucléole et qui lie les centromères. Ces résultats, avec les données sur l'homologue humain, suscitent des questions sur le rôle qui peut être joué par ces ARN MTases dans la stabilité des fuseaux mitotiques et si cela est un rôle principal ou secondaire.

4.5 Conclusions et perspectives

Les ARN MTases sont importants pour la régulation de la structure et la fonction des ARN codants et non codants. L'association de C9orf114, l'homologue chez l'humain des protéines YGR et YMR, avec plusieurs cancers poussent les scientifiques à investiguer plus sur les mécanismes derrière son rôle dans la maturation des miRNA et dans la stabilité de fuseau mitotique lors des divisions cellulaires.

Dans mon projet de recherche, j'ai étudié l'homologue chez la levure de C9orf114, qui n'est pas une, mais plutôt deux protéines paralogues : YGR et YMR. Chez la levure, les gènes YGR et YMR ne sont pas essentiels à la survie des levures et même la délétion double n'affecte pas la viabilité et la croissance des cellules.

La délétion du gène *YGR* ralenti légèrement la croissance des levures et augmente la durée de leur cycle de vie. Mes résultats montrent aussi que les protéines YGR et YMR se localisent au nucléole. Aussi, j'ai montré que la délétion du gène *YMR* diminue légèrement le taux d'expression de la protéine YGR. Dans des travaux futurs, on peut étudier l'effet de la délétion de YMR sur le taux de l'ARNm codant pour la protéine YGR afin de vérifier si la régulation se fait au niveau de l'expression génétique. Dans ce cas, la protéine YMR exprimée en phase M de mitose peut induire l'expression du gène *YGR* et son absence affecterait l'expression de la protéine YGR pendant la phase M.

La vérification de l'expression des gènes au niveau de l'ARNm est crucial surtout dans le cas du crible génétique où cela permet de vérifier que le plasmide est bien exprimé même si on est sûr que le promoteur en amont (-500 pb) est capable d'exprimer les protéines fonctionnelles YGR et YMR.

Le criblage génétique, qui n'a pas été achevé pendant mon projet, pourra révéler des interactions génétiques qui vont permettre une meilleure compréhension de la fonction des protéines YGR et YMR. Généralement, dans les cribles d'un gène non létal on s'attend à identifier un gène impliqué dans le même processus biologique ce qui peut donner une meilleure idée sur la fonction de la protéine étudiée. Comme ici on étudie deux paralogues, on s'attend aussi à identifier le gène YGR dans le crible du gène YMR et vice versa. Le gène à l'étude (par exemple YGR) doit aussi être identifié et cela sert de contrôle de la fiabilité de l'ensemble des étapes du criblage génétique.

On peut aussi étudier la cinétique de dimérisation (YGR-YGR, YGR-YMR et YMR-YMR, si ce dernier existe) au cours de cycle cellulaire pour élucider la régulation de la fonction de la méthylation par les paralogue YGR et YMR chez la levure. Aussi, la vérification de l'effet de la délétion du gène YGR sur le taux d'expression de la protéine YMR pourra donner plus d'information pour mieux comprendre la relation fonctionnelle entre YGR et son paralogue YMR.

Finalement, afin d'identifier les substrats de la méthylation de YGR et YMR, on veut aussi faire un CRAC (*cross-linking and analysis of cDNA*) qui consiste à identifier les interactions des protéines YGR et YMR avec les molécules d'ARN cibles, éventuellement pour la méthylation. Cela nous permettra par la suite de vérifier l'activité méthyltransférase de YGR et YMR.
ANNEXE A

Liste des souches de levures utilisées

Nom de la souche	Génotype	Plasmide utilisé	Utilisation
ҮРН499	MATa ura3-52 lys2- 801_amber ade2- 101_ochre trp1-∆63 his3- ∆200 leu2-∆1)	-	Souche parentale pour les transformations et contrôle négatif
ygr∆	YPH499 ∆ <i>YGR283C::TRP1</i>	pFA6a- <i>TRP1</i>	Tests de viabilité et microscopie (avec le plasmide 33GFP-YGR)
ymr∆	ΥΡΗ499 Δ <i>ΥΜR310C::HIS3</i>	pFA6a- <i>His3MX6</i>	Tests de viabilité et microscopie (avec le plasmide 111GFP-YMR)
GAR1-CH YGR-GFP	YPH499 GAR1-mCherry- KanMX YGR283C-GFP- TRP1	mCherry- KanMX pFA6a- <i>GFP(S65T)-</i> <i>TRP1</i>	Localisation des protéines sous microscope confocal
GAR1-CH YMR-GFP	YPH499 GAR1-mCherry- KanMX YMR310C-GFP- TRP1	pFA6a- <i>GFP(S65T</i>)- <i>TRP1</i>	
YGR-HTP	YPH499 YGR283C-HTP- URA3	pBS1539- <i>HTP-URA3</i>	
YGR-HTP ∆YMR	YPH499 YGR283C-HTP- URA3 ΔYMR310C::HIS3	pBS1539- HTP-URA3 et pFA6a- HIS3MX6	·
YMR-HTP	YPH499 YMR310C-HTP- URA3	pBS1539- <i>HTP-URA3</i>	immunoouvardage
YMR-HTP ∆YGR	YPH499 <i>YMR310C-HTP- URA3 ΔYGR283C::TRP1</i>	pBS1539- <i>HTP-URA3</i> et pFA6a- <i>TRP1</i>	

ANNEXE B

Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification des cassettes et la vérification de leur intégration dans le génome de levures.

catégorie	Nom	Séquences	
A	F1-YGR283 (413)	5'CAATGAGGTGAAACACATCTACCAAGGGAA GTGTAGCATAATAGGGGAAGCGGATCCCCGG GTTAATTAA	
	R1-YGR283 (404)	5'GATGATTATATAACATAAATAGTAATATCA GTTATTAATTGCTATTTATTGAATTCGAGCTCG TTTAAAC	
В	R1-YMR310 (408)	5'TGCGTCTCTAATATATACGTACTTATCCATT GCATGAAGGTAATTTGGGAGAATTCGAGCTC GTTTAAAC	
	F1-YMR310C (990)	5'GTCCCAGGAATATATACTACTGACCACAAA GCTGTGTATCACTTAGTTTGCGGATCCCCGGG TTAATTAA	
С	GAR1-538-Cherry-F (1116)	5'AGAGGTGGATCTCGTGGCGGATC	
	GAR1-716-Cherry-R (1117)	5'CGACGTTAGACGTGCTTCGGCAG	
D	F2-YGR283Cnew (+2aa) (1230)	5'GATAGCCTACCCATAGCTCCTACCATGTTTC AGCGTTGGGCAAGTGGTGGACGGATCCCCGG GTTAATTAA	
	R1-YGR283 (404)	5'GATGATTATATAACATAAATAGTAATATCA GTTATTAATTGCTATTTATTGAATTCGAGCTCG TTTAAAC	
Е	F2-YMR310Cnew (+2aa) (1231)	5'GCAGATGCAATCCCCATGACACTGACAACT CTTTCAACTGTATTTGGTGGACGGATCCCCGG GTTAATTAA	
	R1-YMR310 (408)	5'TGCGTCTCTAATATATACGTACTTATCCATT GCATGAAGGTAATTTGGGAGAATTCGAGCTC	

	1999 - Marine Carlos - Carlos	GTTTAAAC
F	YGR-HTP-F (1226)	5'TTCAAGATAGCCTACCCATAGCTCTTACCAT GTTTCAGCGTTGGGCAAGTGGTGGAGAGCAC CATCACCATCACC
	YGR-HTP-R (1227)	5'GATGATTATATAACATAAATAGTAATATCA GTTATTAATTGCTATTTATTTACGACTCACTAT AGGG
G	YMR-HTP-F (1228)	5'ACGTTGCAGATGCAATCCCCATGACACTGA CAACTCTTTCAACTGTATTTGGTGGAGAGCAC CATCACCATCACC
	YMR-HTP-R (1229)	5'TGCGTCTCTAATATATACGTACTTATCCATT GCATGAAGGTAATTTGGGATACGACTCACTAT AGGG
Н	YGR283C-KpnI-F (1250)	5'CCGGGTACCGCTTTCAATACCCTGCTAGCT
	YGR283C-SalI-R (1251)	5'CAGGTCGACTCCACCACTTGCCCAACGCTGA AACATGGT
Ι	YMR310C-SacI-F (1252)	5'TTCGAGCTCGGTGCTGTGGACCCTCACGGGG
	YMR310Cc-SalI-R (1253)	5'CAGGTCGACTCCACCAAATACAGTTGAAAG AGTTGT
J	YMR310CheckNtFOR (416)	5'ATATGCACTGTTTGTTATCACGCG
	YMR310CheckCtREV (410)	5'CAAGTGCAACTGCGAACCTGT
	YMR310-EcoRI-Rev (434)	5'CGCGAATTCTTAAAATACAGTTGAAAGAGT TGTCAG
K	YGR283CheckNtFOR (414)	5'CTCTTTAGCAACTATTGTAAACCGC
	YGR283CheckCtREV (406)	5'CTCTTTTTCAGGGCGAAAAACTGA
	YGR283C-EcoRI-Rev (432)	5' CGCGAATTCTCAACTTGCCCAACGCTGAA
L	GAR1-461-checkCt-F (1118)	5'GCGGTGGTAGCAGAGGAGGTTTC
	GAR1-865-checkCt-R (1119)	5'CCGTGGTCGTTTGTTTAACTACGGCG

BIBLIOGRAPHIE

- Alamgir, M., Erukova, V., Jessulat, M., Azizi, A. et Golshani, A. (2010). Chemicalgenetic profile analysis of five inhibitory compounds in yeast. BMC Chem Biol, 10, 6. doi: 10.1186/1472-6769-10-6
- Albuquerque, C. P., Smolka, M. B., Payne, S. H., Bafna, V., Eng, J. et Zhou, H. (2008). A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics*, 7(7), 1389-1396. doi: 10.1074/mcp.M700468-MCP200
- Anantharaman, V., Koonin, E. V. et Aravind, L. (2002). SPOUT: a class of methyltransferases that includes spoU and trmD RNA methylase superfamilies, and novel superfamilies of predicted prokaryotic RNA methylases. J Mol Microbiol Biotechnol, 4(1), 71-75.
- Anderson, J. B., Sirjusingh, C., Parsons, A. B., Boone, C., Wickens, C., Cowen, L. E. et Kohn, L. M. (2003). Mode of selection and experimental evolution of antifungal drug resistance in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 163(4), 1287-1298.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. et Struhl, K. (1999). Short protocols in molecular biology. *Édition WILEY, 4th Edition*.
- Bacalini, M. G., Pacilli, A., Giuliani, C., Penzo, M., Trere, D., Pirazzini, C., ... Garagnani, P. (2014). The nucleolar size is associated to the methylation status of ribosomal DNA in breast carcinomas. *BMC Cancer*, 14, 361. doi: 10.1186/1471-2407-14-361
- Baudin-Baillieu, A., Tollervey, D., Cullin, C. et Lacroute, F. (1997). Functional analysis of Rrp7p, an essential yeast protein involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly. *Mol Cell Biol*, 17(9), 5023-5032.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G. et Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol*, 154, 164-175.
- Byrne, K. P. et Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Research*, 15(10), 1456-1461. doi: 10.1101/gr.3672305
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., ... Hentze, M. W. (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*, 149(6), 1393-1406. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.031

- Chan, M. W., Wei, S. H., Wen, P., Wang, Z., Matei, D. E., Liu, J. C., . . . Huang, T. H. (2005). Hypermethylation of 18S and 28S ribosomal DNAs predicts progression-free survival in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11(20), 7376-7383. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-05-1100
- Cheng, X. et Roberts, R. J. (2001). AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res*, 29(18), 3784-3795.
- Chow, C. S., Lamichhane, T. N. et Mahto, S. K. (2007). Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *ACS Chem Biol*, 2(9), 610-619. doi: 10.1021/cb7001494
- Dai, D., Wang, H., Zhu, L., Jin, H. et Wang, X. (2018). N6-methyladenosine links RNA metabolism to cancer progression. *Cell Death & Disease*, 9(2), 124. doi: 10.1038/s41419-017-0129-x
- Dannheisig, D. (2017). Impact of Survivin Acetylation on its Biological Function. Springer Spektrum, Wiesbaden.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobitg, M., Montanyola, A., Chang, J. M., ... Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res, 39*(Web Server issue), W13-17. doi: 10.1093/nar/gkr245
- Dimitrova, E., Turberfield, A. H. et Klose, R. J. (2015). Histone demethylases in chromatin biology and beyond. *EMBO Reports*.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., . . . Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol*, 190(7), 2597-2606. doi: 10.1128/jb.01695-07
- Durso, D. F., Bacalini, M. G., do Valle, İ. F., Pirazzini, C., Bonafé, M., Castellani, G., . . . Nardini, C. (2017). Aberrant methylation patterns in colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(8), 12820-12830. doi: 10.18632/oncotarget.14590
- Emmott, E. et Hiscox, J. A. (2009). Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Reports*, 10(3), 231-238. doi: 10.1038/embor.2009.14
- Fischer, U., Schäuble, N., Schütz, S., Altvater, M., Chang, Y., Faza, M. B. et Panse, V. G. (2015). A non-canonical mechanism for Crm1-export cargo complex assembly. *eLife*, 4, e05745. doi: 10.7554/eLife.05745
- Fleischer, T. C., Weaver, C. M., McAfee, K. J., Jennings, J. L. et Link, A. J. (2006). Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev, 20*(10), 1294-1307. doi: 10.1101/gad.1422006
- Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., . . . Superti-Furga, G. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, 440(7084), 631-636. doi: 10.1038/nature04532
- Gérus, M., Bonnart, C., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y. et Henras, A. K. (2010). Evolutionarily Conserved Function of RRP36 in Early Cleavages of the Pre-

rRNA and Production of the 40S Ribosomal Subunit. *Molecular and Cellular Biology*, 30(5), 1130-1144. doi: 10.1128/MCB.00999-09

- Giaever, G., Chu, A., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., . . . Johnston, M. (2002). Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome.
- Granneman, S., Kudla, G., Petfalski, E. et Tollervey, D. (2009). Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A, 106*(24), 9613-9618. doi: 10.1073/pnas.0901997106
- Greer, E. L. et Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature reviews. Genetics*, 13(5), 343-357. doi: 10.1038/nrg3173
- Grosjean, H. (2005). Modification and editing of RNA: historical overview and important facts to remember. Dans H. Grosjean (dir.), *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing* (p. 1-22). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Grove, T. L., Benner, J. S., Radle, M. I., Ahlum, J. H., Landgraf, B. J., Krebs, C. et Booker, S. J. (2011). A radically different mechanism for Sadenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Science*, 332(6029), 604-607. doi: 10.1126/science.1200877
- Gumy-Pause, F., Pardo, B., Khoshbeen-Boudal, M., Ansari, M., Gayet-Ageron, A., Sappino, A. P., . . . Ozsahin, H. (2012). GSTP1 hypermethylation is associated with reduced protein expression, aggressive disease and prognosis in neuroblastoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51(2), 174-185. doi: doi:10.1002/gcc.20941
- Gustafsson, C., Reid, R., Greene, P. J. et Santi, D. V. (1996). Identification of New RNA Modifying Enzymes by Iterative Genome Search Using Known Modifying Enzymes as Probes. *Nucleic Acids Research*, 24(19), 3756-3762. doi: 10.1093/nar/24.19.3756
- Hasegawa, Y., Irie, K. et Gerber, A. P. (2008). Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast. *Rna*, 14(11), 2333-2347. doi: 10.1261/rna.1016508
- Hirai, Y., Tamura, M., Otani, J. et Ishikawa, F. (2016). NEK6-mediated phosphorylation of human TPP1 regulates telomere length through telomerase recruitment. *Genes Cells*, 21(8), 874-889. doi: 10.1111/gtc.12391
- Hori, H. (2014). Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases. Frontiers in Genetics, 5(144). doi: 10.3389/fgene.2014.00144
- Hori, H. (2017). Transfer RNA methyltransferases with a SpoU-TrmD (SPOUT) fold and their modified nucleosides in tRNA. *Biomolecules*, 7(1). doi: 10.3390/biom7010023
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. et O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425(6959), 686-691. doi: 10.1038/nature02026

- Ishii, K., Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G. et Laemmli, U. K. (2002). Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell*, 109(5), 551-562.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. et Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10, 845. doi: 10.1038/nprot.2015.053
- Kozbial, P. Z. et Mushegian, A. R. (2005). Natural history of S-adenosylmethioninebinding proteins. BMC Struct Biol, 5, 19. doi: 10.1186/1472-6807-5-19
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., . . . Greenblatt, J. F. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Nature*, 440(7084), 637-643. doi: 10.1038/nature04670
- Krogan, N. J., Peng, W. T., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., . . . Greenblatt, J. F. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell*, 13(2), 225-239.
- Limbach, P. A., Crain, P. F. et McCloskey, J. A. (1994). Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic Acids Research*, 22(12), 2183-2196. doi: 10.1093/nar/22.12.2183
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., . . Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 14(10), 953-961. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(199807)14:10<953::Aid-yea293>3.0.Co;2-u
- Marcet-Houben, M. et Gabaldon, T. (2015). Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage. *PLoS Biol, 13*(8), e1002220. doi: 10.1371/journal.pbio.1002220
- Meder, V. S., Boeglin, M., de Murcia, G. et Schreiber, V. (2005). PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J Cell Sci*, 118(Pt 1), 211-222. doi: 10.1242/jcs.01606
- Michaillat, L. et Mayer, A. (2013). Identification of Genes Affecting Vacuole Membrane Fragmentation in Saccharomyces cerevisiae. *PLoS One*, 8(2), e54160. doi: 10.1371/journal.pone.0054160
- Motorin, Y. et Helm, M. (2011). RNA nucleotide methylation. *Wiley* Interdisciplinary Reviews: RNA, 2(5), 611-631. doi: doi:10.1002/wrna.79
- Nureki, O., Shirouzu, M., Hashimoto, K., Ishitani, R., Terada, T., Tamakoshi, M., . . . Seiki Kuramitsub, c., g and Shigeyuki Yokoyamaa,b,c*. (2002). An enzyme with a deep trefoil knot for the active-site architecture.
- Ohta, S., Bukowski-Wills, J.-C., Sanchez-Pulido, L., Alves, F. d. L., Wood, L., Chen, Z. A., ... Rappsilber, J. (2010). The Protein Composition of Mitotic Chromosomes Determined Using Multiclassifier Combinatorial Proteomics. *Cell*, 142(5), 810-821. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.047

- Ohta, S., Wood, L., Toramoto, I., Yagyu, K.-I., Fukagawa, T. et Earnshaw, W. C. (2015). CENP-32 is required to maintain centrosomal dominance in bipolar spindle assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 26(7), 1225-1237. doi: 10.1091/mbc.E14-09-1366
- Pietrzak, M., Rempala, G., Nelson, P. T., Zheng, J.-J. et Hetman, M. (2011). Epigenetic Silencing of Nucleolar rRNA Genes in Alzheimer's Disease. *PLoS One*, 6(7), e22585. doi: 10.1371/journal.pone.0022585
- Razin, A., Cedar, H. et Riggs, A. D. (1984). DNA methylation: biochemistry and biological significance ((p. 1-10): Springer-Verlag New York Inc.
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y. et Yao, X. (2009). DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Res*, 19(2), 271-273. doi: 10.1038/cr.2009.6
- Ren, X.-Y., Zhou, G.-Q., Jiang, W., Sun, Y., Xu, Y.-F., Li, Y.-Q., ... Ma, J. (2015). Low SFRP1 Expression Correlates with Poor Prognosis and Promotes Cell Invasion by Activating the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway in NPC. *Cancer Prevention Research*, 8(10), 968-977. doi: 10.1158/1940-6207.Capr-14-0369
- Samanfar, B., Omidi, K., Hooshyar, M., Laliberte, B., Alamgir, M., Seal, A. J., . . . Golshani, A. (2013). Large-scale investigation of oxygen response mutants in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biosyst*, 9(6), 1351-1359. doi: 10.1039/c3mb25516f
- Santos, A., Wernersson, R. et Jensen, L. J. (2015). Cyclebase 3.0: a multi-organism database on cell-cycle regulation and phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D1140-D1144. doi: 10.1093/nar/gku1092
- Schäfer, T., Straub, D., Petfalski, E., Tollervey, D. et Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *Embo j, 22*(6), 1370-1380. doi: 10.1093/emboj/cdg121
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schmidt, M., Akasaka, K., Messerly, J. T. et Boyer, M. P. (2012). Role of Hog1, Tps1 and Sod1 in boric acid tolerance of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology*, 158(Pt 10), 2667-2678. doi: 10.1099/mic.0.060590-0
- Schubert, H. L., Blumenthal, R. M. et Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), 329-335. doi: 10.1016/s0968-0004(03)00090-2
- Schwer, B., Erdjument-Bromage, H. et Shuman, S. (2011). Composition of yeast snRNPs and snoRNPs in the absence of trimethylguanosine caps reveals nuclear cap binding protein as a gained U1 component implicated in the coldsensitivity of tgs1Delta cells. *Nucleic Acids Res*, 39(15), 6715-6728. doi: 10.1093/nar/gkr279
- Scorer, C. A., Clare, J. J., McCombie, W. R., Romanos, M. A. et Sreekrishna, K. (1994). Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of Pichia pastoris for High–level Foreign Gene Expression. *Nature Biotechnology*, 12(2), 181-184. doi: 10.1038/nbt0294-181

- Scott, M. S., Troshin, P. V. et Barton, G. J. (2011). NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics*, 12, 317. doi: 10.1186/1471-2105-12-317
- Sergiev, P. V., Aleksashin, N. A., Chugunova, A. A., Polikanov, Y. S. et Dontsova, O. A. (2018). Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nat Chem Biol*, 14(3), 226-235. doi: 10.1038/nchembio.2569
- Sikorski, R. S. et 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.
- Stallcup, M. R. (2001). Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene*, 20, 3014. doi: 10.1038/sj.onc.1204325
- Szczepinska, T., Kutner, J., Kopczynski, M., Pawlowski, K., Dziembowski, A., Kudlicki, A., . . . Rowicka, M. (2014). Probabilistic approach to predicting substrate specificity of methyltransferases. *PLoS Comput Biol*, 10(3), e1003514. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003514
- Taddei, A. et Gasser, S. M. (2012). Structure and function in the budding yeast nucleus. *Genetics*, 192(1), 107-129. doi: 10.1534/genetics.112.140608
- Teng, X., Cheng, W. C., Qi, B., Yu, T. X., Ramachandran, K., Boersma, M. D., ... Hardwick, J. M. (2011). Gene-dependent cell death in yeast. *Cell Death & Disease*, 2, e188. doi: 10.1038/cddis.2011.72
- Thoms, H. C., Dunlop, M. G. et Stark, L. A. (2007). CDK4 Inhibitors and Apoptosis: A Novel Mechanism Requiring Nucleolar Targeting of RelA. *Cell Cycle*, 6(11), 1293-1297. doi: 10.4161/cc.6.11.4312
- Tkaczuk, K. L., Dunin-Horkawicz, S., Purta, E. et Bujnicki, J. M. (2007). Structural and evolutionary bioinformatics of the SPOUT superfamily of methyltransferases. *BMC Bioinformatics*, 8, 73. doi: 10.1186/1471-2105-8-73
- Treiber, Treiber, N., Plessmann, U., Harlander, S., Daiss, J. L., Eichner, N., . . . Meister, G. (2017). A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis. *Mol Cell, 66*(2), 270-284 e213. doi: 10.1016/j.molcel.2017.03.014
- Trumtel, S., Léger-Silvestre, I., Gleizes, P. E., Teulières, F. et Gas, N. (2000). Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of Saccharomyces cerevisiae mutants. *Molecular Biology of the Cell*, 11(6), 2175-2189. doi: 10.1091/mbc.11.6.2175
- Tsekrekou, M., Stratigi, K. et Chatzinikolaou, G. (2017). The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *Int J Mol Sci, 18*(7). doi: 10.3390/ijms18071411
- Tu, B. P., Kudlicki, A., Rowicka, M. et McKnight, S. L. (2005). Logic of the Yeast Metabolic Cycle: Temporal Compartmentalization of Cellular Processes. *Science*, 310(5751), 1152-1158. doi: 10.1126/science.1120499
- Uluisik, I., Kaya, A., Unlu, E. S., Avsar, K., Karakaya, H. C., Yalcin, T. et Koc, A. (2011). Genome-wide identification of genes that play a role in boron stress response in yeast. *Genomics*, 97(2), 106-111. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.10.006

- Wade, C. H., Umbarger, M. A. et McAlear, M. A. (2006). The budding yeast rRNA and ribosome biosynthesis (RRB) regulon contains over 200 genes. Yeast, 23(4), 293-306. doi: 10.1002/yea.1353
- Waern, K. et Snyder, M. (2013). Extensive transcript diversity and novel upstream open reading frame regulation in yeast. G3 (Bethesda), 3(2), 343-352. doi: 10.1534/g3.112.003640
- Waters, A. J., Makarevitch, I., Noshay, J., Burghardt, L. T., Hirsch, C. N., Hirsch, C. D. et Springer, N. M. (2017). Natural variation for gene expression responses to abiotic stress in maize. *Plant J*, 89(4), 706-717. doi: 10.1111/tpj.13414
- Watkins, N. J. et Bohnsack, M. T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. Wiley Interdiscip Rev RNA, 3(3), 397-414. doi: 10.1002/wrna.117
- Winston, M. K. et Bhattacharjee, J. K. (1982). Growth inhibition by alphaaminoadipate and reversal of the effect by specific amino acid supplements in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol, 152(2), 874-879.
- Wlodarski, T., Kutner, J., Towpik, J., Knizewski, L., Rychlewski, L., Kudlicki, A., ... Ginalski, K. (2011). Comprehensive structural and substrate specificity classification of the Saccharomyces cerevisiae methyltransferome. *PLoS One*, 6(8), e23168. doi: 10.1371/journal.pone.0023168
- Wolfe, K. H. (2015). Origin of the Yeast Whole-Genome Duplication. *PLoS Biol,* 13(8), e1002221. doi: 10.1371/journal.pbio.1002221
- Woolford, J. L. et Baserga, S. J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 195(3), 643-681. doi: 10.1534/genetics.113.153197
- Xhemalce, B., Robson, S. C. et Kouzarides, T. (2012). Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing. *Cell*, 151(2), 278-288. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.041
- Yang, J.-M., Baserga, S. J., Turley, S. J. et Pollard, K. M. (2001). Fibrillarin and Other snoRNP Proteins Are Targets of Autoantibodies in Xenobiotic-Induced Autoimmunity. *Clinical Immunology*, 101(1), 38-50. doi: <u>https://doi.org/10.1006/clim.2001.5099</u>
- Yang, J., Sharma, S., Kötter, P. et Entian, K.-D. (2015). Identification of a new ribose methylation in the 18S rRNA of S. cerevisiae. *Nucleic Acids Research*, 43(4), 2342-2352. doi: 10.1093/nar/gkv058
- Ye, P., Shi, Y., An, N., Zhou, Q., Guo, J. et Long, X. (2018). miR-145 overexpression triggers alteration of the whole transcriptome and inhibits breast cancer development. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 100, 72-82. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.167</u>
- Yoo, C. J. et Wolin, S. L. (1997). The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell*, 89(3), 393-402.
- Young, B. D., Weiss, D. I., Zurita-Lopez, C. I., Webb, K. J., Clarke, S. G. et McBride, A. E. (2012). Identification of methylated proteins in the yeast small

ribosomal subunit: a role for SPOUT methyltransferases in protein arginine methylation. *Biochemistry*, 51(25), 5091-5104. doi: 10.1021/bi300186g

- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., ... Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307(5711), 932-935. doi: 10.1126/science.1107130
- Zarembinski, T. I., Kim, Y., Peterson, K., Christendat, D., Dharamsi, A., Arrowsmith, C. H., . . . Joachimiak, A. (2003). Deep trefoil knot implicated in RNA binding found in an archaebacterial protein. *Proteins*, 50(2), 177-183. doi: 10.1002/prot.10311