UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DE L'EXTENSION C-TERMINALE DE L'ARN HÉLICASE DBP4 CHEZ LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR CHIRAZ AKORÉDÉ IBINIKÈ RADJI

JUIN 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs (SDU-522 – Rév.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

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Professeur François Dragon de m'avoir acceptée dans son laboratoire et permis d'exercer ma passion pour la recherche scientifique. Je suis très reconnaissante envers son assistance pour bien mener le présent travail avec sa disponibilité, ses encouragements permanents, sa compréhension, son soutien. Je n'aurai su arriver à l'élaboration de cet ouvrage sans ses conseils éclairés et judicieux.

J'exprime ma reconnaissance à Sophie Sleiman pour ses hautes qualités humaines et scientifiques. J'espère qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et ma sincère admiration.

Je remercie très profondément tous les membres du département des sciences biologiques de l'UQAM, du centre de recherche BioMed, professeurs, techniciens et étudiants qui m'ont soutenu durant ce projet. Je n'oublierais non plus leurs petits coups de main et leur gentillesse.

Mes remerciements les plus sincères, également aux membres du comité d'évaluation pour le grand plaisir qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

Enfin, un profond remerciement à ma famille pour leur amour et support moral constant.

DÉDICACE

À ma mère Bilkissou Adédjokè ABDOU. Merci de m'avoir soutenue pendant toutes ces années et de croire en moi malgré tous mes doutes. Au risque de me répéter, merci pour ton amour, ta générosité, ton écoute et ton optimisme. Tu nous as transmis le goût du travail, le sens des responsabilités, ta curiosité, et le goût de la liberté! Forever Grateful! Thanks Mumsi!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURESvii			
LISTE DES TABLEAUXix			
LIS	TE DES	ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES10	
RÉS	SUMÉ .	xi	
CH	APITRE	EI INTRODUCTION	
1.1	Génér	alités sur le ribosome1	
	1.1.1 1.1.2 1.1.3 1.1.4 1.1.5	Origine	
1.2	La bio	ogenèse des ribosomes chez Saccharomyces cerevisiae	
	1.2.1 1.2.2 1.2.3 1.2.4	Saccharomyces cerevisiae comme modèle d'étude8Structure du ribosome de S. cerevisiae9Synthèse et maturation du précurseur d'ARNr chez S. cerevisiae11Les petits ARN nucléolaires13	
1.3	Le «si	mall subunit» processome14	
1.4	Généi	alités sur les hélicases à ARN15	
	1.4.1 1.4.2	Classification	
1.5	Les A	RN hélicases «DEAD-box»16	
	1.5.1 1.5.2 1.5.3	Origine	
1.6	L'héli	case DEAD-box protein 4 (Dbp4)22	
	1.6.1	Structure primaire de la protéine Dbp422	

	1.6.2 1.6.3	Fonctions DDX10: homologue de Dbp4 chez l'humain	.23 .23
1.7	Les of	utils bio-informatiques de prédiction	23
1.8	Identi	fication des motifs présents sur l'extension C-terminale de Dbp4	24
1.9	Quelq	ues pathologies liées à un dysfonctionnement du ribosome	.27
1.1() Нуро	thèses et objectifs	29
CH	APITRE	E II MATÉRIEL ET MÉTHODES	.30
2.1	Matér	iel	.30
2.2	Métho	odes	.32
	2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5	Préparation et transformation de bactéries compétentes La mutagenèse dirigée Purification des acides nucléiques Séquençage des clones produits Technique de clonage moléculaire	32 32 35 35 35
2.3	Analy	se fonctionnelle des mutants	36
	2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6	Construction de la souche de déplétion <i>GAL::DBP4</i> Préparation et transformation de levures compétentes Création de la banque de mutants aléatoires de Dbp4 Tests en gouttes Test en réplique Expériences de déplétion.	36 36 36 37 37
2.4	Analy	se de l'expression protéique des mutants de Dbp4	38
	2.4.1 2.4.2	Séparation des protéines par électrophorèse (SDS-PAGE) Technique d'immunobuvardage	38 38
2.5	Analy	se du profil d'expression des ARN ribosomiques	39
	2.5.1 2.5.2	Extraction des ARN totaux Électrophorèse des ARNr matures	39 39
CH	APITRE	E III RÉSULTATS	40
3.1	Étude Dbp4	bio-informatique des motifs présents dans l'extension C-terminale de	40
3.2	Réalis	ation des mutations et analyse des séquences	47
3.3	Le mo cellula	otif «coiled-coil» et le domaine DUF4217 sont essentiels à la survie aire	49

V

3.4	Les motifs NLS 3 et 4 ne sont pas nécessaires à la survie cellulaire	53	
3.5	Étude de la croissance des souches de levures mutantes	54	
3.6	Analyse de l'expression protéique des mutants	59	
3.7	Criblage génétique de la banque de mutants aléatoires	60	
3.8	Analyse du profil d'expression des ARN ribosomiques	63	
CHA	PITRE IV DISCUSSION	65	
СПА	PITRE V CONCLUSION ET PERSPECTIVES	/1	
BIBL	BIBLIOGRAPHIE		

vi

LISTE DES FIGURES

Figure	

Page

1.1	Observation de structures nucléolaires de levure et de chromatine nucléolaire par microscopie électronique	5
1.2	Structure du ribosome de Saccharomyces cerevisiae	10
1.3	Les étapes de maturation du pré-ARNr chez la levure Saccharomyces cerevisiae	12
1.4	Représentation schématique d'une hélicase «DEAD-box»	20
1.5	Vue d'ensemble d'un motif «coiled-coil».	25
3.1	Prédiction bio-informatique du motif «coiled coil» de Dbp4 par COILS	43
3.2	Prédiction bio-informatique des motifs NLS sur la séquence protéique de Dbp4 par le serveur cNLS Mapper	45
3.3	Positionnement des mutations au niveau des motifs présents dans l'extension C-terminale de Dbp4	47
3.4	Alignement de séquences des protéines Dbp4 mutées	48
3.5	Effet des mutations de Dbp4 sur la viabilité cellulaire	51
3.6	Tests de viabilité cellulaire en milieu solide.	53
3.7	Courbes de croissance des souches wt, v, cc1 et Δ cc à 30 °C	55

3.8	Courbes de croissances des souches cc1 et Δ cc	56
3.9	Analyse du profil d'expression des protéines recombinantes Dbp4 par immunobuvardage.	59
3.10	Vérification par immunobuvardage de l'expression protéique de quelques mutants de la banque aléatoire.	62
3.11	Analyse du profil d'expression des ARNr matures dans les souches mutantes cc1 et Δ cc.	64

viii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau

Page

2.1	Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée	33
2.2	Position des mutations sur l'extension C-terminale de Dbp4	34
3.1	Tableau récapitulatif des mutants obtenus et l'impact des mutations sur la survie cellulaire	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ARNr	ARN ribosomique
ARN pol I	ARN polymérase I
ARN pol II	ARN polymérase II
ARN pol III	ARN polymérase III
ARNm	ARN messager
ARNt	ARN de transfert
DFC	Centres fibrillaires denses
DO	Densité optique (absorbance)
EN	Enveloppe nucléaire
FC	Centres fibrillaires
GC	Composante granulaire
GFP	Protéine fluorescente verte
HA	Hémagglutinine
ITS	«Internal transcribed spacer»
NES	Signal d'exportation nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PEG	Polyéthylène glycol
PGALI	Promoteur inductible au galactose
pré-ARNr	ARNr précurseur
PVDF	«Polyvinylidene difluoride»
SF	Superfamille
snoARN	«small nucleolar RNA»
snoARN C/D	snoARN à boîtes C et D
snoARN H/ACA	snoARN à boîtes H et ACA
RNP	Ribonucléoprotéine
SSU	«Small subunit»

RÉSUMÉ

Le projet porte sur l'étude de l'ARN hélicase Dbp4 (« DEAD-box protein 4 »). DBP4 est un gène essentiel chez Saccharomyces cerevisiae. Dbp4 est une protéine nucléolaire impliquée dans la synthèse de l'ARNr 18S lors de la formation de la sousunité 40S du ribosome. Dbp4 est caractérisée par un cœur catalytique flanqué des extensions amino- et carboxy- terminales (N-terminale et C-terminale). L'objectif principal de ce projet est la caractérisation des acides aminés fonctionnels de l'extension C-terminale de la protéine Dbp4. L'étude permet d'identifier la présence de domaines conservés: le domaine de fonction inconnue DUF4217, un motif «coiled-coil» et des signaux de localisation nucléaire (NLS). Les résultats des analyses bio-informatiques suggèrent une déstabilisation du «coiled-coil» après introduction des mutations CC1 (K665P, K667P), CC2 (R680P, R681P) et 2CC (CC1+CC2). Les expériences in vivo révèlent qu'une délétion du DUF4217 ou du «coiled-coil» est létale. Les mutations CC1 et 2CC génèrent un phénotype non-viable tandis que CC2 génère un phénotype viable. Les mutations introduites dans les NLS : mNLS3 (K672A, R673A); mNLS4 (K726A, K727A, K728A); m2NLS (3 et 4) et $\Delta NLS4$, n'ont pas d'effet sur la croissance cellulaire. Les résultats démontrent que le domaine DUF4217 et le «coiled-coil» sont des éléments clefs dans la fonction de Dbp4 sur la survie cellulaire. Les tests de complémentation révèlent que plusieurs acides aminés présents dans l'extension C-terminale sont nécessaires à la survie cellulaire. Cette étude permet également de vérifier l'effet des mutations sur l'activité de Dbp4. Les analyses révèlent que le ratio 18S:25S diffère (1:2) dans les souches cc1 et Δcc comparativement au wt (1:1). On observe un défaut de production du 18S dans les souches mutantes cc1 et \triangle cc à 30 °C et 37 °C. Les résultats obtenus montrent que les mutations CC1 et \triangle CC peuvent avoir un effet sur la production de l'ARNr 18S mature, ce qui suggère que le motif d'interaction protéique «coiled-coil» pourrait être impliqué dans la fonction de Dbp4 dans les réactions de clivage aboutissant à la synthèse de l'ARNr 18S.

Mots-clés: ARNr 18S, ARN hélicase, DEAD-box, Dbp4.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Généralités sur le ribosome

1.1.1 Origine

La première description des ribosomes à l'échelle cellulaire est attribuée à Palade (Palade, 1955). Dans les années 1980s, la structure du ribosome procaryote fût réalisée grâce aux études permettant d'obtenir des cristaux des sous-unités 50S de *Bacillus stearothermophilus* (Makowski *et al.*, 1987) puis du ribosome entier (Glotz *et al.*, 1987) et enfin des sous-unités 50S de *Halobacterirum marismortui* (Yonath *et al.*, 1988). Quelques années plus tard, les progrès technologiques ont mis à la disposition des chercheurs des informations abondantes sur les structures des ribosomes procaryotes et eucaryotes. Ce n'est toutefois qu'à la fin des années 1990 que la résolution atomique de la structure des ribosome procaryote (*Escherichia coli*) a été réalisée. Cette prouesse technique a été possible grâce au couplage de méthodes de cristallographie, et de cryo-microscopie électronique (Agrawal *et al.*, 1996; Frank *et al.*, 1995; Stark *et al.*, 1995). Une première avancée dans le domaine a été la découverte de la structure atomique du ribosome bactérien et son fonctionnement à l'échelle atomique par la méthode de cristallographie par rayons X (Ban *et al.*, 2000). Quelques années après, la première structure du ribosome de levure fût déterminée; le

ribosome a été cristallisé puis analysé par cristallographie aux rayons X à une résolution atomique de 3,0 Å («angströms») (Ben-Shem *et al.*, 2011). Puis en 2013 et 2015, la structure quasi-atomique du ribosome humain a été obtenue à une résolution atomique de 5,4 à 6 Å (Anger *et al.*, 2013; Khatter *et al.*, 2015). Ces découvertes ont permis de comprendre le fonctionnement des ribosomes procaryotes et eucaryotes (Khatter *et al.*, 2015; Kornprobst *et al.*, 2016; Yusupov *et al.*, 2001).

1.1.2 Structure et composition des ribosomes

Les ribosomes sont des nanomachines ribonucléoprotéiques qui catalysent la conversion de l'information génétique contenue dans les ARN messagers (ARNm) pour créer le protéome dans toutes les cellules. Tous les ribosomes sont composés de deux sous-unités asymétriques, la petite sous-unité (ou «small subunit» SSU en anglais) et la grande sous-unité (ou «large subunit» LSU en anglais) qui resteront indépendantes jusqu'à leur liaison à un ARN messager. Elles sont désignées par leur coefficient de sédimentation S (unité de Svedberg) qui sont respectivement de 40S et 60S chez les eucaryotes et 30S et 50S chez les bactéries (Klinge et al., 2012). Les eucaryotes utilisent trois ARN polymérases (ARN Pol) distinctes pour transcrire leur génome, auxquelles il est nécessaire d'ajouter les ARN Pol spécifiquement dédiées à la transcription des génomes mitochondriaux ou chloroplastiques. Chez les eucaryotes, la composition, l'assemblage et la fonction des ribosomes des mitochondries et chloroplastes sont similaires à ceux des bactéries, tandis que la biogenèse et la fonction des ribosomes cytoplasmiques seraient plus complexes (Henras et al., 2008). En ajoutant les ARNr et les PR de la bactérie Escherichia coli dans un ordre précis, il est possible de provoquer l'auto-assemblage de ribosomes procaryotes matures et fonctionnels in vitro.

La biogenèse des ribosomes eucaryotes cytoplasmiques nécessite la synthèse des quatre ARNr et 80 PR ainsi que des facteurs d'assemblages protéiques et de petits ARN nucléolaires (snoARN) (Chaker-Margot, 2018; Gumienny *et al.*, 2017) ce qui souligne la complexité plus importante de la structure des sous-unités et des mécanismes de leurs synthèses.

La petite sous-unité 40S du ribosome a pour fonctions d'initier la traduction en se liant aux ARNm, de porter l'activité de décodage de l'information génétique et de permettre la reconnaissance entre codons de l'ARNm et anticodons des ARNt. Ceci prend place au niveau du centre de décodage de la petite sous-unité. Elle est donc directement impliquée dans la fidélité de la traduction.

La grande sous-unité 60S quant à elle, renferme le centre peptidyltransférase qui catalyse la formation des liaisons peptidiques entre la chaine polypeptidique naissante et l'acide aminé correspondant au codon suivant contenu dans l'ARNm. L'assemblage de ces deux sous-unités forme le ribosome. La chaîne peptidique en formation sort du ribosome où elle est prise en charge par des protéines chaperonnes pour permettre son repliement tridimensionnel.

1.1.3 Fonction ou activités du ribosome

Les ribosomes médient la traduction de la séquence nucléotidique des ARNm dans la séquence d'acides aminés des protéines et sont essentiels dans toutes les formes de vie. Le ribosome est considéré comme un ribozyme dans lequel l'ARNr possède l'activité catalytique intrinsèque (Muth *et al.*, 2000). Les protéines ribosomiques (PR) assureraient plus un rôle de support et de maintien de la structure tridimensionnelle des ARNr et ainsi exerceraient un rôle indirect sur la régulation de l'activité traductionnelle des ribosomes (Khatter *et al.*, 2015).

1.1.4 Le nucléole

Dans une cellule eucaryote, l'organite qui joue le rôle de centre de commande est le noyau. On y retrouve le nucléole, un petit compartiment spécialisé du noyau, observé par microscopie dans des cellules d'eucaryotes supérieurs par Fontana (Fontana, 1781). Environ 150 ans plus tard, McClintock montre que le nucléole s'organise autour de loci chromosomiques regroupés en plusieurs centaines de répétitions tandem (150) dans les régions organisatrices nucléolaires (NOR) (McClintock, 1934). Quelques décennies après, des expériences d'hybridation in situ démontraient que ces NOR contiennent l'ADN ribosomique (ADNr) (Ritossa et Spiegelman, 1965). La biogenèse des ribosomes a lieu dans le nucléole. Chez S. cerevisiae, l'ADNr est contenu intégralement sur le chromosome XII, on observe ainsi un seul nucléole. Chez l'Homme, les NOR sont présents sur les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22. Le nucléole est le siège de transcription des gènes ribosomiques. Au cours de la biogenèse des ribosomes, son activité reflète un équilibre entre le niveau de synthèse des ARN ribosomiques (ARNr), directement lié à la croissance et à la prolifération cellulaire, l'efficacité de la maturation des ARNr, et le transport des sous-unités ribosomiques vers le cytoplasme. Le protéome nucléolaire est d'environ 200 protéines chez la levure contre 5000 protéines chez l'Homme (Ahmad et al., 2009). L'ultrastructure des nucléoles révèle trois compartiments: le centre fibrillaire (CF) entouré par la composante fibrillaire dense (CFD) composé d'une couche compacte de forte densité qui sont tous les deux intégrés dans la composante granulaire (CG) riche en granules de 15 à 20 nm (Raska et al., 2006) (Figure 1.1).



Figure 1.1 Observation de structures nucléolaires de levure et de chromatine nucléolaire par microscopie électronique. A) Couche mince d'un nucléole de levure fixé *in situ*. Les lettres F, D et G représentent les compartiments du nucléole : CF, CFD et CG. NP représente le nucléoplasme. B) et C) Étalement de chromatine nucléolaire observée par microscopie électronique. En C), les flèches indiquent les granules terminaux à l'extrémité 5' du transcrit nouvellement synthétisé. Les valeurs des barres d'échelle sont de 0,25 μ m en A), 1,0 μ m en B) et 0,5 μ m en C). (Raska *et al.*, 2006).

La composition du nucléole semble hautement conservée au cours de l'évolution. Une liste exhaustive des protéines contenues dans le nucléole de plantes, de levures, et vertébrés est désormais disponible. La biogénèse des ribosomes débute dans le nucléole dans lequel se manifestent plusieurs activités biologiques importantes. En effet, ces activités incluent la sénescence et la régulation de la télomérase, la progression du cycle cellulaire, l'activité oncogénique et le contrôle de l'infection virale (Boulon *et al.*, 2010).

1.1.5 Le transport nucléo-cytoplasmique

Après leur synthèse dans le cytoplasme, les protéines ribosomiques doivent être transportées dans le noyau pour être incorporées dans des particules pré-ribosomiques en formation, ce transport se fait à travers le pore nucléaire. Les phénomènes de transport entre le noyau et le cytoplasme à travers les pores nucléaires sont des mécanismes essentiels et hautement régulés dans les cellules eucaryotes.

Le pore nucléaire (NPC pour nuclear pore complex) est un complexe protéique de 125 megaDaltons (MDa) environ chez les vertébrés et 66 MDa chez la levure; formé d'une centaine de protéines différentes (8-16 copies) appelées nucléoporines dont la plupart possèdent des domaines comportant de nombreuses répétitions d'acides aminés phénylalanine (F) et glycine (G) (Adam, 2001; Reichelt et al., 1990). Elles ont un domaine intra membranaire et un extramembranaire et des doigts protéiques qui vont permettre l'attachement à la membrane nucléaire (Schwartz, 2005). Le pore nucléaire est perméable à toutes les molécules qui sont plus petites que 40 kDa; des biomolécules de petite taille diffusent ainsi passivement à travers le canal NPC. Du fait de leur taille, le transport des protéines ribosomiques et des particules préribosomiques (>40 kDa) se fait de façon active et nécessite de l'énergie. Le transport requiert la GTPase Ran, les karyophérines ainsi que certains cofacteurs de maturation (Bayliss et al., 2000). Les karyophérines forment deux classes de protéines: les importines et les exportines. Les importines sont classées en deux catégories, α et β , elles-mêmes regroupées dans la superfamille des importines β . Le transport nucléaire est une suite d'importations et d'exportations de protéines gouvernée par un gradient de RanGTP, faiblement concentré dans le cytoplasme et fortement concentré dans le noyau (Lange et al., 2007). Le transport des macromolécules dans le noyau nécessite notamment la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS).

La reconnaissance du signal NLS du cargo par l'importine α initie le processus d'importation nucléaire. Quand le cargo se fixe sur l'importine α , celle-ci est reconnue par l'importine β qui permet la fixation au NPC. Ran-GDP se lie au complexe ce qui conduit à la translocation du complexe à travers le pore nucléaire. Les sous-unités de karyophérines coopèrent pour fixer les séquences répétées FG des nucléoporines: les karyophérines β fixent les nucléoporines sur les répétitions peptidiques FG (Weis *et al.*, 1995). Une fois fixé, le complexe pénètre dans le noyau, RanGEF («Ran Guanine nucleotide Exchange Factor») déstabilise le complexe en échangeant Ran-GDP en RanGTP. RanGTP se fixe aux karyophérines β et cause la dissociation du complexe. La protéine est libérée dans le noyau alors que les importines et cofacteurs sont recyclés dans le compartiment cytoplasmique. Enfin, la Ran-GAP («Ran GTPase-activating protein») active l'hydrolyse du GTP intrinsèque à Ran pour former du Ran-GDP ce qui cause la relâche du récepteur ; ainsi un nouveau cycle peut débuter.

-Signaux de localisation nucléaire (NLS)

La sélectivité de l'importation de ces protéines réside dans des signaux appelés «Nuclear Localisation Signal» (NLS). Le NLS est décrit originalement suite à une comparaison avec la séquence PKKRKV de l'antigène grand T du virus simien (SV40). Le NLS est présent uniquement chez les protéines nucléaires et peut être localisé n'importe où dans la séquence protéique et consiste généralement en une courte séquence (4 et 8 acides aminés). Les séquences NLS varient selon les protéines nucléaires mais sont souvent riche en acide aminés chargé positivement (lysine, arginine) et contenant parfois des prolines (Mor *et al.*, 2014).

Les NLS sont classifiés en deux familles, les NLS classiques et les NLS non classiques. Les NLS classiques sont les plus étudiés et sont divisés en deux classes: les monopartites et les bipartites. Brièvement, le NLS monopartite comporte une séquence linéaire de type KK/RxK et le NLS bipartite est constitué de groupements basiques de 2 à 3 résidus basiques chacun et séparés par un petit espaceur de composition variable soit environ 10 à 12 acides aminés (Lange *et al.*, 2007). Les proline-tyrosine NLS «PY-NLS» (Dong *et al.*, 2009) appartiennent à la famille des NLS non classiques. Enfin, il existe également des signaux d'exportation nucléaire appelés NES («Nuclear Export Signal»). Les protéines responsables de l'export nucléaire sont appelées exportines. L'exportation se fait selon un procédé similaire grâce aux exportines et la RanGDP. La protéine exportée est alors libérée dans le cytoplasme alors qu'exportine et co-facteur sont recyclés dans le compartiment nucléaire (Dong *et al.*, 2009).

1.2 La biogenèse des ribosomes chez Saccharomyces cerevisiae.

1.2.1 Saccharomyces cerevisiae comme modèle d'étude

Le modèle choisi dans cette étude est la levure *Saccharomyces cerevisiae* appelée «levure de boulanger» ou aussi «levure de bière». *S. cerevisiae* est un organisme modèle eucaryote simple et commun utilisé pour l'étude de la génétique et de la biologie cellulaire. Au milieu des années 1970, elle a été introduite comme un organisme qui convient à la recherche scientifique (Boram et Roman, 1976). Elle est reconnue comme un modèle-clé d'étude dont le génome est facilement manipulable. En 1996, *S. cerevisiae* a été le premier eucaryote dont la séquence complète du génome fût déchiffrée (Goffeau *et al.*, 1996).

Son génome de 12 millions de paires de bases contient 16 chromosomes linéaires et environ 6000 gènes dont la plupart trouvent leurs orthologues chez l'Homme (<u>www.yeastgenome.org</u>). Cet organisme eucaryote inférieur présente de nombreux avantages tant au niveau génétique que biochimique (Woolford et Baserga, 2013). Les souches de *S. cerevisiae*, contrairement à d'autres microorganismes, sont stables non seulement sous leur forme diploïde mais aussi haploïde.

De plus, les techniques de biologie moléculaire ont été exploitées chez *S. cerevisiae* dans l'étude de la régulation de gènes, la relation structure-fonction des protéines, la structure des chromosomes et autres grandes questions de la biologie cellulaire. Par la suite, la biogenèse des ribosomes eucaryotes a été étudiée chez *S. cerevisiae*. En phase exponentielle de croissance, la transcription des gènes ribosomiques équivaut à 60% de l'activité transcriptionnelle totale et environ 2000 ribosomes sont produits par minute. Ainsi, la majeure partie de l'activité métabolique des cellules en prolifération est dédiée à la biogenèse des ribosomes (Warner, 1999).

1.2.2 Structure du ribosome de S. cerevisiae

Chez les eucaryotes, la synthèse des ribosomes est un processus essentiel et nécessaire à la croissance, la division et la survie des cellules. Ce processus se déroule principalement dans le nucléole, le nucléoplasme et s'achève dans le cytoplasme (Woolford et Baserga, 2013). Certains complexes pré-ribosomiques sont formés dans le nucléoplasme, où les particules pré-ribosomiques acquièrent des compétences d'exportation, et dans le cytoplasme où se déroulent les dernières étapes de la maturation des sous-unités. La plupart des ARNr font initialement partie d'un transcrit primaire traité en plusieurs étapes pour dériver les ARNr matures formant une grande partie du noyau catalytique du ribosome.

Le ribosome de levure de poids moléculaire d'environ 3,3 MDa, est 40% plus grand que son homologue bactérien (2,5 MDa) et plus petit que celui de l'Homme qui est de 4,3 MDa (Ben-Shem *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012). À titre d'exemple, l'étude de (Ben-Shem *et al.*, 2011) a permis de déterminer la structure tridimensionnelle des ribosomes (Figure 1.3).



Figure 1.2 Structure du ribosome de *Saccharomyces cerevisiae*. La sous-unité 40S est représentée en bleu et la sous-unité 60S en jaune. Chaque sous-unité est formée de nombreuses chaînes d'ARNr (bleu et jaune pâle) et de plusieurs protéines (bleu et jaune foncé). Les segments d'extension, qui constituent des segments d'ARN supplémentaire sont indiqués en rouge (Ben-Shem *et al.*, 2010).

1.2.3 Synthèse et maturation du précurseur d'ARNr chez S. cerevisiae

Les ribosomes du type eucaryote contiennent des protéines ribosomiques (PR) et des éléments de séquence supplémentaires dans les ARNr, appelés segments d'expansion eucaryote. Chez les eucaryotes dont la levure, la synthèse des ARNr nécessaires à la maturation des sous-unités requiert l'activité de trois ARN polymérases (Woolford et Baserga, 2013).

Chez S. cerevisiae, les NOR qui correspondent aux régions des gènes de l'ADNr, sont répétés en tandem (150-200 copies) sur le chromosome XII (Petes, 1979). Chez S. cerevisiae, l'ADN ribosomique est transcrit en un long précurseur polycistronique (pré-ARNr) 35S qui contient les ARNr 18S, 5.8S et 25S séparés pardes espaceurs internes ou «internal-transcribed spacer» (ITS) et flanqués par des espaceurs externes appelés «external-transcribed spacer» (ETS). L'ARN polymérase I est requise pour la synthèse du pré-ARNr 35S, l'ARN polymérase III pour la synthèse de l'ARNr 5S et l'ARN polymérase II assure la transcription des gènes codant les protéines ribosomiques, les facteurs d'assemblage et les petites séquences d'ARN nucléolaires (snoARN). Contrairement aux autres ARNr, l'ARNr 5S est transcrit au sein du nucléoplasme puis importé dans le nucléole. Les espaceurs sont ensuite éliminés par une série de clivages endonucléolytiques ayant lieu séquentiellement dans le nucléole, le nucléoplasme et le cytoplasme. Le pré-ARNr 35S est clivé aux sites A0 et A1 dans la séquence 5' ETS, ce qui génère les intermédiaires 33S et 32S respectivement. La coupure au site A2 dans l'ITS1 sépare les intermédiaires de maturation des sousunités ribosomiques 40S et 60S: le pré-ARNr 20S précurseur de l'ARNr 18S, et le pré-ARNr 27SA2 précurseur des ARNr 25S et 5.8S. Les sous-unités ribosomiques sont ainsi le fruit de l'assemblage de quatre ARN, qui composent l'essentiel de la masse du ribosome, et d'environ 80 protéines. Tout au long de la transcription du pré-ARNr, les protéines sont assemblées dans les pré-ribosomes lorsqu'elles migrent à travers le nucléoplasme.

Les détails des finales de maturation de l'ARNr 18S peuvent être trouvés dans la littérature (Chaker-Margot *et al.*, 2015; Woolford et Baserga, 2013).



Figure 1.3 Les étapes de maturation du pré-ARNr chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Woolford et Baserga, 2013). Le pré-ARN 35S est transcrit par l'ARN polymérase I et contient les ARNr 18S, 5.8S et 25S (noir, gris foncé et gris clair cylindres) flanqués et séparés par des espaceurs externes ETS et ITS (lignes solides). L'ARNr pré-5S (blanc cylindre) est transcrit indépendamment par l'ARN polymérase

III. Les séquences d'espacement sont ensuite retirées du pré-ARNr par une série de clivages à des sites spécifiques. La synthèse commence dans le nucléole de la cellule, mais plus tard les étapes se produisent dans le nucléoplasme et le cytoplasme.

Les travaux chez les eucaryotes dont *S. cerevisiae* ont mis en évidence la participation de nombreux facteurs en *trans* dans la biogenèse des ribosomes, protéines et particules ribonucléoprotéiques (RNP pour ribonucléoprotéine).

Le traitement des ARNr et l'assemblage des sous-unités ribosomiques nécessite un certain nombre de facteurs d'assemblage; exo- et endonucléases, les ATPases, GTPases, enzymes de modification de l'ARN, facteurs d'exportation (Chaker-Margot *et al.*, 2015; Klinge *et al.*, 2012; Kressler *et al.*, 2017).

1.2.4 Les petits ARN nucléolaires

Les snoARN («small nucleolar RNA») sont des petits ARN non codants présents dans le nucléole et définis sur la base des séquences conservées. Il existe trois types de snoARN: les ARN C/D catalysant respectivement des méthylations du ribose (le motif consensus de la boîte C est RUGAUGA et celui de la boite D est CUGA); les ARN H/ACA (boîte H: ANANNA; boîte ACA: ACANNN) catalysant l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine et RNase MRP («ARN Mitochondrial RNA Processing») permet le clivage des pré-ARNr grâce à leur activité exonucléase (Lafontaine, 2015). Certains snoARN fonctionnent en tant que chaperons en contribuant au repliement du pré-ARNr tout en favorisant leur association aux protéines ribosomiques. Chez la levure, il a été démontré que l'ARN 35S est modifié par le biais des snoRNP de la famille C/D et H/ACA. D'autres snoARN des deux familles fonctionnent à la fois en tant que guides de modification et en tant que chaperons de clivage: le snoARN à boîtes C/D U14 (Liang *et al.*, 1997; Zagorski *et al.*, 1988) et le snoARN à boîtes H/ACA snR10 (King *et al.*, 2003). Une étude a démontré que la perte ou l'inactivation du snoARN U14 peut perturber les clivages spécifiques des pré-ARNr, ce qui engendre une réduction du niveau d'expression de l'ARNr mature 18S (Liang *et al.*, 1997). Alors que les gènes codant les snoARN guides de modification peuvent être individuellement inactivés sans conséquence sur la croissance chez la levure, U3, U14 et snR30 sont essentiels à la viabilité (Morrissey et Tollervey, 1993) et la perte d'expression de snR10 affecte la croissance à basse température (Tollervey et Guthrie, 1985).

1.3 Le «small subunit» processome

Le «small subunit» SSU processome est une énorme ribonucléoprotéine d'environ 80S essentielle au processus de maturation de l'ARNr 18S chez les eucaryotes (Dragon *et al.*, 2002; Phipps *et al.*, 2011). Il est constitué du petit ARN nucléolaire U3 et d'environ 70 protéines ribosomiques et non ribosomiques incluant plusieurs hélicases (ex., Dbp4, Has1, et Dhr1) et des protéines de liaison à l'ARN (ex., Rrp5 and Mrd1) (Chaker-Margot, 2018). Les composants du SSU processome sont assemblés de façon coordonnée, avec la formation de plusieurs sous-complexes qui sont incorporés aux pré-ARNr en ordre chronologique. L'union du sous-complexe UTP-A/tUTP (Nan1, Utpl0, Utpl5, Utp4, Utp5, Utp8, Utp9) est essentielle pour le processus de transcription du pré-ARNr 35S et pour l'association des autres sous-complexes.

Les prochains composants du SSU processome sont assemblés dans deux branches différentes. La protéine Rrp5 s'incorpore dans une des branches, suivie du sous-complexe UTP-C (Ckal, Cka2, Ckb1, Ckb2, Rrp7, Utp22).

Dans la deuxième branche le snoARN U3 et le sous-complexe UTP-B (Dip2, Pwp2, Utpl3, Utp18, Utp21, Utp6) sont co-assemblés, suivis des sous-complexes Bms1/Rcll, Mpp10/Imp3/Imp4 et Dbp4/Bfr2/Enp2. Néanmoins, un grand nombre de travaux menés chez la levure ou cellules de mammifères démontrent la participation de nombreuses ARN hélicases requises pour l'assemblage structural et l'export nucléo-cytoplasmique des sous-unités et dans la maturation des ARNr (Chaker-Margot *et al.*, 2017; Gallagher *et al.*, 2004).

1.4 Généralités sur les hélicases à ARN

1.4.1 Classification

Les hélicases à ARN peuvent être regroupées en six superfamilles (SF) (SFI, II, III, IV, V et VI) en fonction de leur séquence, structure et fonction biologique. On peut dégager deux grandes catégories: les hélicases formant des anneaux oligomériques (SF3 à 6) et celles qui n'en forment pas (SF1 et 2) (Singleton *et al.*, 2007). Les deux plus grandes superfamilles sont SF1 et SF2 qui contiennent des ARN et ADN hélicases chez les archaebactéries, eubactéries, eucaryotes et virus (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Les hélicases des superfamilles SF3, SF4 et SF5 adoptent généralement une structure hexamérique. Elles sont caractérisées par un domaine unique et contiennent de 2 à 5 motifs conservés. Les hélicases de la superfamille 2 (SF2) sont les plus répandues chez les organismes vivants et sont subdivisées en sous-familles dépendamment de leur composition.

Chez S. cerevisiae, on distingue deux familles majeures: les ARN hélicases «DEADbox» et les ARN hélicases «DEAH-box» (Gilman et al., 2017).

1.4.2 Processus biologiques impliquant les ARN hélicases

À l'origine, les ARN hélicases ont été répertoriées comme enzymes capables d'utiliser les nucléotides triphosphates (NTP) comme source d'énergie pour l'accomplissement de plusieurs fonctions cellulaires (Hodgman, 1988). Dotées d'activité ATPasique, les ARN hélicases sont des moteurs moléculaires qui déroulent et remodèlent les complexes d'acides nucléiques en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP.

Les ARN hélicases sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires dont la biogenèse des ribosomes, la réplication, la réparation de l'ADN, la recombinaison ainsi que le remodelage de la chromatine (Jankowsky, 2011). L'ARN hélicase Dbp4, étudié au cours de mon projet de recherche appartient à la famille des hélicases ARN «DEAD-box».

1.5 Les ARN hélicases «DEAD-box»

1.5.1 Origine

La protéine eIF4A a été la première ARN hélicase «DEAD-box» identifiée (Grifo *et al.*, 1982). Ce n'est que sept ans plus tard que la découverte d'un groupe de NTPases avec des motifs similaires et la caractérisation de plusieurs de ces protéines donnèrent naissance au groupe des protéines «DEAD-box» (Linder *et al.*, 1989). Les ARN hélicases «DEAD-box» constituent la plus grande sous-famille des hélicases de la SF2.

Le nom de cette famille dérive de la séquence d'acides aminés D-E-A-D (Asp-Glu-Ala-Asp) qui correspond au motif Il ou Walker B. Ces enzymes ubiquitaires interviennent dans tous les processus cellulaires impliquant l'ARN; de la transcription à la dégradation de l'ARN, la biogenèse des ribosomes, la régulation des gènes, le trafic nucléo-cytoplasmique et l'apoptose. Elles catalysent le déroulement des brins d'acides nucléiques de 10 à 15 paires de bases et participent au remodelage des structures protéiques et complexes ribonucléoprotéiques (Russell *et al.*, 2013). La combinaison de méthodes génétiques et protéomiques révèle la participation d'une vingtaine d'hélicases «DEAD-box» contribuant à la synthèse des sous-unités du ribosome de levure et une trentaine chez l'Homme. Sept hélicases (Dbp4, Dbp8, Dhr1, Dhr2, Fal1, Rok1, Rrp3) sont impliquées dans la synthèse de la sous-unité 40S, dix hélicases (Dbp2, Dbp3, Dbp6, Dbp7, Dbp9, Dbp10, Drs1, Mak5, Mtr4, Spb4) dans la synthèse de 60S, et deux (Prp43, Has1) dans la synthèse des deux sous-unités (Cordin *et al.*, 2006; Hilbert *et al.*, 2009; Linder et Jankowsky, 2011).

1.5.2 Structure générale

Les hélicases «DEAD-box» sont constituées d'un cœur hélicasique caractérisé par deux domaines globulaires «RecA-like» reliés par une séquence de liaison intermédiaire «linker» et relâchés en l'absence de liaison à ARN. Ces domaines sont virtuellement identiques αβ proches de la recombinase A (RecA) chez la bactérie *Escherichia coli* (Andreou et Klostermeier, 2013; Caruthers *et al.*, 2000). Le cœur catalytique des hélicases «DEAD-box» (300-400 acides aminés) est très conservé dans l'évolution et présente douze motifs qui participent à la liaison et à l'hydrolyse d'ATP (Figure 1.4), à la liaison et au déroulement de l'ARN ou au réarrangement du complexe ARN-protéine (Linder et Fuller-Pace, 2015; Liu *et al.*, 2014; Rocak et Linder, 2004).

Le laboratoire de Patrick Linder est à l'origine de l'identification du motif Q par la caractérisation d'une glutamine (Q) définie comme essentielle *in vivo*, dans les hélicases «DEAD-box» (Tanner *et al.*, 2003). Le résidu glutamine est présent dans la séquence de plus de 99% de ces motifs, et c'est la raison pour laquelle la séquence porte le nom de ce résidu. Le motif Q fait partie d'une structure sous forme de coiffe "cap-like structure" et est impliqué dans la fixation de la base azotée des nucléotides.

Le motif I (ou Walker A) est commun à toutes les hélicases et également à de nombreuses NTPases (Walker *et al.*, 1982). En effet, des mutations au niveau du motif AxTGoGKT, notamment le premier résidu alanine (A), la lysine (K) et la thréonine (T) abolissent les fonctions ATPasique et hélicasique par la réduction de l'affinité pour l'ATP et de l'efficacité de son hydrolyse. 'x'est n'importe quel résidu hydrophile ou hydrophobe et 'o' un résidu hydrophile. Il semble également être impliqué dans la liaison du NTP en interagissant avec des ions magnésium (Cordin *et al.*, 2006).

Le motif II (ou Walker B) correspond à la séquence DEAD caractéristique des hélicases ARN «DEAD-box». Le premier acide aspartique (D) et le glutamate (E) présents dans ce motif sont ultra-conservés et permettent de distinguer les différentes familles d'ARN hélicases comme les DEAD ou les DEAH lorsque ceux-ci sont associés à d'autres acides aminés. La principale caractéristique du motif II est sa contribution à l'hydrolyse des NTP pour assurer l'activité de déroulement. Des mutations ponctuelles des résidus de ce motif, notamment du premier acide aspartique (D) abolissent l'activité ATPase et hélicase des protéines DEAD-box ARN hélicases p68 et p72 (Ogilvie *et al.*, 2003).

Le Motif III est impliqué dans les activités hélicasiques et dans la liaison à l'ATP. Une étude effectuée sur la protéine Ded1 chez la levure montre que des mutations des acides aminés du motif III (SAT) affectent l'hydrolyse de l'ATP et l'affinité de la protéine pour les ARN simple brin mais pas l'affinité pour l'ATP (Banroques *et al.*, 2010).

Les motifs Ia, Ib, Ic, IV et V sont des motifs de fixation à l'ARN. L'étude de Banroques a démontré l'importance de la phénylalanine (F), résidu conservé à près de 100% chez les ARN hélicases de la superfamille 2. La mutation de ce résidu résulte en une réduction importante de la capacité à lier l'ARN, que ce soit en absence ou présence d'ATP (Banroques *et al.*, 2008).

Le motif V dont la séquence consensus est TDVuARGID (où u correspond à une alanine ou glycine) joue un rôle dans la liaison à l'ARN de façon conjointe avec les motifs auxiliaires Ia, Ib et IV (Cordin *et al.*, 2006). L'étude de Schneider révèle que le motif V de la protéine Prp22p chez la levure est requis pour la stimulation de l'activité ATPase suite à l'association avec l'ARN (Schneider *et al.*, 2004).

Le motif VI est caractérisé par la séquence consensus «HRxGRxGR». Il est localisé à l'interface des deux domaines structurellement fonctionnels composés d'un côté par les motifs Q, I, Ia, Ib, II et de l'autre côté par les motifs IV, V et VI chez les hélicases DEAD. Ce motif est requis pour l'activité ATPase et joue un rôle dans la liaison à l'ARN (Lin *et al.*, 2005). Il a été proposé que le second résidu arginine de ce motif soit nécessaire pour l'hydrolyse d'ATP. En conclusion, les motifs I, II, Q et VI sont nécessaires pour la liaison d'ATP, tandis que les motifs Ia, Ib, III, IV et V sont impliqués dans les interactions avec l'ARN et les motifs Va et III dans les réarrangements intramoléculaires (Rodriguez-Galan *et al.*, 2013).



Figure 1.4 Représentation schématique d'une hélicase «DEAD-box». Le cœur catalytique est constitué de 12 motifs conservés impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Q, I, II, VI), dans la liaison et le déroulement de l'ARN (Ia, Ib, Ic, IV, IVa, V) ou le réarrangement du complexe ARN-protéine, ainsi que des extensions N- et C-terminales de longueur et taille variables (Linder et Jankowsky, 2011).

Le remodelage de l'ARN par les hélicases «DEAD-box» est un processus qui nécessite l'hydrolyse d'ATP. Les différentes étapes du cycle d'hydrolyse de l'ATP provoquent des changements conformationnels dans l'ARN et des variations dans l'affinité de l'enzyme, ce qui permet à ces protéines de lier ou de libérer l'ARN de façon contrôlée (Linder et Jankowsky, 2011).

La particularité des hélicases ARN «DEAD-box» repose sur le rôle des structures présentes aux extrémités de l'hélice. Le cœur catalytique des hélicases «DEAD-box» est flanqué par des extensions N- et C-terminales variables conférant la spécificité à chaque protéine. Ces extensions seraient impliquées dans les interactions protéine-protéine et protéine/ARN, le recrutement de complexes spécifiques ou l'identification de séquences d'acides nucléiques (Linder et Jankowsky, 2011).

1.5.3 Quelques exemples d'hélicases et leurs fonctions

eIF4A est une ARN hélicase «DEAD-box» qui joue un rôle très important dans l'initiation de traduction et le recrutement de plusieurs autres facteurs qui participent à l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques (Andreou et Klostermeier, 2013). L'exportation d'ARNm du noyau vers le cytoplasme nécessite la protéine Dbp5. Dbp5 et Ded1 chaperonnent les ARN du noyau dans le cytoplasme (Rocak et Linder, 2004). De plus, une étude sur DbpA, une protéine «DEAD-box» chez *E. coli*, a montré que le domaine C-terminal est le lieu d'interaction entre les protéines et leurs substrats en activant l'hydrolyse d'ATP (Iost et Dreyfus, 2006). Une autre étude qui tente d'explorer la fonction de la partie C-terminale de la protéine Mss116 chez *S. cerevisiae* démontra que ce domaine est capable de soutenir et moduler les activités hélicasiques ou encore les fonctions d'épissage d'ARN (Mohr *et al.*, 2008).

D'autres études soulignent leur participation dans le mécanisme de prolifération et de transformation des cellules cancéreuses, dans la réponse immunitaire ainsi que dans les mécanismes de réplication des virus. À titre d'exemple, chez les mammifères, il a été démontré que DDX1 joue un rôle dans la voie de réponse à l'interféron, DDX1 interagissant avec la protéine non structurelle 14 du coronavirus entéropathogène porcin (Zhou *et al.*, 2017). DDX5 (Dbp2 chez la levure) est une ARN hélicase «DEAD-box» qui joue un rôle essentiel dans l'épissage d'ARNm, la régulation de la transcription et la biogenèse des ribosomes.

1.6 L'hélicase DEAD-box protein 4 (Dbp4)

Dans ce mémoire, l'étude est concentrée sur Dbp4. La protéine Dbp4 fut découverte suite à un lien génétique avec le snoARN U14 essentiel à la production d'ARNr 18S (Liang *et al.*, 1997).

1.6.1 Structure primaire de la protéine Dbp4

Dbp4 est une hélicase à ARN de la famille «DEAD-box». Elle est constituée de 770 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 87 kDa. Elle est composée d'un cœur catalytique conservé de 328 acides aminés flanqué par des extensions N-terminale et C-terminale. Dbp4 possède une courte partie N-terminale de 60 acides aminés et d'une extension C-terminale qui couvre à peu près la moitié de la longueur totale de la protéine soit 382 acides aminés. Dbp4 est une enzyme très conservée dans l'évolution.

1.6.2 Fonctions

DBP4 est un gène essentiel à la survie de la levure *S. cerevisiae*, et son absence ne peut être remplacé par une autre hélicase (Liang *et al.*, 1997). Une autre étude a démontré que Dbp4 est impliquée dans les clivages précoces aux sites A0, Al et A2 et au relâchement du snoARN U14 du pré-ARN 35S, ce qui suggère que l'activité de Dbp4 concerne la dissociation de cette interaction (Kos et Tollervey, 2005).

Les précédentes recherches réalisées dans notre laboratoire ont démontré que la déplétion de Dbp4 génère une réduction drastique dans le clivage co-transcriptionnel du pré-ARNr. Dbp4 est un composant du SSU processome et elle interagit avec d'autres protéines nucléolaires dont Bfr2 et Enp2 qui sont impliquées dans le processus de maturation de l'ARN 18S (Soltanieh *et al.*, 2014; Soltanieh *et al.*, 2015). L'algorithme COILS a révélé la présence d'un motif d'interaction protéique dans l'extension C-terminale de la protéine.

1.6.3 DDX10: homologue de Dbp4 chez l'humain

L'hélicase DDX10 est l'homologue de Dbp4 chez l'Homme ; le pourcentage de similarité de séquence étant défini de 50%. Pendant sa thèse dans notre laboratoire, Sahar Soltanieh a démontré que DDX10 joue un rôle dans la maturation de l'ARNr 18S (Soltanieh, 2015). Néanmoins, très peu de choses sont connues quant à la relation structure-fonction et au mécanisme d'action de cette hélicase.

1.7 Les outils bio-informatiques de prédiction

La prédiction de structure par la bio-informatique est utile pour générer des hypothèses sur la relation structure/fonction d'une protéine. Ces outils fournissent à l'utilisateur un grand nombre d'applications telles que : rechercher des séquences de protéines homologues; constituer un sous-ensemble de séquences protéiques

correspondantes; effectuer plusieurs alignements; faire des prédictions de structure secondaire, prédire l'emplacement des régions enroulées et identifier des motifs possibles hélice-tour-hélice. L'annotation fonctionnelle des motifs «coiled-coil» a été réalisée par les algorithmes COILS et CC2Builder 2.0.

Les algorithmes PSORTII, NLStradamus, cNLS Mapper et NLSdb ont été utiles pour la prédiction des signaux NLS des protéines. La base de données SMART a été utile pour identifier le domaine DUF4217 de Dbp4. Les bases de données sur le génome de *Saccharomyces* (SGD) ont fourni des informations biologiques détaillées sur la levure *S. cerevisiae*. Enfin, la base de données NCBI (National Cancer for Biology Information) a été utile pour l'accès aux données de plusieurs espèces à l'aide d'une interface graphique.

1.8 Identification des motifs présents sur l'extension C-terminale de Dbp4

-Le motif «coiled coil»

Un «coiled coil» ou superhélice est un motif structural présent dans une large variété de protéines telles que certaines protéines du muscle, des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette ou encore des moteurs moléculaires comme la kinésine. Il s'agit d'un regroupement d'hélice α compactées et enroulées les unes autour des autres avec une inclinaison de 20 degrés les unes par rapport aux autres. Les hélices se serrent étroitement les unes dans les autres, avec leurs chaînes latérales qui s'associent en formant des interactions «knobs-into-holes» en utilisant trois paramètres: 'pitch' (P) ou l'angle de 'pitch' (α), rayon de l'assemblage (r) et l'angle de l'interface (Figure 1.7).
La structure ainsi créée s'appelle un 'superenroulement' baptisé «coiled coil» par Francis Crick en 1953. Il s'agit d'un motif «enroulé» ou «spiralé» constitué de chaînes rentrant en interaction les unes avec les autres afin de créer une structure d'ordre supérieur (Crick, 1953). Ces motifs, à tour gauche, sont caractérisés par une répétition de 7 résidus à tous les deux tours d'hélices formant une heptade répétitive hxxhcxc où 'h' est un acide aminé hydrophobe, 'c' un résidu chargé et 'x' n'importe quel acide aminé (Masan et Arndt, 2004). Les positions des acides aminés dans les heptades sont notées a-b-c-d-e-f-g sur une hélice et a'-b'-c'-d'-e'-f'-g' sur l'autre, où 'a' et 'd' sont typiquement des résidus apolaires, alors que 'e' et 'g' sont des résidus polaires conférant la spécificité de chaque hélice par leur charge électrostatique.



D



Figure 1.5 Vue d'ensemble d'un motif «coiled-coil». A) Structure d'un enroulement hélicoïdal en hélices α. Diagrammes à roues hélicoïdales montrant la projection des résidus dans la répétition heptade. (B) Les hélices dans une bobine enroulée se serrent étroitement les unes dans les autres, en formant des interactions «knobs-into-holes». (C) Les spires enroulées sont décrites en utilisant trois paramètres géométriques: angle (8), rayon (A°) et pas (A°). (D) Schéma de la structure d'un motif «coiled-coil» dimérique avec les positions des différents résidus (Wood et Woolfson, 2018).

-Le domaine DUF4217

Les domaines DUF appartiennent à un ensemble de familles de protéines appelées domaines de fonction inconnue (DUF). Ces domaines furent regroupés sur la base de données Pfam. Le nom DUF a été introduit par le biais de l'ajout de domaines largement distribués dans les protéines de signalisation bactériennes appelées DUF1 et DUF2 à la base de données SMART (Schultz *et al.*, 1998). Par la suite, les fonctions de ces domaines ont été identifiées et renommées. Le domaine DUF retrouvé dans les régions C-terminales de plusieurs hélicases a ainsi été rajouté sur la liste des bases de données protéomiques. Une étude antérieure de notre laboratoire montre la présence du domaine DUF4217 à la position 428 à 491 en acides aminés

dans la protéine Dbp4 grâce à la base de données SMART. DUF4217 est également retrouvé dans les homologues de Dbp4.

-Les signaux NLS de l'extension C-terminale de Dbp4

Grâce au cNLSMapper, de récentes études révèlent la présence de deux séquences reconnues comme signal de localisation nucléaire (NLS) dans l'extension C-terminale de Dbp4. La première séquence correspond à GHLKKKARTVDY entre les positions 723 à 734, tandis que la deuxième est QEKKRKRLE entre les positions 669 à 677.

1.9 Quelques pathologies liées à un dysfonctionnement du ribosome

Des anomalies de fonctionnement des ribosomes semblent être impliquées dans plusieurs maladies qui causent différents phénotypes cliniques impliquant le plus souvent une insuffisance de la moelle osseuse et/ou des anomalies cranio-faciales et squelettiques (Trahan *et al.*, 2010). Un exemple de ribosomopathie est le syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond associé à des mutations dans la protéine SBDS (Shwachman, 1964). L'homologue de SBDS chez la levure est la protéine Sdo1p essentielle et impliquée dans les étapes tardives de la maturation des particules pré-ribosomiques pré-60S (Menne *et al.*, 2007).

Un deuxième exemple de ribosomopathie est le syndrome de Treacher Collins (STC) provoqué par des mutations présentes dans le gène *TCOF1* codant la protéine «Treacle», phosphoprotéine essentielle pour la transcription de l'ADNr et la méthylation de l'ARNr 18S (Treacher Collins, 1900). Les pathologies telles que l'anémie de Diamond-Blackfan (Diamond, 1938), la dyskératose congénitale (Mitchell *et al.*, 1999), la cirrhose amérindienne infantile, le syndrôme 5q- (Ebert *et*

al., 2008) et l'hypoplasie cartilagineuse ont été associées à un dysfonctionnement du ribosome.

-Pathologies liées à DDX10

Une étude a montré que l'anomalie récurrente des chromosomes inv (11) (p15q22) conduit à la fusion du gène de la nucléoporine NUP98 avec DDX10 chez les patients atteints de leucémie aiguës myéloïde (Arai *et al.*, 1997). Une autre étude a révélé que deux mutations consistant en une mutation ponctuelle du 566e acide aminé et une délétion de 25 acides aminés ont été associées au cancer du sein (Sjoblom *et al.*, 2006). De plus, la protéine formée NUP98-DDX10 provoque une augmentation considérable de la prolifération et de l'auto-renouvellement de cellules humaines primaires CD34+ (Yassin *et al.*, 2010). La thèse de Soltanieh (2015) suggère une possible implication de DDX10 dans la maturation de l'ARNr 18S. Enfin, une étude résume les mécanismes aberrants des hélicases «DEAD/H-box» dans différents types de cancers et discute de leur potentiel en tant que biomarqueurs de diagnostic et de pronostic (Cai *et al.*, 2017).

1.10 Hypothèses et objectifs

Des études antérieures ont révélé qu'une délétion de l'extension C-terminale de Dbp4 génère un phénotype létal chez la levure (Soltanieh *et al.*, 2015), ce qui suggère que la partie C-terminale de Dbp4 contient des acides aminés nécessaires à la fonction de cette enzyme. Quelques hypothèses sont émises dans le cadre de mon projet d'étude. Les motifs putatifs présents dans la région C-terminale de Dbp4 pourraient jouer un rôle crucial dans la survie cellulaire. En effet, ces motifs pourraient être nécessaires à la translocation nucléaire de la protéine Dbp4 pour ainsi assurer son rôle dans la maturation de l'ARN ribosomique 18S. Par ailleurs, plusieurs acides aminés présents dans l'extension C-terminale pourraient également être essentiels au fonctionnement de Dbp4.

Ainsi, je souhaite tout d'abord caractériser les motifs présents dans l'extension Cterminale de Dbp4 qui lui confère son rôle dans la survie cellulaire et son importation nucléaire. Ensuite, l'étude consistera à identifier tous les acides aminés présents dans l'extension C-terminale de Dbp4 qui seront essentiels à la croissance cellulaire. Pour finir, cette étude consistera à déterminer les motifs essentiels pour accomplir la fonction de Dbp4 dans la maturation de l'ARN ribosomique 18S. Pour atteindre ses objectifs, des analyses bio-informatiques seront utilisées pour identifier les motifs présents dans la région C-terminale de Dbp4. De plus, différentes études mutationnelles couplées aux techniques de biologie moléculaire permettront de déterminer si ces motifs sont essentiels à la survie de la cellule. Finalement, l'impact des mutations sur le processus de maturation d'ARN 18S sera évalué.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Les bactéries DH5 α ont été maintenues dans du milieu LB (Luria-Bertani) supplémenté avec de l'ampicilline (100 µg/mL). La souche *GAL::DBP4* a été maintenue en milieu synthétique complet (SC) «Yeast Nitrogen Base without amino acids» (Gibco) à 0,67% supplémenté avec un mélange acides aminés essentiels «drop out» dépourvu de tryptophane à une concentration de 0,13%. Le galactose ou dextrose est ajouté à 2% comme source de carbone. Les milieux synthétiques respectifs seront appelés SGal (galactose) ou SDex (dextrose).

-La souche bactérienne *Escherichia coli* DH5 α (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44* Φ 80' *lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) a été utilisée pour les clonages et la réplication des plasmides recombinants.

-La souche de levure GAL::DBP4 issue de *S. cerevisiae* YPH499 (*MATa ura3-52lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-\Delta 63 his3-\Delta 200 \ leu2-\Delta 1) (Sikorski et Hieter, 1989). Le promoteur original en amont du gène DBP4 fût remplacé par un promoteur inductible par le galactose P_{GAL1} (Longtine <i>et al.*, 1998).

-Le plasmide pCM188 (ATCC 87656-87662): vecteur navette *E. coli/S. cerevisiae* dont l'expression est sous le contrôle du promoteur cytochrome *CYC1*, l'opérateur tétracycline tet O_2 et du terminateur *CYC1* (Gari *et al.*, 1997).

Il possède un marqueur de sélection bactérien Amp^r (gène de résistance à l'ampicilline), un marqueur de sélection de levure URA3 et une origine de réplication CEN/ARS permettant le maintien d'une seule copie par cellule. Pour la transformation des clones pCM188-3HA dans la souche GAL::DBP4, on utilisera le milieu SC (-Trp-Ura) dépourvu d'uracile et de tryptophane.

-Le vecteur pBlueScript II SK couramment utilisé en biologie moléculaire est choisi comme vecteur de clonage pour *DBP4* dont la séquence du C-terminale est environ 1000 pb.

-Les outils bio-informatiques utilisés dans cette étude sont : CCBuilder 2.0 (Wood et Woolfson, 2018), COILS (Lupas, 1996), PSORTII (Nakai et Horton, 1999), cNLS Mapper (Kosugi *et al.*, 2009), NLStradamus (Nguyen Ba *et al.*, 2009).

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation et transformation de bactéries compétentes

La préparation et transformation des bactéries chimiocompétentes a été faite selon le protocole de Hanahan (Hanahan, 1983) et celle des bactéries électrocompétentes selon le protocole de Bio-Rad avec le Gene Pulser Xcell.

2.2.2 La mutagenèse dirigée

Le gène DBP4 fût inséré entre les sites ClaI et KpnI du vecteur d'expression pCM188 portant l'épitope 3HA (pCM188-3HA). Les mutations ciblées dans l'extension Cterminale de la protéine Dbp4 ont été introduites par PCR selon le protocole «QuikChange Site-Directed Mutagenesis» de Agilent. La région encodant l'extension C-terminale de Dbp4 (441 à 770 aa) a été clonée entre les sites BamHI et KpnI du vecteur pBlueScript II SK et cette construction (pBS-DBP4-Ct) a été utilisée pour la mutagenèse dirigée. Plusieurs paramètres ont été modifiés pour obtenir la mutation désirée : le choix des amorces, la quantité d'ADN matrice et les conditions de PCR. Les oligonucléotides utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le Tableau 2.1. Les produits de PCR obtenus de la méthode QuikChange fûrent ensuite digérés par l'enzyme DpnI (1 U/ μ L) et transformés dans des bactéries compétentes. Des colonies sont remises en culture liquide puis des mini-préparations de plasmides ont été faites pour analyse par séquençage. Les mutants générés par substitution d'acides aminés dans les motifs «coiled-coil» et NLS sont nommés: pCM-DBP4-CC1, pCM-DBP4-CC2, pCM-DBP4-2CC(1+2), pCM-DBP4-NLS3, pCM-DBP4-NLS4 et pCM-DBP4-2NLS (3+4). Les mutants générés par délétion complète des motifs putatifs sont: pCM-DBP4- Δ NLS4, CM-DBP4- Δ CC, pCM-DBP4- Δ DUF4217, et pCM-DBP4- Δ Ct. La position des mutations est listée dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.1 Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée de Dbp4.

Oligonucléotide	Séquence
DBP4-mutCC1-For	5'-GCAGGTGGCTCCAGAACCAAAACAAGAGA AGAAG-3'
DBP4-mutCC1-Rev	5'-CTTCTTCTTGTTTTGGTTCTGGAGCCACCTGC- 3'
DBP4-mutCC2-For	5'-AAGACTAGAAGCCATGCCACCGGAAATGG AGGCT-3'
DBP4-mutCC2-Rev	5'-AGCCTCCATTTCCGGTGGCATGGCTTCTAG TCTT-3 '
DBP4-mutNLS3-For	5'-CTAAAGAAAAAAAAAAAGAGAGAAGGCGGCA AAAAGACTAGAAGC-3'
DBP4-mutNLS3-Rev	5'-ATGGCTTCTAGTCTTTTTGCCGCCTTCTCTTGT TTTTCT -3'
DBP4-mutNLS4-For	5 '-GGCCACTTGGCTGCCGCTGCTAGAACTG-3'
DBP4-mutNLS4-Rev	5'-TCTAGCAGCGGCAGCCAAGTGGCCTTC C-3'
DBP4-ANLS4-For	5'-GGCCACTTGGCTAGAACTGTTGACTAT-3'
DBP4-ANLS4-Rev	5'-AACAGTTCTAGCCAAGTGGCCTTCCGAGTC-3'
DBP4-∆CC-For	5'GAATCTGCAGTAATGGCAGACATTGGAGATGAA GAAGAAGGGAAGACA-3'
DBP4-∆CC-Rev	5'-TGTCTTCCCTTCTTCATCTCCAATGTC TGCCATTACTGCAGATTC-3'

DBP4-1195-1255	5'-CCACAAGAGCAGGAAGCGTTC-3'
DBP4-ADUF4217	5'-CGCGGATCCAATGAAGGGTATGAAGACCA TTGA-3'
DBP4-∆Ct-For	5 '-CACCTCCACCACCTG-3'
DBP4-∆Ct-Rev	5'-GATCCAGGTGGTGGAGGTGGTAC-3'

Tableau 2.2 Position des mutations sur l'extension C-terminale de Dbp4

Mutants	Positions des acides aminés mutés
pCM-DBP4-mutCC1	K665P K667P
pCM-DBP4-mutCC2	R680P R681P
pCM-DBP4-mutNLS3	K672A R673A
pCM-DBP4-mutNLS4	K726A K727A K728A
pCM-DBP4- Δ NLS4	Délétion de 726 à 728
pCM-DBP4-∆CC	Délétion de 655 à 697
pCM-DBP4-ΔDUF4217	Délétion de 428 à 491
pCM-DBP4-∆Ct	Délétion de 333 aa

2.2.3 Purification des acides nucléiques

L'ADN plasmidique bactérien fut extrait soit à l'aide d'une trousse Mini-prep ou Midi-prep (QIAGEN) en suivant les recommandations du manufacturier. Pour l'extraction de l'ADN plasmidique de levure, on utilise le protocole de Ausubel (Ausubel *et al.*, 1999).

2.2.4 Séquençage des clones produits

Les échantillons d'ADN plasmidique des mutants létaux de pleine longueur fûrent acheminés au Centre Innovation Génome Québec de l'Université McGill pour séquençage par la procédure de Sanger. Afin d'analyser les clones, chaque séquence fût sélectionnée puis comparée à la séquence nucléotidique originale de Dbp4 de la base de données de la levure SGD.

2.2.5 Technique de clonage moléculaire

Les échantillons d'ADN du vecteur Pcm188-DBP4-WT et de l'insert (DBP4-Ct) fûrent digérés aux sites BamHI et KpnI afin puis soumis à une électrophorèse avec le marqueur 2-log DNA ladder à 110 Volts pendant une heure. Après migration, les bandes d'intérêt (~1000 pb pour l'insert et ~9500 pb du vecteur) ont été excisées et l'ADN est extrait en suivant les instructions de la trousse d'extraction de Bio Basic Inc. La ligation s'est déroulée en présence de 300 ng d'ADN de l'insert (Dbp4-Ct) et de 100 ng du vecteur pCM188-Dbp4-WT, du tampon de ligation 1X et de la T4-DNA ligase (0,5 U/µL) (New England Biolabs) dans 20 µL; le mélange est incubé à 16°C toute la nuit. Chaque produit de ligation a été transformé dans des bactéries compétentes et incubées sur deux géloses LB-Amp à 37°C pour la nuit. Quatre colonies par transformation furent sélectionnées et repiquées chacune dans 4 mL LB-Amp pendant la nuit à 37°C pour des mini-préparations d'ADN plasmidique.

2.3 Analyse fonctionnelle des mutants

2.3.1 Construction de la souche de déplétion GAL::DBP4

La souche GAL::DBP4 fût obtenue à partir de la souche YPH499 : le promoteur en amont du gène DBP4 a été remplacé par un promoteur P_{GAL1} inductible au galactose (Longtine *et al.*, 1998). La construction fut réalisée par un ancien membre de notre laboratoire (Sahar Soltanieh).

2.3.2 Préparation et transformation de levures compétentes

La préparation et transformation des levures compétentes *GAL::DBP4* a été réalisée selon la méthode de transformation au PEG-lithium acétate (Gietz *et al.*, 1992).

2.3.3 Création de la banque de mutants aléatoires de Dbp4

Afin d'identifier les acides aminés importants pour la fonction de Dbp4, la technique de mutagenèse aléatoire par PCR fut réalisée et une banque de 60000 clones a été générée par Sahar Soltanieh.

2.3.4 Tests en gouttes

Les constructions générées dans le plasmide pCM188-3HA ont été transformées dans la souche *GAL::DBP4*. Les clones ont été inoculés dans 50 mL de milieu SGal (-Trp-Ura) liquide. Les cultures furent incubées toute la nuit à 30°C à une vitesse de 250 rpm jusqu'à l'obtention d'une A_{600} entre 0,5 et 0,7, puis centrifugées à 1000xg pendant 10 minutes. Le culot fût resuspendu et lavé 3 fois avec de l'eau stérile. Les cellules sont récoltées puis des gouttes de suspension de levures à différentes concentrations sont déposées sur le milieu gélosé. Des dilutions en série 1:10 ont été faites à partir de cette suspension. 5 μ L de chaque dilution fût déposé en ordre croissant sur des géloses SGal (-Trp-Ura) et SDex (-Trp-Ura). Les géloses ont été incubées à 30 °C

pendant 3 jours (SDex) et 6 jours (SGal). Certains tests ont également été faits à 23 °C et 37 °C.

2.3.5 Test en réplique

L'analyse du criblage génétique a été faite en utilisant la banque génomique de mutants Dbp4. Les colonies de transformants obtenues sur les plaques SGal (-Trp-Ura) ont été transférées sur un tissu de velours stérile. Par la suite, une gélose de milieu SDex (-Trp-Ura) a été appliquée sur ce tissu pour produire une copie de la plaque d'origine. Sur le milieu SDex (-Trp-Ura), le promoteur P_{GAL1} n'est pas induit. Ainsi le gène *DBP4* n'est pas exprimé et les cellules cessent de croître sur ce milieu sauf si la fonction est complémentée par la protéine Dbp4 recombinante. Une gélose de SGal (-Trp-Ura) a été utilisée comme contrôle positif.

2.3.6 Expériences de déplétion

Les différentes cultures ont été ensemencées à partir de pré-culture de la souche sauvage et de ses dérivés (mutants) puis incubées à 30°C jusqu'à l'obtention d'une A_{600} entre 0,4 et 0,8. Les cellules ont été récoltées par centrifugation et lavées avec de l'eau distillée. Elles ont ensuite été remises en suspension à une DO de 0,1 dans du milieu SDex pré-chauffé à 30°C. Les différentes souches de levures furent inoculées dans le milieu adéquat additionné de 2% de dextrose et incubées à différentes températures 37°C, 30°C et 23°C. Au cours de la croissance, les cellules ont été maintenues en phase exponentielle ($A_{600} < 0,8$) par dilution avec du milieu SDex préincubé et l'absorbance a été mesurée sur une période de 48 heures.

2.4 Analyse de l'expression protéique des mutants de Dbp4

2.4.1 Séparation des protéines par électrophorèse (SDS-PAGE)

L'extraction a été faite directement à partir de cultures sur milieu solide (Kushnirov, 2000). Les extraits protéiques ont été récupérés et analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant contenant du dodécysulfate de sodium (ou SDS-PAGE en anglais). Chaque échantillon fût déposé dans chacun des puits des mini gels de 1 mm d'épaisseur (cuve Protéan III de Bio-Rad). La migration fût réalisée à un voltage de 100 volts.

2.4.2 Technique d'immunobuvardage

À l'issue de la migration, les protéines ont été transférées par électrotransfert, à voltage constant de 100 V durant 30 minutes dans du tampon de transfert Towbin (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol), sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). La membrane a été incubée pendant une heure avec une solution de TBS-Tween (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 136,8 mM NaCl 0,2% Tween-20) contenant 5% de lait écrémé en poudre. Après une série de lavages avec la solution TBS-Tween, la membrane a été incubée avec l'anticorps monoclonal de souris anti-HA 12CA5 (1/200) puis avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris (GE Healthcare ; 1/10000). Par la suite, la membrane fût incubée pendant 5 min dans une solution de luminol/peroxyde (Immobilon) pour la détection de Dbp4 provenant du plasmide. Après la première révélation, la membrane fut lavée et une deuxième analyse fut faite l'anticorps polyclonal de lapin anti-Dbp4 (1/1000) (Soltanieh *et al.*, 2014) et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin (GE Healthcare ; 1/80000). Ceci permet de détecter la Dbp4 encodée par le chromosome et qui ne porte pas d'épitope HA en C-terminal.

2.5 Analyse du profil d'expression des ARN ribosomiques

2.5.1 Extraction des ARN totaux

Les prélèvements ont été réalisés à un stade avancé de la phase de croissance exponentielle après 12 heures de déplétion. Les levures cultivées à 23° C, 30° C et 37° C ont été recueillies à une A₆₀₀ entre 0,6-0,8. Des volumes correspondants environ à $4x10^{9}$ cellules ont été prélevés des cultures pour l'extraction des ARN cellulaires qui a été faite en suivant le protocole du phénol acide chaud (Sigma). Le dosage des ARN a été effectué en mesurant la densité optique à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop One (Thermo Scientific).

2.5.2 Électrophorèse des ARNr matures

La technique de séparation des grands ARN par électrophorèse en milieu dénaturant (agarose 1,2%, formaldéhyde) a été réalisée suivant le protocole de Soltanieh (Soltanieh *et al.*, 2014) avec quelques modifications. Après transfert sur membrane de nylon (Hybond-N+; Amhersham), la membrane a été colorée au bleu de méthylène en suivant les recommandations du manufacturier (Molecular Research Center, Inc).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Étude bio-informatique des motifs présents dans l'extension C-terminale de Dbp4

J'ai réalisé une étude approfondie en utilisant une variété d'outils bio-informatiques afin de caractériser l'extension C-terminale de Dbp4. Les algorithmes COILS et CCBuilder 2.0 ont permis d'identifier le motif «coiled-coil» dans l'extension Cterminale de Dbp4. Les algorithmes cNLSMapper, PSORTII et NLStradamus ont démontré la présence de quatre motifs NLS : deux NLS dans l'extension N-terminale et deux autres dans l'extension C-terminale de Dbp4. Le motif «coiled-coil» étant caractérisé par une heptade répétitive de 7 résidus à tous les deux tours d'hélices, les paramètres par défaut du programme COILS déterminent le nombre et le type de résidus pour en déduire les fenêtres de répétition de 14, 21 et 28 résidus (en multiple de 7). Ce programme compare ainsi la séquence protéique de Dbp4 obtenue de SGD à une base de données PDB («Protein Data Bank ») de superhélices α connues et en déduit un score de similarité en utilisant plusieurs paramètres. La distribution des résidus polaires et hydrophobes dans une séquence est utile pour positionner les hélices α lors des prédictions de structure et pour prévoir leurs positions au niveau des interfaces. L'analyse des résidus formant le «coiled-coil» aux trois fenêtres de répétition 14, 21 et 28 permet d'observer un score de distribution variant de 0,475 à 0,997.

La séquence du motif «coiled-coil»

(IDKQVAKEKKQEKKRKRLEAMRREMEAAMEEEISGDEEE) s'étend des acides aminés 659 à 697. Le motif IDKQVAKEKKQEKK possède un score variant de 0,993 0.475 à dans les trois fenêtres de répétitions. Le motif RKRLEAMRREMEAAMEEE possède un score élevé de 0,768 à 0,997. Le motif AAMEEEISGDEEE possède un score de 0,135 dans la fenêtre 14, un score de 0.280 dans la fenêtre 21 et un score de 0.821 dans la fenêtre 28. Le motif en amont et en aval du motif «coiled-coil» possède un score quasiment nul de 0,002 à 0,008. On constate une diminution graduelle du score de distribution à partir du 690ème acide aminé vers la fin du «coiled-coil». Le motif possédant un score inférieur à 0.8 possède soit des courtes hélices ou ces hélices sont instables voire discontinues. Plus le score est élevé, plus la probabilité d'identifier des superhélices α à ces positions est forte. En comparant ce score à la distribution des scores des protéines globulaires et protéines possédant un «coiled-coil» (myosine, paramyosine, tropomyosines, kinésine, filaments intermédiaires type I - V, etc.), le programme calcule ensuite la probabilité que la séquence adopte une conformation «coiled-coil».

Le score de distribution permet d'obtenir une estimation de la présence de superhélices α ainsi, toute séquence de protéines globulaires ayant un score de distribution de 0,8 à 1 correspond à une région riche en longues hélices α amphipathiques (hélices possédant des résidus hydrophiles et hydrophobes qui favorisent la stabilité de l'assemblage entre hélices). Une analyse comparative des séquences protéiques de Dbp4 et ses homologues révèle que le «coiled-coil» est conservé chez certains homologues de Dbp4.

Les mutations de substitution réalisées dans le motif «coiled-coil» consistent en des changements d'acides aminés polaires de charge positive en acides aminés apolaires. Ces mutations sont annotées CC1, CC2 et 2CC (1+2). La mutation CC1 consiste en deux substitutions (K665P et K667P). La mutation CC2 consiste aussi en deux substitutions (R680P et R681P). La double mutation 2CC (1+2) est une combinaisons des mutations CC1 et CC2.

Ces substitutions pourraient nuire aux charges électrostatiques de la protéine ou provoquer un changement de conformation comme la perte de la conformation en hélice. En effet, les hélices α sont caractérisées par des liaisons hydrogène entre le groupe N-H d'un acide aminé et le groupe C=O du quatrième acide aminé le précédant. La proline ne possède pas d'hydrogène sur son atome d'azote et ne peut pas former de liaison hydrogène, de plus sa chaine latérale interfère stériquement avec le squelette carboné du tour précédent. La proline est connue pour son rôle déstabilisant dans la création des hélices α , sa présence provoquerait l'arrêt de l'hélice ou une forte déformation d'environ 30° par rapport à l'axe de l'hélice. Les résultats obtenus des outils bio-informatiques montrent une déstabilisation du motif «coiled-coil» après analyse des mutants CC1, CC2 et le double mutant 2CC (1+2) (Figure 3.1).



Figure 3.1 Prédiction bio-informatique du motif «coiled-coil» de Dbp4 par COILS avant et après mutation. (A) WT: Type sauvage, (B) Mutant CC1, (C) Mutant CC2, (D) double mutation 2CC (1+2). Le graphe représente le score de distribution en fonction de la position en acides aminés dans les trois fenêtres de répétition de l'heptade (14, 21 et 28).

Les motifs NLS prédits dans l'extension N-terminale sont entre autres le NLS1 (position 2 à 44) dont la séquence est conservée chez quelques homologues de Dbp4 dont DDX10 et le NLS2 (position 412 à 428) spécifique à Dbp4 dont la séquence est 'RKIEPGKLNIKQSKKKS'. Les algorithmes révèlent également la présence de deux signaux NLS dans l'extension C-terminale de Dbp4 : NLS3 (position 669 à 677) et NLS4 (position 723 à 734) dont les séquences sont 'QEKKRKRLE' et 'GHLKKKARTVDY' respectivement. Ces algorithmes ont permis de déduire que le NLS3 se situe à l'intérieur du motif «coiled coil». Une analyse comparative montre que la séquence NLS3 est conservée chez plusieurs homologues de Dbp4.

Les mutations de substitution dans les motifs NLS putatifs consistent aux changements de résidus polaires en apolaires favorisant ainsi l'établissement de nouvelles interactions hydrophobes et permettant de camoufler ces motifs (Figure 3.2). Les motifs NLS mutés ne seront plus reconnus par les récepteurs impliqués dans le transport nucléo-cytoplasmique des protéines. Les mutations au niveau du NLS3 sont K672A et R673A et celles pour NLS4 sont K726A, K727A et K728A.

La mutation de délétion réalisée dans le NLS4 consiste en la délétion des acides aminés 726-728. Suite à cela, j'ai pu vérifier que chacune des mutations ciblées au niveau de chaque motif n'affecte pas la prédiction des autres NLS ou la structure du motif «coiled coil». Enfin, les bases de données Pfam et SMART furent utiles pour identifier un domaine DUF4217 conservé dans Dbp4 et ses homologues.

MAKKNRLNTTQRKTLRQKEDEYIENLKTKIDEYDPKITKAKFFKDLPISD	50
PTLKGLRESSFIKLTEIQADSIPVSLQGHDVLAAAKTGSGKTLAFLVPVI	100
EKLYREKWTEFDGLGALIISPTRELAMQIYEVLTKIGSHTSFSAGLVIGG	150
KDVKFELERISRINILIGTPGRILQHLDQAVGLNTSNLQMLVLDEADRCL	200
DMGFKKTLDAIVSTLSPSRQTLLFSATQSQSVADLARLSLTDYKTVGTHD	250
VMDGSVNKEASTPETLQQFYIEVPLADKLDILFSFIKSHLKCKMIVFLSS	300
SKQVHFVYETFRKMQPGISLMHLHGRQKQRARTETLDKFNRAQQVCLFAT	350
DVVARGIDFPAVDWVVQVDCPEDVDTYIHRVGRCARYGKKGKSLIMLTPQ	400
EQEAFLKRLNARKIEPGKLNIKQSKKKSIKPQLQSLLFKDPELKYLGQKA	450
FISYVRSIYVQKDKQVFKFDELPTEEFAYSLGLPGAPKIKMKGMKTIEQA	500
KERKNAPRQLAFLSKANEDGEVIEDKSKQPRTKYDKMFERKNQTILSEHY	550
LNITKAQAQEDEDDDFISVKRKDHEINEAELPALTLPTSRRAQKKALSKK	600
ASLASKGNASKLIFDDEGEAHPVYELEDEEEFHKRGDAEVQKTEFLTKES	650
AVMADIDNIDKQVAKEKKQEKKRKRLEAMRREMEAAMEEEISGDEEEGKT	700
VAYLGTGNLSDDMSDGDMPDSEGHLKKKARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIE	750
VEEPQTLEDLESLTAKLIQG	770

(B)

MAKKNRLNTTQRKTLRQKEDEYIENLKTKIDEYDPKITKAKFFKDLPIS	50
PTLKGLRESSFIKLTEIQADSIPVSLQGHDVLAAAKTGSGKTLAFLVPVI	100
EKLYREKWTEFDGLGALIISPTRELAMQIYEVLTKIGSHTSFSAGLVIGG	150
KDVKFELERISRINILIGTPGRILQHLDQAVGLNTSNLQMLVLDEADRCL	200
DMGFKKTLDAIVSTLSPSRQTLLFSATQSQSVADLARLSLTDYKTVGTHD	250
VMDGSVNKEASTPETLQQFYIEVPLADKLDILFSFIKSHLKCKMIVFLSS	300
SKQVHFVYETFRKMQPGISLMHLHGRQKQRARTETLDKFNRAQQVCLFAT	350
DVVARGIDFPAVDWVVQVDCPEDVDTYIHRVGRCARYGKKGKSLIMLTPQ	400
EQEAFLKRLNARKIEPGKLNIKQSKKKSIKPQLQSLLFKDPELKYLGQKA	450
FISYVRSIYVQKDKQVFKFDELPTEEFAYSLGLPGAPKIKMKGMKTIEQA	500
KERKNAPRQLAFLSKANEDGEVIEDKSKQPRTKYDKMFERKNQTILSEHY	550
LNITKAQAQEDEDDDFISVKRKDHEINEAELPALTLPTSRRAQKKALSKK	600
ASLASKGNASKLIFDDEGEAHPVYELEDEEEFHKRGDAEVQKTEFLTKES	650
AVMADIDNIDKQVAKEKKQEKAAKRLEAMRREMEAAMEEEISGDEEEGKT	700
VAYLGTGNLSDDMSDGDMPDSEGHLKKKARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIE	750
VEEPQTLEDLESLTAKLIQG	770

(C)

MAKKNRLNTTQRKTLRQKEDEYIENLKTKIDEYDPKITKAKFFKDLPISD	50
PTLKGLRESSFIKLTEIQADSIPVSLQGHDVLAAAKTGSGKTLAFLVPVI	100
EKLYREKWTEFDGLGALIISPTRELAMQIYEVLTKIGSHTSFSAGLVIGG	150
KDVKFELERISRINILIGTPGRILQHLDQAVGLNTSNLQMLVLDEADRCL	200
DMGFKKTLDAIVSTLSPSRQTLLFSATQSQSVADLARLSLTDYKTVGTHD	250
VMDGSVNKEASTPETLQQFYIEVPLADKLDILFSFIKSHLKCKMIVFLSS	300
SKQVHFVYETFRKMQPGISLMHLHGRQKQRARTETLDKFNRAQQVCLFAT	350
DVVARGIDFPAVDWVVQVDCPEDVDTYIHRVGRCARYGKKGKSLIMLTPQ	400
EQEAFLKRLNARKIEPGKLNIKQSKKKSIKPQLQSLLFKDPELKYLGQKA	450
FISYVRSIYVQKDKQVFKFDELPTEEFAYSLGLPGAPKIKMKGMKTIEQA	500
KERKNAPRQLAFLSKANEDGEVIEDKSKQPRTKYDKMFERKNQTILSEHY	550
LNITKAQAQEDEDDDFISVKRKDHEINEAELPALTLPTSRRAQKKALSKK	600
ASLASKGNASKLIFDDEGEAHPVYELEDEEEFHKRGDAEVQKTEFLTKES	650
AVMADIDNIDKQVAKEKKQEKKRKRLEAMRREMEAAMEEEISGDEEEGKT	700
VAYLGTGNLSDDMSDGDMPDSEGHLAAAARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIE	750
VEEPOTLEDLESLTAKLIOG	770

MAKKNRLNTTQRKTLRQKEDEYIENLKTKIDEYDPKITKAKFFKDLPISD 50 PTLKGLRESSFIKLTEIQADSIPVSLQGHDVLAAAKTGSGKTLAFLVPVI 100 EKLYREKWTEFDGLGALIISPTRELAMQIYEVLTKIGSHTSFSAGLVIGG 150 KDVKFELERISRINILIGTPGRILQHLDQAVGLNTSNLQMLVLDEADRCL 200 DMGFKKTLDAIVSTLSPSRQTLLFSATQSQSVADLARLSLTDYKTVGTHD 250 300 VMDGSVNKEASTPETLQQFYIEVPLADKLDILFSFIKSHLKCKMIVFLSS SKQVHFVYETFRKMQPGISLMHLHGRQKQRARTETLDKFNRAQQVCLFAT 350 DVVARGIDFPAVDWVVQVDCPEDVDTYIHRVGRCARYGKKGKSLIMLTPQ 400 EQEAFLKRLNARKIEPGKLNIKQSKKKSIKPQLQSLLFKDPELKYLGQKA 450 FISYVRSIYVQKDKQVFKFDELPTEEFAYSLGLPGAPKIKMKGMKTIEQA 500 KERKNAPRQLAFLSKANEDGEVIEDKSKQPRTKYDKMFERKNQTILSEHY 550 LNITKAQAQEDEDDDFISVKRKDHEINEAELPALTLPTSRRAQKKALSKK 600 ASLASKGNASKLIFDDEGEAHPVYELEDEEEFHKRGDAEVQKTEFLTKES 650 AVMADIDNIDKQVAKEKKQEKAAKRLEAMRREMEAAMEEEISGDEEEGKT 700 VAYLGTGNLSDDMSDGDMPDSEGHLAAAARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIE 750 VEEPQTLEDLESLTAKLIQG 770

(E)

MAKKNRLNTTQRKTLRQKEDEYIENLKTKIDEYDPKITKAKFFKDLPISD	50
PTLKGLRESSFIKLTEIQADSIPVSLQGHDVLAAAKTGSGKTLAFLVPVI	100
EKLYREKWTEFDGLGALIISPTRELAMQIYEVLTKIGSHTSFSAGLVIGG	150
KDVKFELERISRINILIGTPGRILQHLDQAVGLNTSNLQMLVLDEADRCL	200
DMGFKKTLDAIVSTLSPSRQTLLFSATQSQSVADLARLSLTDYKTVGTHD	250
VMDGSVNKEASTPETLQQFYIEVPLADKLDILFSFIKSHLKCKMIVFLSS	300
SKQVHFVYETFRKMQPGISLMHLHGRQKQRARTETLDKFNRAQQVCLFAT	350
DVVARGIDFPAVDWVVQVDCPEDVDTYIHRVGRCARYGKKGKSLIMLTPQ	400
EQEAFLKRLNARKIEPGKLNIKQSKKKSIKPQLQSLLFKDPELKYLGQKA	450
FISYVRSIYVQKDKQVFKFDELPTEEFAYSLGLPGAPKIKMKGMKTIEQA	500
KERKNAPRQLAFLSKANEDGEVIEDKSKQPRTKYDKMFERKNQTILSEHY	550
LNITKAQAQEDEDDDFISVKRKDHEINEAELPALTLPTSRRAQKKALSKK	600
ASLASKGNASKLIFDDEGEAHPVYELEDEEEFHKRGDAEVQKTEFLTKES	650
AVMADIDNIDKQVAKEKKQEKKRKRLEAMRREMEAAMEEEISGDEEEGKT	700
VAYLGTGNLSDDMSDGDMPDSEGHLARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIEVEE	750
PQTLEDLESLTAKLIQG	767

Figure 3.2 Prédiction bio-informatique des motifs NLS sur la séquence protéique de Dbp4. cNLSMapper et PSORTII permettent d'identifier quatre motifs NLS dans la séquence protéique de Dbp4. Les motifs NLS sont indiqués en rouge et les acides aminés substitués indiqués en bleu foncé. (A) Séquence de type sauvage (WT) sans mutation. (B) Séquence du mutant NLS3 (mNLS3). (C) Séquence du mutant NLS4 (mNLS4). (D) Séquence du double mutant 'm2NLS (3+4)'. (E) Séquence du mutant ' Δ NLS4'.

(D)

3.2 Réalisation des mutations et analyse des séquences

Le choix des mutations s'est appuyé sur les résultats bio-informatiques obtenus. Afin d'identifier les motifs fonctionnels de l'extension C-terminale de Dbp4, des mutations de substitution et délétion ont ensuite été réalisées dans le motif «coiled coil»: CC1 (K665P et K667P), CC2 (R680P et R681P) et la double mutation 2CC (1+2). J'ai également réalisé des mutations dans les motifs NLS3 (K672A et R673A) et NLS4 (K726A, K727A et K728A) et la double mutation 2NLS. Les mutations de délétion sont: Δ NLS4, Δ CC et Δ DUF4217. La Figure 3.3 illustre le positionnement des mutations au niveau des motifs présents dans l'extension C-terminale de Dbp4.



Figure 3.3 Positionnement des mutations au niveau des motifs présents dans l'extension C-terminale de Dbp4. (*): Mutation de substitution, (Δ): Mutation de délétion. N-t: Extension N-terminale, C-t: Extension C-terminale.

J'ai ainsi développé plusieurs mutants de Dbp4 et je les ai insérés dans le vecteur d'expression pCM188-3HA. La présence des inserts fut vérifiée après une digestion enzymatique utilisant les mêmes enzymes de restrictions (BamHI et KpnI) précédemment utilisés pour le clonage. Par la suite, j'ai procédé à l'analyse des séquences par alignement et comparaison avec la séquence protéique de type sauvage. Les résultats du séquençage Sanger confirment le clonage des inserts au plasmide pCM188-3HA et démontrent que les clones obtenus possèdent les mutations effectuées à des sites spécifiques (Figure 3.4).

(A)

2CC	652	VMADIDNIDKQVA EKKRKRLEAM EMEAAMEEEISGDEEEGKTVAYLGTG	720
		VMADIDNIDKQVA E KQEKKRKRLEAM EMEAAMEEEISGDEEEGKTVAYLGTG	
WT	652	VMADIDN <mark>IDKQVAkek</mark> k <mark>oekkrkrle</mark> am rr emeaameeeisgdeeegktvaylgtg	720
(B)			
mNLS3	652	VMADIDNIDKQVAKEKKQEK <mark>ava</mark> KRLEAMRREMEAAMEEEISGDEEEGKTVAYLGTG	720
		VMADIDNIDKQVAKEKKQEK KRLEAMRREMEAAMEEEISGDEEEGKTVAYLGTG	
WT	652	VMADIDN <u>IDKQVAKEKK<mark>QEKKRKRLE</mark>AMRREMEAAMEEEISGDEEE</u> GKTVAYLGTG	720
mNLS4	721	SEGHL ARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIEVEEPQTLEDLESLTAKLIQG 770	
		SEGHL ARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIEVEEPQTLEDLESLTAKLIQG	
WT	721	<mark>seghlkkkartvdy</mark> shghnpsnsvdddiieveepqtledlesltakliqg 770	

(C)

ANLS4	721	SEGHL	-ARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIEVEEPQTLEDLESLTAKLIQG	770
		SEGHL	ARTVDYSHGHNPSNSVDDDIIEVEEPQTLEDLESLTAKLIQG	
WT	721	SEGHL KK	K ARTVDY <mark>SHGHNPSNSVDDDIIEVEEPQTLEDLESLTAKLIQG</mark>	770



Figure 3.4 Alignement de séquences des protéines Dbp4 mutées. (A) Double mutant du «coiled coil» 2CC (1+2): CC1 (K665P et K667P), CC2 (R680P et R681P) ; (B) 2NLS: Double mutant 2NLS (3+4), (C) Δ NLS4: Délétion du NLS4, (D) Δ CC: Mutant de délétion du motif «coiled-coil», (E) Δ DUF4217: Délétion du DUF4217. *Le Δ DUF4217 et les motifs NLS sont représentés respectivement en gris et jaune ; les acides aminés du «coiled-coil» sont soulignés. Les acides aminés substitués sont surlignés en couleur verte et ceux délétés en couleur cyan.

3.3 Le motif «coiled-coil» et le domaine DUF4217 sont essentiels à la survie cellulaire

Des mutations ont été introduites dans Dbp4 par mutagenèse dirigée. Les différentes constructions plasmidiques ont ensuite été transformées individuellement dans la levure GAL::DBP4 qui exprime de façon conditionnelle la Dbp4 endogène (native) encodée par le chromosome; en effet, sa production est sous contrôle du promoteur P_{GAL1} et nécessite la présence de galactose dans le milieu de culture. Les différents transformants ont ensuite été utilisés pour faire des tests de viabilité cellulaire.

Dans cette étude, les transformants de la souche *GAL::DBP4* sont maintenus en milieu SGal (-Trp-Ura) puisqu'en présence de galactose la protéine Dbp4 endogène est exprimée et tous les transformants peuvent croître au même rythme,

indépendamment de la présence ou non de mutations dans la Dbp4 recombinante encodée par la plasmide pCM188-3HA (la Dbp4 recombinante porte un épitope HA en C-terminal).

La capacité des protéines mutantes à remplacer la fonction de la protéine Dbp4 a été évaluée en milieu SDex (-Trp-Ura) puisque l'absence de galactose empêche l'expression de la Dbp4 endogène. Seules les souches transformées par les mutants viables vont croître sur le milieu SDex (Figure 3.5). C'est le cas de la souche wt qui sert de contrôle positif. La souche *GAL::DBP4-v* (v) transformée avec le vecteur pCM188-3HA vide sert de contrôle négatif. En premier lieu, la croissance cellulaire est évaluée à 30 °C en comparant les 'spots' entre les souches mutantes et la souche wt à chaque dilution effectuée (Figure 3.5B). On constate que la croissance des souches cc1, 2cc et Δ cc est ralentie à partir de la dilution 10⁻² sur le milieu SDex. Bien que la mutation de substitution CC1 (K665P, K667P) provoque un ralentissement de la croissance cellulaire, ce n'est pas le case de la mutation CC2 (R680P, R681P). La double mutation 2CC (1+2) entraine bien évidemment un ralentissement de la croissance cellulaire (puisqu'elle porte la mutation CC1), mais le phénotype n'est pas accentué par la présence simultanée de la mutation CC2.



Figure 3.5 Effet des mutations de Dbp4 sur la viabilité cellulaire. Les mutants générés ont été transformés dans *GAL::DBP4* et étalés sur des géloses SGal (-Trp -Ura) et SDex (-Trp -Ura) à 30 °C. Des dilutions en série 1/10 à partir des cultures en phase exponentielle ont été déposées en points successifs sur des géloses SGal (A) et SDex (B). Les géloses furent incubées à 30 °C pendant 6 jours sur le milieu SGal et 4 jours sur SDex.

Tout comme la mutation $\triangle CC$, la mutation $\triangle DUF$ cause un fort ralentissement de la croissance cellulaire à 30 °C à partir de la dilution 10^{-3} sur le milieu SDex (Figure 3.5B, panneau du milieu). On en déduit que les souches cc1, $\triangle cc$ et $\triangle DUF$ ont généré un phénotype non-viable dans les conditions restrictives. L'étude plus approfondie des mutations du «coiled-coil» a été réalisée en modifiant les paramètres thermodynamiques. La température optimale de culture des levures se situe en général entre 25 °C et 30 °C. La croissance des souches mutantes fut analysée à 30 °C, 37 °C et 23 °C (Figure 3.6).

Les souches cc1 et 2cc ne sont pas viables sur le milieu restrictif contenant du dextrose comme source de carbone; les résultats du test en spot montrent une altération de la croissance cellulaire de cc1 et 2cc à partir de 30 °C qui s'aggrave progressivement à 23 °C; cet effet est toutefois moins prononcé à 37 °C puisque les mutants croissent un peu mieux que la souche contrôle v. Des phénotypes similaires ont été observés à 16 °C (résultats non présentés).

La croissance du mutant cc2 est similaire à celle de wt à toutes les températures, cela signifie que la mutation CC2 n'a aucun effet sur la croissance cellulaire.



Figure 3.6 Tests de viabilité cellulaire en milieu solide. Isolement des mutants cc1 et 2cc et vérification de la létalité à différentes températures : 30 °C, 37 °C, 23 °C. Les plaques furent incubées pendant 6 jours sur le milieu SGal (A) et 4 jours sur milieu SDex (B).

3.4 Les motifs NLS 3 et 4 ne sont pas nécessaires à la survie cellulaire

Les résultats présentés à la Figure 3.5 indiquent que les souches nls3, 2nls et Δ nls4 sont viables après 3 jours d'incubation sur le milieu SDex (-Trp-Ura).

53

Bien que la souche 2nls montre un ralentissement de croissance plus important que les autres, globalement les souches mutantes ne montrent pas une différence de croissance importante comparativement à la version native. On peut conclure que les mutations de substitution et délétion effectuées dans ces motifs NLS ont peu d'effet sur la survie cellulaire.

3.5 Étude de la croissance des souches de levures mutantes

Les mutations perturbant le motif «coiled-coil» (CC1 et Δ CC) et causant un phénotype non-viable ont été utilisés dans la suite des expériences. Les mutants CC1 et Δ CC transformés dans *GAL::DBP4* ont été cultivés en présence de dextrose à différentes températures (30 °C, 37 °C et 23 °C). L'impact phénotypique est évalué par comparaison de l'écart entre les courbes de croissance (Figure 3.7). Dans un premier temps, j'ai étudié la cinétique de déplétion des souches cc1 et Δ cc à 30 °C. Pendant les 12 premières heures de déplétion, les souches cc1 et Δ cc ont le même rythme de croissance que la souche wt avec un temps de dédoublement de 2 heures. À 14 heures de déplétion, la croissance des souches cc1 et Δ cc ralentit progressivement par rapport à la souche wt et l'écart entre les courbes est plus marqué par la suite.



Figure 3.7 Courbes de croissance des souches wt, v, cc1 et Δ cc à 30 °C. Les souches ont été cultivées dans du milieu SGal puis transférées dans le milieu SDex et maintenues en phase exponentielle pendant toute l'expérience. Des mesures de densité optique à 600 nm ont été prises toutes les deux heures pendant une période de 48 heures après le changement de SGal à SDex. *dCC= Δ cc.

Puis, j'ai étudié la cinétique de déplétion des souches cc1 et Δ cc (Figure 3.8). On observe que la croissance des souches cc1 et Δ cc diffère à 37 °C. Les souches cc1 et wt ont le même rythme de croissance pendant 24 heures de déplétion. Toutefois, on observe un léger écart entre les courbes de croissance cc1 et wt à partir de 26 heures et à partir de 30 heures, la croissance de cc1 ralentit considérablement; le rythme de croissance de la souche cc1 est similaire à celui de la souche Δ cc. Toujours à 37 °C, on observe que la croissance de la souche Δ cc ralentit par rapport à la souche sauvage wt plus tôt à partir de 12 heures de déplétion, marquant un ralentissement plus sévère de la croissance de ce mutant. Pour le test à 23 °C, le rythme de croissance des deux souches cc1 et Δ cc est fortement altéré à partir de 14 heures de déplétion.

La croissance des souches cc1 et Δ cc est très lente comparée à la souche wt, suggérant que les mutations sont davantage délétères à basse température. La souche wt croît avec un temps de génération de 4 heures alors que les souches mutantes croissent avec un temps de génération de 8 heures (Figure 3.8).



(A)



Figure 3.8 Courbes de croissance des souches cc1 et Δ cc. Les souches ont été cultivées dans du milieu SGal puis transférées dans le milieu SDex et maintenues en phase exponentielle pendant toute l'expérience. Des mesures de densité optique à 600 nm ont été prises pendant une période de 54 heures après le changement de galactose à dextrose. 37 °C (A), 23 °C (B).

Le Tableau 3.1 présente les différentes mutations effectuées dans cette étude en indiquant la position des acides aminés mutés ainsi que le phénotype observé sur la survie cellulaire.

(B)

Numéro de clone	Mutants	Position	Phénotype
1	CC1	K665P K667P	Retard de croissance
2	CC2	R680P R681P	Viable
3	2CC (1+2)	K665P K667P	Retard de croissance
		R680P R681P	
4	mNLS3	K680A R681A	Viable
5	mNLS4	K726A K727A K728A	Viable
6	m2NLS	K680A R681A K726A K727A K728A	Viable
7	ΔNLS4	Délétion de 726-728	Viable
8	ΔCC	Délétion de 655-697	Létal
9	ΔDUF4217-	Délétion de 424-491	Létal
10	ΔCt	Délétion de 328	Létal

Tableau 3.1 Tableau récapitulatif des mutants obtenus et l'impact des mutations sur la survie cellulaire.

3.6 Analyse de l'expression protéique des mutants

Les résultats d'immunobuvardage démontrent que les souches cc1, cc2, 2cc, nls3, Δ nls4, 2nls et Δ cc expriment la protéine Dbp4 recombinante qui porte un épitope HA en C-terminal. La version wt migre à environ 100 kDa mais une variation de migration est observée avec Δ cc, cc1 et 2cc. Δ C-t exprime une protéine tronquée qui migre à un peu plus de 50 kDa. Les souches mutantes de la banque aléatoire (M1 à M5) expriment une protéine Dbp4 de pleine longueur. Les protéines Dbp4 produites suite aux mutations cc2, nls3, Δ nls4 et 2nls migrent à 100 kDa comme la version wt. Il ne semble pas y avoir de différences significatives du niveau d'expression dans les extraits protéiques analysés.



Figure 3.9 Analyse du profil d'expression des protéines recombinantes par immunobuvardage. Les protéines mutées produites à partir du plasmide pCM188-3HA portent un épitope HA à leur extrémité C-terminale et sont détectées avec un anticorps anti-HA. L'expression du gène *DBP4* natif est vérifiée avec l'anticorps anti-

Dbp4. La protéine Dbp4 migre à 100 kDa et le contrôle interne HA à 50 kDa. L'absence de signal à 100 kDa indique que la protéine est tronquée. Dans les panneaux du bas, les pistes M1 à M5 sont des mutants de la banque aléatoire.

3.7 Criblage génétique de la banque de mutants aléatoires

Les résultats du test de réplica nous permettent de déterminer les mutants à phénotype létal de la banque aléatoire de 60000 clones. Les clones présentant un phénotype non viable ont été sélectionnés par absence de colonies sur milieu SDex (-Trp-Ura). Un total de 24195 clones dont 23745 de phénotype viable et 450 clones de phénotypes non viables sont obtenus après le test en réplique. Une analyse plus approfondie a été réalisée pour obtenir 240 mutants létaux et 210 clones à phénotype de ralentissement de croissance.

Tous les 450 mutants ont été analysés par immunobuvardage ; la majorité des clones de phénotype létal (240) analysés n'expriment pas une protéine de pleine longueur. Sur les 210 clones à phénotype de ralentissement de croissance, 101 expriment une protéine de pleine longueur et 109 codent pour une protéine tronquée. Ces résultats indiquent un taux de 1% des clones à phénotype létal et 1% des clones à phénotype de ralentissement de croissance.

Les tests de viabilité ont permis de distinguer plusieurs types de mutants. Trois classes de mutants ont été sélectionnées: classe 1, mutants à phénotype létal; classe 2, mutants à phénotype 'ralentissement de croissance'; classe 3, mutants à phénotype viable. Une vingtaine de mutants ont été séquencés et alignés avec la séquence Dbp4 de type sauvage pour identifier les acides aminés mutés. Tous nos mutants de la classe 1 présentent un codon stop signifiant la troncature de la protéine.
En ce qui concerne la classe 2, tous les mutants présentent plus d'une mutation voire trois ou plus dans leurs séquences. Ces mutations sont des mutations de substitution et sont réparties tout au long de la région C-terminale. Certains clones portent des mutations au niveau du domaine DUF4217 et peu au niveau du «coiled-coil». Enfin, une faible minorité des mutants (classe 3) présente une ou deux mutations de substitution d'acides aminés. L'expression de ces mutations dans la levure génère un phénotype viable, ces mutations sont dites silencieuses. Par la suite, j'ai vérifié l'expression protéique de tous les mutants y compris ceux de la classe 1 (Figure 3.10). Les résultats d'immunobuvardage montrent que tous les mutants à phénotype létal (classe 1) n'expriment pas une protéine de pleine longueur. Les mutants à phénotype 'ralentissement de croissance' (classe 2) et les mutants à phénotype 'viable' (classe 3) expriment une protéine de pleine longueur. J'ai ensuite effectué une deuxième vérification des mutants à phénotype 'ralentissement de croissance' (classe 2) en extrayant l'ADN plasmidique de levure de chaque clone et en les retransformant dans E. coli puis dans S. cerevisiae. Les résultats montrent que le phénotype est viable dans la grande majorité des mutants analysés, très peu de mutants ont maintenus le phénotype 'ralentissement de croissance'. Ces mutations sont caractérisées par des substitutions de 4 à 7 acides aminés. Il est fort probable que la souche ait révertée après plusieurs manipulations. Toutefois, plusieurs copies du même mutant M1 ont été retrouvées; ces clones affichent les mêmes mutations: K444I, V455M, I458K, Q543L, Q559H, A579T et F632L. Le clone M2 porte les mutations T643D, E644R, F645I et E697G. Le clone M3 porte les mutations S457T, K462Q, G482D N517K et D535A. Le clone M4 porte les mutations K533R, N542K, Q543K, T544N et I545K (Figure 3.9).

Par la suite j'ai procédé à la vérification de l'expression protéique de quelques mutants de la banque aléatoire. Les résultats d'immunobuvardage montrent que plusieurs mutants ne sont pas détectables avec l'anti-HA, suggérant qu'ils sont tronqués (Figure 3.10).



Figure 3.10 Vérification par immunobuvardage de l'expression protéique de quelques mutants de la banque aléatoire. Les mutants (4, 5, 6, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19) expriment une protéine Dbp4 qui migre à 100 kDa. L'absence de signal à 100 kDa dans les mutants (1, 2, 3, 7, 8,9,11,17) indique que la protéine Dbp4 est tronquée. L'expression de *DBP4* endogène est vérifiée avec l'anticorps anti-Dbp4.

3.8 Analyse du profil d'expression des ARN ribosomiques

La suite de cette étude consiste à vérifier l'effet des mutations CC1 et Δ CC sur le processus de maturation de l'ARNr 18S. Les cultures ont été récupérées à différents temps de déplétion, indiqués en heures sur la Figure 3.11 (le temps 0h correspond à la culture dans le SGal, soit avant la déplétion en SDex). Les ARN totaux ont été extraits des levures puis séparés par électrophorèse, transférés sur membrane de nylon et colorés au bleu de méthylène.

Les différences dans l'intensité des signaux obtenus peuvent être attribuées soit à un transfert sur membrane discontinu soit à des variations dans la quantité d'extraits utilisés. L'analyse comparative des niveaux d'expression est définie en fonction de l'intensité des signaux obtenus.

La coloration au bleu de méthylène révèle la présence des ARNr matures 25S et 18S dans les souches wt, cc1 et Δ cc (Figure 3.11). En milieu SDex, on observe que le ratio 18S:25S (1:1) reste inchangé dans la souche wt, par contre ce ratio diffère (1:2) dans les souches cc1 et Δ cc. Le niveau d'ARNr 18S est légèrement plus faible dans les souches cc1 et Δ cc à 18h de déplétion à 30 °C (pistes 5 et 9), ce qui indique un défaut de production du 18S. À 37 °C, on observe également une baisse du 18S par rapport au 25S dans Δ cc à 24h (piste 11) et semble rester invariable dans cc1 (piste 7), ce qui apparaît incohérent et pourrait être attribué à un mauvais tranfert du 25S dans cette piste. À 23 °C, le niveau d'expression d'ARNr 18S a diminué dans cc1 et Δ cc à 24h de déplétion (pistes 6 et 10, respectivement). Toutefois, les niveaux d'ARNr 25S restent pratiquement inchangés entre les pistes, ce qui montre que le processus de synthèse des ARNr de la sous-unité 60S n'est pas affecté.



Figure 3.11 Analyse du profil d'expression des ARNr dans les souches mutantes cc1 et Δ cc. Les extraits d'ARN extraits ont été résolus sur un gel d'agarose à 1,2% contenant 7% de formaldéhyde et transférés sur une membrane Hybond-XL. Les ARNr 18S et 25S ont été détectés par coloration de la membrane au bleu de méthylène.

Les résultats obtenus montrent que les mutations CC1 et \triangle CC peuvent avoir un effet sur la production de l'ARNr 18S mature, ce qui suggère que le motif d'interaction protéique «coiled-coil» pourrait être impliqué dans la fonction de Dbp4 dans les réactions de clivage aboutissant à la synthèse de l'ARNr 18S.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'extension C-terminale de Dbp4 a fait l'objet de nombreuses recherches au laboratoire. La première partie de mon travail a été consacrée à une étude bioinformatique pour identifier des motifs présents dans l'extension C-terminale de Dbp4. Les motifs «coiled-coil» et les signaux NLS3 et NLS4 valident les recherches antérieures du mémoire de maitrise de Chaabane (2016). Néanmoins, la présente étude a également permis de prédire deux autres signaux NLS putatifs dans l'extension N-terminale.

Afin de mieux comprendre les régions essentielles aux fonctions de Dbp4, j'ai procédé à la réalisation de différentes mutations dans les motifs 'putatifs' identifiés dans l'extension C-terminale de Dbp4 et les constructions plasmidiques obtenues ont été transformées dans la souche de levure *GAL::DBP4*. Les différents tests de viabilité cellulaire indiquent que la plupart des mutations au niveau du motif «coiled-coil» sont létales. En effet, non seulement une délétion du motif «coiled-coil» (Δ CC) génère un phénotype létal, mais également la mutation ponctuelle CC1 (K665P et K667P) ainsi que la combinaison des mutation ponctuelles CC1 et CC2 (R680P et R681P). Les cultures en milieu liquide montrent une croissance fortement altérée pour les mutants cc1 et Δ cc, bien que le ralentissement ne soit pas aussi prononcé qu'avec le plasmide vide (Figure 3.7). Pour les mutants cc1 et Δ cc, il semble que les mutations soient plus délétères à 23°C qu'à 37°C (Figure 3.8).

La mutation CC1 induit une forte sensibilité de la souche au froid; elle est dite «coldsensitive» et se traduit par un ralentissement sévère de la croissance à 23 °C (Figure 3.6) et encore davantage à 16 °C (résultats non présentés). La structure des motifs «coiled-coil» est régulière et consiste en répétitions d'acides aminés apolaires en position 'a' et 'd' de l'heptade et polaires chargés dans les positions 'e' et 'g'. Ce sont ces derniers qui confèrent la spécificité de chaque hélice par leurs charges électrostatiques. Une explication pour ce phénomène serait que la mutation CC1 pourrait causer un défaut de structure menant au déroulement de la superhélice ou une perte de spécificité de l'hélice. Cette substitution pourrait nuire aux charges électrostatiques de cette portion de la protéine en déstabilisant les hélices α ou avoir un effet sur leur conformation. Toutefois, force est de constater que la mutation CC2 (R680P et R681P) n'induit pas une baisse de la croissance cellulaire (le phénotype observé est identique à celui de la souche wt. L'altération de la croissance de la souche 2cc sûrement due à la présence de la mutation CC1.

L'étude réalisée par Mohr (Mohr *et al.*, 2008) révèle que les mutations situées dans un motif ayant une structure en hélice α au niveau de la région C-terminale chez la protéine «DEAD-box» Mss116 ont fortement inhibé l'activité ATPasique, ce qui a conduit à la fois à une perte de la fonction de la protéine et à un défaut d'épissage de l'ARN. Il est tentant de supposer que la région en hélice α (C-terminale de Mss116) pourrait stabiliser et ou réguler l'activité de l'ARN hélicase Dbp4. L'étude de Chaabane (2016) suggère que la délétion du «coiled-coil» combinée à la mutation de substitution NLS1 (la mutation NLS1 est nommée mNLS4 dans mon étude) génère un phénotype létal chez la levure. J'ai donc investigué si seule la délétion du «coiledcoil» ou la délétion du NLS4 génère le même phénotype. Mes résultats montrent une fonction mineure du NLS4 sur la survie cellulaire ce qui m'amène à conclure que la délétion du «coiled-coil» est responsable du phénotype létal. Mes résultats coïncident avec ceux de Chaabane (2016) concernant l'importance des motifs «coiled-coil» et DUF4217 sur la survie cellulaire.

Il a été démontré que les protéines Dbp4 et Bfr2 sont des composantes du SSU processome. Dbp4 interagit avec la protéine Bfr2 également impliquée dans la maturation de l'ARNr 18S (Soltanieh *et al.*, 2014). Il est possible que le motif «coiled-coil» de Dbp4 soit responsable de cette interaction et que la mutation non fonctionnelle CC1 puisse affecter la structure du motif «coiled-coil» et ainsi perturber l'interaction avec Bfr2. Des tests avec le système double hybride pourraient permettre de d'investiguer cette hypothèse. Les résultats d'immunobuvardage démontrent l'expression de la protéine Dbp4 dans les souches cc1, Δ cc et Δ DUF4217. Cela indique qu'un changement de conformation de ces motifs ou même une délétion n'affecte pas la stabilité protéique de Dbp4 mais peut entrainer une altération fonctionnelle de la protéine. Ces résultats montrent ainsi que le domaine DUF4217 et le motif «coiled-coil» sont des éléments clefs dans la fonction de Dbp4.

Deux approches complémentaires sont nécessaires pour caractériser les motifs NLS. La première approche consiste à l'introduction des mutations dans les deux motifs NLS 3 et 4. Les résultats montrent que ces mutations ont peu d'effet sur la survie cellulaire. Les acides aminés retrouvés au niveau des motifs NLS3 et 4 semblent avoir un rôle mineur. Mes résultats confirment les résultats antérieurs effectués par Chabaane sur les motifs NLS de la région C-terminale. Les résultats de Chaabane (2016) montrent que la combinaison de mutations NLS1 et 2 (nommées NLS3 et 4 dans mon étude) modifie l'interaction avec son partenaire nucléolaire Bfr2. La seconde approche consiste à coupler le NLS putatif à une protéine indicatrice cytoplasmique afin de montrer qu'il est suffisant pour l'importation nucléaire de Dbp4. Pour cela, il faudrait synthétiser les séquences NLS putatifs et les cloner dans le vecteur d'expression YCplac33-yEGFP-TCYC1 (Garcia-Gomez *et al.*, 2011). Ce vecteur possède des origines de réplication bactérienne et de levure, deux marqueurs Amp^r et *URA3*, ainsi qu'une origine de réplication centromérique (CEN/ARS). La ligation pourrait être réalisée en utilisant la technique de «Shotgun ligation» (Grundstrom *et al.*, 1985) Une fois, les plasmides obtenus, il suffirait de vérifier la localisation des constructions par microscopie à fluorescence. Il sera nécessaire d'effectuer des expériences supplémentaires afin de confirmer la nature de ces motifs NLS prédits dans l'extension C-terminale de la protéine Dbp4. De plus, une analyse plus approfondie des autres NLS putatifs pourrait nous renseigner sur leur rôle précis dans la localisation de Dbp4.

La deuxième partie de mon travail a été consacrée à l'identification d'acides aminés essentiels situés dans la région C-terminale de Dbp4. Nos résultats indiquent 1% des clones à phénotype létal et 1% des clones à phénotype de ralentissement de croissance. Mes résultats révèlent la présence de plusieurs mutations de substitution réparties tout au long de la région C-terminale. Certains clones portent des mutations au niveau du domaine DUF4217 et peu au niveau du motif «coiled coil». De plus, le clone M1 a été retrouvé en plusieurs copies. On suggère que les acides aminés K444I, V455M, I458K, Q543L, Q559H, A579T et F632L présents sur l'extension C-terminale sont nécessaires à la survie cellulaire. Il est possible que l'effet d'une mutation soit fortement accentué par la présence d'une autre. À partir de ces résultats, il est difficile de dire lequel de ces acides aminés peut avoir un effet sur la croissance et être à l'origine du phénotype observé. De plus, les mutants à phénotype létal identifiés dans cette étude n'expriment pas une protéine de pleine longueur.

Ces résultats sont en contradiction avec les résultats de Chabaane suggérant que 62% des 73 mutants dits 'létaux' identifiés expriment une protéine de pleine longueur. J'ai également pu identifier la présence de quelques mutations présentant un phénotype viable; ces mutations sont dites 'sans effet'. Les résultats montrent également que la plupart des mutants de la classe 2 ont un phénotype viable après une double vérification dans la souche *GAL::DBP4*. Il est possible que la souche *GAL::DBP4* construite sous le contrôle du promoteur P_{GAL1} ne répond plus au galactose, cela expliquerait la croissance observée aussi bien sur SGal que sur SDex. Il est fort probable que la souche ait révertée après plusieurs manipulations. Néanmoins, la question se pose si les mutations 'sans effet' identifiées dans cette étude dont CC2 et Δ NLS4 auraient un effet sur la survie cellulaire dans la souche construite par Chabaane. Il est possible que l'éffet de la mutation observée dans la souche construite par Chabaane (2016) soit réprimé dans la souche utilisée dans mon étude.

Chez les eucaryotes, la maturation des sous-unités ribosomiques nécessite une régulation fine aussi bien quantitative que qualitative. Le pré-ARNr 35S est clivé à différents sites afin d'éliminer les régions espaceur menant à la formation des ARNr matures. Il fut prouvé que plusieurs snoARN interviennent dans les réactions menant à la production de l'ARNr 18S. U3 et snR30 sont requis aux sites A0, Al et A2 tandis que U14, snR10 aux sites A1 et A2. La formation de l'ARNr 18S mature requiert l'élimination des séquences 5'ETS et ITS1. Il est établi que Dbp4 est impliquée dans les clivages précoces aux sites A0, Al et A2 et dans le relâchement du snoARN U14 du pré-ARN 35S (Kos et Tollervey, 2005; Soltanieh *et al.*, 2015). L'étude de Soltanieh montre que l'extension C-terminale est essentielle dans le relâchement de U14 au pré-ARNr.

L'analyse du profil des polysomes a montré que la délétion de l'extension Cterminale de Dbp4 entraine une réduction graduelle du 40S et une accumulation du 60S (Soltanieh *et al.*, 2015). Ainsi, la dernière partie de mon travail a été consacrée à étudier l'effet des mutations CC1 et Δ CC sur le processus de maturation de l'ARNr 18S. Les résultats obtenus dans mon étude suggèrent que les mutations CC1 et Δ CC ont un effet sur la production de l'ARNr 18S. De nombreuses études ont démontré que l'absence d'un ou plusieurs composants du SSU processome provoque la perte des clivages aux sites A0, A1 et A2, sans affecter le clivage A3 ; une diminution des ARNr 20S et 18S et une accumulation des pré-ARNr 35S et 23S (généré par clivage du pré-ARNr 35S au site A3) sont observées, tandis que les niveaux du pré-ARNr 27SA3 et des ARNr 5,8 S et 2SS ne sont pas affectés (Dragon *et al.*, 2002; Hughes et Ares, 1991; Lackmann *et al.*, 2018).

Des expériences futures sont nécessaires pour évaluer le niveau d'expression des précurseurs 20S et 23S impliqués dans la synthèse de l'ARNr 18S. Ces expériences seraient utiles pour déterminer si le motif «coiled-coil» est nécessaire pour la fonction Dbp4 dans les événements de traitement du pré-ARNr conduisant à la production de l'ARNr 18S.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les ribosomes sont des complexes macromoléculaires vitaux pour la croissance et pour la survie cellulaire. Mon projet d'étude a été consacré à l'identification d'acides aminés essentiels aux fonctions de Dbp4. Les analyses ont montré que l'absence du motif «coiled-coil» ou du domaine DUF4217 est létal, ce qui indique que ces régions sont nécessaires pour la fonction de Dbp4. Les données rapportées dans cette étude montrent que plusieurs mutations génèrent un phénotype de ralentissement de croissance cellulaire. Une étude réalisée dans notre laboratoire a montré que l'acide aminé à la position 566 sur la séquence protéique de l'homologue humain de Dbp4 (DDX10) semble avoir un rôle sur la prolifération cellulaire et la division cellulaire (Moujaber, 2013). De plus, l'étude réalisée par Soltanieh suggérait qu'une répression de DDX10 affectait la croissance cellulaire suite à une accumulation des cellules à la phase G1 du cycle cellulaire (Soltanieh, 2015). Il s'avère donc important de réaliser des tests supplémentaires pour vérifier l'effet des mutants sur la prolifération cellulaire et le cycle de division cellulaire.

Le projet a également pour but d'étudier la fonction de Dbp4 dans la maturation de l'ARNr 18S. Pour cela, j'ai analysé l'effet des mutations K665P et K667P (CC1) et de délétion du motif «coiled-coil» (Δ CC) sur le processus de maturation de l'ARNr 18S. On constate que ces mutations ont un effet sur la production de l'ARNr 18S. Une approche quantitative est nécessaire pour confirmer les résultats obtenus. Il aurait été judicieux de faire plusieurs réplicas et de procéder par qRT-PCR.

À la lumière de ces résultats, l'analyse du profil des polysomes pourrait nous renseigner sur la biogenèse des sous-unités 40S et 60S au cours de la déplétion de Dbp4 dans les souches mutantes. L'isolement et la caractérisation des mutants sensibles au froid devraient fournir une approche fructueuse pour l'étude de l'assemblage du ribosome *in vivo*.

À ce jour, le mécanisme d'action exact de la protéine Dbp4 reste à établir. La détermination de la structure de la protéine par cristallographie serait des plus utiles. Mes observations pourraient également ouvrir la voie vers une meilleure compréhension des motifs responsables des interactions de Dbp4 avec ses partenaires. Ainsi il est tentant de supposer que la principale cible moléculaire de ces associations serait le motif «coiled-coil» présent dans son extrémité C-terminale. Les études futures peuvent permettre de déterminer si le motif «coiled-coil» est responsable de cette interaction. Pour améliorer cette expérience, il est suggéré de réaliser des expériences avec la technique récente de test par ligature de proximité (PLA en anglais). Cela permettrait également de proposer un premier modèle du mode d'intégration du complexe dans les particules pré-ribosomiques. De plus, une librairie restreinte de levures exprimant des protéines qui interagissent avec la protéine Dbp4 pourrait être criblée avec différents mutants de Dbp4 afin de déterminer si certaines protéines mutées n'interagissent plus avec Dbp4. La technique double hybride pourrait être utilisée à cette fin. L'introduction de ces mutations aiderait à identifier les acides aminés impliqués dans les domaines d'interaction. Un autre objectif important pour des études futures serait l'étude structurale fine de toutes ces séquences NLS qui devrait nous renseigner sur leur importance dans la localisation de Dbp4. En utilisant les techniques mentionnées ci-haut, nous pourrions être capables de visualiser l'effet des mutations sur la production de l'ARNr 18S afin d'en déduire les acides aminés impliqués dans la fonction de Dbp4.

Enfin, il serait nécessaire de faire une étude comparative de la fonction de Dbp4 par rapport à DDX10. Des progrès futurs pourraient venir de la compréhension du rôle de DDX10 dans la biogénèse des ribosomes chez l'humain.

BIBLIOGRAPHIE

Adam, S. A. (2001). The nuclear pore complex. Genome Biol, 2(9), REVIEWS0007.

Agrawal, R. K., Penczek, P., Grassucci, R. A., Li, Y., Leith, A., Nierhaus, K. H. et Frank, J. (1996). Direct visualization of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the Escherichia coli ribosome. *Science*, 271(5251), 1000-1002.

Ahmad, Y., Boisvert, F. M., Gregor, P., Cobley, A. et Lamond, A. I. (2009). NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res*, 37, D181-184.

Andreou, A. Z. et Klostermeier, D. (2013). The DEAD-box helicase eIF4A: paradigm or the odd one out? *RNA Biol*, 10(1), 19-32.

Anger, A. M., Armache, J. P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D. N. et Beckmann, R. (2013). Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature*, 497(7447), 80-85.

Arai, Y., Hosoda, F., Kobayashi, H., Arai, K., Hayashi, Y., Kamada, N., Ohki, M. (1997). The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of de novo and therapy-related myeloid malignancies results in fusion of the nucleoporin gene, NUP98, with the putative RNA helicase gene, DDX10. *Blood*, 89(11), 3936-3944.

Ausubel, B. R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1999). Short protocols in molecular biology. *New York: John Wiley & Sons, Inc.*

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. et Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 A resolution. *Science*, 289(5481), 905-920.

Banroques, J., Cordin, O., Doere, M., Linder, P. et Tanner, N. K. (2008). A conserved phenylalanine of motif IV in superfamily 2 helicases is required for cooperative, ATP-dependent binding of RNA substrates in DEAD-box proteins. *Mol Cell Biol*, 28(10), 3359-3371.

Banroques, J., Doere, M., Dreyfus, M., Linder, P. et Tanner, N. K. (2010). Motif III in superfamily 2 "helicases" helps convert the binding energy of ATP into a high-affinity RNA binding site in the yeast DEAD-box protein Ded1. *J Mol Biol*, 396(4), 949-966.

Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. et Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 A resolution. *Science*, 334(6062), 1524-1529.

Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G. et Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*, 330(6008), 1203-1209.

Boram, W. R. et Roman, H. (1976). Recombination in Saccharomyces cerevisiae: a DNA repair mutation associated with elevated mitotic gene conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(8), 2828-2832.

Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M. et Lamond, A. I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol Cell*, 40(2), 216-227.

Cai, W., Xiong Chen, Z., Rane, G., Satendra Singh, S., Choo, Z., Wang, C., Prem Kumar, A. (2017). Wanted DEAD/H or Alive: Helicases Winding Up in Cancers. *J Natl Cancer Inst*, 109(6).

Caruthers, J. M., Johnson, E. R. et McKay, D. B. (2000). Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24), 13080-13085.

Chaabane, M. A. (2016). Analyse et identification d'acides aminés essentiels de l'extension C-terminale de l'ARN hélicase Dbp4. Mémoire de maitrise en biologie, UQAM.

Chaker-Margot, M. (2018). Assembly of the small ribosomal subunit in yeast: mechanism and regulation. *RNA*, 24(7), 881-891.

Chaker-Margot, M., Barandun, J., Hunziker, M. et Klinge, S. (2017). Architecture of the yeast small subunit processome. *Science*, 355(6321).

Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Barandun, J., Dill, B. D. et Klinge, S. (2015). Stagespecific assembly events of the 6-MDa small-subunit processome initiate eukaryotic ribosome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, 22(11), 920-923. Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K. et Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 367, 17-37.

Crick, F. H. C. (1953). The Fourier transform of a coiled-coil. . *Acta Crystallographica*, 6(8), 685–689.

Diamond, L. K., and Blackfan, K.D. (1938). Hypoplastic anemia. Am. J. Dis. Child. 56: 464-467.

Dong, X., Biswas, A. et Chook, Y. M. (2009). Structural basis for assembly and disassembly of the CRM1 nuclear export complex. *Nat Struct Mol Biol*, *16*(5), 558-560.

Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 417(6892), 967-970.

Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C. Y., Tamayo, P., Galili, N., Golub, T. R. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*, 451(7176), 335-339.

Fairman-Williams, M. E., Guenther, U. P. et Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol*, 20(3), 313-324.

Fontana, F. (1781). Traité sur le venin de la viper, sur les Poisons américains, sur le Laurier-Cerise et sur quelques autres poisons végétaux. Gibelin : Florence, Italy.

Frank, J., Zhu, J., Penczek, P., Li, Y., Srivastava, S., Verschoor, A., Agrawal, R. K. (1995). A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome. *Nature*, 376(6539), 441-444.

Gallagher, J. E., Dunbar, D. A., Granneman, S., Mitchell, B. M., Osheim, Y., Beyer, A. L. et Baserga, S. J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev*, 18(20), 2506-2517.

Garcia-Gomez, J. J., Babiano, R., Lebaron, S., Froment, C., Monsarrat, B., Henry, Y. et de la Cruz, J. (2011). Nop6, a component of 90S pre-ribosomal particles, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *RNA Biol*, 8(1), 112-124.

Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. et Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 13(9), 837-848

Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. et Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, 20(6), 1425.

Gilman, B., Tijerina, P. et Russell, R. (2017). Distinct RNA-unwinding mechanisms of DEAD-box and DEAH-box RNA helicase proteins in remodeling structured RNAs and RNPs. *Biochem Soc Trans*, 45(6), 1313-1321.

Glotz, C., Mussig, J., Gewitz, H. S., Makowski, I., Arad, T., Yonath, A. et Wittmann, H. G. (1987). Three-dimensional crystals of ribosomes and their subunits from eu- and archaebacteria. *Biochem Int*, 15(5), 953-960.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546, 563-547.

Grifo, J. A., Tahara, S. M., Leis, J. P., Morgan, M. A., Shatkin, A. J. et Merrick, W. C. (1982). Characterization of eukaryotic initiation factor 4A, a protein involved in ATP-dependent binding of globin mRNA. *J Biol Chem*, 257(9), 5246-5252.

Grundstrom, T., Zenke, W. M., Wintzerith, M., Matthes, H. W., Staub, A. et Chambon, P. (1985). Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis. *Nucleic Acids Res*, 13(9), 3305-3316.

Gumienny, R., Jedlinski, D. J., Schmidt, A., Gypas, F., Martin, G., Vina-Vilaseca, A. et Zavolan, M. (2017). High-throughput identification of C/D box snoRNA targets with CLIP and RiboMeth-seq. *Nucleic Acids Res*, 45(5), 2341-2353.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580.

Henras, A. K., Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A. et Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 65(15), 2334-2359.

Hilbert, M., Karow, A. R. et Klostermeier, D. (2009). The mechanism of ATPdependent RNA unwinding by DEAD box proteins. *Biol Chem*, 390(12), 1237-1250.

Hodgman, T. C. (1988). A new superfamily of replicative proteins. *Nature*, 333(6168), 22-23.

Hughes, J. M. et Ares, M., Jr. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J*, 10(13), 4231-4239.

Iost, I. et Dreyfus, M. (2006). DEAD-box RNA helicases in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, 34(15), 4189-4197.

Jankowsky, E. (2011). RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem Sci*, 36(1), 19-29.

Khatter, H., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K. et Klaholz, B. P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature*, 520(7549), 640-645.

King, T. H., Liu, B., McCully, R. R. et Fournier, M. J. (2003). Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol Cell*, 11(2), 425-435.

Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M. et Ban, N. (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci*, 37(5), 189-198.

Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Kos-Braun, I., Hurt, E. (2016). Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell*, 166(2), 380-393.

Kos, M. et Tollervey, D. (2005). The Putative RNA Helicase Dbp4p Is Required for Release of the U14 snoRNA from Preribosomes in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell*, 20(1), 53-64.

Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. et Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem*, 284(1), 478-485.

Kressler, D., Hurt, E. et Bassler, J. (2017). A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem Sci*, 42(8), 640-654.

Lackmann, F., Belikov, S., Burlacu, E., Granneman, S. et Wieslander, L. (2018). Maturation of the 90S pre-ribosome requires Mrd1 dependent U3 snoRNA and 35S pre-rRNA structural rearrangements. *Nucleic Acids Res*, 46(7), 3692-3706.

Lafontaine, D. L. (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat Struct Mol Biol*, 22(1), 11-19.

Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E. et Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*, 282(8), 5101-5105.

Liang, W. Q., Clark, J. A. et Fournier, M. J. (1997). The rRNA-processing function of the yeast U14 small nucleolar RNA can be rescued by a conserved RNA helicase-like protein. *Mol Cell Biol*, 17(7), 4124-4132.

Lin, C., Yang, L., Yang, J. J., Huang, Y. et Liu, Z. R. (2005). ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol Cell Biol*, 25(17), 7484-7493.

Linder, P. et Fuller-Pace, F. (2015). Happy birthday: 25 years of DEAD-box proteins. *Methods Mol Biol*, 1259, 17-33.

Linder, P. et Jankowsky, E. (2011). From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(8), 505-516.

Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Slonimski, P. P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature*, 337(6203), 121-122.

Liu, F., Putnam, A. A. et Jankowsky, E. (2014). DEAD-box helicases form nucleotidedependent, long-lived complexes with RNA. *Biochemistry*, 53(2), 423-433.

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.

Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, 21(10), 375-382.

Makowski, I., Frolow, F., Saper, M. A., Shoham, M., Wittmann, H. G. et Yonath, A. (1987). Single crystals of large ribosomal particles from Halobacterium marismortui diffract to 6 A. *J Mol Biol*, 193(4), 819-822.

McClintock, B. (1934). The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat., (21), 294–326.

Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G. et Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6), 560-567.

Menne, T. F., Goyenechea, B., Sanchez-Puig, N., Wong, C. C., Tonkin, L. M., Ancliff, P. J., Warren, A. J. (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet*, 39(4), 486-495.

Mitchell, J. R., Wood, E. et Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the huan disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 402(6761), 551-555.

Mohr, G., Del Campo, M., Mohr, S., Yang, Q., Jia, H., Jankowsky, E. et Lambowitz, A. M. (2008). Function of the C-terminal domain of the DEAD-box protein Mss116p analyzed in vivo and in vitro. *J Mol Biol*, 375(5), 1344-1364.

Mor, A., White, M. A. et Fontoura, B. M. (2014). Nuclear trafficking in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 28, 28-35.

Morrissey, J. P. et Tollervey, D. (1993). Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 13(4), 2469-2477.

Moujaber, O. (2013). Effet des mutations de l'ARN hélicase DDX10 associées au cancer du sein. . Mémoire de maitrise en biologie, UQAM.

Muth, G. W., Ortoleva-Donnelly, L. et Strobel, S. A. (2000). A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science*, *289*(5481), 947-950.

Nakai, K. et Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, 24(1), 34-36.

Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N. et Moses, A. M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, 10, 202.

Ogilvie, V. C., Wilson, B. J., Nicol, S. M., Morrice, N. A., Saunders, L. R., Barber, G. N. et Fuller-Pace, F. V. (2003). The highly related DEAD box RNA helicases p68 and p72 exist as heterodimers in cells. *Nucleic Acids Res*, *31*(5), 1470-1480.

Palade, G. E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. J Biophys Biochem Cytol, 1(1), 59-68.

Petes, T. D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(1), 410-414.

Phipps, K. R., Charette, J. et Baserga, S. J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2(1), 1-21.

Raska, I., Shaw, P. J. et Cmarko, D. (2006). New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol*, 255, 177-235.

Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. et Aebi, U. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol*, 110(4), 883-894.

Ritossa, F. M. et Spiegelman, S. (1965). Localization of DNA Complementary to Ribosomal Rna in the Nucleolus Organizer Region of Drosophila Melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53, 737-745.

Rocak, S. et Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(3), 232-241.

Rodriguez-Galan, O., Garcia-Gomez, J. J. et de la Cruz, J. (2013). Yeast and human RNA helicases involved in ribosome biogenesis: current status and perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1829(8), 775-790.

Russell, R., Jarmoskaite, I. et Lambowitz, A. M. (2013). Toward a molecular understanding of RNA remodeling by DEAD-box proteins. *RNA Biol*, 10(1), 44-55.

Schneider, S., Campodonico, E. et Schwer, B. (2004). Motifs IV and V in the DEAH box splicing factor Prp22 are important for RNA unwinding, and helicase-defective Prp22 mutants are suppressed by Prp8. *J Biol Chem*, 279(10), 8617-8626

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. et Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(11), 5857-5864.

Schwartz, T. U. (2005). Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr Opin Struct Biol*, *15*(2), 221-226.

Shwachman, H., Diamond, L.K., Oski, F.A., and Khaw, K.T. (1964). The syndrome of Pancreatic Insufficiency and Bone Marrow Dysfunction. *J Pediatr* 65, 645-663.

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.

Singleton, M. R., Dillingham, M. S. et Wigley, D. B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem*, 76, 23-50.

Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Velculescu, V. E. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, *314*(5797), 268-274.

Soltanieh, S. (2015). Functional analyses of the yeast DEAD-box RNA helicase Dbp4 and its human homologue DDX10 in ribosome biogenesis. Thèse de doctorat en biologie, UQAM.

Soltanieh, S., Lapensée, M. et Dragon, F. (2014). Nucleolar proteins Bfr2 and Enp2 interact with DEAD-box RNA helicase Dbp4 in two different complexes. *Nucleic Acids Res*, 42(5), 3194-3206.

Soltanieh, S., Osheim, Y. N., Spasov, K., Trahan, C., Beyer, A. L. et Dragon, F. (2015). DEAD-box RNA helicase Dbp4 is required for small-subunit processome formation and function. *Mol Cell Biol*, 35(5), 816-830.

Stark, H., Mueller, F., Orlova, E. V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., van Heel, M. (1995). The 70S Escherichia coli ribosome at 23 A resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure*, 3(8), 815-821.

Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M. et Linder, P. (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell*, 11(1), 127-138.

Tollervey, D. et Guthrie, C. (1985). Deletion of a yeast small nuclear RNA gene impairs growth. *EMBO J*, 4(13B), 3873-3878.

Trahan, C., Martel, C. et Dragon, F. (2010). Effects of dyskeratosis congenita mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on assembly of H/ACA pre-RNPs. *Hum Mol Genet*, 19(5), 825-836.

Treacher Collins, E. (1900). Case with symmetrical congenital notches in the outer part of each lower lid and defective development of the malar bones. *Trans Ophthalmol Soc UK.*). 90.

Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. et Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1(8), 945-951.

Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, 24(11), 437-440.

Weis, K., Mattaj, I. W. et Lamond, A. I. (1995). Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science*, 268(5213), 1049-1053.

Wood, C. W. et Woolfson, D. N. (2018). CCBuilder 2.0: Powerful and accessible coiledcoil modeling. *Protein Sci*, 27(1), 103-111.

Woolford, J. L., Jr. et Baserga, S. J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 195(3), 643-681.

Yassin, E. R., Abdul-Nabi, A. M., Takeda, A. et Yaseen, N. R. (2010). Effects of the NUP98-DDX10 oncogene on primary human CD34+ cells: role of a conserved helicase motif. *Leukemia*, 24(5), 1001-1011.

Yonath, A., Glotz, C., Gewitz, H. S., Bartels, K. S., von Bohlen, K., Makowski, I. et Wittmann, H. G. (1988). Characterization of crystals of small ribosomal subunits. *J Mol Biol*, 203(3), 831-834.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. et Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution. *Science*, 292(5518), 883-896.

Zagorski, J., Tollervey, D. et Fournier, M. J. (1988). Characterization of an SNR gene locus in Saccharomyces cerevisiae that specifies both dispensible and essential small nuclear RNAs. *Mol Cell Biol*, 8(8), 3282-3290.

Zhou, Y., Wu, W., Xie, L., Wang, D., Ke, Q., Hou, Z., Fang, L. (2017). Cellular RNA Helicase DDX1 Is Involved in Transmissible Gastroenteritis Virus nsp14-Induced Interferon-Beta Production. *Front Immunol*, 8, 940.