

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

KRE33: UN NOUVEAU CONSTITUANT DU SSU PROCESSOME EUCARYOTE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
ERLINDA FERNÁNDEZ DÍAZ

OCTOBRE 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr François Dragon, pour son dévouement et son support tout au long de mes travaux de recherche ainsi que pour ses grandes qualités humaines. Je vous remercie profondément d'avoir écouté toutes mes idées et d'avoir toujours su m'orienter toujours dans la bonne direction.

Un grand merci à tous mes collègues du laboratoire (Amine, Sabrina, Hélène et Kevin) et en particulier Sahar pour sa patience et pour tous ses conseils. J'aimerais également remercier Oraly et Giselle pour leur amitié, votre présence ici a été d'une immense valeur.

Mes remerciements les plus sincères à tous les membres du Centre de recherche BioMed et aux professeurs du Département des sciences biologiques de l'UQAM, qui m'ont accueilli comme un membre de plus. Je remercie de façon très spéciale Madame Louise Brissette, pour m'avoir guidé et encouragé dans toutes les démarches et les professeurs Nicolas Pilon et François Bachand pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Enfin, un profond remerciement à ma famille et à mon copain pour leur amour et leur support constant ainsi qu'à toutes les personnes qui d'une façon ou d'autre m'ont aidé dans la réalisation de ces travaux.

À mes grands-parents Barbarita Berta, María, Raúl
et Agustin, qui seront toujours avec moi

«...on doit donner libre cours à l'imagination; l'idée est le principe de tout
raisonnement et de toute invention...»

Carlos Juan Finlay

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	x
RÉSUMÉ.....	xiii

CHAPITRE I

INTRODUCTION.....	1
1. ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1.1 Le nucléole.....	1
1.1.1 Structure et fonctions du nucléole.....	1
1.1.2 Localisation nucléolaire et infections virales.....	4
1.2 Les petits ARN nucléolaires.....	8
1.3 Biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes.....	13
1.3.1 Synthèse et maturation des pré-ARNr.....	13
1.3.2 Le SSU processome.....	16
1.3.3 Ribosomopathies.....	17
1.3.4 Les liens avec le cancer.....	20
1.4 Les ARN hélicases de la famille «DEAD-box».....	21
1.5 Les GNAT.....	23
1.6 La protéine nucléolaire Kre33.....	25
2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	27

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	28
2.1 Souches bactériennes et souches de levures.....	28
2.2 Milieux de culture.....	29

2.3 Oligonucléotides.....	30
2.4 Préparation et transformation des bactéries compétentes.....	33
2.5 Préparation et transformation des levures compétentes.....	34
2.6 Extraction d'ADN génomique des levures.....	35
2.7 Extraction des protéines de levures.....	36
2.8 Analyse des protéines par immunobuvardage («western blotting»).....	36
2.9 Construction des souches de levures.....	37
2.9.1 Construction des souches KRE33-MYC, YS1-YS7, YSK1-YSK7 et GAL::KRE33-MYC.....	37
2.9.2 Construction des souches GAL::KRE33, GAL::KRE33ΔCt et GAL::KRE33ΔNLS.....	39
2.10 Préparation des extraits cellulaires de levures.....	40
2.11 Gradients de densité de saccharose.....	41
2.12 Immunoprécipitations.....	42
2.13 Hybridation de type «northern».....	42
2.14 Système double hybride de levure.....	43
2.14.1 Construction du vecteur pGBKT7-KRE33.....	43
2.14.2 Tests d'auto-activation et analyse des interactions protéine-protéine.....	44
2.15 Courbes de croissance.....	45
2.16 Expériences de complémentation en milieu solide («spot assays»).....	45
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	47
3.1 Kre33 est associée avec des composants du SSU processome dans un complexe de 80S.....	47
3.2 Kre33 interagit fortement avec la protéine Bfr2.....	54
3.3 Kre33 interagit <i>in vivo</i> avec le petit ARN nucléolaire U3.....	57
3.4 Le motif NLS dans l'extension C-terminale de Kre33 est important	

pour la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	63
4.1 Kre33 est une composante du SSU processome eucaryote	63
4.2 Kre33 interagit fortement avec la protéine Bfr2	65
4.3 Kre33 sédimente dans un complexe de 40-50S	66
4.4 L'extension C-terminale de Kre33 contient des éléments fonctionnels importants	67
CHAPITRE V	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	70
RÉFÉRENCES	72

LISTE DES FIGURES

Figure	Pages
1.1	Co-localisation des protéines Rev et NF90 dans le nucléole.....8
1.2	Structure secondaire et classification des snoRNA..... 11
1.3	Maturation des pré-ARNr chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>15
1.4	Structure du domaine catalytique des ARN hélicases DEAD-box.....22
1.5	Alignement de séquences des motifs conservés de Kre33.....26
3.1	Construction des souches KRE33-MYC, YSK1-YSK7 et YS1-YS7.....49
3.2	Vérification de l'intégration de la cassette HA/HIS3 dans le génome des souches YSK1-YSK7.....50
3.3	Kre33 co-précipite avec des composants du SSU processome dans une IP anti-MYC.....51
3.4	Kre33 co-précipite avec des composants du SSU processome dans une IP anti-HA/anti-Dbp4.....52
3.5	Analyse du profil de sédimentation de Kre33 et des composants du SSU processome.....53
3.6	Kre33 co-précipite avec des composants du SSU processome dans un complexe de 80S.....54

3.7	Analyse des partenaires potentiels de Kre33 en utilisant le système double hybride chez la levure.....	56
3.8	Kre33 interagit avec le petit ARN nucléolaire U3 (snoRNA U3).....	57
3.9	Alignement de séquences de l'extension C-terminale de Kre33.....	58
3.10	Cinétique de déplétion de Kre33 dans la souche GAL::KRE33-MYC.....	60
3.11	Expériences de complémentation avec les protéines recombinantes Kre33, Kre33 Δ Ct et Kre33 Δ NLS.....	61
3.12	Cinétique de complémentation des protéines recombinantes Kre33, Kre33 Δ Ct et Kre33 Δ NLS.....	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Pages
1.1	Signaux de localisation nucléolaire de quelques protéines virales.....	7
2.1	Oligonucléotides utilisés pour l'amplification et le séquençage de la région qui code pour la protéine Kre33.....	31
2.2	Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des cassettes MYC/TRP1, HA/HIS3 et GAL1/KanMX6 et l'intégration dans le génome de la levure.....	32
2.3	Oligonucléotides utilisés pour la vérification de l'intégration des cassettes MYC/TRP1, HA/HIS3 et GAL1/KanMX6 dans le génome de la levure.....	33

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

A ₆₀₀	Absorbance à 600 nm
Acétyl-coA	Acétyl-coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ARF	«Alternative reading frame product of the CDKN2A locus»
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
CDK	Kinase dépendante de cyclines («cyclin-dependent kinase»)
CRM1	«Chromosome region maintenance 1»
DTT	1,4-Dithiothreitol
eRNA	ARN activateur («enhancer RNA»)
ETS	«External transcribed spacer»
FGF2	«Fibroblast growth factor 2»
GFP	Protéine fluorescente verte («green fluorescent protein»)
GGNNV α	«Betanodavirus greasy grouper nervous necrosis virus protein α »
GNAT	GCN5 <i>N</i> -acétyltransférase
gRNA	ARN guide
HAT	Histone acétyltransférase
HBV	«Hepatitis B virus»
HB	«Hepatitis B virus core antigen»

HIV-1 REV	«Human immunodeficiency virus-1 regulator of virion»
HIV-1 TAT	«Human immunodeficiency virus-1 transactivator of transcription»
HSV	«Herpes simplex virus»
HVS	«Herpesvirus saimiri»
IBV N	«Infectious bronchitis virus nucleocapsid»
IP	Immunoprécipitation
ITS	«Internal transcribed spacer»
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LIMK2	«LIM kinase 2»
lncRNA	Long ARN non-codant («long non-coding RNA»)
LSU	Grande sous-unité («large subunit»)
MCS	Site de clonage multiple («multiple cloning site»)
miRNA	Micro ARN
NES	Signal d'exportation nucléaire («nuclear export signal»)
NF90	«Nuclear factor 90»
NIK	«Nuclear factor- κ B inducing kinase»
NLS	Signal de localisation nucléaire («nuclear localisation signal»)
NoLS	Signal de localisation nucléolaire («nucleolar localization signal»)
NOM1	«Nucleolar protein with MIF4G domain 1»
NOR	Région d'organisation nucléolaire («nucleolar organizer region»)
NRF	«Nuclear factor- κ B-repressing factor»
ORF	Cadre de lecture ouvert («open reading frame»)
PCR	«Polymerase chain reaction»
piRNA	ARN interagissant avec Piwi («Piwi-interacting RNA»)
PP1	«Protein phosphatase 1»
Pré-ARNr	ARN ribosomique précurseur

PVDF	«Polyvinylidene fluoride»
RFP	Protéine fluorescente rouge («red fluorescent protein»)
RISC	«RNA-induced silencing complex»
RNP	Ribonucléoprotéine
RPA	«RNA polymerase I subunit A»
saRNA	Petit ARN activateur («small activating RNA»)
scRNA	Petit ARN cytoplasmique
scaRNA	Petit ARN des corps de Cajal («small Cajal body RNA»)
sdRNA	ARN dérivés des petits ARN nucléolaires («sno-derived RNA»).
SDS-PAGE	«Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis»
snRNA	Petit ARN nucléaire («small nuclear RNA»)
snoRNA	Petit ARN nucléolaire («small nucleolar RNA»)
snoRNA C/D	Petit ARN nucléolaire à boîtes C et D
snoRNA H/ACA	Petit ARN nucléolaire à boîtes H et ACA
SRP	Signal recognition particle
SSU	Petite sous-unité («small subunit»)
SPB	Corps à pôle-fuseau («spindle pole body»)
TBE	Tris/Borate/EDTA
TE	Tris-EDTA
TERC	ARN composant de la telomerase («telomerase RNA component»)
tiRNA	ARN initiateur de la transcription («transcription initiation RNA»)
UBF	«Upstream binding factor»
UTP	«U3 protein»
UTR	Région non traduite («untranslated region»)
WNV	«West Nile virus»

RÉSUMÉ

Le SSU («small subunit») processome est une énorme ribonucléoprotéine d'environ 80S qui est nécessaire aux processus d'assemblage et maturation de la sous-unité 40S du ribosome eucaryote. Ces processus commencent dans le nucléole par la transcription d'un long ARN ribosomique précurseur (pré-ARNr) de 47S (35S chez la levure) par l'ARN polymérase I. Chez *Saccharomyces cerevisiae* ce pré-ARNr subit une série de modifications chimiques et de clivages pour générer l'ARNr 18S mature qui compose la petite sous-unité (40S), ainsi que les ARNr 5,8S et 25S de la grande sous-unité (60S) du ribosome. Kre33 est une protéine nucléolaire qui contient des motifs conservés acétyltransférase, ATPase et ARN hélicase, ainsi qu'une extension C-terminale unique aux eucaryotes qui contient des motifs «coiled-coil» et NLS. Cette protéine est essentielle à la viabilité cellulaire et nécessaire à la formation de la sous-unité 40S, mais son rôle spécifique dans la biogenèse des ribosomes n'a pas encore été élucidé. Nos objectifs de recherche sont de déterminer si Kre33 est une composante du SSU processome et si son extension C-terminale contient des éléments importants pour sa fonction. Pour cela nous avons analysé le profil de sédimentation de Kre33 dans des gradients de saccharose et nous avons étudié les interactions de cette protéine avec différents composants du SSU processome par co-immunoprécipitation. Nos résultats montrent que Kre33 interagit *in vivo* avec plusieurs protéines du SSU processome dans un complexe de 80S ainsi qu'avec le petit ARN nucléolaire U3 («U3 snoRNA»), ce qui indique qu'elle est une composante du SSU processome eucaryote. De plus, nous avons démontré par mutagenèse dirigée et par des expériences de complémentation que l'extension C-terminale de Kre33, et en particulier le motif NLS, sont importants pour la croissance de la levure. L'ensemble de ces résultats ouvrent la voie à des nouvelles expérimentations afin de mieux comprendre le rôle de cette enzyme dans la biogenèse des ribosomes et dans d'autres processus cellulaires chez les eucaryotes.

Mots clés: nucléole, ribosome, SSU processome, levure, acétyltransférase, interaction protéine-protéine, «U3 snoRNA».

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le nucléole

1.1.1 Structure et fonctions du nucléole

Le nucléole est la plus proéminente des structures du noyau en interphase et le site de synthèse et maturation de l'ARN ribosomique (ARNr) et des ribosomes (Feng *et al.*, 2012). Chez la levure il occupe approximativement le tiers du volume nucléaire et se localise près de la membrane nucléaire, opposé au corps à pôle-fuseau (SPB) (Taddei et Gasser, 2012). Le nucléole se forme autour de certaines régions chromosomiques connues comme régions d'organisation nucléolaire (NOR: «nucleolar organiser region») et caractérisées par plusieurs gènes d'ARNr en série (Raska *et al.*, 2006; Shaw et Brown, 2012). Chez les cellules humaines, les NOR se trouvent dans les bras courts des chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 et contiennent environ 400 gènes ribosomiques. Pendant l'interphase plus d'un de ces chromosomes sont réunis ensembles et participent dans la formation d'un nouveau nucléole (Cmarko *et al.*, 2008).

L'apparence du nucléole au microscope électronique varie en fonction de son activité et du type cellulaire. Quand la biogenèse des ribosomes est active, le nucléole est organisé en trois composants majeurs: les centres fibrillaires qui sont des régions claires dont la taille varie de 0,1 à 1 μm ; ils sont entourés par le composant fibrillaire dense, dont le nom est directement lié à son aspect contrasté et à sa texture; ces deux composants sont enchâssés dans le composant granulaire constitué de granules de 15 à 20 nm (Hernandez-Verdun et Louvet, 2004; Berciano *et al.*, 2007; Hernandez-

Verdun *et al.*, 2010). Le nucléole peut contenir différentes quantités de centres fibrillaires qui varient aussi dans leur dimension. Les cellules avec une biogenèse des ribosomes active possèdent généralement plusieurs petits centres fibrillaires. Dans le cas contraire, des cellules avec des activités transcriptionnelles et métaboliques réduites montrent de petits nucléoles avec un long centre fibrillaire, comme c'est le cas des lymphocytes et des neurones en état inactif. De plus, dans quelques espèces de chordés il existe des variantes structurales du nucléole qui ne contiennent pas de centres fibrillaires (Thiry *et al.*, 2011). Il a été proposé que ces différences puissent être associées avec l'évolution des ADN ribosomiques (ADNr) et de façon particulière avec la taille des séquences intergéniques (Sirri *et al.*, 2008).

Les interactions entre les différents composants (interactions protéine-protéine, interactions protéine-acide nucléique) sont essentielles à la coordination des fonctions nucléolaires (Cmarko *et al.*, 2008). Également, la localisation des éléments fonctionnels est reliée à leur fonction dans la production de petites et grandes sous-unités ribosomiques, ce qui a permis d'associer des rôles aux différents compartiments. Les transcrits nouvellement synthétisés émergent entre les centres fibrillaires et le composant fibrillaire dense et sont accumulés dans ce dernier, mais ils ne sont pas détectés dans le composant granulaire (Casafont *et al.*, 2007). Chez l'humain les clivages et les modifications post-transcriptionnelles du pré-ARNr 47S (35S chez *S. cerevisiae*) commencent au site de transcription dans le composant fibrillaire dense et continuent pendant leur migration intranucléolaire au travers du composant granulaire. Les protéines et petits ARN nucléolaires (snoRNA) qui participent aux étapes précoces de maturation de ce pré-ARNr se localisent dans le composant fibrillaire dense, alors que les facteurs qui agissent dans les étapes intermédiaires et finales se trouvent dans le composant granulaire et aussi dans le cytoplasme. Par contre, la majorité des étapes de maturation de la grande sous-unité 60S se passent dans le composant granulaire (Sirri *et al.*, 2008).

Plus de 4500 protéines nucléolaires humaines ont été déjà identifiées dont 90% ont des homologues chez la levure (Andersen *et al.*, 2005 ; Ahmad *et al.*, 2009) ce qui démontre que le protéome du nucléole et possiblement ses fonctions sont très conservés dans l'évolution (Boisvert *et al.*, 2007; Cmarko *et al.*, 2008). De nombreuses études faites dans les dernières années ont indiqué que le nucléole pourrait avoir d'autres fonctions comme la maturation des ARN messagers (ARNm) et des ARN de transfert (ARNt), l'assemblage de la particule de reconnaissance du signal (SRP: «signal recognition particle»), le vieillissement, la réponse aux stress cellulaires et la régulation du cycle cellulaire et de l'activité télomérase. Il contient des protéines qui ne sont pas impliquées dans le processus d'assemblage des ribosomes et plusieurs autres qui n'ont pas de fonction connue, ce qui indique que sa composition et ses fonctions sont beaucoup plus compliquées que ce que l'on pensait (Boulon *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2012; Hetman et Pietrzak, 2012; Miroslav, 2012). Cette idée est appuyée par les faits que la plupart des types d'ARN et des protéines nucléaires sont constamment échangés avec le nucléoplasme et que plusieurs autres protéines sont accumulées dans le nucléole de façon transitoire et dépendante des signaux cellulaires (Taddei *et al.*, 2010).

Le nucléole se désassemble au début de la mitose après la répression de la transcription de l'ADNr. Cette répression est provoquée par la phosphorylation des composants de la machinerie de transcription, de façon dépendante de la CDK1-cycline B. Par contre, le nucléole est réassemblé et est fonctionnellement actif pendant l'interphase (Sirri *et al.*, 2008; Hernandez-Verdun, 2011). Pendant la prophase, les composants des complexes de maturation des pré-ARNr se détachent de l'ADNr et sont redistribués sur la surface des chromosomes pendant que les facteurs qui participent à la transcription restent associés avec l'ADNr dans les NOR. Cependant, quelques études ont démontré que les sous-unités Rpa39, Rpa16 et Rpa194 de l'ARN polymérase I sont temporairement dissociées de l'ADNr pendant la

métaphase et réassociées pendant l'anaphase. Il est important de dire que la migration des complexes qui participent à la maturation des pré-ARNr se passe avant que l'inhibition de la transcription soit finie et que les pré-ARNr nouvellement synthétisés s'accumulent sous forme de pré-ARNr 45S (Sirri *et al.*, 2008). Ceci indique que la transcription et la maturation des ARNr pendant la prophase sont régulées par des mécanismes différents. De plus, des études récentes chez la levure ont montré que les sous-unités Rpa34 et Rpa49 de l'ARN polymérase I et le nombre de molécules de cette enzyme, par rapport au nombre d'unités transcriptionnelles sur l'ADNr, sont essentielles pour l'assemblage du nucléole (Albert *et al.*, 2011).

1.1.2 Localisation nucléolaire et infections virales

Contrairement aux signaux de localisation nucléaire (NLS), les séquences consensus ou signaux de localisation nucléolaire (NoLS) ne sont pas bien caractérisés. Cependant, la plupart des NoLS déjà identifiées sont des séquences riches en résidus basiques, principalement des arginines et des lysines qui peuvent varier de sept jusqu'à trente acides aminés (Reed *et al.*, 2006). Des motifs riches en proline ou tryptophane ont été aussi décrits (Catez *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2002). Dans quelques cas les NoLS font partie d'un NLS, ce qui rend son identification difficile. Par exemple, la protéine FGF2 («fibroblast growth factor 2») contient deux NLS et celui de la région C-terminale agit comme un NoLS (Sheng *et al.*, 2004). La protéine ORF57 du HSV («herpes simplex virus») contient deux NLS qui sont aussi impliqués dans la localisation nucléolaire (Boyne et Whitehouse, 2006). C'est aussi le cas des protéines qui dépassent la taille limite d'exclusion du pore nucléaire et qui ont besoin d'un NLS pour être transportées de manière active au travers de l'enveloppe nucléaire, ce qui pourrait expliquer l'existence des motifs partagés NLS/NoLS (Emmott et Hiscox, 2009).

Toutefois, la localisation nucléolaire d'une protéine est possiblement déterminée par plusieurs facteurs et la présence d'un NoLS n'est pas suffisante pour prédire sa localisation. C'est le cas de l'activité de certains NoLS qui peuvent être régulés par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et la SUMOylation (Liu *et al.*, 2007; Emmott et Hiscox, 2009). Il a été proposé que la localisation nucléolaire des protéines peut être une conséquence, directe ou indirecte, de son interaction avec des molécules nucléolaires (ADNr, ARN, protéines), comme dans les cas de la protéine nucléoline et du NRF («NF- κ B-repressing factor»). Certaines protéines nucléolaires ont des interactions avec la protéine B23 (nucléophosmine). La capacité de B23 (qui contient un NoLS) d'interagir avec de nombreuses protéines nucléolaires ainsi que son déplacement constant entre le cytoplasme et le noyau suggèrent qu'elle peut fonctionner comme un transporteur pour ces protéines (Sirri *et al.*, 2008). Par exemple, le suppresseur de tumeurs ARF («alternative reading frame product of the CDKN2A locus») est fonctionnellement inactif dans le nucléole où il est retenu par association avec B23 (Emmott et Hiscox, 2009). D'autres exemples sont les protéines PP1 («protein phosphatase 1») et NOP58 dont la localisation dépend de l'interaction avec les protéines NOM1 («nucleolar protein with MIF4G domain 1») et CRM1 («chromosome region maintenance 1», aussi nommée exportine 1), respectivement (Gunawardena *et al.*, 2008; Verheggen et Bertrand, 2012). L'association avec B23 ou avec d'autres protéines nucléolaires est aussi requise pour le transport vers le nucléole et pour la fonction de plusieurs protéines virales (Hiscox, 2007; Kim *et al.*, 2007).

Des protéines de différents virus à ADN ou à ARN sont dirigées vers le noyau des cellules infectées, ce qui est nécessaire à la réplication, à la pathogénie et à la dissémination de l'infection virale (Taliensky *et al.*, 2010). Tel est le cas des familles *Herpesviridae*, *Adenoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Retroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Potyviridae*, *Coronaviridae* et *Flaviviridae* (Emmott et Hiscox,

2009). Certaines de ces protéines virales contiennent des NoLS (Tableau I), des signaux d'exportation nucléaire (NES: «nuclear export signal») ou des motifs de liaison à l'ARN ou à l'ADN (Kann *et al.*, 2007; Melen *et al.*, 2007) et il y en a d'autres dont la localisation dépend des étapes du cycle cellulaire (Cawood *et al.*, 2007).

La protéine Rev du HIV-1 («human immunodeficiency virus-1»), par exemple, est essentielle pour la réplication virale. Sa localisation subcellulaire est nucléolaire mais elle se déplace constamment entre le noyau et le cytoplasme. Cette protéine possède un NES et un NLS et ce dernier s'associe avec les protéines importine-1 et B23. Le déplacement de Rev dans le nucléole est très limité, ce qui indique qu'elle est fixée à des structures ou à des sites de liaison internes de ce compartiment. En plus, la translocation de Rev du nucléole au cytoplasme est inhibée par la protéine NF90, une protéine cellulaire qui co-localise avec Rev dans le nucléole (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2006; Sirri *et al.*, 2008) (Figure 1.1).

La protéine ORF57 du HVS est requise pour la translocation vers le nucléole des protéines humaines nécessaires aux étapes de transcription et exportation nucléaire des ARNm viraux (Boyne et Whitehouse, 2006). Des études réalisées avec des cellules infectées avec l'IBV («infectious bronchitis virus») ont montré des variations dans le contenu protéique du nucléole et des changements morphologiques qui incluent l'élargissement du centre fibrillaire et la redistribution du suppresseur de tumeurs p53 vers le cytoplasme (Dove *et al.*, 2006). La co-localisation nucléolaire du HBcAg («hepatitis B virus core antigen») avec les protéines nucléoline et B23 est souvent associée avec des cellules à noyaux multiples et en apoptose, ce qui indique que la localisation du HBcAg dans ce compartiment cellulaire affecte la cytokinèse (Ning et Shih, 2004). Des effets similaires ont été observés pour les protéines NS2B, NS3 et WNVCp du WNV («West Nile virus») (Yang *et al.*, 2007).

Tableau 1.1
Signaux de localisation nucléolaire de quelques protéines virales
 (Adapté de Emmott et Hiscox, 2009)

Protéine	Séquence NoLS	Position	Numéro d'accès	Référence
IBV N	WRRQARFK	71–78	AAA46214	Reed <i>et al.</i> , 2006
ApLLP	MAKSIRSKHRRQMRM MKRE	1–19	ABY66901	Kim <i>et al.</i> , 2003
HIV-1 TAT	RKKRRQRRRAHQ	48–61	AAC82591	Siomi <i>et al.</i> , 1990
GGNNV α	RRRANNRRR	23–31	ACB21052	Guo <i>et al.</i> , 2003
HSV type 1 $\gamma(1)34.5$	MARRRRHRGPRRPRPP	1–16	P08353	Cheng <i>et al.</i> , 2002
HIV-1 REV	RRNRRRRWRERQRQI	38–52	CAA41586	Cochrane <i>et al.</i> , 1990
LIMK2	KKRTLKNDRKKR	491–503	CAG30399	Goyal <i>et al.</i> , 2006
HVS ORF57	KRPR-RRPSRPFRKP	91–94, 119–128	NP_040259	Boyne et Whitehouse, 2006
NIK	RKKRKKK	143–149	Q99558	Birbach <i>et al.</i> , 2004

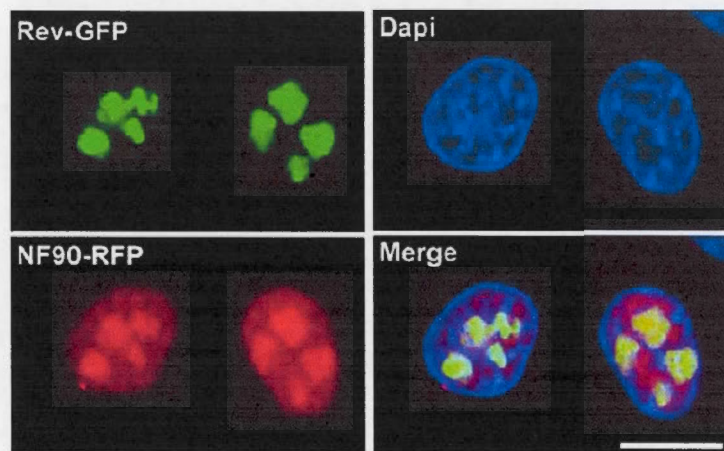


Figure 1.1 Co-localisation des protéines Rev et NF90 dans le nucléole. Des protéines de fusion Rev-GFP et NF90-RFP ont été exprimées dans des cellules HeLa. Le noyau est visualisé en bleu par coloration au DAPI. La co-localisation des protéines Rev-GFP et NF90-RFP est montrée dans le panneau «Merge». Barre: 10 μ m. (Figure tirée de Sirri *et al.*, 2008).

1.2 Les petits ARN nucléolaires

Le transcriptome eucaryote est formé d'ARN codants et non-codants dont le dernier groupe représente 95% de la population totale des ARN (Rother et Meister, 2011; Siomi *et al.*, 2011; Rinn et Chang, 2012). Les ARN non-codants sont regroupés en différentes catégories fonctionnelles: ARN ribosomiques (ARNr), ARN de transfert (ARNt), petits ARN cytoplasmiques (scRNA), petits ARN nucléaires (snRNA), petits ARN nucléolaires (snoRNA), petits ARN des corps de Cajal (scaRNA), composants de la télomérase (TERC: «telomerase RNA component»), micro ARN (miRNA), longs ARN non-codants (lncRNA), ARN activateurs (eRNA), ARN guide (gRNA), ARN interagissant avec Piwi (piRNA), petits ARN activateurs (saRNA) et ARN initiateurs de la transcription (tiRNA). L'équilibre des ARN dans la cellule est affecté dans des conditions de stress, inflammation, cancer et d'autres maladies (Nallar et Kalvakolanu, 2013).

Plus de 200 petits ARN nucléolaires (snoRNA) ont été identifiés chez les mammifères et presque 80 chez la levure. En général, leur longueur varie de 60 à 300 nucléotides. Ils fonctionnent sous la forme de ribonucléoprotéines (RNP) et leur fonction la plus étudiée est la participation dans les étapes de maturation des ARNr 18S, 5,8S et 28S (25S chez la levure). Les snoRNA sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II et produits à partir des introns de quelques transcrits codants ou non-codants. Ils ont été classifiés selon la présence de motifs conservés et selon leur structure secondaire dans deux familles: les snoRNA à boîtes C et D (snoRNA C/D) et les snoRNA à boîtes H et ACA (snoRNA H/ACA) (Dragon *et al.*, 2006; Mannoor *et al.*, 2012; Nallar et Kalvakolanu, 2013).

La plupart des snoRNA de la famille C/D sont responsables de la méthylation des pré-ARNr en position 2'-OH de riboses spécifiques (Makarova *et al.*, 2013). Ces snoRNA se caractérisent par la présence vers l'extrémité 5' de la séquence consensus RUGAUGA (boîte C) et d'une deuxième région (boîte D) contenant la séquence CUGA vers l'extrémité 3'. Les extrémités 5' et 3' s'apparient souvent entre elles pour former une courte hélice terminale nommée motif C/D central («C/D core motif»). D'autres copies des boîtes C et D, appelées C' et D', sont souvent retrouvées dans la partie centrale de l'ARN, séparées par quelques nucléotides.

Les snoRNA de la famille C/D possèdent de courtes séquences de 10 à 21 nucléotides situées en amont de la boîte D ou D' et qui sont complémentaires à des séquences conservées des ARNr, permettant l'appariement avec l'ARNr cible (Dragon *et al.*, 2006; Mannoor *et al.*, 2012). L'hélice ainsi formée entre le snoRNA et l'ARNr, place la boîte D ou D' à exactement 5 nucléotides du résidu de l'ARNr qui sera méthylée en position 2'-O-ribose (Kiss et Darzacq, 2001) (Figure 1.2 A). Cette modification est catalysée par la protéine fibrillarine (Nop1 chez la levure) (Watkins et Bohnsack,

2012). D'autres composants fonctionnels des RNP C/D sont NOP56, NOP58 et NHP2L1 (Snu13 chez la levure) (Nallar *et al.*, 2013).

La majorité des snoRNA de la famille H/ACA participent à la pseudouridylation des pré-ARNr (Makarova *et al.*, 2013). Ils se caractérisent par la présence des motifs conservés ANANNA (boîte H) et ACA (boîte ACA), qui sont importants pour leur stabilité et leur accumulation *in vivo*. Les snoRNA H/ACA présentent une structure secondaire conservée dans l'évolution qui consiste en deux tiges-boucles connectées, suivies par deux régions simple brin en position centrale et terminale. Ces régions simple brin portent les boîtes H et ACA. Les tiges-boucles sont généralement interrompues par des boucles internes qui contiennent des séquences complémentaires à l'ARNr cible (Kiss et Darzacq, 2001; Dragon *et al.*, 2006) (Figure 1.2 B). L'appariement entre le snoRNA et l'ARNr laisse libre l'uridine qui sera modifiée, permettant ainsi la rotation de la base pendant la réaction d'isomérisation. Le site de pseudouridylation du snoRNA est toujours placé en amont de la boîte H ou de la boîte ACA, à une distance qui peut varier de 14 à 16 nucléotides, par rapport à la pseudouridine. L'enzyme qui catalyse cette réaction d'isomérisation est la pseudouridine synthase NAP57, aussi nommée dyskérine (son homologue chez la levure est appelé Cbf5) (Kiss et Darzacq, 2001). Les autres constituants des RNP H/ACA sont NHP2, NOP10 et GAR1 (Nallar *et al.*, 2013). Chez les vertébrés, l'ARN du complexe de la télomérase contient un motif H/ACA vers son extrémité 3' qui est essentiel pour l'accumulation *in vivo* de cette RNP (Dragon *et al.*, 2006). De plus, la télomérase des vertébrés est associée avec les protéines GAR1, dyskérine, NOP10 et NHP2 (Makarova *et al.*, 2013).

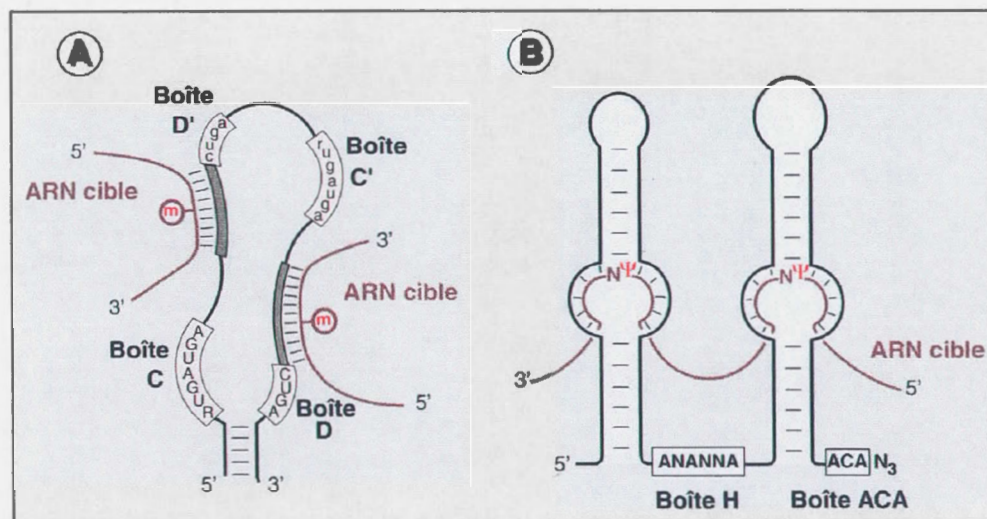


Figure 1.2 Structure secondaire et classification des snoRNA. (A) Les snoRNA à boîtes C et D, responsables de la méthylation en position 2'-OH du ribose, contiennent des éléments anti-sens, capables de s'apparier avec des séquences dans l'ARN cible. Cette interaction place la boîte D ou D' à une distance de cinq nucléotides par rapport la base qui sera méthylée. (B) Les snoRNA à boîtes H et ACA forment une structure avec leur ARN cible dans laquelle l'uridine substrat (Ψ) occupe toujours la même position par rapport au site de pseudouridylation du snoRNA (Figure tirée de Kiss et Darzacq, 2001).

L'ARN 7-2/MRP (un composant du complexe RNase MRP) est un snoRNA qui n'appartient ni à la famille C/D ni à la famille H/ACA et dont sa structure ressemble à l'ARN du complexe RNase P, l'endonucléase qui clive les extensions 5' des pré-ARNt. Le complexe RNase MRP est impliqué dans la maturation des pré-ARNr, spécifiquement dans le clivage en position A3 (Lygerou *et al.*, 1996). D'autre part, des mutations dans l'ARN RPR1 du complexe RNase P affectent le processus de maturation des pré-ARNr, ce qui indique que ce complexe a des fonctions dans le nucléole. Il a aussi été proposé que les complexes RNase P et RNase MRP ont des étapes évolutives en commun (Hipp *et al.*, 2012; Khanova *et al.*, 2012; Krehan *et al.*, 2012).

Les snoRNA sont impliqués dans d'autres fonctions cellulaires comme la maturation des petits ARN nucléaires (snRNA) et des ARNt, l'épissage alternatif, le contrôle de l'expression génique et la réponse cellulaire au stress (Kawaji *et al.*, 2008; Mannoor *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2012). Des défauts dans leur production peuvent provoquer des sévères maladies comme le Syndrome de Prader-Willi (Falaleeva et Stamm, 2013). Plus de la moitié des snoRNA des vertébrés, d'*Arabidopsis* et de levure peuvent donner origine à des plus petits fragments appelés ARN dérivés de snoRNA (sdRNA: «sno-derived RNA») qui sont capables de réguler la traduction grâce à des interactions de complémentarité avec les ARNm (Taft *et al.*, 2009; Makarova *et al.*, 2013). La plupart des sdRNA sont produits par des mécanismes de maturation spécifiques des snoRNA et non par leur dégradation. Quelques études ont mis en évidence que certains miRNA sont des fragments de snoRNA (Langenberger *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2012). De façon similaire aux miRNA, les sdRNA lient les protéines de la famille Ago (Ago 1-4) du complexe RISC («RNA-induced silencing complex») (Ender *et al.*, 2008; Burroughs *et al.*, 2011; Fabian et Sonenberg, 2012).

L'endonucléase Drosha et la protéine de liaison à l'ARN DGCR8 ne sont pas impliquées dans la formation de la plus part des sdRNA. Ceux-ci sont plutôt maturés par la voie non-canonique des «mirtons» qui requiert la participation de l'endonucléase Dicer. Dicer a été récemment trouvée dans le noyau des cellules mammifères et sa déplétion cause des défauts dans la maturation des ARNr et des changements dans la structure du nucléole (Ando *et al.*, 2011; Liang et Crooke, 2011; Ohrt *et al.*, 2012). Cependant, le processus de maturation de plusieurs autres sdRNA H/ACA semble être indépendant de Dicer (Makarova *et al.*, 2013).

1.3 Biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes

1.3.1 Synthèse et maturation des pré-ARNr

Le ribosome est une énorme ribonucléoprotéine qui est responsable d'un des processus essentiels à toutes les cellules, la traduction de l'information portée par les ARNm en protéines. Les ribosomes bactériens ont un coefficient de sédimentation de 70S. Ils sont constitués par une petite sous-unité (SSU) contenant l'ARNr 16S et 21 protéines ribosomiques (S1-S21) ainsi que par une grande sous-unité (LSU) composée des ARNr 5S et 23S et 33 protéines ribosomiques (L1-L33). Les ribosomes eucaryotes sont des structures plus grandes et complexes que ceux des bactéries, avec un coefficient de sédimentation d'approximativement 80S. La petite sous-unité 40S est formée par l'ARNr 18S et 33 protéines ribosomiques tandis que la grande sous-unité 60S contient les ARNr 5S, 5,8S et 28S (25S chez la levure) et 47 protéines ribosomiques (46 chez la levure) (Lecompte *et al.*, 2002; Wilson et Doudna Cate, 2012).

La biogenèse des ribosomes est un processus très conservé chez les eucaryotes et qui demande la contribution des trois ARN polymérases et de centaines d'autres protéines et petits ARN nucléolaires (Phipps *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Le génome de *Saccharomyces cerevisiae* contient de 100 à 200 copies d'ADNr localisées sur le chromosome XII, chacune avec une longueur d'environ 9,1 kb (Karkusiewicz *et al.*, 2004; Taddei et Gasser, 2012). Le processus de production des ribosomes commence dans le nucléole avec la transcription par l'ARN polymérase I d'un long précurseur polycistronique, qui est clivé en 3' pour produire le pré-ARNr 35S (47S chez l'humain) (Kong *et al.*, 2011; Taddei et Gasser, 2012). Ce pré-ARNr 35S contient les ARNr 18S, 5,8S et 25S (28S chez l'humain), séparés par des régions internes appelées ITS1 et ITS2 («internal transcribed spacers»), et flanqués en 5' et 3' par des séquences externes ou ETS («external transcribed spacers»). L'ARNr 5S est

transcrit de façon indépendante par l'ARN polymérase III (Gerbi *et al.*, 2003; Swiatkowska *et al.*, 2012; Sloan *et al.*, 2014).

La maturation des ARNr 18S, 5,8S et 25S implique plusieurs clivages et des modifications chimiques covalentes, principalement la méthylation en position 2'-OH de riboses et la pseudouridylation (Rempola *et al.*, 2006). Les clivages aux sites A0, A1 (dans le 5'-ETS) et A2 (dans l'ITS1) produisent les pré-ARNr 20S et 27SA2, pendant que le clivage en position A3 peut générer le pré-ARNr 27SA3 de façon indépendante de A2. Ensuite, le pré-ARNr 20S est exporté vers le cytoplasme où il est clivé en position 3' (clivage D) pour donner l'ARNr 18S de la sous-unité 40S du ribosome. Les ARNr 5,8S et 25S sont maturés à partir du pré-ARNr 27SA2/27SA3 et assemblés avec les protéines ribosomiques de la grande sous-unité 60S dans le cytoplasme (Strunk et Karbstein 2009; Charette et Baserga, 2010; Swiatkowska *et al.*, 2012) (Figure 1.3).

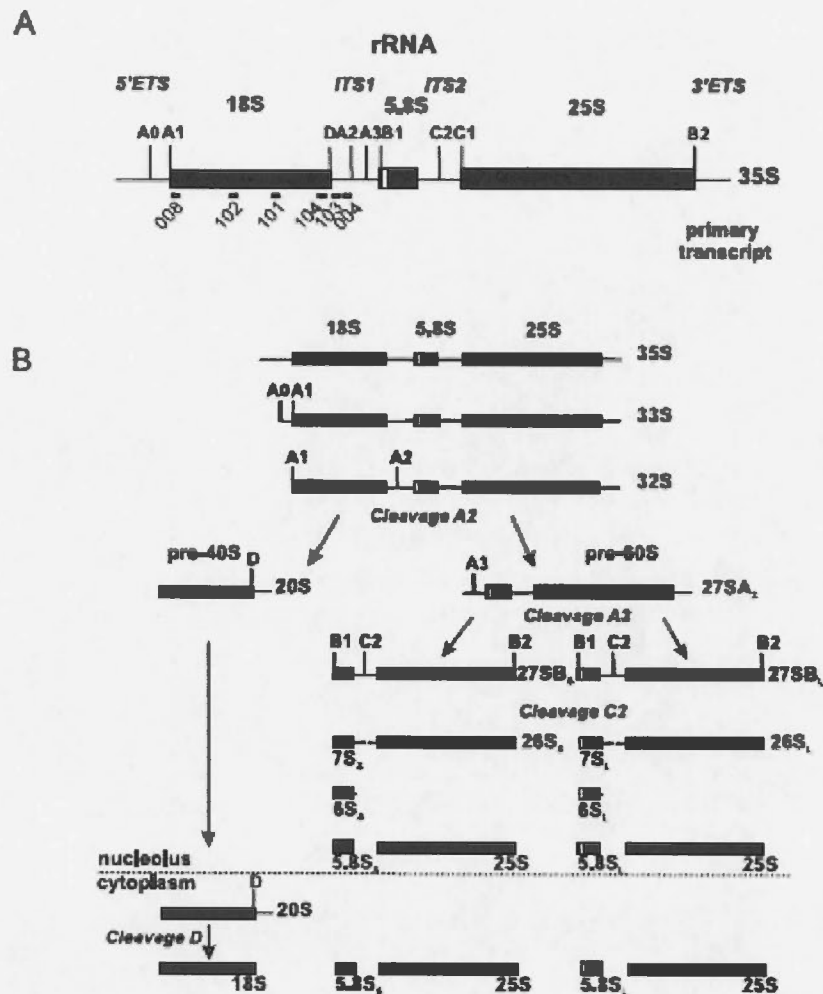


Figure 1.3 Maturation des pré-ARNr chez *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Structure du pré-ARNr 35S. (B) Étapes de maturation des pré-ARNr 18S, 5,8S et 25S. (Figure tirée de Swiatkowska *et al.*, 2012).

Les processus de clivage et maturation des pré-ARNr requièrent la collaboration de plus de 200 protéines non ribosomiques (nucléases, ARN hélicases, ATPases, GTPases, etc) et des petits ARN nucléolaires agissant sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (snoRNP) (Henras *et al.*, 2008; Ohmayer *et al.*, 2013; Sloan *et al.*, 2013). Ces snoRNP s'assemblent pendant la transcription et peuvent être

visualisés au microscope électronique comme des granules à l'extrémité 5' des nouveaux transcrits en formation (Mougey *et al.*, 1993; Sloan *et al.*, 2014). Chez *S. cerevisiae* le pré-ARNr 35S est modifié par 43 snoRNP C/D et 28 snoRNP H/ACA (Phipps *et al.*, 2011). Les clivages aux sites A0, A1 et A2 requièrent la participation des snoRNP U3 et snR30, tandis que l'activité des snoRNP snR10 et U14 est nécessaire seulement pour les clivages en positions A1 et A2 (Dragon *et al.*, 2002; Osheim *et al.*, 2004; Lemay *et al.*, 2011; Lebaron *et al.*, 2013). Le mécanisme de maturation des ARNr 18S, 5,8S et 25S nécessite aussi la collaboration des protéines Rrp6, Rrp17, Rat1, Xrn1, Xrn2, Nob1 et Erb1 (Granneman *et al.*, 2011; Sahasranaman *et al.*, 2011; Preti *et al.*, 2013; Sloan *et al.*, 2013; Axt *et al.*, 2014). La participation des endonucléases Dicer et Drosha dans la maturation de l'extrémité 5' du pré-ARNr 5,8S a été aussi décrite chez les cellules mammifères (Liang et Crooke, 2011).

1.3.2 Le SSU processome

Le SSU («small subunit») processome est une énorme ribonucléoprotéine d'environ 80S qui est essentielle au processus de maturation de l'ARNr 18S chez les eucaryotes. Il est constitué du petit ARN nucléolaire U3 et d'environ 72 protéines ribosomiques et non ribosomiques (Dragon *et al.*, 2002; Charette et Baserga, 2010; Lim *et al.*, 2011). Des nombreuses études ont montré 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. Cet effet se manifeste comme une diminution dramatique des ARNr 20S et 18S et une accumulation dans la cellule des pré-ARNr 35S et 23S (généré par clivage du pré-ARNr 35S au site A3), tandis que les niveaux du pré-ARNr 27SA3 et des ARNr 5,8S et 25S ne sont pas affectés (Sharma and Tollervey 1999; Bleichert *et al.*, 2006; Charrette et Baserga, 2010).

Les composants du SSU processome sont assemblés de façon coordonnée, avec la formation de plusieurs sous-complexes autonomes, qui sont incorporés aux pré-ARNr en ordre chronologique (Kuhn *et al.*, 2009; Perez-Fernandez *et al.*, 2011). Cependant, seulement 43% des protéines connues du SSU processome ont été décrites comme faisant partie d'un de ces sous-complexes et il existe même d'autres composants qui n'ont pas encore été identifiés (Lim *et al.*, 2011; Phipps *et al.*, 2011; Soltanieh *et al.*, 2014). L'union du sous-complexe UTP-A/tUTP (Nan1, Utp10, Utp15, 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 (Cka1, Cka2, Ckb1, Ckb2, Rrp7, Utp22). Dans la deuxième branche le snoRNA U3 et le sous-complexe UTP-B (Dip2, Pwp2, Utp13, Utp18, Utp21, Utp6) sont co-assemblés, suivis des sous-complexes Bms1/Rcl1, Mpp10/Imp3/Imp4 et Dbp4/Bfr2/Enp2. Le reste des constituants du SSU processome sont incorporés plus tard d'une façon qui n'est pas encore connue (Gallagher *et al.*, 2004; Krogan *et al.*, 2004; Perez-Fernandez *et al.*, 2011; Soltanieh *et al.*, 2014)

1.3.3 Ribosomopathies

La plupart des protéines ribosomiques et des facteurs qui participent à la biogenèse des ribosomes sont essentiels à la viabilité cellulaire. Les ribosomopathies sont des maladies caractérisées par des anomalies génétiques qui causent des défauts dans la maturation et dans la fonction des ribosomes, ce qui entraîne différents signes cliniques (Narla et Ebert, 2010).

L'anémie de Diamond-Blackfan a été initialement décrite par Josephs en 1936 (Josephs, 1936) et classée comme une anémie hypoplasique congénitale par Diamond et Blackfan en 1938 (Diamond et Blackfan, 1938). Les signes cliniques les plus

importants sont l'anémie, la macrocytose, la réticulocytopénie et une diminution ou une absence de précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse. L'incidence est estimée de 4 à 5 cas par million et la plus part des patients sont diagnostiqués pendant la première année de vie, ayant pâleur et léthargie comme les symptômes les plus communs. De 40% à 62% des patients présentent aussi des malformations cranio-faciales, cardiaques, des membres et urogénitales (Lipton et Ellis, 2009; Freed *et al.*, 2010). Les traitements actuels comprennent des stéroïdes, des transfusions sanguines et la transplantation de la moelle osseuse (Vlachos *et al.*, 2001). Des mutations dans les gènes codants pour les protéines ribosomiques RPS19, RPS24, RPS17, RPL35A, RPL5 et RPL11 ont été détectées dans approximativement 50% des patients. Les mutations dans le gène *RPL5* sont associées aux symptômes les plus sévères. D'autres mutations dans les gènes des protéines RPS7, RPL36, RPS15 et RPS27A ont été aussi décrites (Freed *et al.*, 2010; Narla et Ebert, 2010; Preti *et al.*, 2013).

Le syndrome 5q a été décrit par van Den Berghe en 1974. Il est caractérisé par une anémie macrocytaire sévère et par des délétions dans le bras long du chromosome 5. Le gène *RPS14* a été identifié comme un des gènes manquants, ce qui provoque des défauts dans la formation de la sous-unité 40S et des impacts sévères sur l'érythropoïèse (Pellagatti *et al.*, 2008; Ebert, 2009).

La chondrodysplasie métaphysaire de McKusick est une ribosomopathie qui a été premièrement décrite en 1965. Les signes cliniques les plus notables sont la dysplasie squelettique, l'anémie macrocytaire, la lymphopénie et une prédisposition au cancer. Elle est provoquée par des mutations dans le gène *RMRP* qui code pour le snoRNA 7-2/MRP du complexe RNase MRP. Ce complexe participe dans les étapes de maturation des ARNt et de l'extrémité 5' de l'ARNr 5,8S (Narla et Ebert, 2010).

Le syndrome de Treacher Collins, décrit en 1900 par Edward Treacher Collins, est une maladie autosomique dominante qui se caractérise par des anomalies morphologiques des oreilles, des yeux et des os du visage, particulièrement au niveau de la mâchoire et des joues (Sakai et Trainor, 2009; Freed *et al.*, 2010). Cette maladie est causée par des mutations dans le gène *TCOF1* qui code pour Treacle, une protéine nucléolaire impliquée dans la transcription et la méthylation de l'ARNr (Valdez *et al.*, 2004).

La dyskératose congénitale est une maladie qui a été découverte en 1910. L'incidence dans la population est estimée à 1 cas par million (Dokal et Vulliamy, 2003; Narla et Ebert, 2010) et les signes cliniques les plus fréquents sont un retard dans la croissance, des défaillances de la moelle osseuse ainsi que des anomalies cutanéomuqueuses et neurologiques. Cette maladie est provoquée par des mutations dans le gène *DKC1* qui code pour la protéine dyskérine, la pseudouridine syntase des snoRNP H/ACA (Liu et Ellis, 2006). Des mutations dans les gènes des protéines NHP2, NOP10 et TERT ont été aussi décrites (Freed *et al.*, 2010).

Le syndrome de Schwachman-Diamond, décrit en 1964, est causé par des mutations dans le gène *SBDS* (Boocock *et al.*, 2003). Les fonctions de SBDS ne sont pas connues, mais les cellules affectées montrent une diminution significative dans les niveaux d'expression des protéines ribosomiques RPS9, RPS20, RPL6, RPL15, RPL22, RPL23, and RPL29 et d'autres facteurs cellulaires nécessaires à la biogenèse des ARNr et des ARNm (Rujkijyanont *et al.*, 2009). De plus, SBDS cosédimente avec le pré-ribosome 60S dans des gradients de saccharose et interagit avec l'ARNr 28S (Ganapathi *et al.*, 2007). Les patients atteints de cette maladie présentent des défauts dans l'hématopoïèse, une insuffisance pancréatique exocrine, une neutropénie, une anémie, une thrombocytopénie, des anomalies squelettiques et une prédisposition à la leucémie (Ganapathi et Shimamura, 2008).

Des mutations dans des gènes importants pour la biogenèse ou la fonction des ribosomes sont impliquées dans plusieurs autres maladies comme le syndrome de Bowen-Conradi, la neurofibromatose de type 1, le glaucome à angle ouvert, le syndrome de Prader-Willi et le syndrome ANE («Alopecia, Neurological defects, and Endocrinopathy syndrome») (Freed *et al.*, 2010).

1.3.4 Les liens avec le cancer

Les liens entre la prolifération cellulaire, le cancer et l'activité nucléolaire ont été bien établis dans les dernières décennies. Le nombre et la taille des nucléoles sont généralement augmentés dans les cellules cancéreuses ou en prolifération et la production des ribosomes est affectée par plusieurs suppresseurs de tumeurs et proto-oncogènes (Ruggero et Pandolfi, 2003; Hein *et al.*, 2013; Vlatković *et al.*, 2014). Le contrôle de l'activité de l'ARN polymérase I en fonction du cycle cellulaire dépend de la protéine du rétinoblastome, un suppresseur de tumeur qui peut inhiber l'activité de l'ARN polymérase I en agissant directement sur la protéine UBF, un facteur essentiel à la transcription des ARNr 18S, 5,8S et 28S (Hernandez-Verdun et Louvet, 2004). Des études faites pendant les dernières années ont aussi montré que la transcription de l'ARNr par l'ARN polymérase I est suractivée par les oncogènes *c-myc* et *RAS* (Arabi *et al.*, 2005; Grandori *et al.*, 2005) et qu'une diminution dans la production des ribosomes peut induire l'apoptose d'une façon dépendante des suppresseurs de tumeurs p53, p14^{ARF} et de l'ubiquitine ligase Mdm2 (Rubbi et Milner, 2003; Sirri *et al.*, 2008; Burger et Eick, 2013; Sloan *et al.*, 2014). Ces observations indiquent que le développement de nouveaux médicaments dirigés vers la régulation de la transcription de l'ARNr pourrait devenir très utile dans le traitement du cancer (Ruggero, 2012; Hein *et al.*, 2013; Pickard et Bierbach, 2013).

Les maladies causées par des défauts dans la biogenèse des ribosomes sont reliées à des changements dans le cycle et dans la prolifération cellulaires, ce qui augmente le

risque de cancer (Montanaro *et al.*, 2008; Freed *et al.*, 2010; Lipton et Ellis, 2010; Narla et Ebert, 2010). Les protéines du SSU processome UTP4 et UTP14 sont impliquées dans les cancers de l'ovaire et du foie chez l'humain et les rôles des protéines BOP1 et 1A6/DRIM (UTP20) sont encore à l'étude (Bernstein et Baserga, 2004; Wang *et al.*, 2007; Sondalle et Baserga, 2014). Plusieurs autres protéines nucléolaires ont été associées avec la pathogénèse du cancer, comme c'est le cas de B23, NCL (nucléoline) et RAR (Grisendi *et al.*, 2005; Rego *et al.*, 2006; Abdelmohsen et Gorospe, 2012). Les protéines ribosomiques RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 et RPS7 s'associent avec Mdm2 et empêchent la dégradation de p53 dans des conditions de stress nucléolaire (Dundr, 2012). D'autres exemples sont la protéine GNL3 (nucléostemine) et le suppresseur de tumeurs p14^{ARF} qui peuvent réguler la fonction de p53 par déplacement entre le nucléole et le nucléoplasme (Grisendi *et al.*, 2005; Tsai et McKay, 2005; Kawahara, 2013).

1.4 Les ARN hélicases de la famille «DEAD-box»

Les hélicases sont des protéines essentielles au métabolisme des acides nucléiques. Elles sont classifiées selon la présence de domaines conservés dans cinq grandes superfamilles: SF1-SF5. Les «DEAD-box» ARN hélicases forment la plus grande famille de la superfamille SF2 et se caractérisent par la présence d'un domaine catalytique comprenant 300-400 acides aminés. Ce domaine contient 13 motifs conservés qui sont impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP et la reconnaissance de l'ARN (Q, I, Ia, Ib, Ic, II, III, IV, IVa, V, Va, Vb et VI) (Figure 1.4).

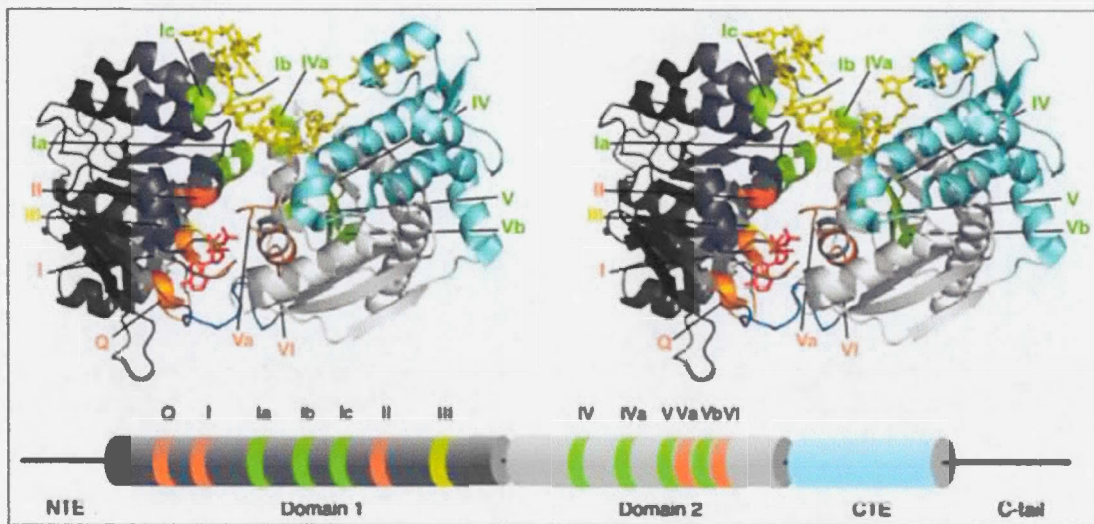


Figure 1.4 Structure du domaine catalytique des ARN hélicases «DEAD-box». Les motifs qui interagissent avec l'ATP sont montrés en orange tandis que ceux qui interagissent avec l'ARN sont présentés en vert. Le motif III, impliqué dans la communication des domaines globulaires 1 et 2 est indiqué en jaune. Dans le panneau du haut, les domaines 1 et 2 sont montrés en gris foncé et en argent, respectivement. Le domaine auxiliaire C-terminal est indiqué en bleu (Figure tirée de Russell *et al.*, 2013).

Le centre catalytique forme deux domaines globulaires similaires à ceux de l'ATPase RecA (Gustafson et Wessel, 2010; Jankowsky *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2013). Le motif II, aussi nommé «Walker B» contient la séquence consensus D-E-A-D. Les motifs I (aussi connu comme «P-loop» ou «Walker A»), II, Va, VI et Q sont impliqués dans l'interaction et l'hydrolyse de l'ATP, tandis que les motifs Ia, Ib, Ic, IV, IVa, V et Vb participent à la reconnaissance et la modification de l'ARN (Jarmoskaite et Russell, 2011; Russell *et al.*, 2013). Le domaine catalytique des protéines «DEAD-box» est encadré par des séquences N- et C-terminales non-conservées, connues sous le nom d'extensions ou de domaines auxiliaires. Ces domaines interagissent avec des éléments structurels du substrat ou avec des cofacteurs, ce qui confère la spécificité fonctionnelle à ces enzymes. Les domaines

auxiliaires peuvent aussi contribuer à la dimérisation de la protéine, à la stabilité des domaines globulaires RecA et à la régulation de l'activité catalytique (Gustafson et Wessel, 2010; Russell *et al.*, 2013). 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 (Hilbert *et al.*, 2009; Jarmoskaite et Russell, 2011; Henn *et al.*, 2012).

Les «DEAD-box» ARN hélicases fonctionnent généralement dans des complexes multiprotéiques et sont capables de dérouler des brins de 25 à 40 paires de bases (Pan et Russell, 2010). Elles participent à des processus cellulaires très divers qui incluent l'assemblage et le fonctionnement de structures macromoléculaires comme le ribosome et le spliceosome, les mécanismes de contrôle de l'expression génique, l'exportation nucléaire des ARNm, la gamétogenèse, la conservation des télomères, la maturation et la dégradation des ARN, l'apoptose, etc. (Jarmoskaite et Russell, 2011; König *et al.*, 2013; Lasko, 2013; Russell *et al.*, 2013; Soto-Rifo et Ohlmann, 2013). Leur implication dans la prolifération et les transformations des cellules cancéreuses, dans la réponse immunitaire et dans les mécanismes de réplication des virus a été aussi démontrée (Garbelli *et al.*, 2011; Fullam et Schröder, 2013; Fuller-Pace, 2013).

1.5 Les GNAT

Les «GCN5-related *N*-acetyltransferases» (GNAT) sont une grande famille d'enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe acétyle de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) vers une amine primaire (Vetting *et al.*, 2005; Chimnaronk *et al.*, 2009). Les membres de cette superfamille sont très conservés et comprennent des aminoglycoside-*N*-acétyltransférases, des sérotonine-*N*-acétyltransférases, des glucosamine-6-phosphate-*N*-acétyltransférases, des histone-acétyltransférases (HAT), des mycothiol-synthases, des *N*-myristoyltransférases et les aminoacyltransférases de

la famille Fem (Kuhn *et al.*, 2013). Les GNAT sont impliquées dans une énorme variété de mécanismes cellulaires comme le métabolisme du carbone et de l'ARN, la résistance aux antibiotiques, le contrôle hormonal et la régulation de l'activité des facteurs de transcription (Furdas *et al.*, 2012; Tucker et Escalante-Semerena, 2013). Il existe aussi plusieurs membres de cette famille dont la fonction et le substrat ne sont pas encore connus (Dida *et al.*, 2000; Yang, 2004; Kuhn *et al.*, 2013).

La superfamille des GNAT se caractérise par la présence de quatre régions conservées (A-D) couvrant à peu près 100 acides aminés (Neuwald et Landsman, 1997). Ces domaines forment une structure de six à sept brins de type β et quatre hélices de type α dans l'ordre $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\beta 2-\beta 3-\beta 4-\alpha 3-\beta 5-\alpha 4-\beta 6$. Le motif A contient la séquence consensus Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala. Les motifs A et B sont les motifs les plus conservés et sont impliqués dans la liaison à l'acétyl-CoA (Tercero *et al.*, 1992; Dyda *et al.*, 2000). Le motif C, au contraire, est le moins conservé des quatre motifs. Les régions qui sont impliquées dans l'interaction avec le substrat sont très différentes dû à la grande variété de types de substrat qu'elles peuvent acétyler, ce qui leur permet d'avoir plusieurs fonctions (Sternglanz et Schindelin, 1999; Vetting *et al.*, 2005).

L'acétylation des protéines par les GNAT se produit par acétylation de l'acide aminé N-terminal (acétylation $N\alpha$), l'acétylation des résidus lysine (acétylation $N\epsilon$) ou la O-acétylation des résidus sérine et thréonine (Yang et Hang, 2011). L'acétylation $N\alpha$ se fait sur des résidus de méthionine, alanine, glycine, sérine ou thréonine qui deviennent accessibles après des clivages par des aminopeptidases (Kuhn *et al.*, 2013). GCN5 est une histone acétyltransférases (HAT) dont la fonction principale est la modification de la chromatine. Cette protéine est un composant catalytique du complexe acétyltransférase Spt-TAFII31-GCN5L (Spt-Ada-GCN5 chez la levure). L'activité enzymatique de GCN5 est nécessaire à l'acétylation des résidus K9 et K14

de l'histone H3 et facilite l'élongation de la transcription par relaxation des nucléosomes. L'acétylation des histones a un rôle fondamental dans le contrôle de plusieurs mécanismes cellulaires comme l'expression génique, la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN, le vieillissement et la pathogénèse des rétrovirus (Yu et Waters, 2005; Ablack *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012). Chez les mammifères, la perturbation de l'activité acétyltransférase du complexe GCN5 a été associée à des défauts dans la fermeture du tube neural, au développement des maladies cardiovasculaires et au cancer (Nagy et Tora, 2007; Lafon *et al.*, 2012).

1.6 La protéine nucléolaire Kre33

Kre33 est une protéine nucléolaire (Grandi *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009), codée par l'ORF (cadre de lecture ouvert) *YNL132W* du chromosome VII de *Saccharomyces cerevisiae*. Elle a été identifiée et séquencée en 1995 par Mallet *et al.*, à partir de la souche S288C de *S. cerevisiae* («UniProtKB/Swiss-Prot Accession number P53914») et associée avec le phénomène de résistance à la toxine «killer» K1 (Pagé *et al.*, 2003). Cette protéine est essentielle à la viabilité cellulaire (Giaever *et al.*, 2002) et nécessaire aux processus de maturation et exportation de la petite sous-unité 40S du ribosome (Grandi *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009).

L'homologue de Kre33 chez *Escherichia coli* est TmcA, une ARNt cytidine acétyltransférase (Chimnaronk *et al.*, 2009), mais la protéine responsable de cette fonction chez *S. cerevisiae* est Tan1 (Johansson et Byström, 2004). Chez l'humain l'homologue de Kre33 est NAT10, une protéine associée à la réponse aux dommages à l'ADN (Liu *et al.*, 2007), à la stabilité des microtubules (Shen *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2013; Larrieu *et al.*, 2014) et à la régulation de l'activité de la télomérase (Lv *et al.*, 2003; Fu et Collins, 2007). Kre33 contient des motifs conservés GNAT (GNAT A et GNAT B), ATPase et ARN hélicase («Walker A» et «Walker B») (Figure 1.5), ainsi qu'une extension C-terminale et d'autres régions internes qui sont uniques aux

eucaryotes. Ces éléments indiquent que Kre33 a une fonction différente de l'homologue TmcA (Chimnaronk *et al.*, 2009; Ebersberger *et al.*, 2014) ou même plusieurs fonctions, conservées ou non, chez les eucaryotes.

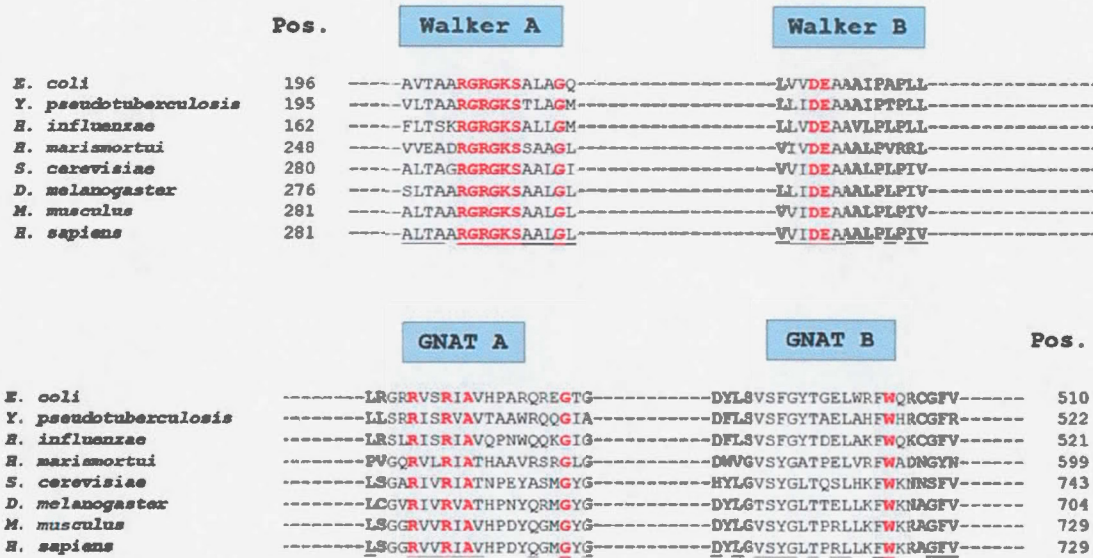


Figure 1.5 Alignement de séquences des motifs conservés de Kre33. Des homologues de Kre33 sont présentés. Les motifs conservés acétyltransférase (GNAT A et GNAT B), ATPase et ARN hélicase (Walker A et Walker B) sont indiqués. Les acides aminés conservés sont soulignés. Les résidus invariables sont indiqués en rouge. (Information obtenue à partir de Chimnaronk *et al.*, 2009).

2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Kre33 est une protéine essentielle à la biogenèse de la petite sous-unité du ribosome, mais ses fonctions spécifiques dans la maturation des pré-ARNr et de la sous-unité 40S chez les eucaryotes ne sont pas encore élucidés (Ebersberger *et al.*, 2014). De plus, elle a été co-purifiée avec d'autres protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes, comme Prp43 (Lebaron *et al.*, 2005), Pwp2 (Pérez-Fernández *et al.*, 2011) et Rrp12 (Dosil, 2011), ce qui suggère qu'elle fonctionne en faisant partie d'un ou plusieurs complexes contenant d'autres protéines.

Hypothèse # 1: Kre33 est une composante du SSU processome eucaryote.

Objectifs:

- Déterminer si Kre33 est associée à des protéines du SSU processome.
- Analyser le profil de sédimentation de Kre33 dans des gradients de saccharose.
- Déterminer si Kre33 est associée au petit ARN nucléolaire U3.
- Identifier des partenaires proches de Kre33 dans le SSU processome.

Hypothèse # 2: L'extension C-terminale de Kre33 contient des éléments fonctionnels importants.

Objectifs:

- Déterminer si l'extension C-terminale de Kre33 est essentielle à la viabilité de *S. cerevisiae*.
- Identifier les motifs de l'extension C-terminale de Kre33 qui lui confèrent une spécificité fonctionnelle chez les eucaryotes.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches bactériennes et souches de levures

La souche DH10B (*F*- *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX*74 *recA*1 *endA*1 *araD*139 Δ (*ara*, *leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL mupG*/pMON14272/pMON7124) (Invitrogen) est dérivée de la souche K-12 MG1655 d'*Escherichia coli* (Durfee *et al.*, 2008). Cette souche a été utilisée pour les clonages et la propagation des plasmides recombinants.

La souche AH109 (*MATa*, *trp1*-901, *leu2*-3, 112, *ura3*-52, *his3*-200, *gal4* Δ , *gal80* Δ , *LYS2*::*GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3*, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*, *URA3*::*MEL1UAS-MEL1TATA-LacZ MEL1*) (Clontech) a été utilisée pour l'analyse des interactions protéine-protéine par le système double hybride chez la levure. La souche YPH499 (*MATa*, *ura3*-52, *lys2*-80, *ade2*-101, *trp1*- Δ 63, *his3*- Δ 200, *leu2*- Δ 1) (Sikorski et Hieter, 1989) a été utilisée pour la construction des souches KRE33-MYC et YS1-YS7 et comme contrôle négatif dans les expériences d'immunoprécipitation (IP) anti-MYC entre les protéines Kre33 et Dbp4.

La souche KRE33-MYC a été obtenue suite à l'introduction d'un épitope 9×MYC fusionné au marqueur de sélection auxotrophe *TRP1* (MYC/TRP1) par recombinaison homologue en aval de la région du génome qui code pour la protéine Kre33 (Knop *et al.*, 1999). Cette souche a été utilisée comme contrôle négatif dans les expériences d'immunoprécipitation anti-HA. Par la suite cette souche a été modifiée en remplaçant le promoteur naturel de *KRE33* par le promoteur inductible *GAL1* (souche *GAL*::KRE33-MYC); cette souche exprime la protéine Kre33 de façon conditionnelle et a été utilisée pour les expériences de complémentation avec la protéine Kre33

exprimée de façon constitutive à partir d'un plasmide (souche GAL::KRE33) ou avec des dérivées de Kre33 portant des mutations, soit une délétion de l'extension C-terminale (souche GAL::KRE33 Δ Ct) ou une délétion du motif NLS (souche GAL::KRE33 Δ NLS).

La série de souches YS1-YS7 a été générée à partir de YPH499, dans laquelle on a introduit un triple épitope HA (3 $\times$ HA) et le marqueur de sélection auxotrophe *HIS3* (HA/*HIS3*) en aval des régions du génome qui codent pour les protéines Utp22, Mpp10, Utp7, Enp1, Bfr2, Noc4 et Nop14, respectivement. Ces souches ont été utilisées comme contrôles négatifs dans les expériences d'immunoprécipitation anti-MYC. Les souches YSK1-YSK7 ont été utilisées pour les études d'immunoprécipitation avec des partenaires potentiels de Kre33. Elles ont été obtenues à partir de la souche KRE33-MYC, par insertion dans le génome de la cassette HA/*HIS3* à l'extrémité 3' des ORF encodant les protéines Utp22, Mpp10, Utp7, Enp1, Bfr2, Noc4 et Nop14, respectivement.

2.2 Milieux de culture

Les bactéries ont été inoculées dans du milieu LB (Luria-Bertani) (tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 85,5 mM), supplémenté avec de l'ampicilline (100 μ g/mL) ou de la kanamycine (50 μ g/mL), selon le cas. La croissance des levures a été faite dans du milieu YP (peptone 2%, extrait de levure 1%) contenant 2% de dextrose (YPD) ou 2% de galactose (YPGal) comme source de carbone. Du milieu YPGal supplémenté avec 200 μ g/mL de généticine ou des milieux sélectifs SD ou SGal («yeast nitrogen base» 0,67%, dextrose ou galactose 2%, respectivement) avec ou sans tryptophane (-Trp), histidine (-His), leucine (-Leu) ou uracile (-Ura) ont été utilisés au besoin. Dans chaque cas les milieux solides ont été obtenus en ajoutant de l'agar dans une concentration finale de 2%.

2.3 Oligonucléotides

Tous les oligonucléotides utilisés dans cette étude ont été synthétisés par la compagnie Integrated DNA Technologies (IDT). Les paires d'oligonucléotides KRE33-XmaI/KRE33-XhoI et KRE33-NotI/KRE33-KpnI ont été utilisées pour l'amplification, à partir de l'ADN génomique de la souche YPH499, de la séquence qui code pour la protéine Kre33 et son clonage dans les vecteurs pGBKT7 (Clontech) et pCM188-HA (Gari *et al.*, 1997), respectivement. Les paires KRE33-NotI/KRE33 Δ Ct-KpnI et KRE33-NotI/KRE33 Δ NLS-KpnI ont été utilisés pour l'amplification et le clonage dans le vecteur pCM188-HA des mutants de délétion de l'extension C-terminale et du motif NLS de Kre33 (Voir les Sections 2.9.2 et 2.14). Les oligonucléotides KRE33-640, KRE33-1322 et KRE33-2006 ont été synthétisés pour le séquençage de l'ORF *KRE33*, tandis que l'oligonucléotide anti-U3 (Soltanieh *et al.*, 2014) radio-marqué au P-32 a été utilisé pour détecter le snoRNA U3 par hybridation de type «northern» (voir dans la section 2.13) (Tableau 2.1).

Les paires d'oligonucléotides S3/S2 et F4/R2 (Tableau 2.2) ont été utilisés pour l'amplification des cassettes MYC/TRP1, HA/HIS3 et GAL1/KanMX6 (contient un gène de résistance à la généticine) à partir des vecteurs dérivés du plasmide pFA6a, selon les procédures décrites par Longtine *et al.* (1998) et Knop *et al.* (1999). Ces amorces contiennent des séquences complémentaires aux régions S3/S2 et F4/R2 des vecteurs pFA6a, fusionnées à des séquences de 50-55 nucléotides identiques aux régions de part et d'autre du codon de terminaison ou du codon d'initiation des protéines d'intérêt, respectivement. Elles ont été utilisées pour la construction des souches KRE33-MYC, YS1-YS7, YSK1-YSK7 et GAL::KRE33-MYC (voir dans la Section 2.9.1).

La dernière série d'amorces a été utilisée pour la vérification de l'intégration des cassettes MYC/TRP1, HA/HIS3 et GAL1/KanMX6 dans le génome de la levure. Ces

amorces contiennent des séquences de 20 à 40 nucléotides complémentaires aux régions du génome situées à une distance de 200-250 nucléotides du codon d'arrêt ou du codon d'initiation des protéines d'intérêt (Tableau 2.3).

Tableau 2.1
Oligonucléotides utilisés pour l'amplification et le séquençage
de la région qui code pour la protéine Kre33.

Les sites de restriction des enzymes *Xma*I, *Xho*I, *Not*I et *Kpn*I sont montrés en rouge

Nom	Séquence
KRE33- <i>Xma</i> I	5'-CCC CCCGGG TGCCAAAAAAGCTATCGATTCAAGA ATC-3'
KRE33- <i>Xho</i> I	5'-CGC CTCGAG GAGTAGAACGCTTAATTTGCAGCC-3'
KRE33- <i>Not</i> I	5'-AAATTT GCGGCCGC GAGAAAATGGCCAAAAAAGC TATCG-3'
KRE33- <i>Kpn</i> I	5'-CCC GGTACC GAGTAGAACGCTTAATTTGCAGCC-3'
KRE33ΔCt- <i>Kpn</i> I	5'-CCC GGTACC TTCAATTGATTGGCTTAACAGCTGA-3'
KRE33ΔNLS- <i>Kpn</i> I	5'-CCC GGTACC TTTGGCCTTGGCAGCTATTTCTAAA-3'
KRE33-640	5'-GTTCTACCGCTATCTGGTGCCA-3'
KRE33-1322	5'-AACAACACATCCGGTTCGGGAAAG-3'
KRE33-2006	5'-CGAGGGTAAATTCAGTACATGTC-3'
Anti-U3	5'-CCAAGTTGGATTCAAGTGGCTC-3'

Tableau 2.2

Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des cassettes MYC/TRP1, HA/HIS3 et GAL1/KanMX6 et l'intégration dans le génome de la levure.

Les régions S3-S2 et F4-R2 sont montrées en rouge.

Nom	Séquence
S3-KRE33	5'-AAGAGATGAAAGCTATGAAAAAACCAAGAAAGTCTAAAAAG GCTGCAAAT CGTACGCTGCAGGTCGAC -3'
S2-KRE33	5'-AAATTAAGTAAACGTTTAGCTATAAAAGGGTTTGACAAAGAGT AGAACGC ATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
F4-KRE33	5'-AAATAAAGTACGCAATAGAGTATATAAGCCAAGTCACCTTTTA TATTTCT GAATTCGAGCTCGTTTAAAC -3'
R2-KRE33	5'-CCATTCCTGATCAGTGACGGGATTCTTGAATCGATAGCTTTTTT GGCCAT CATTTTGAGATCCGGGTTTT -3'
S3-UTP22	5'-ATGAGATTGCTGCATTTCGGAATGACATGGTTATAAATTTGA GACAGAT CGTACGCTGCAGGTCGAC -3'
S2-UTP22	5'-TATTTAATATTATACAGATACTTCTAAAAGTTATGATTTTGTTG TTTATT ATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
S3-MPP10	5'-GTAAAACGAAGAAGAGCAGATCAGGGCCAGATAGCACAAATA TAAAACTT CGTACGCTGCAGGTCGAC -3'
S2-MPP10	5'-TGAAGAAATAATTTTTTACCTAAATACAACTAAGTCTTCTTCG GCGTGT ATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
S3-UTP7	5'-TTTCAGAAGACCACAAGGATGTCATCGAAGAGGCATTGAGCAG ATTCGGC CGTACGCTGCAGGTCGAC -3'
S2-UTP7	5'-TATATATACATACATAATCATTTAAGTTTTTTTTTTAAAGATATT TCGAT ATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
S3-ENP1	5'-AGTTTGTTGATCCACAGGAAGCTAATGATGATTTAATGATTGAT GTCAAT CGTACGCTGCAGGTCGAC -3'
S2-ENP1	5'-GGGGGAAAGACCGAGCGATATAAAATTGATGAAAAATTGATA TTACAGCA ATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
S3-BFR2	5'-AATGACGAAGAATTAGAGGCTGTTAAAAACGATGATATCCAAA TCTTTGGT CGTACGCTGCAGGTCGAC -3'
S2-BFR2	5'-TTATAAGCCCTAAATTAAATGAGTTGTGCGTATTTAAATAAAT GTATAT ATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
S3-NOC4	5'-ATAGCGAAGCGTCATCCCAAGGTAACGTCTACTTGCCTGGGGT AGCATGG CGTACGCTGCAGGTCGAC -3'
S2-NOC4	5'-TATAAATGTATATATACACACTTTTAAAACTTCGTTGTTTCATCT TCGCTT ATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
S3-NOP14	5'-CGGAAAAAACAAGTATGAAAGAGAAAGAAACTACGTGGCG GAAAGAAA CGTACGCTGCAGGTCGAC -3'
S2-NOP14	5'-TCTGAGAAGCCTAATAAGAAAAAAGAGGTTAATAAATTATTA TTATTGG ATCGATGAATTCGAGCTCG -3'

Tableau 2.3

Oligonucléotides utilisés pour la vérification de l'intégration des cassettes MYC/TRP1, HA/HIS3 et GAL1/KanMX6 dans le génome de la levure.

Nom	Séquence
KRE33checkCt-f	5'-AGTGAGGAATGGGCTGAATCTCAA-3'
KRE33checkCt-r	5'-GGGTTTCAGTTTTTCGCCGGCA-3'
KRE33checkNt-f	5'-GAAGAGCCAAGATACAATGAGATGAG-3'
KRE33checkNt-r	5'-AGCCCATAAGACGGACTTGTTTCAT-3'
UTP22checkCt-f	5'-GCCACTCTTCAAGGGAGCCCAC-3'
UTP22checkCt-r	5'-CTGAGCGTCGCCACAGCAGTAC-3'
MPP10checkCt-f	5'-AGAGAAGATAAAAACAGATTGCGCAGGGC-3'
MPP10checkCt-r	5'-GTATTTATGAGTGTATATGTTCCGCATCTCGTC-3'
UTP7checkCt-f	5'-GTAAGAATTCGGGTTTTCGTTCTTTTGC-3'
UTP7checkCt-r	5'-CAATCGATTCTCATACTGTCAACTTTTTGAACATG-3'
ENP1checkCt-f	5'-GCACAAGGCTTTCTTAACATTTGCACAACG-3'
ENP1checkCt-r	5'-GGCTAATATATAGGCCATATTTTGATGATTTCGATAG-3'
BFR2checkCt-f	5'-CGACCAAATCGATGAATTCTTTGCGG-3'
BFR2checkCt-r	5'-TGAAGAATTGTGCAGAGCAGCTGTTT-3'
NOC4checkCt-f	5'-CTCTCTGTGGGAGCTGGCGTC-3'
NOC4checkCt-r	5'-CGGGGATCAGCGGTTTCGATCC-3'
NOP14checkCt-f	5'-CCGTATCCATACCTACGCATGCTCC-3'
NOP14checkCt-r	5'-GAGAATCCCTTCCCTGTTTTAGAAATGAGTAG-3'

2.4 Préparation et transformation des bactéries compétentes

Pour la préparation des bactéries compétentes, la souche DH10B a été inoculée dans 10 mL de milieu LB et incubée à 37°C pendant toute la nuit, sous une agitation de 250 rpm. La pré-culture a été transférée dans un erlenmeyer contenant 500 mL de LB

et incubée dans les mêmes conditions jusqu'à une A_{600} de 0,6. La culture a ensuite été refroidie sur glace et centrifugée à 4000g et 4°C pendant 15 minutes. Le culot a été resuspendu dans 100 mL de solution TFB1 froide (KOAc 30 mM, KCl 100 mM, $MnCl_2$ 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, glycérol 15%). L'étape de centrifugation a été répétée et le culot a été resuspendu dans 20 mL de solution TFB2 froide (MOPS 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM, KCl 10 mM, glycérol 15%). Des aliquotes de 200 μ L, préparées dans 50% de glycérol (v/v) ont été congelées dans un bain de glace sèche/éthanol et puis conservées à -80°C.

Pour les transformations, 10 ng d'ADN plasmidique ou 50-100 ng de produit de ligation ont été mélangés avec 100 μ L des bactéries compétentes. Le mélange a été incubé sur la glace pendant 20-30 minutes, puis à 42°C pendant 2 minutes et ensuite gardé sur glace pendant 10 minutes. Après ajout de milieu LB (1 mL) le mélange a été incubé à 37°C pendant 1 heure avec une agitation (200 rpm). Finalement, 200 μ L du mélange ont été étalés sur une gélose contenant du LB et un antibiotique pour la sélection, soit de l'ampicilline (100 μ g/mL) ou de la kanamycine (50 μ g/mL), selon le cas. Les géloses ont été incubées à 37°C jusqu'à l'apparition des colonies.

2.5 Préparation et transformation des levures compétentes

La préparation et transformation des levures compétentes ont été faites selon la méthode de Gietz *et al.* (1992). Brièvement, 60 mL d'une culture de levure en phase exponentielle ont été centrifugés à une vitesse de 1200g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot a été lavé avec de l'eau stérile et resuspendu dans 300 μ L de solution TE/LiOAc froide (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, LiOAc 100 mM). Ensuite 100 ng d'ADN ont été mélangés avec 0,1 mg d'ADN «carrier» (« sheared hareng sperm DNA », Roche) et 100 μ L de cellules compétentes. Après l'ajout de 600 μ L d'une solution stérile de TE/PEG/LiOAc (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, PEG 40%, LiOAc 100 mM), le mélange a été incubé pendant 30

minutes à 30°C avec agitation (200 rpm). Juste avant de procéder à la transformation du DMSO a été ajouté à une concentration finale de 10%. Les tubes ont été incubés à 42°C pendant 15 minutes, puis 10 minutes dans la glace. Après quelques secondes de centrifugation à haute vitesse (13000g) le culot a été resuspendu dans 500 µL de solution TE stérile (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM). Finalement, 200 µL du mélange ont été étalés sur milieu riche (YP) ou sur milieu sélectif auxotrophe contenant du galactose ou du dextrose. Les plaques ont été incubées à 30°C jusqu'à l'apparition des colonies.

2.6 Extraction d'ADN génomique des levures

L'ADN génomique des levures a été préparé selon les procédures décrites par Hoffman et Winston (1987). Une colonie fraîche de levure a été inoculée dans un tube contenant 10 mL de milieu YPD ou YPGal stérile. La culture a été incubée à 30°C dans un agitateur (250 rpm) jusqu'à atteindre la phase stationnaire, puis centrifugée à température ambiante pendant 5 minutes à une vitesse de 1200g. Les cellules ont été resuspendues dans de l'eau nanopure puis centrifugées pendant 5 minutes, avant de resuspendre le culot dans 400 µL de tampon de lyse cellulaire (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, SDS 34,7 mM, Triton X-100 2%). Par la suite, 0,3g de billes de verre de 450-625 µm de diamètre (Sigma-Aldrich) et 400 µL d'une solution de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) ont été ajoutés au mélange. Après avoir mélangé dans un vortex pendant 3 minutes, l'échantillon a été centrifugé à 18000g pendant 5 minutes à température ambiante et la phase aqueuse a été transférée dans un tube Eppendorf propre. L'étape d'extraction avec phénol-chloroforme-alcool isoamylique a été répétée une deuxième fois et une troisième fois avec seulement le mélange chloroforme-alcool isoamylique (24:1) pour éliminer les résidus de phénol. La solution résultante a été mélangée avec 1 mL d'éthanol 100% et centrifugée à 18000g pendant 3 minutes à température ambiante. Le culot a été suspendu dans 400 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1

mM) puis incubé à 37°C pendant une demi-heure en présence de 30 µg de RNase A (Sigma-Aldrich). L'ADN a été précipité avec 1 mL d'éthanol 100% en présence de 0,04 mM d'acétate d'ammonium et centrifugé à vitesse maximale (18000g) pendant 3 minutes. Le culot été lavé avec de l'éthanol 70%, séché à température ambiante et puis resuspendu dans 200 µL de tampon TE. La quantification de l'ADN génomique a été faite avec un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2.7 Extraction des protéines de levures pour immunobuvardage

Les protéines des levures ont été extraites par la méthode de Kushnirov (2000). Quelques colonies d'une culture de levure en milieu solide ont été grattées et resuspendues dans 200 µL d'eau nanopure. Après avoir ajouté 200 µL d'une solution de NaOH 0,2N, le mélange a été bien agité à l'aide d'un vortex, incubé à température pièce pendant 5 minutes et puis centrifugé à vitesse maximale (18000g) pendant 1 minute. Le culot a immédiatement été resuspendu dans 50 µL de tampon de charge SDS 2X (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 138,7 mM, glycérol 20%, β-mercaptoéthanol 4%, bleu de bromophénol 0,01%). Les échantillons ont été chauffés pendant 5 minutes à 95°C, puis centrifugés à 18000g pendant quelques secondes. Le surnageant a été récupéré et analysé par électrophorèse de protéines (SDS-PAGE).

2.8 Analyse des protéines par immunobuvardage («western blotting»)

Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide 8% (Tris-HCl 380 mM pH 8,8, acrylamide/bisacrylamide (37,5:1) 8%, SDS 0,1%, APS 0,1% et TEMED 0,06%). La migration a été réalisée dans du tampon d'électrophorèse (Tris-base 25 mM, glycine 200 mM, SDS 3,5 mM, pH 8,3) à 100 V pendant 45-60 minutes, en utilisant le standard Precision Plus Protein™ All Blue de Bio-Rad comme marqueur de poids moléculaire. Les protéines du gel ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon-P, Millipore) préalablement traité au méthanol. Le transfert a été fait dans d'un appareil de transfert électrophorétique (Bio-Rad)

contenant du tampon Towbin (Tris-base 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%, pH 8,3), à 100 V pendant 30–40 minutes. Ensuite, la membrane a été incubée pendant 5 minutes dans une solution de Ponceau S (Ponceau S 0,1%, acide acétique 1%) afin de mettre en évidence la présence de protéines et d'évaluer la qualité du transfert. Puis la membrane a été rincée à l'eau distillée et incubée pendant 1 heure dans la solution de blocage contenant 5% de lait écrémé dissout dans du tampon TBS-T (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 154 mM, Tween-20 0,2%). Par la suite elle a été incubée 60 minutes dans la solution de blocage en présence de l'anticorps primaire: anti-myc monoclonal de souris (hybridome 9E10) dilué 1:200, anti-HA monoclonal de souris (hybridome 12CA5) dilué 1:200 ou anti-Dbp4 polyclonal de lapin dilué 1:1000), selon le cas. La membrane a été lavée trois fois avec du tampon TBS-T pendant 15 minutes au total puis incubée pendant 1 heure dans la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire approprié: anti-IgG de souris dilué 1:10000 ou anti-IgG de lapin dilué 1:100000 (GE Healthcare). Une seconde série de lavages a été effectuée après l'incubation. Ensuite la membrane a été traitée avec du «Western Chemiluminescent HRP Substrate» (Immobilon), selon le protocole du manufacturier et exposée à un film d'autoradiographie Hyblot CL (Denville Scientific).

2.9 Construction des souches de levures

2.9.1 Construction des souches KRE33-MYC, YS1-YS7, YSK1-YSK7 et GAL::KRE33-MYC

Les cassettes MYC/TRP1 et HA/HIS3 (voir Section 2.3) ont été amplifiées par PCR à partir des vecteurs pYM6 et pYM2, respectivement, selon les procédures décrites par Knop *et al.* (1999) en utilisant les oligonucléotides de la série S3/S2 (Tableau 2.2). La cassette GAL1/KanMX6 a été amplifiée par PCR avec les amorces F4-Kre33 et R2-Kre33 (Tableau 2.2) à l'aide du vecteur pFA6a-kanMX6-PGAL1 selon la procédure décrites par Longtine *et al.* (1999). Chaque réaction de PCR a été préparée dans 50

μL (volume final), contenant 20 ng du plasmide adéquat, 0,6 μM de chaque oligonucléotide, 200 μM d'un mélange de dNTP, le tampon de réaction à une concentration finale de 1X et 5 unités l'enzyme *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs). Dans tous les cas nous avons utilisé un programme de PCR de 30 cycles divisé en deux étapes: suite à un «hotstart» de 5 minutes à 95°C, la première étape d'amplification (10 cycles) consiste en 30 secondes de dénaturation à 95°C, 1 minute d'hybridation à 50°C et de 3 minutes d'extension à 68°C. La deuxième étape (20 cycles) a été effectuée par 30 secondes de dénaturation à 95°C, 1 minute d'hybridation à 60°C et 3 minutes d'extension à 68°C. La PCR se termine par 7 minutes d'extension à 68°C.

Les produits de PCR (aliquotes de 2 μL) ont été vérifiés sur un gel d'agarose 0,8% préparé dans du tampon TBE (Tris-HCl 89 mM pH 8,0, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM), en utilisant le standard 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) comme marqueur de poids moléculaire. Par la suite, les échantillons d'ADN ont été précipités avec 2.5 volumes d'éthanol 100% en présence de NaOAc 0,3 M pH 5,2 et 40 μg de glycogène (Roche), centrifugés à 14000 rpm et à 4°C pendant 20 minutes et resuspendus dans 10 μL d'eau nanopure stérile. Les produits de PCR contenant les cassettes MYC/TRP1 et HA/HIS3 ont été utilisés pour générer les souches KRE33-MYC et YS1-YS7, après transformation de la souche de levure YPH499, tandis que ceux contenant les cassettes HA/HIS3 et GAL1/KanMX6 ont été utilisés pour la construction des souches YSK1-YSK7 et GAL::KRE33-MYC, à partir de la souche KRE33-MYC (voir Sections 2.1 et 2.5). Les produits des transformations ont été étalés sur des géloses YPGal (supplémentées avec 200 $\mu\text{g/mL}$ de généticine), SD-Trp ou SD-Trp-His, selon le cas.

La vérification de l'intégration des cassettes dans le génome de chaque souche de levure a été réalisée par PCR. Les réactions ont été faites à partir de 100 ng d'ADN

génomique (voir épigraphe 2.6), en utilisant les amorces du Tableau 2.3 et l'enzyme *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs). Le programme de PCR utilisé a été le suivant: 5 minutes de dénaturation initiale à 95°C suivies de 30 cycles commençant par 30 secondes à 95°C, 1 minute d'hybridation à 51°C et 3 minutes d'extension à 68°C. Une extension terminale de 7 minutes a été faite à 68°C à la fin de la réaction. L'expression des protéines recombinantes Kre33-myc, Utp22-HA, Mpp10-HA, Utp7-HA, Enp1-HA, Bfr2-HA, Noc4-HA et Nop14-HA a été analysée par immunobuvardage avec des anticorps anti-myc ou anti-HA, selon le cas (voir la section 2.8).

2.9.2 Construction des souches GAL::KRE33, GAL::KRE33ΔCt et GAL::KRE33ΔNLS

La séquence qui code pour la protéine Kre33 a été amplifiée par PCR à partir de 100 ng d'ADN génomique de la souche YPH499, avec les amorces KRE33-NotI et KRE33-KpnI (Tableau 2.1). Ces oligonucléotides renferment les sites de restriction des endonucléases NotI et KpnI, respectivement. Pour l'amplification des mutants de délétion de l'extension C-terminale et du motif NLS de Kre33 les oligonucléotides KRE33-NotI, KRE33ΔCt-KpnI et KRE33ΔNLS-KpnI ont été utilisés. Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 50 µL avec l'enzyme *Pfu* Turbo DNA Polymerase (Agilent Technologies), en utilisant 5 minutes de dénaturation initiale à 95°C suivies de 30 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute d'hybridation à 60°C et 3 minutes d'extension à 72°C. Une extension de 7 minutes à 72°C a été faite à la fin de la réaction. Après vérification sur gel d'agarose 0,8%, les produits de PCR ont été digérés avec les enzymes de restriction *NotI* et *KpnI* (New England Biolabs) et clonés dans le plasmide pBluescript II SK(-) (pBS) (Agilent Technologies) à l'aide de l'enzyme T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Par la suite, des bactéries DH10B compétentes ont été transformées avec les produits de ligation (voir épigraphe 2.4) et la sélection des clones recombinants a été faite par analyse de restriction avec les

enzymes *NdeI*, *BglII*, *NotI* et *KpnI* (New England Biolabs). Les constructions obtenues (nommées pBS-KRE33, pBS-KRE33ΔCt et pBS-KRE33ΔNLS) ont été vérifiées par séquençage au Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill, en utilisant les oligonucléotides KRE33-640, KRE33-1322 et KRE33-2006 (voir Tableau 2.1).

La séquence qui code pour la protéine Kre33 et pour les mutants Kre33ΔCt et Kre33ΔNLS ont été digérées avec les enzymes *NotI* et *KpnI* à partir des plasmides pBS-KRE33, pBS-KRE33ΔCt et pBS-KRE33ΔNLS et clonées dans les mêmes sites de restriction dans le vecteur pCM188-HA. Ce vecteur contient un épitope HA après le site de clonage multiple et un marqueur de sélection auxotrophe *URA3*. Les plasmides recombinants ont été sélectionnés par analyse de restriction avec l'enzyme *BamHI* (New England Biolabs) et utilisés pour transformer la souche de levure GAL::KRE33-MYC (voir les sections 2.1 et 2.6). Les souches obtenues (nommées GAL::KRE33, GAL::KRE33ΔCt et GAL::KRE33ΔNLS) ont été sélectionnées dans du milieu solide SGal-Trp-Ura. L'expression des protéines recombinantes Kre33, Kre33ΔCt et Kre33ΔNLS a été vérifiée par immunobuvardage avec des anticorps anti-HA (voir épigraphe 2.8).

2.10 Préparation des extraits cellulaires de levures pour immunoprécipitations et gradients de saccharose

Pour la préparation des extraits cellulaires de levures, 30 mL d'une culture à A_{600} de 0,5 (15 unités A_{600}) ont été centrifugés à 1200g et à température pièce pendant 5 minutes, puis lavés avec de l'eau nanopure et resuspendus dans 0,4 mL de tampon d'extraction TMN100 froid (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, NP-40 0,1 %, cocktail d'inhibiteur de protéases Complete® de Roche) préparé dans des conditions «RNase-free». Des billes de verre (0,3-0,4 g) de 450-625 μm de diamètre (Sigma-Aldrich) ont été ajoutées au mélange et la lyse cellulaire a été

faite en alternant 45 secondes de vortex et 2 minutes dans la glace. Cette étape a été répétée 7 fois et les débris cellulaires ont été centrifugés à 2500g et à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant (extrait cellulaire) a été récupéré et maintenu dans la glace jusqu'à son utilisation pour les expériences d'immunoprécipitation (voir Section 2.12).

Pour les analyses sur gradients de saccharose, une quantité de cellules équivalente à 35 unités A_{600} (70 mL de culture à A_{600} de 0,5) a été incubée avec 100 µg/mL de cycloheximide dans un bain de glace pendant 10 minutes. La cycloheximide a été maintenue dans toutes les étapes suivantes. Après centrifugation, le culot de cellules a été resuspendu dans 0,5 mL de tampon d'extraction TMK100 froid (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, NP-40 0,1 %, cocktail d'inhibiteur de protéase Complete® de Roche) préparé dans des conditions «RNase-free», avant de procéder à la lyse cellulaire.

2.11 Gradients de densité de saccharose

Les extraits cellulaires de levures ont été préparés dans du tampon TMK100 contenant 100 µg/mL de cycloheximide, suivant la procédure décrite dans la Section 2.10. Ils ont ensuite été fractionnés dans des gradients linéaires de saccharose 7-47% (préparés dans du tampon TMK100), selon la procédure décrite par Foiani *et al.* (1991). Les gradients ont été centrifugés à 4°C dans un rotor Beckman SW41 à 39000 rpm pendant 2 heures et 45 minutes. Ensuite, 16 fractions ont été collectées à l'aide d'un collecteur à gradient ISCO équipé d'un détecteur UA-6 permettant une lecture continue de l'absorbance à 254 nm. Les profils de sédimentation ont été analysés afin de localiser les sous-unités ribosomiques 40S et 60S, les ribosomes 80S et les polysomes. Trente-cinq µL de chaque fraction ont été utilisés pour l'analyse du profil de sédimentation des protéines et 200 µl pour la détection des ARN.

2.12 Immunoprécipitations

Les extraits cellulaires de levures ont été préparés dans du tampon TMN100, suivant la procédure décrite dans l'épigraphie 2.10. Les fractions 7-9 des gradients de saccharose (pic de 80S) ont aussi été analysées par immunoprécipitation. Cinquante μL de billes de protéine A-agarose (Roche) ont été incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps monoclonal anti-myc (hybridome 9E10), un anticorps monoclonal anti-HA (hybridome 12CA5) ou avec un anticorps polyclonal anti-Dbp4 (Soltanieh *et al.*, 2014), selon les cas. Les billes ont été lavées trois fois avec du tampon TMN100 et incubées avec les échantillons sur un NutatorTM (BD diagnostics) pendant 1 heure à 4°C. Ensuite, elles ont été centrifugées à 500g pendant 30 secondes dans une centrifugeuse réfrigérée et lavées cinq fois avec du tampon TMN100. L'élution a été faite dans du tampon d'élution (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, SDS 17,4 mM) à 65°C pendant 10 minutes, puis les billes ont été centrifugées à 500g et à 4°C pendant 30 secondes. Le surnageant a été récupéré et la détection des protéines co-immunoprécipitées a été faite par immunobuvardage. Pour l'analyse des petits ARN, des extractions au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) ont été faites, suivies d'une précipitation à l'éthanol à -20°C pendant toute la nuit.

2.13 Hybridation de type «northern»

Après trois extractions successives au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) et une précipitation à l'éthanol, les ARN ont été centrifugés à 18000g pendant 30 minutes à 4°C puis resuspendus dans 10 μL d'eau nanopure, le tout dans des conditions «RNase-free». Les échantillons ont été mélangés avec 10 μL du tampon de charge (formamide 95%, EDTA 10 mM, xylène cyanol 0,1%, bleu de bromophénol 0,1%), chauffés à 95°C pendant 3 minutes puis mis sur glace immédiatement après chauffage. Par la suite, les ARN ont été séparés dans un gel de polyacrylamide 8% contenant de l'urée 8M. La migration a été effectuée dans du tampon TBE (Tris-HCl 89 mM pH 8,0, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM) à 10

watts pendant environ une heure et demie. Après la migration, les ARN ont été transférées sur une membrane Hybond-XL (GE Healthcare) dans du tampon TBE à 15 V et 250 mA pendant toute la nuit. La membrane a ensuite été exposée à la lumière UV dans un XL-1000 UV Crosslinker (Spectrolinker) et pré-incubée pendant 1 heure à 37°C dans du tampon d'hybridation contenant 5% de SSPE (NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,7), 5% de solution de Denhardt (Ficoll 0,1%, polyvinylpyrrolidone 0,1%, BSA 0,1%), 17,4 mM de SDS et 1 mg d'ARNt dénaturé. L'hybridation a ensuite été faite à 37°C avec la sonde radioactive anti-U3 (voir Tableau 2.1) qui reconnaît spécifiquement le snoRNA U3; la sonde a été marquée au P-32 par incubation avec la T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs) et de l'adénosine triphosphate γ -³²P (6000 Ci/mmol; PerkinElmer). Après une nuit d'incubation, la membrane a été lavée deux fois avec 50 mL de solution de lavage I (SSPE 5%, SDS 3,5 mM) et une troisième fois avec 100 mL de solution de lavage II (SSPE 0,5%, SDS 3,5 mM), pendant un total de 45 minutes. La membrane a été exposée à un écran au phosphore pendant toute la nuit puis révélée avec un Molecular Imager F/X™ (Bio-Rad).

2.14 Système double hybride de levure

2.14.1 Construction du vecteur pGBKT7-KRE33

Les oligonucléotides KRE33-XmaI et KRE33-XhoI (voir Tableau 2.1) ont été utilisés pour amplifier la séquence qui code pour la protéine Kre33. Ces amorces renferment les sites de restriction des endonucléases *Xma*I et *Xho*I, respectivement. L'amplification a été réalisée par PCR avec l'enzyme *Pfu* Turbo DNA Polymerase (Agilent Technologies) incubée avec 100 ng d'ADN génomique de la souche YPH499 dans un volume final de 50 µl. Le programme de PCR utilisé a été le suivant: 5 minutes d'amplification initiale à 95°C suivies de 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95°C, 1 minute d'hybridation à 58°C et 3 minutes d'extension à

72°C. Une extension terminale de 7 minutes à 72°C a été faite à la fin de la réaction. Après vérification sur gel d'agarose 0,8%, le produit de PCR a été digéré avec les enzymes de restriction *Xma*I et *Xho*I (New England Biolabs) et cloné dans le plasmide pBluescript II SK(-) (pBS) (Agilent Technologies). Les clones recombinants ont été sélectionnés par analyse de restriction avec les enzymes *Nde*I, *Bgl*II, *Xma*I et *Xho*I (New England Biolabs) et vérifiés par séquençage au Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill avec les oligonucléotides KRE33-640, KRE33-1322 et KRE33-2006 (Tableau 2.1). Par la suite, la séquence qui code pour la protéine Kre33 a été digérée avec les enzymes *Xma*I et *Xho*I et clonée dans les mêmes sites de restriction dans le vecteur pGBKT7 (Clontech). Ce vecteur contient un épitope MYC entre le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription *GAL4* (DNA-BD) et le site multiple de clonage, ainsi que le marqueur de sélection auxotrophe *TRP1*. Le vecteur recombinant obtenu a été nommé pGBKT7-KRE33. Ce vecteur sera utilisé avec les plasmides pGADT7-DBP4, pGADT7-BFR2, pGADT7-ENP2 et pGADT7-LCP5 (disponibles au laboratoire) pour l'analyse des interactions de Kre33 avec les protéines Dbp4, Bfr2, Enp2 et Lcp5. Le vecteur pGADT7 (Clontech) contient un épitope HA entre le domaine d'activation du facteur de transcription *GAL4* (AD) et le site multiple de clonage, ainsi que le marqueur de sélection auxotrophe *LEU2*.

2.14.2 Tests d'auto-activation et analyse des interactions protéine-protéine

Le vecteur recombinant pGBKT7-KRE33 a été co-transformé avec chacun des plasmides pGADT7-DBP4, pGADT7-BFR2, pGADT7-ENP2 et pGADT7-LCP5 dans la souche de levure AH109 (voir les sections 2.1 et 2.6). Des combinaisons entre chacun de ces vecteurs recombinants et les vecteurs pGADT7 ou pGBKT7 vides ont été utilisées pour les tests d'auto-activation. La sélection des transformants a été faite par étalement sur gélose SD-Trp-Leu et l'expression des protéines recombinantes a été vérifiée par immunobuvardage avec des anticorps anti-myc ou anti-HA, selon le

cas (voir la section 2.8). Les tests d'auto-activation du gène rapporteur *HIS3* et l'analyse des interactions protéine-protéine ont été réalisés par «spots assays». Les cellules ont été cultivées dans 10 mL de milieu SD-Trp-Leu jusqu'à une A_{600} de 0,5-0,7. Après, elles ont été centrifugées à 1200g pendant 5 minutes, lavées trois fois et resuspendues dans l'eau stérile. Des dilutions en série 1/10 à partir d'une A_{600} de 1 ont été faites et déposées sur géloses SD-Trp-Leu-His supplémentées ou non avec 2 mM, 5 mM, 10 mM et 20 mM de 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT).

2.15 Courbes de croissance

Une colonie fraîche de levure a été inoculée dans un erlenmeyer contenant 50 mL de milieu YPGal ou SGal-Trp-Ura stérile, selon le cas. La culture a été incubée dans un agitateur à 250 rpm et 30°C jusqu'à une A_{600} de 0,6. Par la suite, les cellules ont été centrifugées à 1200g pendant 5 minutes, lavées trois fois avec de l'eau stérile et puis resuspendues à une A_{600} de 0,1 dans du milieu YPD ou SD-Trp-Ura stérile, préchauffés à 30°C. Les cultures ont été maintenues en phase exponentielle ($A_{600} < 0,8$), en faisant des dilutions dans du milieu YPD ou SD-Trp-Ura frais. Des mesures de densité optique à 600 nm (A_{600}) ont été prises à chaque heure pendant une période de 50 heures après le changement de galactose à dextrose.

2.16 Expériences de complémentation en milieu solide

Les expériences de complémentation ont été réalisées par «spots assays». Pour cela la souche GAL::KRE33-MYC transformée avec le vecteur pCM188-HA vide et les souches GAL::KRE33, GAL::KRE33 Δ Ct et GAL::KRE33 Δ NLS ont été inocuées dans 10 mL de milieu SGal-Trp-Ura liquide. Les cultures ont été incubées à 30°C jusqu'à une A_{600} de 0,5-0,7, puis centrifugées à 1200g pendant 5 minutes. Par la suite, les cellules ont été lavées trois fois et resuspendues à une A_{600} de 1 dans l'eau stérile. Des dilutions en série 1/10 ont été faites à partir de ces suspensions et déposées en

points successifs sur géloses SGal-Trp-Ura ou SD-Trp-Ura. Les plaques ont été incubées à 30°C pendant 3-5 jours, jusqu'à l'apparition des colonies.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Kre33 est associée avec des composants du SSU processome dans un complexe de 80S

Kre33 est une protéine nucléolaire essentielle à la viabilité cellulaire et qui contient des motifs conservés acétyltransférase (GNAT), ATPase et ARN hélicase. (Giaever *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003; Chimnaronk *et al.*, 2009). Quelques études ont montré que Kre33 est nécessaire à la maturation de la petite sous-unité 40S du ribosome, mais le rôle spécifique de cette protéine dans la biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes n'est pas élucidé (Li *et al.*, 2009; Ebersberger *et al.*, 2014). La première question qu'on peut se poser à propos de cette problématique est si Kre33 est un constituant du SSU («small subunit») processome, un gros complexe ribonucléoprotéique d'environ 80S qui est essentiel au processus de maturation de l'ARNr 18S chez les eucaryotes (Dragon *et al.*, 2002; Charette et Baserga, 2010).

Pour répondre à cette question nous avons choisi huit protéines du SSU processome à partir du répertoire des partenaires potentiels de Kre33 dans les bases de données BioGRID (<http://thebiogrid.org/>), DIP (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/Main.cgi>) et STRING (<http://string.embl.de/>). Ces protéines du SSU processome sont: Utp22, Mpp10, Utp7, Enp1, Bfr2, Dbp4, Noc4 et Nop14 (Dragon *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2004; Kühn *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 2009; Pérez-Fernández *et al.*, 2011; Eswara *et al.*, 2012; Jakob *et al.*, 2012; Soltanieh *et al.*, 2014). Par la suite, nous avons construit 15 souches de levure à partir de la souche YPH499 de *Saccharomyces cerevisiae* et nous avons étudié les interactions de Kre33 avec chacune de ces protéines par co-immunoprécipitation. Pour cela nous avons introduit

par recombinaison homologue un épitope 9×MYC fusionné au marqueur de sélection *TRP1* en aval de la région du génome qui code pour la protéine Kre33 (souche KRE33-MYC), dans le but de la détecter avec des anticorps anti-MYC. La cassette MYC/TRP1 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pYM6 (Knop *et al.*, 1999) et utilisée pour transformer la souche YPH499. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification contiennent des séquences identiques aux régions de part et d'autre du codon de terminaison de la protéine Kre33, ce qui permet la recombinaison homologue avec le génome de la levure. De façon similaire et à partir des souches YPH499 et KRE33-MYC nous avons généré 14 autres souches de levure qui contiennent un épitope 3×HA et le marqueur de sélection auxotrophe *HIS3* après la région C-terminale des protéines Utp22, Mpp10, Utp7, Enp1, Bfr2, Noc4 et Nop14, respectivement (souches YS1-YS7 et YSK1-YSK7). Les souches YS1-YS7, obtenues à partir de la souche YPH499, ont été utilisées comme contrôles négatifs dans les expériences d'immunoprécipitation (Figure 3.1).

La sélection des clones transformants a été faite dans du milieu sélectif SD-Trp, SD-His ou SD-Trp-His. L'intégration des cassettes MYC/TRP1 et/ou HA/HIS3 dans le génome a été vérifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de chaque souche. Les amorces utilisées pour l'amplification sont complémentaires aux régions du génome situées à une distance de 200-250 nucléotides du codon de terminaison des protéines d'intérêt. En conséquence, dans les cas des clones qui ont intégré la cassette MYC/TRP1 au bon endroit nous avons observé une bande d'environ 1,9 kb, tandis qu'une bande de 2,1-2,2 kb a été détectée dans ceux qui ont intégré correctement la cassette HA/HIS3. Une bande de 400-500 pb a été amplifiée dans les cas de clones négatifs. L'intégration de la cassette HA/HIS3 dans le génome des souches YSK1-YSK7 est montrée comme exemple dans la Figure 3.2.

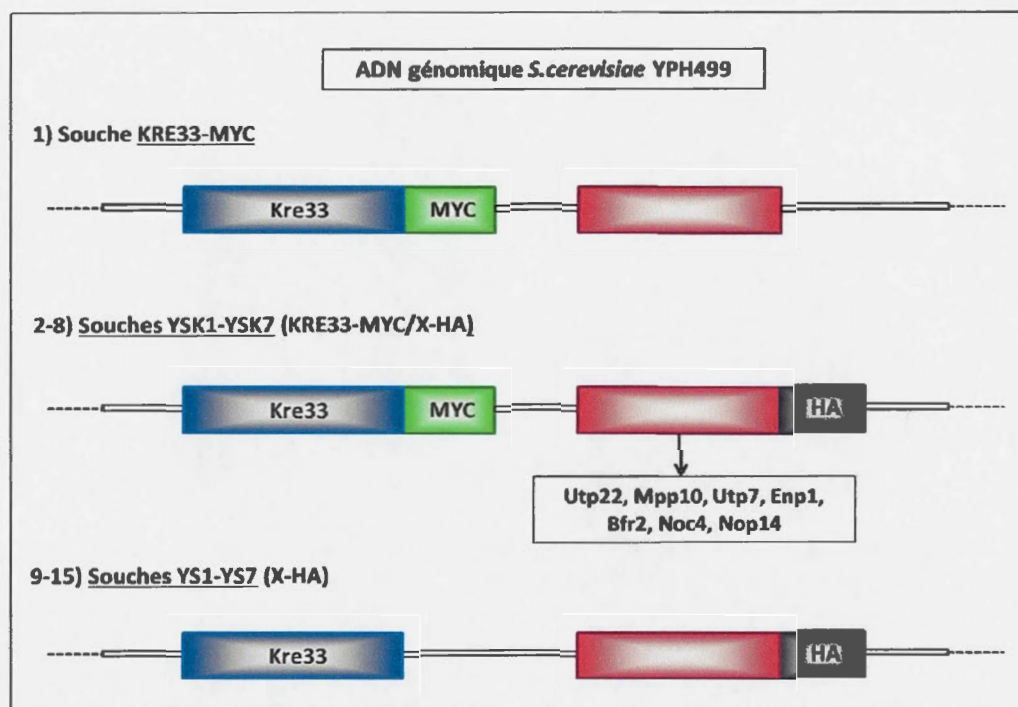


Figure 3.1 Construction des souches KRE33-MYC, YSK1-YSK7 et YS1-YS7. Les cassettes MYC/TRP1 et HA/HIS3 ont été amplifiées par PCR et introduits par recombinaison homologue dans le génome de la souche YPH499 de *Saccharomyces cerevisiae*. La souche KRE33-MYC contient la cassette MYC/TRP1 en aval de la région du génome qui code pour la protéine Kre33. Les souches YSK1-YSK7 et YS1-YS7 ont été obtenues par insertion de la cassette HA/HIS3 à l'extrémité 3' des ORF encodant les protéines Utp22, Mpp10, Utp7, Enp1, Bfr2, Noc4 et Nop14, dans le génome des souches Kre33-MYC et YPH499, respectivement.

L'expression des protéines recombinantes a été vérifiée par immunobuvardage avec des anticorps anti-MYC, anti-HA ou anti-Dbp4. Des bandes d'environ 130 kDa, 144 kDa, 70 kDa, 66 kDa, 58 kDa, 65 kDa, 67 kDa, 98 kDa et 87 kDa ont été détectées pour les protéines Kre33-MYC, Utp22-HA, Mpp10-HA, Utp7-HA, Enp1-HA, Bfr2-HA, Noc4-HA, Nop14-HA et Dbp4, respectivement. Des produits de dégradation protéolytique ont été observés dans quelques cas. Suite à des expériences

d'immunoprécipitation (IP) avec des anticorps anti-MYC et une immunodétection avec des anticorps anti-Dbp4 et anti-HA, nous avons détecté une association physique de Kre33 avec la plupart des protéines du SSU processome testées, sauf avec la protéine Dbp4, alors qu'aucun signal n'a été observé dans les contrôles négatifs dû à l'absence de l'épitope MYC. La précipitation de la protéine Kre33 a été confirmée avec des anticorps anti-MYC dans tous les cas (Figure 3.3).

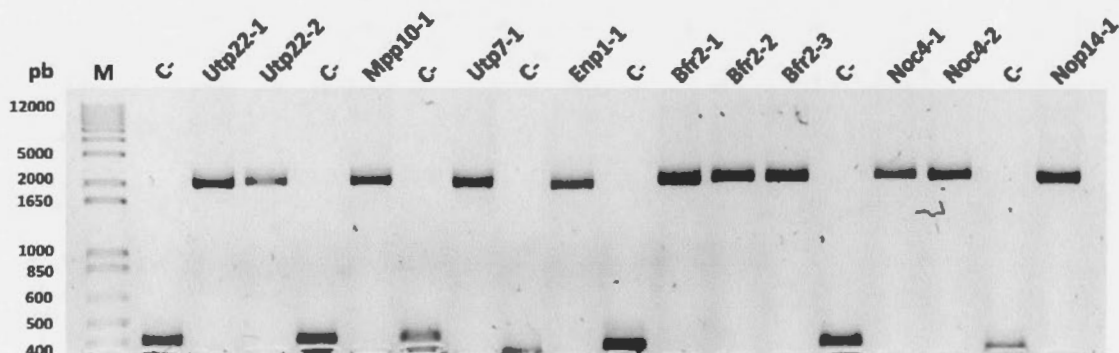


Figure 3.2 Vérification de l'intégration de la cassette HA/HIS3 dans le génome des souches YSK1-YSK7. L'intégration de la cassette HA/HIS3 après la région du génome qui code pour les protéines Utp22, Mpp10, Utp7, Enp1, Bfr2, Noc4 et Nop14 dans les souches YSK1-YSK7 (générées à partir de la souche KRE33-MYC) a été vérifiée par PCR. Des bandes de 2,0-2,1 kb ont été détectées pour les clones positifs dans un gel d'agarose 0,8%. Le standard 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire (M). L'ADN génomique de la souche Kre33-MYC a été utilisé comme contrôle négatif (C-).

L'interaction de Kre33 avec chacun des partenaires potentiels a été confirmée dans une immunoprécipitation (IP) anti-HA. Aucune bande n'a été observée dans le cas du contrôle négatif (souche KRE33-MYC), puisque cette souche ne contient pas de protéines marquées avec l'épitope HA. Une association entre Kre33 et la protéine Dbp4 a été aussi détectée dans une immunoprécipitation avec des anticorps anti-Dbp4. Dans ce cas des billes de protéine A-agarose non-couplées à l'anticorps anti-

Dbp4 et incubées avec l'extrait cellulaire de la souche Kre33-MYC ont été utilisées comme contrôle négatif. La précipitation des protéines Utp22-HA, Mpp10-HA, Utp7-HA, Enp1-HA, Bfr2-HA, Noc4-HA, Nop14-HA et Dbp4 a été vérifiée avec des anticorps anti-HA ou anti-Dbp4 (Figure 3.4). Ces résultats montrent que Kre33 interagit *in vivo* avec plusieurs composantes du SSU processome.

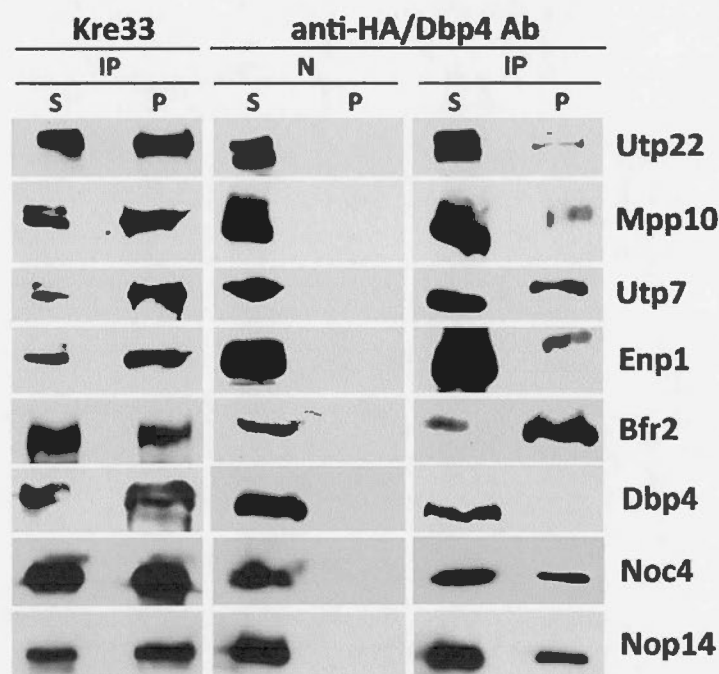


Figure 3.3 Kre33 co-précipite avec des composants du SSU processome dans une IP anti-MYC. Les extraits cellulaires des souches YPH499, YS1-YS7 (contrôles négatifs) et YSK1-YSK7 ont été incubés avec des billes de protéine A-agarose couplées à des anticorps anti-MYC. Les protéines co-immunoprécipitées ont été détectées par immunobuvardage avec des anticorps anti-HA, anti-MYC ou anti-Dbp4. N: contrôle négatif; S: surnageant de départ (5% de l'extrait cellulaire); P: protéines co-immunoprécipitées.

Par la suite nous avons procédé à l'analyse du profil de sédimentation de Kre33. Les extraits cellulaires des souches KRE33-MYC et YSK1-YSK7 ont été fractionnés dans des gradients linéaires de saccharose 7-47%. Après 2 heures et 45 minutes

d'ultracentrifugation nous avons collecté les fractions et nous avons détecté les protéines par immunobuvardage avec des anticorps anti-MYC, anti-HA ou anti-Dbp4. Nous avons trouvé que Kre33 co-sédimente avec toutes les protéines partenaires testées dans un complexe de 80S, ce qui correspond au coefficient de sédimentation du SSU processome, et qu'elle sédimente aussi dans un plus petit complexe d'environ 40-50S (Figure 3.5).

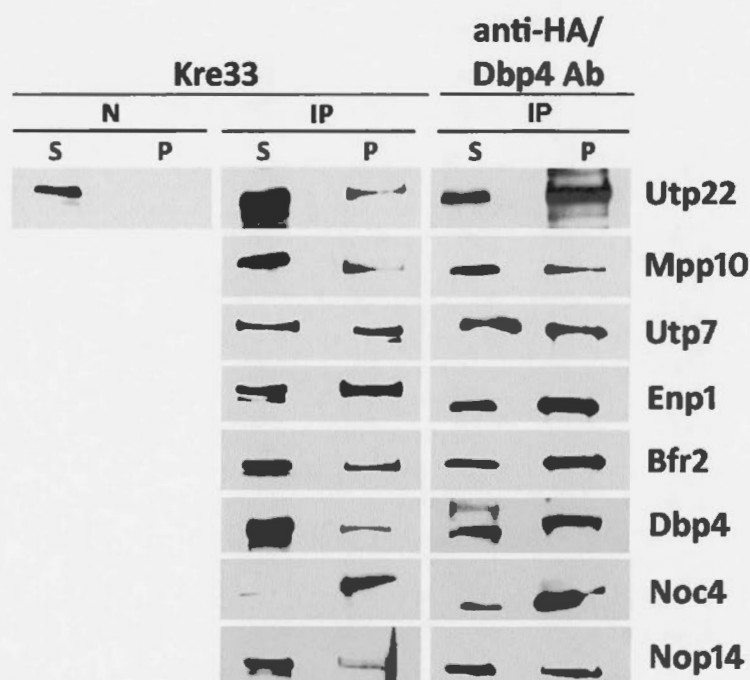


Figure 3.4 Kre33 co-précipite avec des composants du SSU processome dans une IP anti-HA/anti-Dbp4. Les extraits cellulaires des souches Kre33-MYC (contrôle négatif) et YSK1-YSK7 ont été incubés avec des billes de protéine A-agarose couplées à des anticorps anti-HA ou anti-Dbp4. Des billes de protéine A-agarose non-couplées ont été incubées avec l'extrait cellulaire de la souche Kre33-MYC et utilisées comme contrôle négatif dans le cas de l'IP anti-Dbp4. Les protéines co-immunoprécipitées ont été détectées par immunobuvardage avec des anticorps anti-MYC, anti-HA ou anti-Dbp4. N: contrôle négatif; S: surnageant de départ (5% de l'extrait cellulaire); P: protéines co-immunoprécipitées.

Les fractions 7, 8 et 9 des gradients de saccharose (pic de 80S) ont été mélangées et analysées par IP avec des billes de protéine A-agarose couplées à des anticorps anti-MYC (IP anti-MYC) ou anti-Dbp4 (IP anti-Dbp4). Des billes de protéine A-agarose non-couplées (BA) ont été incubées avec les fractions 7-9 d'un deuxième gradient et utilisées comme contrôle négatif dans chaque cas. Après les lavages avec du tampon, l'élution et l'analyse des protéines par immunobuvardage nous avons observé une co-précipitation de Kre33 avec la protéine Dbp4 dans l'IP anti-Dbp4, ainsi que de tous les autres partenaires avec la protéine Kre33 dans le cas des IP anti-MYC. Aucune interaction n'a été observée dans les contrôles négatifs. Ces résultats indiquent que Kre33 a des interactions avec ces protéines du SSU processome dans un complexe de 80S (Figure 3.6).

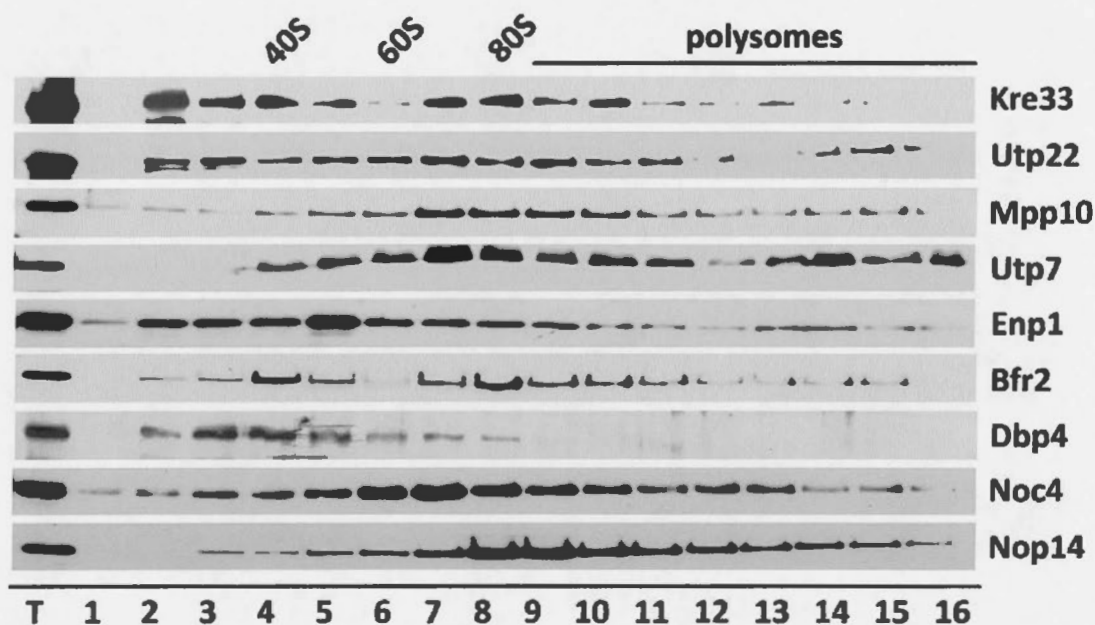


Figure 3.5 Analyse du profil de sédimentation de Kre33 et des composants du SSU processome. Les extraits cellulaires des souches Kre33-MYC et YSK1-YSK7 ont été fractionnés dans un gradient linéaire de saccharose (7-47%). Les protéines ont été détectées par immunobuvardage avec des anticorps anti-MYC, anti-HA ou anti-Dbp4. T: extrait total.

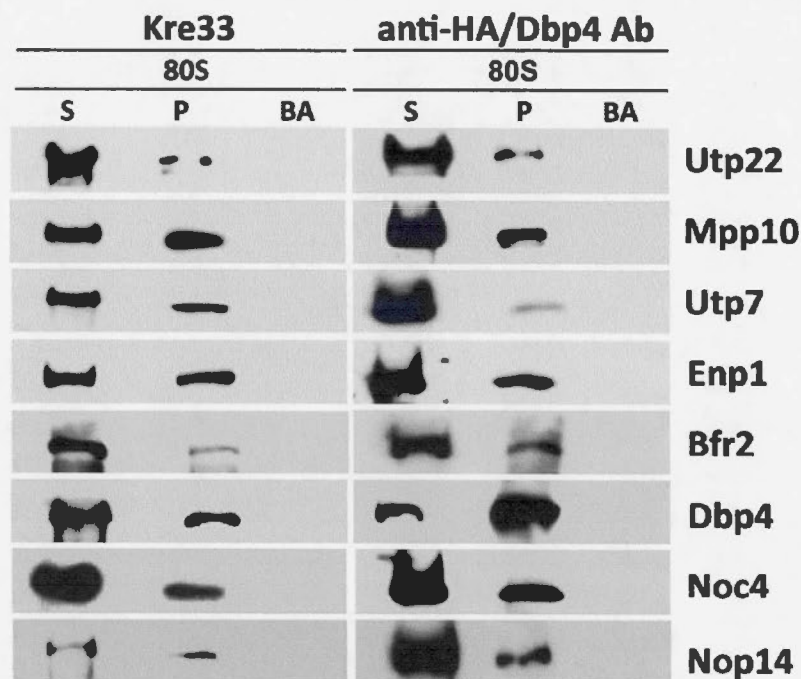


Figure 3.6 Kre33 co-précipite avec des composants du SSU processome dans un complexe de 80S. Les fractions 7-9 des gradients de saccharose (pic de 80S) ont été mélangées et incubées avec des billes de protéine A-agarose, couplées à des anticorps anti-MYC ou anti-Dbp4. Les protéines co-immunoprécipitées ont été détectées par immunobuvardage avec des anticorps anti-HA, anti-MYC ou anti-Dbp4. BA: «beads alone» (contrôle négatif); S: surnageant de départ (5% de l'extrait cellulaire); P: protéines co-immunoprécipitées.

3.2 Kre33 interagit fortement avec la protéine Bfr2

Dans la section 3.1 nous avons démontré que Kre33 est associée *in vivo* avec plusieurs protéines du SSU processome. Dans le but de trouver des partenaires proches de Kre33, nous avons analysé l'interaction de cette protéine avec quelques composantes de ce gros complexe en utilisant le système double hybride chez la levure. Pour cela nous avons amplifié la séquence d'ADN qui code pour Kre33 à

partir de l'ADN génomique de la souche YPH499 et nous avons cloné cette séquence dans les sites *Xma*I et *Xho*I du vecteur pGBKT7 (Clontech). Le vecteur recombinant obtenu, nommé pGBKT7-KRE33, contient la séquence de la protéine Kre33 fusionnée à un épitope MYC et au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription *GAL4* (DNA-BD). Les constructions pGADT7-DBP4, pGADT7-BFR2, pGADT7-ENP2 et pGADT7-LCP5, générés dans notre laboratoire à partir du plasmide pGADT7 (Clontech), contiennent les séquences des protéines Dbp4, Bfr2, Enp2 et Lcp5, respectivement, fusionnées à un épitope HA et au domaine d'activation du facteur de transcription *GAL4* (AD). L'interaction de Kre33 avec une des protéines testées permettra de reconstituer le facteur de transcription *GAL4* et d'activer la transcription du gène rapporteur *HIS3* chez la levure.

Par la suite, la souche AH109 de *S. cerevisiae* a été co-transformée avec des combinaisons du vecteur pGBKT7-KRE33 et chacun des plasmides pGADT7-DBP4, pGADT7-BFR2, pGADT7-ENP2 et pGADT7-LCP5. L'expression des protéines recombinantes Kre33-MYC, Dbp4-HA, Enp2-HA, Bfr2-HA et Lcp5-HA a été vérifiée par immunobuvardage avec des anticorps anti-MYC ou anti-HA, en utilisant la souche AH109 transformée avec les vecteurs pGBKT7 et pGADT7 vides comme contrôle négatif. L'auto-activation du gène rapporteur *HIS3* par les différentes constructions a été examinée en combinaison avec les vecteurs pGADT7 ou pGBKT7 (selon le cas) et des résultats négatifs ont été obtenus dans tous les cas. Nous avons trouvé une interaction double hybride entre Kre33 et les protéines Bfr2 et Dbp4 dans du milieu sélectif sans histidine. Cette interaction est très forte dans le cas de la protéine Bfr2 puisque l'utilisation de concentrations de 20 mM de 3-amino-1,2,4-triazole (un inhibiteur du produit du gène *HIS3*) (Van Criekeing et Beyaert, 1999), n'empêche pas la croissance sur milieu sélectif (Figure 3.7). Ceci suggère que Bfr2 pourrait être un partenaire direct de Kre33 dans le SSU processome.

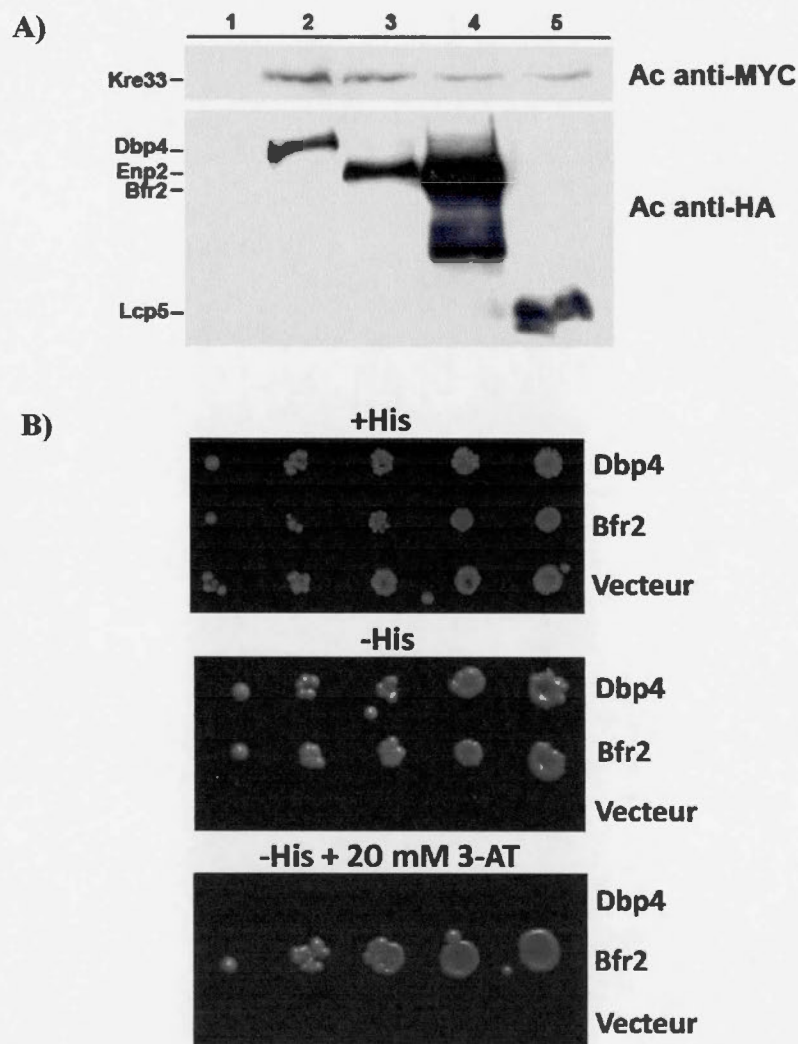


Figure 3.7 Analyse des partenaires potentiels de Kre33 en utilisant le système double hybride chez la levure. **A)** La protéine appât (Kre33) et les protéines proies (Dbp4, Enp2, Bfr2 et Lcp5) ont été exprimées dans la souche AH109 à l'aide des constructions dérivées des vecteurs pGBKT7 et pGADT7, respectivement. 1. pGBKT7/pGADT7 (contrôle négatif); 2. pGBKT7-KRE33/pGADT7-DBP4, 3. pGBKT7-KRE33/pGADT7-ENP2, 4. pGBKT7-KRE33/pGADT7-BFR2, 5. pGBKT7-KRE33/pGADT7-LCP5. **B)** L'analyse des interactions protéine-protéine a été réalisée par «spots assays» dans du milieu minimum sans histidine, en absence ou en présence de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT).

3.3 Kre33 interagit *in vivo* avec le petit ARN nucléolaire U3

Le SSU processome est constitué du petit ARN nucléolaire U3 (snoRNA U3) et de plus de 72 protéines ribosomiques et non ribosomiques (Dragon *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2011). Dans le but de déterminer si Kre33 est associée avec le snoRNA U3 nous avons incubé l'extrait cellulaire des souches KRE33-MYC et YPH499 (contrôle négatif) avec des billes de protéine A-agarose préalablement couplées à des anticorps anti-MYC (IP anti-MYC). Après l'élution les ARN ont été séparés dans un gel dénaturant de polyacrylamide et transférés sur une membrane de nylon. Après l'hybridation avec une sonde radioactive spécifique pour le snoRNA U3 et l'exposition de la membrane à un écran au phosphore, nous avons détecté une association entre Kre33 et le snoRNA U3 dans l'extrait total de la souche Kre33-MYC. Aucun signal n'a été observé dans le cas de la souche contrôle négatif YPH499 (Figure 3.8). Finalement, l'ensemble de résultats obtenus dans les sections 3.1, 3.2 et 3.3 permet de conclure que la protéine Kre33 est un nouveau constituant du SSU processome.

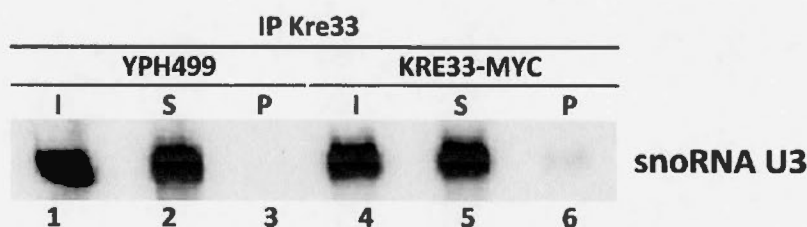


Figure 3.8 Kre33 interagit avec le petit ARN nucléolaire U3 (snoRNA U3). Les extraits cellulaires des souches YPH499 (contrôle négatif) et Kre33-MYC ont été incubés avec des billes de protéine A-agarose, couplées à des anticorps anti-MYC. Les ARN ont été séparés dans un gel dénaturant de polyacrylamide 8%, transférés sur une membrane de nylon et incubés avec une sonde radioactive marquée au ^{32}P , spécifique pour le snoRNA U3. I: «input» (10% de l'extrait cellulaire); S: surnageant (10% de l'extrait cellulaire après l'immunoprécipitation); P: culot («pellet»).

Dans le but de déterminer si les motifs de l'extension C-terminale sont essentiels à la viabilité de *S. cerevisiae* nous avons remplacé le promoteur naturel de *KRE33* par le promoteur inductible *GAL1* dans la souche KRE33-MYC. Cette nouvelle souche, nommée GAL::KRE33-MYC, exprime la protéine Kre33 de façon conditionnelle, ce qui permettra d'évaluer l'effet de mutations dirigées dans l'extension C-terminale par des expériences de complémentation. Pendant la cinétique de déplétion de Kre33-MYC (incubation de la souche GAL::KRE33-MYC en milieu liquide contenant du dextrose comme source de carbone), nous avons observé une réduction importante de la croissance cellulaire. Cet effet s'est mis en évidence à partir de 13 heures de déplétion, tandis que les souches YPH499 et KRE33-MYC, utilisées comme des contrôles, se sont maintenues en phase exponentielle jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 3.10).

Ensuite, nous avons amplifié la séquence d'ADN qui code pour la protéine Kre33 et pour deux mutants de délétion de l'extension C-terminale (Kre33 Δ Ct) et du motif NLS (Kre33 Δ NLS). Les produits de PCR ont été vérifiés par séquençage, insérés aux sites *NotI* et *KpnI* dans le vecteur pCM188-HA et les constructions obtenues ont été utilisées pour transformer la souche GAL::KRE33-MYC. L'expression des protéines recombinantes dans les souches GAL::KRE33, GAL::KRE33 Δ Ct et GAL::KRE33 Δ NLS a été mise en évidence avec des anticorps monoclonaux anti-HA, alors qu'aucun signal n'a été détecté dans le cas de la souche GAL::KRE33-MYC transformée avec le vecteur pCM188-HA vide (contrôle négatif) (Figure 3.11 A).

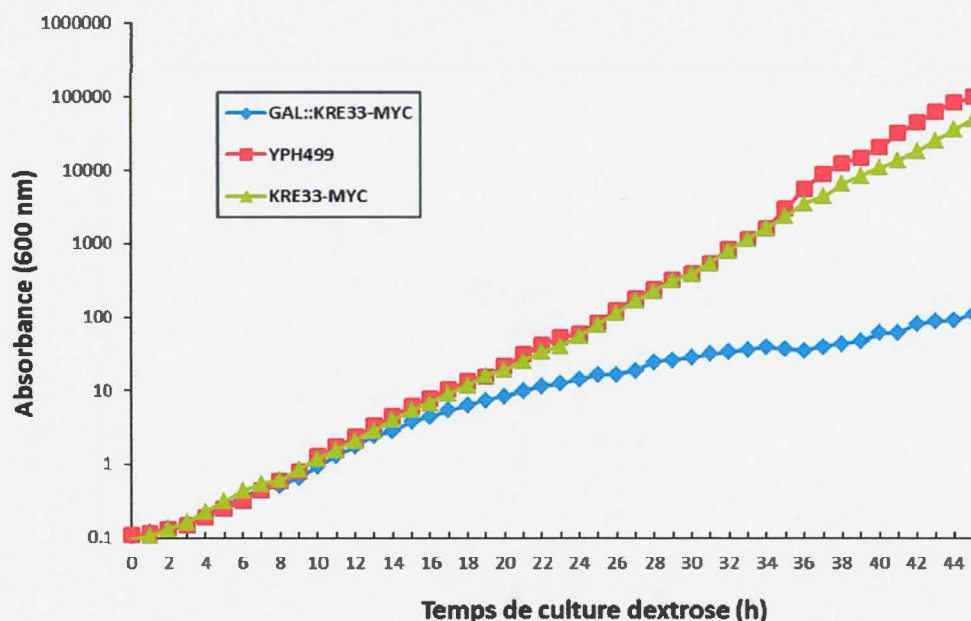


Figure 3.10 Cinétique de déplétion de Kre33 dans la souche GAL::KRE33-MYC. Les souches YPH499, KRE33-MYC et GAL::KRE33-MYC ont été cultivées dans du milieu YPGal puis transférées dans le milieu YPD et maintenues en phase exponentielle pendant toute l'expérience. Des mesures de densité optique à 600 nm ont été prises à chaque heure pendant un période de 45 heures après le changement de galactose à dextrose.

La capacité des protéines recombinantes Kre33, Kre33 Δ Ct et Kre33 Δ NLS de remplacer la fonction de la protéine Kre33 endogène a été évaluée par des expériences de complémentation sur milieu solide en absence de galactose (pas d'expression de la protéine Kre33-MYC endogène). La croissance de la souche GAL::KRE33 a été similaire en présence de galactose ou de dextrose comme source de carbone, contrairement à la souche contrôle négatif. Ce résultat indique que la protéine exprimée à partir du vecteur pCM188-KRE33 est capable de suppléer la fonction de la protéine Kre33 endogène. Par contre, nous avons observé un phénotype de croissance ralentie des mutants Kre33 Δ Ct et Kre33 Δ NLS en absence de galactose (Figure 3.11 B). Ces résultats ont été confirmés dans une cinétique de

complémentation en milieu liquide à partir des 18 heures post-déplétion (Figure 3.12), ce qui suggère que l'extension C-terminale et en particulier son motif NLS sont importants pour la fonction de Kre33.

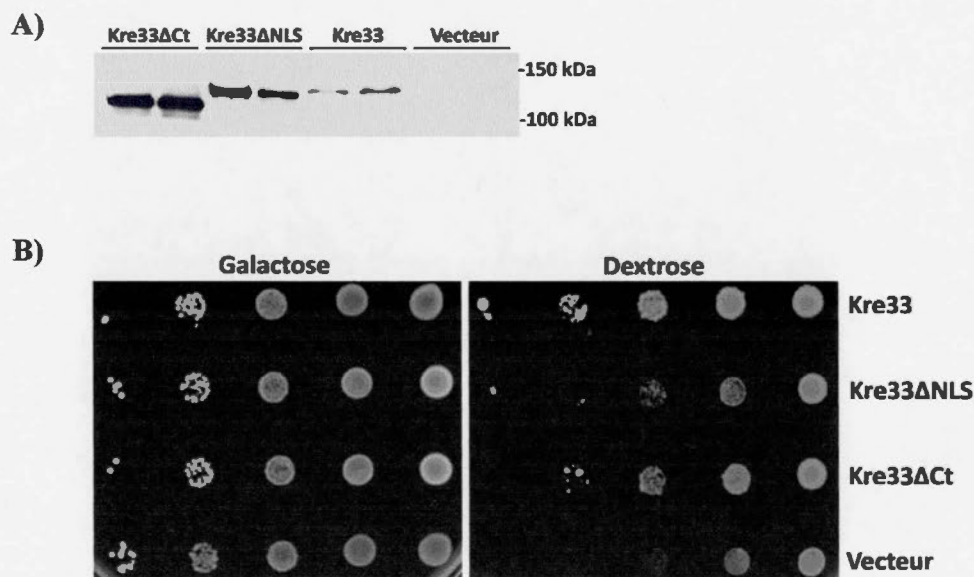


Figure 3.11 Expériences de complémentation avec les protéines recombinantes Kre33, Kre33ΔCt et Kre33ΔNLS. **A)** Les extraits protéiques ont été obtenus à partir des souches GAL::KRE33, GAL::KRE33ΔCT, GAL::KRE33ΔNLS et de la souche GAL::KRE33-MYC transformée avec le vecteur pCM188-HA. Les protéines recombinantes (de deux clones différents dans chaque cas) ont été détectées par immunobuvardage avec des anticorps anti-HA. **B)** Expériences de complémentation en milieu solide. Des dilutions en série 1/10 à partir des cultures en phase exponentielle ont été déposées en points successifs sur des géloses contenant du galactose ou du dextrose comme source de carbone.

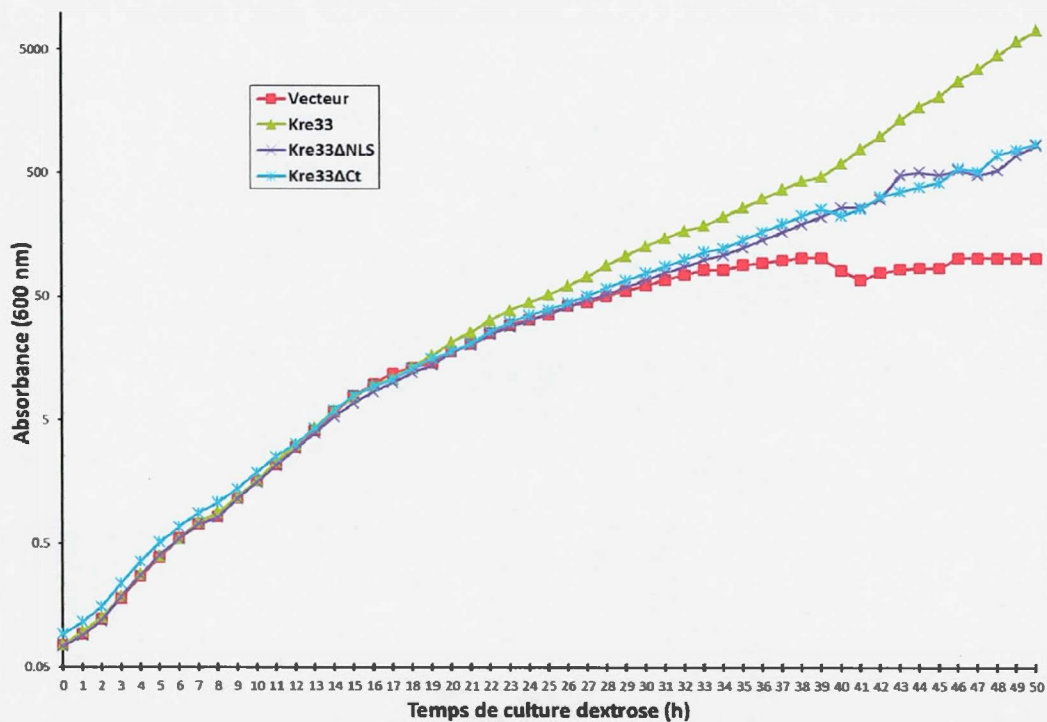


Figure 3.12 Cinétique de complémentation des protéines recombinantes Kre33, Kre33ΔCt et Kre33ΔNLS. Les souches de levure GAL::KRE33, GAL::KRE33ΔCT, GAL::KRE33ΔNLS et la souche GAL::KRE33-MYC transformée avec le vecteur pCM188-HA ont été cultivées dans du milieu YPGal puis transférées dans le milieu YPD et maintenues en phase exponentielle pendant toute l'expérience. Des mesures de densité optique à 600 nm ont été prises chaque heure pendant un période de 50 heures après le changement de galactose à dextrose.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le SSU processome est un énorme complexe ribonucléoprotéique d'environ 80S qui est essentiel à la maturation de l'ARNr 18S chez les eucaryotes, spécifiquement au niveau des clivages A0, A1 et A2 du pré-ARNr 35S. Il est composé par le petit ARN nucléolaire U3 et plus de 72 protéines ribosomiques et non ribosomiques (Dragon *et al.*, 2002; Bleichert *et al.*, 2006; Charrette et Baserga, 2010; Lim *et al.*, 2011). Quelques protéines du SSU processome sont incorporées au pré-ARNr 35S de façon individuelle ou en faisant partie des sous-complexes UTP-A/tUTP, UTP-B, UTP-C, Bms1/Rcl1, Mpp10/Imp3/Imp4 ou Dbp4/Bfr2/Enp2 (Gallagher *et al.*, 2004; Krogan *et al.*, 2004; Perez-Fernandez *et al.*, 2011; Soltanieh *et al.*, 2014). Cependant, il existe d'autres sous-complexes dont le mécanisme d'assemblage dans le SSU processome est inconnu et il y a aussi des composantes de ce complexe qui n'ont pas été identifiées. De plus, la fonction spécifique de plusieurs de ces protéines dans le processus de maturation de l'ARNr 18S et de la sous-unité 40S du ribosome n'est pas élucidée (Lim *et al.*, 2011; Phipps *et al.*, 2011; Soltanieh *et al.*, 2014).

4.1 Kre33 est une composante du SSU processome eucaryote

Kre33 est une protéine nucléolaire essentielle à la viabilité de *S. cerevisiae* et à la maturation de la petite sous-unité du ribosome. Sa co-purification avec d'autres protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes (Lebaron *et al.*, 2005; Dosil, 2011; Pérez-Fernández *et al.*, 2011) suggère qu'elle fonctionne dans le contexte d'un ou plusieurs complexes dans la cellule. Cependant, l'identification de nouvelles interactions protéine-protéine par purification par affinité (TAP: «tandem-affinity purification») et spectrométrie de masse peut conduire à des résultats très hétérogènes et à l'isolement de plusieurs complexes, tous contenant la protéine appât. Par ailleurs,

si une protéine est présente dans plusieurs complexes, ils ne seront pas tous isolés avec la même efficacité dû aux faits que certains composants sont associées de manière transitoire et que l'épitope utilisé pour l'étiquetage de la protéine appât peut devenir inaccessible dans différents complexes et conditions physiologiques. Quelques partenaires ou complexes peuvent ne pas être détectés dû à des variations dans leur solubilité ou à l'instabilité de l'interaction avec la protéine appât ou avec les partenaires intermédiaires. De plus, cette méthode ne fournit pas d'information sur l'orientation des composants dans les complexes (Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002; Milkereit *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus ici montrent que Kre33 co-précipite avec les huit protéines du SSU processome testées. Quelques unes de ces protéines ont déjà été décrites comme faisant partie d'un des sous-complexes autonomes du SSU processome, comme c'est le cas des protéines Utp22 (sous-complexe UTP-C), Mpp10 (sous-complexe Mpp10/Imp3/Imp4), Bfr2 et Dbp4 (sous-complexe Dbp4/Bfr2/Enp2) (Gallagher *et al.*, 2004; Krogan *et al.*, 2004; Perez-Fernandez *et al.*, 2011; Soltanieh *et al.*, 2014). L'existence d'un sous-complexe du SSU processome contenant les protéines Noc4 et Nop14 a été aussi proposée (Kühn *et al.*, 2009). L'interaction de Kre33 avec des protéines faisant partie de sous-complexes différents élimine la possibilité que les résultats obtenus dans les expériences d'immunoprécipitation (IP) soient dus exclusivement à des associations transitoires ou dans le contexte d'un autre complexe dans la cellule, et favorisent plutôt l'hypothèse que Kre33 est une vraie composante du SSU processome.

On note également que sept des huit protéines ont co-précipité avec Kre33 dans une IP anti-MYC (anti-Kre33), sauf la protéine Dbp4 (voir Figures 3.3 et 3.4). Ce phénomène a déjà été décrit dans des études antérieures sur l'interaction de Dbp4 avec ses partenaires Enp2 et Bfr2 et semble être la conséquence de différences dans la quantité des protéines co-précipitées, qui dans le cas de Dbp4 a été en dessous des

limites de détection (Soltanieh *et al.*, 2014). Cette hypothèse est appuyée par les faits que seulement une petite fraction de Dbp4 sédimente dans la région qui correspond au pic de 80S et qu'elle est plutôt présente dans un plus petit complexe (voir Figure 3.5) (Turner *et al.*, 2009; Soltanieh *et al.*, 2014), suggérant que son association avec le SSU processome est transitoire et dépendante de l'état physiologique.

Le profil de sédimentation de Kre33 dans un gradient de saccharose indique qu'une grande quantité de cette protéine sédimente à environ 80S, ce qui correspond au coefficient de sédimentation du SSU processome (voir Figure 3.5). Les IP faites à partir des fractions isolées des gradients ont aussi révélé qu'elle a des interactions physiques avec plusieurs protéines du SSU processome dans un complexe de 80S (voir Figure 3.6). De plus, une association entre Kre33 et le snoRNA U3 a été démontrée par hybridation de type «northern» après une IP anti-myc (IP anti-Kre33) (voir Figure 3.8). Des études antérieures ont signalé que Kre33 est une protéine nucléolaire et qu'elle est essentielle à la maturation de la sous-unité 40S du ribosome (Grandi *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009; Ebersberger *et al.*, 2014). Ces éléments appuient les résultats mentionnés ci-dessus et permettent de conclure de Kre33 est un nouveau composant du SSU processome. Des études ultérieures seront nécessaires afin de déterminer le rôle spécifique de Kre33 dans les étapes de maturation de l'ARNr 18S.

4.2 Kre33 interagit fortement avec la protéine Bfr2

Dans cette étude nous avons analysé l'interaction de Kre33 avec quelques composantes du SSU processome en utilisant le système double hybride chez la levure. Nos résultats ont mis en évidence l'existence d'une interaction forte entre Kre33 et la protéine Bfr2, dans du milieu sélectif dépourvu d'histidine et contenant 20 mM 3-AT, un inhibiteur du produit du gène *HIS3* (Van Crielinge et Beyaert, 1999) (voir Figure 3.7), ce qui suggère que Kre33 et Bfr2 pourraient interagir directement

l'une avec l'autre. Cette idée est soutenue par les faits que nous avons aussi trouvé une interaction entre Kre33 et Dbp4 (dans du milieu sélectif sans histidine) et qu'une interaction directe entre les protéines Dbp4 et Bfr2 a été déjà démontrée (Soltanieh *et al.*, 2014). Nonobstant, les résultats obtenus ici ne permettent pas d'exclure la possibilité que l'interaction entre Kre33 et Bfr2 nécessite l'intervention d'une troisième protéine et des études futures par «GST-pulldown» seront nécessaires pour confirmer notre hypothèse.

4.3 Kre33 sédimente dans un complexe de 40-50S

Dans nos études nous avons trouvé que, en plus du complexe 80S, une fraction importante de Kre33 sédimente dans un plus petit complexe d'environ 40-50S. Un comportement similaire a été observé pour les protéines Enp1, Dbp4 et Bfr2 (voir la Figure 3.5). Dbp4 est présente dans un sous-complexe du SSU processome de 40-50S contenant aussi les protéines Bfr2 et Enp2 et le snoRNA U14 (Soltanieh *et al.*, 2014). Le profil de sédimentation de Kre33 ainsi que la forte interaction double hybride avec Bfr2 suggèrent qu'elle pourrait appartenir à ce sous-complexe. Nonobstant, il existe toujours la possibilité que Kre33 soit incorporée au SSU processome de façon individuelle ou en faisant partie d'un autre sous-complexe non-identifié et que l'association avec Bfr2 se passe uniquement dans le contexte du SSU processome, comme prérequis à l'incorporation de Kre33 ou du sous-complexe Dbp4/Bfr2/Enp2.

La protéine Enp1 est une composante du SSU processome et du pré-ribosome 40S, ce qui peut expliquer son profil de sédimentation. Sa localisation dans la cellule est principalement nucléolaire mais quelques études ont aussi montré qu'elle reste associée au pré-ARNr 20S dans le noyau (Grandi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 2003; Léger-Silvestre *et al.*, 2004). D'autres partenaires d'Enp1 dans le pré-ribosome 40S sont Lvt1, Tsr1, Rrp12, Hrr25 et Dim1 (Léger-Silvestre *et al.*, 2004). De façon similaire à Enp1, il est aussi possible que Kre33 soit relâchée du

SSU processome et qu'elle reste associée au pré-ARNr 20S et aux protéines du pré-ribosome 40S pendant son exportation vers le noyau ou vers le cytoplasme. Une étude récente avec l'homologue humain de Kre33, la protéine NAT10, a montré qu'elle est partiellement co-localisée au noyau (Larrieu *et al.*, 2014), ce qui pourrait appuyer cette idée. Cependant, NAT10 a été associée avec des multiples processus cellulaires comme la cytokinèse (Shen *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2013; Larrieu *et al.*, 2014), la régulation de l'activité de la télomérase (Lv *et al.*, 2003; Fu et Collins, 2007) et la réponse aux dommages à l'ADN (Liu *et al.*, 2007). Donc, on ne peut pas non plus exclure la possibilité que Kre33 soit une protéine multifonctionnelle et que, en conséquence, elle ait des interactions dans le contexte d'autres complexes. Des expériences supplémentaires d'immunoprécipitation, de sédimentation dans des gradients de saccharose et de complémentation seront nécessaires pour pouvoir répondre à toutes ces questions.

4.4 L'extension C-terminale de Kre33 contient des éléments fonctionnels importants

Kre33 contient une extension C-terminale et des régions internes qui sont uniques aux eucaryotes, ce qui indique qu'elle a des fonctions différentes de son homologue bactérien TmcA. De plus, nos analyses bioinformatiques ont montré que l'extension C-terminale de Kre33 contient un motif d'interaction protéine-protéine de type «coiled-coil» (acides aminés 940-992) et un signal de localisation nucléaire (NLS) (acides aminés 1019-1056) (voir Figure 3.9). Même si la séquence d'acides aminés dans l'extension C-terminale de Kre33 n'est pas conservée chez les eucaryotes, nos prédictions bioinformatiques montrent que cette région contient toujours un motif «coiled-coil» et un NLS. Comme exemples nous pouvons mentionner les cas des homologues de Kre33 chez *Bos taurus* («coiled-coil»: acides aminés 910-952; NLS: acides aminés 989-1026), *Drosophila melanogaster* («coiled-coil»: acides aminés 906-939; NLS: acides aminés 969-1005), *Danio rerio* («coiled-coil»: acides aminés 909-961; NLS: acides aminés 990-1025), *Gallus gallus* («coiled-coil»: acides aminés

909-957; NLS: acides aminés 988-1019), *Xenopus tropicalis* («coiled-coil»: acides aminés 898-959; NLS: acides aminés 989-1022), *Mus musculus* («coiled-coil»: acides aminés 910-952; NLS: acides aminés 989-1024) et chez l'humain (*Homo sapiens*) («coiled-coil»: acides aminés 908-952; NLS: acides aminés 989-1025).

Dans ce projet nous avons évalué la capacité de deux mutants de délétion de l'extension C-terminale (Kre33 Δ Ct) et du motif NLS (Kre33 Δ NLS) de remplacer la fonction de la protéine Kre33 endogène. La détection des protéines recombinantes a été effectuée par immunobuvardage avec des anticorps anti-HA (voir la Figure 3.11 A). Les différences dans l'intensité des signaux obtenus peuvent être attribuées à des variations dans l'efficacité de la rupture ou dans la quantité de cellules utilisées pour l'obtention des extraits. Toutefois, nous avons analysé deux clones différents dans chaque cas, et il semble avoir toujours une augmentation des niveaux d'expression des mutants Kre33 Δ Ct et Kre33 Δ NLS par rapport à Kre33. Nous pourrions expliquer cet effet par une augmentation dans la demi-vie des protéines mutantes en raison de variations dans leur vitesse de synthèse ou de dégradation et en réponse au stress cellulaire généré. Il sera donc nécessaire d'effectuer un dosage des protéines et de charger des quantités égales de protéines totales sur gel pour pouvoir bien démontrer que les mutants Kre33 Δ Ct et Kre33 Δ NLS sont plus stables que Kre33.

Nos expériences de complémentation avec les protéines mutantes (voir Figures 3.11 B et 3.12) ont montré que l'absence de l'extension C-terminale ou du motif NLS provoque un ralentissement de la croissance de la levure, ce qui indique que ces régions sont importantes pour la fonction de Kre33. Nous vérifions maintenant la localisation cellulaire des mutants Kre33 Δ Ct et Kre33 Δ NLS et l'effet de mutations ponctuelles dans des résidus spécifiques du motif NLS. Ceci va nous permettre de déterminer si les résultats obtenus dans les expériences de complémentation sont vraiment dus à la perte des fonctions des motifs de l'extension C-terminale et non à des changements dans la conformation de la protéine, provoqués par la délétion de

plusieurs acides aminés. Il est important de souligner que nous n'avons pas observé de phénotype létal (similaire à celui observé pour le contrôle négatif) dans aucun des cas, ce qui était attendu de la perte de fonction du motif NLS. Des analyses bioinformatiques de la séquence de Kre33 ont montré qu'elle contient un deuxième motif NLS dans sa portion N-terminale (acides aminés 60-87). Des protéines avec plusieurs motifs NLS ont été déjà décrites (Sheng *et al.*, 2004; Boyne et Whitehouse, 2006). Il est donc possible que ce NLS additionnel ou une autre protéine nucléolaire interagissant avec Kre33 (Sirri *et al.*, 2008; Emmott et Hiscox, 2009) soient capables de la diriger vers le noyau même en absence du motif NLS C-terminal. Finalement, nous avons observé un comportement similaire du mutant Kre33 Δ Ct par rapport au mutant Kre33 Δ NLS en absence de galactose, ce qui suggère que le motif «coiled-coil» n'est pas essentiel à la fonction de Kre33. Nous évaluerons l'effet de la délétion du motif «coiled-coil» sur la viabilité cellulaire pour confirmer cette hypothèse.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Des défauts dans l'assemblage, la maturation ou les fonctions des ribosomes entraînent de sérieuses maladies, communément appelées ribosomopathies. Ces maladies sont provoquées par des mutations dans les gènes codants pour des protéines ribosomiques ou dans les gènes des protéines ou des snoRNA qui participent dans les mécanismes de biogenèse des ribosomes (Freed *et al.*, 2010; Narla et Ebert, 2010). D'autre part, les cellules cancéreuses présentent une synthèse de ribosomes suractivée, qui est essentielle à leur hyper-prolifération. Des études récentes ont aussi montré que certaines protéines ribosomiques peuvent réguler des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs comme p53 et p14^{ARF} (Dundr, 2012; Burger et Eick, 2013; Sloan *et al.*, 2014), mais les particularités des liens entre le cancer et la biogenèse des ribosomes sont encore incompris. Donc, une meilleure compréhension de ce processus cellulaire pourrait servir comme ligne directrice pour le développement de nouvelles thérapies pour le traitement des ribosomopathies et du cancer.

Dans ce projet, nous avons montré que la protéine nucléolaire Kre33 co-sédimente et interagit avec Utp22, Mpp10, Utp7, Enp1, Bfr2, Dbp4, Noc4 et Nop14 dans un complexe de 80S et qu'elle est associée *in vivo* au petit ARN nucléolaire U3. Ces résultats indiquent qu'elle est une composante du SSU processome, un complexe ribonucléoprotéique nécessaire à la maturation de l'ARNr 18S chez les eucaryotes. Nous avons trouvé que Kre33 sédimente également dans un plus petit complexe d'environ 40-50S et aussi qu'elle a une forte interaction avec Bfr2, ce qui suggère que cette protéine pourrait être un partenaire direct de Kre33 dans le SSU processome. Finalement, nous avons démontré par mutagenèse dirigée et par des

expériences de complémentation que l'extension C-terminale de Kre33 et en particulier le motif NLS sont importants pour la fonction de cette protéine chez *S. cerevisiae*. Nous vérifions présentement la localisation cellulaire des mutants Kre33 Δ Ct et Kre33 Δ NLS et nous allons évaluer l'effet de la délétion du motif «coiled-coil» sur la viabilité cellulaire.

Nos travaux futurs porteront sur la description du mécanisme d'assemblage de Kre33 dans le SSU processome et sur la détermination de son rôle dans les étapes de maturation de l'ARNr 18S. Pour cela nous allons identifier les composants du SSU processome qui sont des partenaires directs de Kre33 et nous allons élucider l'ordre et la dynamique d'assemblage dans le SSU processome par des expériences de déplétion et de sédimentation dans des gradients de saccharose. Les composants du complexe 40-50S, ainsi que d'autres partenaires cellulaires de Kre33 seront identifiés par immunoprécipitation, hybridation de type «northern», «UV-induced protein-RNA cross-linking and analysis of cDNAs» (CRAC) et par spectrométrie de masse. Nous allons aussi étudier l'effet de mutations dirigées dans les motifs «coiled-coil», NLS (N-terminal et C-terminal) et les motifs conservés acétyltransférase, ATPase et ARN hélicase de Kre33, afin d'élucider si son activité enzymatique est requise aux étapes de maturation de l'ARNr 18S et si les régions uniques aux eucaryotes sont essentielles à la survie cellulaire et à la fonction de cette protéine. Finalement, dans le but de déterminer si la fonction de Kre33 dans la biogenèse des ribosomes est conservée chez l'humain et si cette protéine est impliquée dans d'autres mécanismes cellulaires chez les eucaryotes, nous allons réaliser une étude comparative de la fonction de Kre33 par rapport à son homologue NAT10 à partir d'expériences de complémentation chez la levure et chez les cellules humaines en culture.

RÉFÉRENCES

- Abdelmohsen, K. et Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biology*, 9(6), 799-808.
- Ablack, J. N. G., Cohen, M., Thillainadesan, G., Fonseca, G. J., Pelka, P., Torchia, J. et Mymryka, J. S. (2012). Cellular GCN5 Is a Novel Regulator of Human Adenovirus E1A-Conserved Region 3 Transactivation. *J. Virol.*, 86(15), 8198-8209.
- Ahmad, Y., Boisvert, F. M., Gregor, P., Cobley, A. et Lamond, A. I. (2009) NOP db: Nucleolar proteome database: 2008 update. *Nucleic Acid Res.*, 37(Database issue), D181-D184.
- Albert, B., Leger-Silvestre, I., Normand, C., Ostermaier, M. K., Perez-Fernandez, J., Panov, K. I., Zomerdijs, J. C., Schultz, P. et Gadai, O. (2011). RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle. *J. Cell Biol.*, 192(2), 277-293.
- Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I. et Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, 433(7021), 77-83.
- Ando, Y., Tomaru, Y., Morinaga, A., Burroughs, A. M., Kawaji, H., Kubosaki, A., Kimura, R., Tagata, M., Ino, Y., Hirano, H., Chiba, J., Suzuki, H., Carninci, P. et Hayashizaki, Y. (2011). Nuclear pore complex protein mediated nuclear localization of dicer protein in human cells. *PLoS One*, 6(8), e23385.
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstråle, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlén, S., Hydbring, P., Söderberg, O., Grummt, I., Larsson, L.G. et Wright, A. P. (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.*, 7(3), 303-310.
- Axt, K., French, S. L., Beyer, A. L. et Tollervey, D. (2014). Kinetic analysis demonstrates a requirement for the Rat1 exonuclease in cotranscriptional pre-rRNA cleavage. *PLoS One*, 9(2), e85703.
- Berciano, M. T., Novell, M., Villagra, N. T., Casafont, I., Bengoechea, R., Val-Bernal, J. F. et Lafarga, M. (2007). Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. *J. Struct. Biol.*, 158(3), 410-420.

Bernstein, K. A. et Baserga, S. J. (2004). The Small Subunit Processome Is Required for Cell Cycle Progression at G1. *Mol. Biol. Cell*, 15(11), 5038-5046.

Bernstein, K. A., Gallagher, J. E., Mitchell, B. M., Granneman, S. et Baserga, S. J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryot. Cell*, 3(6), 1619-1626.

Birbach, A., Bailey, S. T., Ghosh, S. et Schmid, J. A. (2004). Cytosolic, nuclear and nucleolar localization signals determine subcellular distribution and activity of the NF-kappaB inducing kinase NIK. *J. Cell Sci.*, 117(16), 3615-3624.

Bleichert, F., Granneman, S., Osheim, Y. N., Beyer, A. L., Baserga, S. J. (2006). The PINc domain protein Utp24, a putative nuclease, is required for the early cleavage steps in 18S rRNA maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(25), 9464-9469.

Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascue, J. et Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(7), 574-585.

Boocock, G. R., Morrioson, J. A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P. R. et Rommens, J. M. (2003). Mutations in SBDS are associated with Schwachman-Diamond syndrome. *Nat. Genet.*, 33(1), 97-101.

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.

Boyne, J. R. et Whitehouse, A. (2006). Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(41), 15190-15195.

Burger, K. et Eick, D. (2013). Functional ribosome biogenesis is a prerequisite for p53 destabilization: impact of chemotherapy on nucleolar functions and RNA metabolism. *Biol. Chem.*, 394(9), 1133-1143.

Burroughs, A. M., Ando, Y., de Hoon, M. J., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y. et Daub, C. O. (2011). Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol.*, 8(1), 158-177.

Casafont, I., Bengoechea, R., Navascue, J., Pena, E., Berciano, M. T. et Lafarga, M. (2007). The giant fibrillar center: a nucleolar structure enriched in upstream binding factor (UBF) that appears in transcriptionally more active sensory ganglia neurons. *J. Struct. Biol.*, 159(3), 451-461.

Catez, F., Erard, M., Schaerer-Uthurralt, N., Kindbeiter, K., Madjar, J. J. et Diaz, J. J. (2002). Unique motif for nucleolar retention and nuclear export regulated by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.*, 22(4), 1126-1139.

Cawood, R., Harrison, S. M., Dove, B. K., Reed, M. L. et Hiscox, J. A. (2007). Cell cycle dependent nucleolar localization of the coronavirus nucleocapsid protein. *Cell Cycle*, 6(7), 863-867.

Charette, J. M. et Baserga, S. J. (2010). The DEAD-box RNA helicase-like Utp25 is an SSU processome component. *RNA*, 16(11), 2156-2169.

Chen, W., Bucaria, J., Band, D. A., Sutton A. et Sternglanz, R. (2003). Enp1, a yeast protein associated with U3 and U14 snoRNAs, is required for pre-rRNA processing and 40S subunit synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 31(2), 690-699.

Cheng, G., Brett, M. E. et He, B. (2002). Signals that dictate nuclear, nucleolar, and cytoplasmic shuttling of the gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.*, 76(18), 9434-9445.

Chimnaronk, S., Suzuki, T., Manita, T., Ikeuchi, Y., Yao, M., Suzuki, T. et Tanaka, I. (2009). RNA helicase module in an acetyltransferase that modifies a specific tRNA anticodon. *EMBO J.*, 28(9), 1362-1373.

Cmarko, D., Smigova, J., Minichova, L. et Popov, A. (2008). Nucleolus: The ribosome factory. *Histol. Histopathol.*, 23(10), 1291-1298.

Cochrane, A. W., Perkins, A. et Rosen, C. A. (1990). Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus. Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J. Virol.*, 64(2), 881-885.

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

Dokal, I. et Vulliamy, T. (2003). Dyskeratosis congenita: its link to telomerase and aplastic anaemia. *Blood Rev.*, 17(4), 217-225.

Dosil, M. (2011). Ribosome synthesis-unrelated functions of the preribosomal factor Rrp12 in cell cycle progression and the DNA damage response. *Mol. Cell. Biol.*, 31(12), 2422-2438.

Dove, B. K., You, J. H., Reed, M. L., Emmett, S. R., Brooks, G., Hiscox, J. A. (2006). Changes in nucleolar morphology and proteins during infection with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Cell Microbiol.*, 8(7), 1147-1157.

Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F. et Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 417(6892), 967-970.

Dragon, F., Lemay, V. et Trahan, C. (2006). snoRNAs: Biogenesis, Structure and Function. Dans Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK.

Dundr, M. (2012). Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome. *Curr Opin. Cell Biol.*, 24(3), 415-422.

Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csörgo, B., Pósfai, G., Weinstock, G. M. et Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.*, 190(7), 2597-2606.

Dyda, F., Klein, D. C. et Hickman, A. B. (2000). GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu. Rev. Biophys Biomol. Struct.*, 29, 81-103.

Ebert, B. L. (2009). Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer. *Leukemia*, 23(7), 1252-1256.

Ebersberger, I., Simm, S., Leisegang, M. S., Schimtzberger, P., Mirus, O., von Haeseler, A., Bohnsack, M. T. et Schleiff, E. (2014). The evolution of the ribosome biogenesis pathway from a yeast perspective. *Nucleic Acids Res.*, 42(3), 1509-1523.

Emmott, E. et Hiscox, J. A. (2009). Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO reports*, 10(3), 231-238.

Ender, C., Krek, A., Friedlander, M. R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N. et Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol. Cell*, 32(4), 519-528.

Eswara, M. B. K., Clayton, A. et Mangroo, D. (2012). Utp22p acts in concert with Utp8p to channel aminoacyl-tRNA from the nucleolus to the nuclear tRNA export receptor Los1p but not Msn5p. *Bioch. Cell Biol.*, 90(6), 731-749.

Fabian, M. R. et Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19(6), 586-593.

Falaleeva, M. et Stamm, S. (2013). Processing of snoRNAs as a new source of regulatory noncoding RNAs snoRNA fragments form a new class of functional RNAs. *Bioessays*, 35(1), 46-54.

Feng, J. M., Sun, J. et Wen, J. F. (2012). Advances in the study of the nucleolus. *Zoological Research*, 33(6), 549-556.

Foiani, M., Cigan, A. M., Paddon, C. J., Harashima S. et Hinnebusch, A. G. (1991). GCD2, a translational repressor of the GCN4 gene, has a general function in the initiation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 11(6), 3203-3216.

Freed, E. F., Bleichert, F., Dutcab, L. M. et Baserga, S. J. (2010). When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis. *Mol. Biosyst.*, 6(3), 481-493.

Fu, D. et Collins, K. (2007). Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Mol. Cell* 28(5), 773-785.

Fullam, A. et Schröder, M. (2013). DExD/H-box RNA helicases as mediators of anti-viral innate immunity and essential host factors for viral replication. *Biochim. Biophys. Acta*, 1829(8), 854-865.

Fuller-Pace, F. V. (2013). DEAD box RNA helicase functions in cancer. *RNA Biology* 10(1), 121-132.

Furdas, S. D., Kannan, S., Sippl, W. et Jung, M. (2012). Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases as epigenetic tools and drug candidates. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 345(1), 7-21.

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.

Ganapathi, K. A., Austin, K. M., Lee, C. S., Dias, A., Malsch, M. M., Reed, R. et Shimamura, A. (2007). The human Schwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA. *Blood*, 110(5), 1458-1465.

Ganapathi, K. A. et Shimamura, A. (2008). Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure. *Br. J. Haematol.*, 141(3), 376-387.

Garbelli, A., Radi, M., Falchi, F., Beermann, S., Zanoli, S., Manetti, F., Dietrich, U., Botta, M. et Maga, G. (2011). Targeting the human DEAD-box polypeptide 3 (DDX3) RNA helicase as a novel strategy to inhibit viral replication. *Curr. Med. Chem.*, 18(20), 3015-3027.

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.

Gavin, A. C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. et Superti-Furga, G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415(6868), 141-147.

Gerbi, S. A., Borovjagin, A. V. et Lange, T. S. (2003). The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15(3), 318-325.

Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Güldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E. et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387-391.

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.

Goyal, P., Pandey, D. et Siess, W. (2006). Phosphorylation-dependent regulation of unique nuclear and nucleolar localization signals of LIM kinase 2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 281(35), 25223-25230.

Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., Gavin, A. C. et Hurt, E. (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lacks 60S synthesis factors. *Mol Cell*, 10(1), 105-115.

Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Ngouenet, C., Galloway, D. A., Eisenman, R.N. et White, R. J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat. Cell Biol.*, 7(3), 311-318.

Granneman, S., Petfalski, E. et Tollervey, D. (2011). A cluster of ribosome synthesis factors regulate pre-rRNA folding and 5.8S rRNA maturation by the Rat1 exonuclease. *EMBO J.*, 30(19), 4006-4019.

Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K. et Pandolfi, P. P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*, 437(7055), 147-153.

Gunawardena, S. R., Ruis, B. L., Meyer, J. A., Kapoor, M. et Conklin, K. F. (2008). NOM1 targets protein phosphatase I to the nucleolus. *J. Biol. Chem.*, 283(1), 398-404.

Guo, Y. X., Dallmann, K. et Kwang, J. (2003). Identification of nucleolus localization signal of betanodavirus GGNN V protein alpha. *Virology*, 306(2), 225-235.

Gustafson, E. A. et Wessel, G. M. (2010). DEAD-box Helicases: Posttranslational Regulation and Function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 395(1), 1-6.

Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, 2(3), 189-194.

Hein, N., Hannan, K. M., George, A. J., Sanij, E. et Hannan, R. D. (2013). The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends Mol. Med.*, 19(11), 643-654.

Henn, A., Bradley, M. J. et De La Cruz, E. M. (2012). ATP utilization and RNA conformational rearrangement by DEAD-box proteins. *Annu. Rev. Biophys.*, 41, 247-267.

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.

Hernandez-Verdun, D. et Louvet, E. (2004). Le nucléole: structure, fonctions et maladies associées. *Médecine Sciences*, 20(1), 37-44.

Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V. et Lafontaine, D. L. (2010). The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 1(3), 415-431.

Hetman, M. et Pietrzak, M. (2012). Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends Neurosci.*, 35(5), 305-314.

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

Hipp, K., Galani, K., Batisse, C., Prinz, S. et Böttcher, B. (2012). Modular architecture of eukaryotic RNase P and RNase MRP revealed by electron microscopy. *Nucleic Acids Res.*, 40(7), 3275-3288.

Hiscox, J. A. (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol.*, 5(2), 119-127.

Hoffman, C. S. et Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sørensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeys, D. et Tyers, M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 415(6868), 180-183.

Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. et O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425(6959), 686-691.

Jakob, S., Ohmayer, U., Neueder, A., Hierlmeier, T., Perez-Fernandez, J., Hochmuth, E., Deutzmann, R., Griesenbeck, J., Tschochner, H. et Milkereit, P. (2012).

Interrelationships between yeast ribosomal protein assembly events and transient ribosome biogenesis factors interactions in early pre-ribosomes. *PLoS One*, 7(3), e32552.

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

Jarmoskaite, I. et Russell, R. (2011). DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2(1), 135-152.

Johansson, M. J. et Byström, A. S. (2004). The *Saccharomyces cerevisiae* TAN1 gene is required for N4-acetylcytidine formation in tRNA. *RNA*, 10(4), 712-719.

Josephs, H. W. (1936). Anaemia of infancy and early childhood. *Medicine*, 15(3), 307-451.

Kann, M., Schmitz, A. et Rabe, B. (2007). Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J. Gastroenterol.*, 13(1), 39-47.

Karkusiewicz, I., Rempola, B., Gromadka, R., Grynberg, M. et Rytka, J. (2004). Functional and physical interactions of Faf1p, a *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319(2), 349-357.

Kawahara, K. (2013). Regulation of p53-MDM2 pathway by nucleolar stress. *Seikagaku*, 85(3), 152-159.

Kawaji, H., Nakamura, M., Takahashi, Y., Sandelin, A., Katayama, S., Fukuda, S., Daub, C. O., Kai, C., Kawai, J., Yasuda, J., Carninci, P. et Hayashizaki, Y. (2008). Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics*, 9, 157.

Khanova, E., Esakova, O., Perederina, A., Berezin, I. et Krasilnikov, A. S. (2012). Structural organizations of yeast RNase P and RNase MRP holoenzymes as revealed by UV-crosslinking studies of RNA-protein interactions. *RNA*, 18(4), 720-728.

Kim, H., Chang, D. J., Lee, J. A., Lee, Y. S. et Kaang, B. K. (2003). Identification of nuclear/nucleolar localization signal in *Aplysia* learning associated protein of slug with a molecular mass of 18 kDa homologous protein. *Neurosci Lett.*, 343(2), 134-138.

Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J. W. et Taliansky, M. (2007). Interaction of a plant virus-

encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(26), 11115-11120.

Kiss, T. et Darzacq, X. (2001). Plus d'un siècle après sa découverte, un nouveau regard sur le nucléole. *Médecine Sciences*, 17(6-7), 730-736.

König, S. L. B., Liyanage, P. S., Sigel, R. K. O. et Rueda, D. (2013). Helicase-mediated changes in RNA structure at the single-molecule level. *RNA Biology*, 10(1), 133-148.

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. et Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, 15(10B), 963-972.

Kong, R., Zhang, L., Hu, L., Peng, Q., Han, W., Du, X. et Ke, Y. (2011). hALP, a novel transcriptional U three protein (t-UTP), activates RNA polymerase I transcription by binding and acetylating the upstream binding factor (UBF). *J. Biol. Chem.*, 286(9), 7139-7148.

Krehan, M., Heubeck, C., Menzel, N., Seibel, P. et Schön, A. (2012). RNase MRP RNA and RNase P activity in plants are associated with a Pop1p containing complex. *Nucleic Acids Res.*, 40(16), 7956-7966.

Krogan, N. J., Peng, W. T., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Lalev, A., Zhang, W., Davierwala, A. P., Mnaimneh, S., Starostine, A., Tikuisis, A. P., Grigull, J., Datta, N., Bray, J. E., Hughes, T. R., Emili, A. et Greenblatt, J. F. (2004) High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol. Cell*, 13(2), 225-239.

Kühn, H., Hierlmeier, T., Merl, J., Jakob, S., Aguisa-Toure, A. H., Milkereit, P. et Tschochner, H. (2009). The Noc-domain containing C-terminus of Noc4p mediates both formation of the Noc4p-Nop14p submodule and its incorporation into the SSU processome. *PloS One*, 4(12), e8370.

Kuhn, M. L., Majorek, K. A., Minor, W. et Anderson, W. F. (2013). Broad-substrate screen as a tool to identify substrates for bacterial Gcn5-related N-acetyltransferases with unknown substrate specificity. *Protein Sci.*, 22(2), 222-230.

Kushnirov, V. V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 16(9), 857-860.

- Lafon, A., Petty, E. et Pillus, L. (2012). Functional antagonism between Sas3 and Gcn5 acetyltransferases and ISWI chromatin remodelers. *PLoS Genet.*, 8(10), e1002994.
- Langenberger, D., Bermudez-Santana, C. I., Stadler, P. F. et Hoffmann, S. (2010). Identification and classification of small RNAs in transcriptome sequence data. *Pac. Symp. Biocomput.*, 80-87.
- Larrieu, D., Britton, S., Demir, M., Rodriguez, R. et Jackson, S. P. (2014). Chemical Inhibition of NAT10 Corrects Defects of Laminopathic Cells. *Science*, 344(6183), 527-532.
- Lasko, P. (2013). The DEAD-box helicase Vasa: evidence for a multiplicity of functions in RNA processes and developmental biology. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1829(8), 810-816.
- Lebaron, S., Froment, C., Fromont-Racine, M., Rain, J. C., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M. et Henry, Y. (2005). The splicing ATPase prp43p is a component of multiple preribosomal particles. *Mol. Cell. Biol.*, 25(21), 9269-9282.
- Lebaron, S., Segerstolpe, A., French, S. L., Dudnakova, T., de Lima Alves, F., Granneman, S., Rappsilber, J., Beyer, A. L., Wieslander, L. et Tollervey, D. (2013). Rrp5 binding at multiple sites coordinates pre-rRNA processing and assembly. *Mol. Cell.*, 52(5), 707-719.
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D. et Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: An example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res.*, 30(24), 5382-5390.
- Léger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J. C., Choismel, V., Guinefoleau, C., Gas, N. et Gleizes, P. E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J.*, 23(12), 2336-2347.
- Lemay, V., Hossain, A., Osheim, Y. N., Beyer, A. L. et Dragon, F. (2011). Identification of novel proteins associated with yeast snR30 small nucleolar RNA. *Nucleic Acids Res.*, 39(22), 9659-9670.
- Li, Z., Lee, I., Moradi, E., Hung, N. J., Johnson, A. W. et Marcotte, E. M. (2009). Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics. *PLoS Biol.*, 7(10), e1000213.

- Liang, X. H. et Crooke, S. T. (2011). Depletion of key protein components of the RISC pathway impairs pre-ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res.*, 39(11), 4875-4889.
- Lim, Y. H., Charette, J. M. et Baserga, S. J. (2011) Assembling a protein-protein interaction map of the SSU processome from existing datasets. *PLoS One*, 6(3), e17701.
- Lipton, J. M. et Ellis, S. R. (2010). Diamond Blackfan anemia 2008-2009: Broadening the scope of ribosome biogenesis disorders. *Curr. Opin. Pediatr.*, 22(1), 12-19.
- Liu, J. M. et Ellis, S. R. (2006). Ribosomes and marrow failure: coincidental association or molecular paradigm? *Blood*, 107(12), 4583-4588.
- Liu, X., Liu, Z., Jang, S. W., Ma, Z., Shinmura, K., Kang, S., Dong, S., Chen, J., Fukasawa, K. et Ye, K. (2007). Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(23), 9679-9684.
- Liu, H., Ling, Y., Gong, Y., Sun, Y., Hou, L. et Zhang, B. (2007). DNA damage induces N-acetyltransferase NAT10 gene expression through transcriptional activation. *Mol. Cell. Biochem.*, 300(1-2), 249-258.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. et Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), 953-961.
- Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D. et Seraphin, B. (1996). Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP *in vitro*. *Science*, 272(5259), 268-270.
- Lv, J., Liu, H., Wang, Q., Tang, Z., Hou, L. et Zhang, B. (2003). Molecular cloning of a novel human gene encoding histone acetyltransferase-like protein involved in transcriptional activation of hTERT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311(2), 506-513.
- Makarova, J. A., Ivanova, S. M., Tonevitsky, A. G. et Grigoriev, A. I. (2013). New functions of small nucleolar RNAs. *Biochemistry (Mosc)*, 78(6), 638-650.

- Mallet, L., Bussereau, F. et Jacquet, M. (1995). A 43.5 kb segment of yeast chromosome XIV, which contains MFA2, MEP2, CAP/SRV2, NAM9, FKB1/FPR1/RBP1, MOM22 and CPT1, predicts an adenosine deaminase gene and 14 new open reading frames. *Yeast*, 11(12), 1195-1209.
- Mannoor, K., Liao, J. et Jiang, F. (2012). Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1826(1), 121-128.
- Melen, K., Kinnunen, L., Fagerlund, R., Ikonen, N., Twu, K. Y., Krug, R. M. et Julkunen, I. (2007). Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J. Virol.*, 81(11), 5995-6006.
- Milkereit, P., Kühn, H., Gas, N. et Tschochner, H. (2003). The pre-ribosomal network. *Nucleic Acids Res*, 31(3), 799-804.
- Miroslav, D. (2012). Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 24(3), 415-422.
- Montanaro, L., Trere, D. et Derenzini, M. (2008). Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am. J. Pathol.*, 173(2), 301-310.
- Mougey, E. B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O. L. Jr., Beyer, A. et Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes and Development*, 7(8), 1609-1619.
- Nagy, Z. et Tora, L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, 26(37), 5341-5357.
- Nallar, S. C. et Kalvakolanu, D. V. (2013). Regulation of snoRNAs in cancer: Close encounters with interferon. *J. Interferon Cytokine Res.*, 33(4), 189-198.
- Narla, A. et Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, 115(16), 3196-3205.
- Neuwald, A. F. et Landsman, D. (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem. Sci.*, 22(5), 154-155.

Ning, B. et Shih, C. (2004). Nucleolar localization of human hepatitis B virus capsid protein. *J. Virol.*, 78(24), 13653–13668.

Nishimura, Y., Ohkubo, T., Furuichi, Y. et Umekawa, H. (2002). Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(10), 2239–2242.

Ohmayer, U., Gamalinda, M., Sauert, M., Ossowski, J., Pöll, G., Linnemann, J., Hierlmeier, T., Perez-Fernandez, J., Kumcuoglu, B., Leger-Silvestre, I., Faubladiet, M., Griesenbeck, J., Woolford, J., Tschochner, H. et Milkereit, P. (2013). Studies on the assembly characteristics of large subunit ribosomal proteins in *S. cerevisiae*. *PLoS One.*, 8(7), e68412.

Ohrt, T., Muetze, J., Svoboda, P. et Schwillle, P. (2012). Intracellular localization and routing of miRNA and RNAi pathway components. *Curr. Top. Med. Chem.*, 12(2), 79–88.

Osheim, Y. N., French, S. L., Keck, K. M., Champion, E. A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S. J. et Beyer, A. L. (2004). Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell.*, 16(6), 943–954.

Pagé, N., Gérard-Vincent, M., Ménard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G. J., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., Dowse, T., Sdicu, A. M. et Bussey, H. (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*, 163(3), 875–894.

Pan, C. et Russell, R. (2010). Roles of DEAD-box proteins in RNA and RNP folding. *RNA Biology*, 7(6), 667–676.

Pellagatti, A., Hellström-Lindberg, E., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M. G., Jädersten, M., Killick, S., Fidler, C., Cazzola, M., Wainscoat, J. S. et Boultonwood, J. (2008). Haploinsufficiency of RPS14 in 5qsyndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *Br. J. Haematol.*, 142(1), 57–64.

Pérez-Fernández, J., Martín-Marcos, P. et Dosil, M. (2011). Elucidation of the assembly events required for the recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto nascent pre-ribosomes. *Nucleic Acids Res.*, 39(18), 8105–8121.

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.

Pickard, A. J. et Bierbach, U. (2013). The cell's nucleolus: an emerging target for chemotherapeutic intervention. *Chem. Med. Chem.*, 8(9), 1441-1449.

Preti, M., O'Donohue, M. F., Montel-Lehry, N., Bortolin-Cavaillé, M. L., Choesmel, V. et Gleizes, P. E. (2013). Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, 41(8), 4709-4723.

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

Reed, M. L., Dove, B. K., Jackson, R. M., Collins, R., Brooks, G. et Hiscox, J. A. (2006). Delineation and modelling of a nucleolar retention signal in the coronavirus nucleocapsid protein. *Traffic*, 7(7), 833-848.

Rego, E. M., Ruggero, D., Tribioli, C., Cattoretti, G., Kogan, S., Redner, R. L. et Pandolfi, P. P. (2006). Leukemia with distinct phenotypes in transgenic mice expressing PML/RAR alpha, PLZF/RAR alpha or NPM/RAR alpha. *Oncogene*, 25(13), 1974-1979.

Rempola, B., Karkusiewicz, I., Piekarska, I. et Rytka, J. (2006). Fcf1p and Fcf2p are novel nucleolar *Saccharomyces cerevisiae* proteins involved in pre-rRNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346(2), 546-554.

Rinn, J. L., et Chang, H. Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, 81, 145-166.

Rother, S. et Meister, G. (2011). Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie*, 93(11), 1905-1915.

Rubbi, C. P. et Milner, J. (2003). Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.*, 22(22), 6068-6077.

Ruggero, D. (2012). Revisiting the nucleolus: from marker to dynamic integrator of cancer signaling. *Sci. Signal*, 5(241), 38.

Ruggero, D. et Pandolfi, P. P. (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer*, 3(3), 179-192.

Rujkijyanont, P., Adams, S. L., Beyene, J. et Dror, Y. (2009). Bone marrow cells from patients with Schwachman-Diamond syndrome abnormally express genes

involved in ribosome biogenesis and RNA processing. *Br. J. Haematol.*, 145(6), 806-815.

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

Sahasranaman, A., Dembowski, J., Strahler, J., Andrews, P., Maddock, J. et Woolford, J. L. Jr. (2011). Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S ribosomal subunits: role of factors required for 27S pre-rRNA processing. *EMBO J.*, 30(19), 4020-4032.

Sakai, D. et Trainor, P. A. (2009). Treacher Collins syndrome: unmasking the role of Tcof1/treacle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 41(6), 1229-1232.

Schäfer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D. et Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.*, 22(6), 1370-1380.

Scott, M. S., Ono, M., Yamada, K., Endo, A., Barton, G. J. et Lamond, A. I. (2012). Human box C/D snoRNA processing conservation across multiple cell types. *Nucleic Acids Res.*, 40(8), 3676-3688.

Shah, B. N., Liu, X. et Correll, C. C. (2013). Imp3 unfolds stem structures in pre-rRNA and U3 snoRNA to form a duplex essential for small subunit processing. *RNA*, 19(10), 1372-1383.

Sharma, K. et Tollervey, D. (1999). Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 59 end of 18S rRNA is required for pre-rRNA processing. *Mol. Cell Biol.*, 19(9), 6012-6019.

Shaw, P. et Brown, J. (2012). Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiol.*, 158(1), 44-51.

Sheng, Z., Lewis, J. A. et Chirico, W. J. (2004). Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. *J. Biol. Chem.* 279(38), 40153-40160.

Shen, Q., Zheng, X., McNutt, M. A., Guang, L., Sun, Y., Wang, J., Gong, Y., Hou, L. et Zhang, B. (2009). NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Exp. Cell Res.*, 315(10), 1653-1667.

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.

Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. et Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12(4), 246-258.

Siomi, H., Shida, H., Maki, M. et Hatanaka, M. (1990). Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J. Virol* 64(4), 1803-1807.

Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P. et Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.*, 129(1), 13-31.

Sloan, K. E., Bohnsack, M. T., Schneider, C. et Watkins, N. J. (2014). The roles of SSU processome components and surveillance factors in the initial processing of human ribosomal RNA. *RNA*, 20(4), 540-550.

Sloan, K. E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Pruijn, G. J. et Watkins, N. J. (2013). Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J. Cell. Biol.*, 200(5), 577-588.

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.

Sondalle, S. B. et Baserga, S. J. (2014). Human diseases of the SSU processome. *Biochim Biophys Acta.*, 1842(6), 758-64

Soto-Rifo, R. et Ohlmann, T. (2013). The role of the DEAD-box RNA helicase DDX3 in mRNA metabolism. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.*, 4(4), 369-385.

Sternglanz, R. et Schindelin, H. (1999). Structure and mechanism of action of the histone acetyltransferase Gcn5 and similarity to other N-acetyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(16), 8807-8808.

Strunk, B.S. et Karbstein, K. (2009). Powering through ribosome assembly. *RNA*, 15(12), 2083-2104.

Sun, W. J., Zhou, X., Zheng, J. H., Lu, M. D., Nie, J. Y., Yang, X. J. et Zheng, Z. Q. (2012). Histone acetyltransferases and deacetylases: molecular and clinical

implications to gastrointestinal carcinogenesis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 44(1), 80-91.

Swiatkowska, A., Wlotzka, W., Tuck, A., Barrass, J. D., Beggs, J. D. et Tollervey, D. (2012). Kinetic analysis of pre-ribosome structure *in vivo*. *RNA*, 18(12), 2187-2200.

Taddei, A. et Gasser S. M. (2012). Structure and function in the budding yeast nucleus. *Genetics*, 192(1), 107-129.

Taddei, A., Schober, H. et Gasser, M. (2010). The budding yeast nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2(8), a000612.

Taft, R. J., Glazov, E. A., Lassmann, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P. et Mattick, J. S. (2009). Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA*, 15(7), 1233-1240.

Taliansky, M. E., Brown, J. W. S., Rajamaki, M. L., Valkonen, J. P. T. et Kalinina, N.O. (2010). Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv. Virus Res.*, 77, 119-158.

Tan, T. Z., Miow, Q. H., Huang, R. Y., Wong, M. K., Ye, J., Lau, J. A., Wu, M. C., Bin Abdul Hadi, L. H., Soong, R., Choolani, M., Davidson, B., Nesland, J. M., Wang, L. Z., Matsumura, N., Mandai, M., Konishi, I., Goh, B. C., Chang, J. T., Thiery, J. P. et Mori, S. (2013). Functional genomics identifies five distinct molecular subtypes with clinical relevance and pathways for growth control in epithelial ovarian cancer. *EMBO Mol. Med.*, 5(7), 983-998.

Tercero, J. C., Riles, L. E. et Wickner, R. B. (1992). Localized mutagenesis and evidence for post-transcriptional regulation of MAK3. A putative N-acetyltransferase required for double-stranded RNA virus propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 267(28), 20270-20276.

Thiry, M., Lamaye, F. et Lafontaine, D. L. (2011). The nucleolus: when 2 became 3. *Nucleus*, 2(4), 289-293.

Tsai, R. Y. et McKay, R. D. (2005). A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J. Cell Biol.*, 168(2), 179-184.

Tucker, A. C. et Escalante-Semerena, J. C. (2013). Acetoacetyl-CoA synthetase activity is controlled by a protein acetyltransferase with unique domain organization in *Streptomyces lividans*. *Molecular Microbiology*, 87(1), 152-167.

Turner, A. J., Knox, A. A., Prieto, J. L., McStay, B. et Watkins, N. J. (2009). A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4. *Mol. Cell. Biol.*, 29(11), 3007-3017.

Urcuqui-Inchima, S., Castano, M. E., Hernandez-Verdun, D., St-Laurent, G. et Kumar, A. (2006). Nuclear factor 90, a cellular dsRNA binding protein inhibits the HIV Rev-export function. *Retrovirology*, 3, 83.

Valdez, B. C., Henning, D., So, R. B., Dixon, J. et Dixon, M. J. (2004). The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101(29), 10709-10714.

Van Crielinge, W. et Beyaert, R. (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol. Proced. Online*, 2, 1-38.

Verheggen, C. et Bertrand, E. (2012). CRM1 plays a nuclear role in transporting snoRNPs to nucleoli in higher eukaryotes. *Nucleus*, 3(2), 132-137.

Vetting, M. W., S de Carvalho, L. P., Yu, M., Hegde, S. S., Magnet, S., Roderick, S. L. et Blanchard, J. S. (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433(1), 212-226.

Vlachos, A., Federman, N., Reyes-Haley, C., Abramson, J. et Lipton, J. M. (2001). Hematopoietic stem cell transplantation for Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan Anemia Registry. *Bone Marrow Transplant*, 27(4), 381-386.

Vlatković, N., Boyd, M. T. et Rubbi, C. P. (2014). Nucleolar control of p53: a cellular Achilles' heel and a target for cancer therapy. *Cell Mol. Life Sci.*, 71(5), 771-791.

Wang, Y., Liu, J., Zhao, H., Lü, W., Zhao, J., Yang, L., Li, N., Du, X. et Ke, Y. (2007). Human 1A6/DRIM, the homolog of yeast Utp20, functions in the 18S rRNA processing. *Bioch. Biophys. Acta*, 1773(6), 863-868.

Watkins, N. J. et Bohnsack, M. T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 3(3), 397-414.

Wilson, D. N. et Doudna Cate, J. H. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4(5), a011536.

Yang, X. J. (2004). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 959-976.

Yang, M. R., Lee, S.R., Oh, W., Lee, E. W., Yeh, J. Y., Nah, J. J., Joo, Y. S., Shin, J., Lee, H. W., Pyo, S. et Song, J. (2007). West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus. *Cell Microbiol.*, 10(1), 165-176.

Yang, Y. Y. et Hang, H. C. (2011). Chemical approaches for the detection and synthesis of acetylated proteins. *Chem-BioChem.*, 12(2): 314–322.

Yu, Y. et Waters, R. (2005). Histone acetylation, chromatin remodeling and nucleotide excision repair. Hint from the study on MFA2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle*, 4(8):1043-1045.

Zhang, L., Lin, J. et Ye, K. (2013). Structural and functional analysis of the U3 snoRNA binding protein Rrp9. *RNA*, 19(5), 701-711.