UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

cnrs

# Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

## Thèse

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

par **Guillaume CLERGET**

# Caractérisation des propriétés d'un mutant de la protéine Rrp9p de la snoRNP U3 de levure *Saccharomyces cerevisiae* et mise en évidence d'un réseau de protéines au sein du complexe de maturation précoce des ARNr

**18 Décembre 2015**

**Membres du jury :**

| | | |
|---|---|---|
| **Rapporteurs :** | **M. Yves HENRY** | DR2, Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse |
| | **M. Nicolas LEULLIOT** | PR2, Université Paris Descartes, Paris |
| **Examinateurs :** | **M. Denis LAFONTAINE** | PR, Université Libre de Bruxelles, Charleroi |
| | **M. Bruno CHARPENTIER** | PR2, Université de Lorraine, Nancy |
| | **M$^{me}$ Christiane BRANLANT** | DRCE2, Université de Lorraine, Nancy<br>Directrice de thèse |
| | **M. Mathieu REDERSTORFF** | MCF, Université de Lorraine, Nancy<br>Co-directeur de thèse |
| **Membres invités:** | **M$^{me}$ Natacha DREUMONT** | MCF, Université de Lorraine, Nancy |

---

UMR 7365 CNRS - Université de Lorraine, Laboratoire IMoPA : Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire – Faculté de Médecine, Bâtiment Biopôle, 9 avenue de la forêt de Haye, BP 184, 54500 Vandoeuvre-Lès-nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

cnrs

# Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

## Thèse

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

par **Guillaume CLERGET**

# Caractérisation des propriétés d'un mutant de la protéine Rrp9p de la snoRNP U3 de levure *Saccharomyces cerevisiae* et mise en évidence d'un réseau de protéines au sein du complexe de maturation précoce des ARNr

**18 Décembre 2015**

**Membres du jury :**

| | | |
|---|---|---|
| **Rapporteurs :** | **M. Yves HENRY** | DR2, Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse |
| | **M. Nicolas LEULLIOT** | PR2, Université Paris Descartes, Paris |
| **Examinateurs :** | **M. Denis LAFONTAINE** | PR, Université Libre de Bruxelles, Charleroi |
| | **M. Bruno CHARPENTIER** | PR2, Université de Lorraine, Nancy |
| | **M$^{me}$ Christiane BRANLANT** | DRCE2, Université de Lorraine, Nancy<br>Directrice de thèse |
| | **M. Mathieu REDERSTORFF** | MCF, Université de Lorraine, Nancy<br>Co-directeur de thèse |
| **Membres invités:** | **M$^{me}$ Natacha DREUMONT** | MCF, Université de Lorraine, Nancy |

---

UMR 7365 CNRS - Université de Lorraine, Laboratoire IMoPA : Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire – Faculté de Médecine, Bâtiment Biopôle, 9 avenue de la forêt de Haye, BP 184, 54500 Vandoeuvre-Lès-nancy

***Un jour, un ami m'a dit :***

***« pour être thésard, il faut avoir la foi ! »***

***Moi, je crois plutôt qu'il faut avoir…le foie !***

*Adapté de « la palombière »*

*Tonton Christo*

# Sommaire

# INTRODUCTION

## Avant-propos

I. **Présentation des ribosomes et de leur biogenèse** ..... 1

II. **Maturation des ARNr chez *Saccharomyces cerevisiae*** ..... 9

**II.1. Organisation de l'ADN ribosomique** ..... 9

**II.2. Transcription du précurseur pré-ARNr 35S chez *Saccharomyces cerevisiae*** ..... 10

**II.3. Maturation du pré-ARNr 35S** ..... 11

## Chapitre 1 : Les snoRNP impliquées dans la maturation du pré-ARNr 35S

I. **Modifications des résidus des ARNr** ..... 14

**I.1. Les snoRNP à boîtes H/ACA guidant les pseudouridylations** ..... 16

**I.2. Les snoRNP à boîtes C/D guidant les 2'-O-méthylations** ..... 17

II. **Chaperonnes du repliement du pré-ARNr 35S** ..... 19

III. **La snoRNP U3** ..... 20

**III.1. Le snoARN U3** ..... 20

*III.1.A. Le domaine 3', contenant des motifs de type C/D* ..... 22

*III.1.B. Le domaine 5', spécifique de la snoRNP U3* ..... 24

**III.2. Les protéines de la snoRNP U3** ..... 25

*III.2.A. La protéine Snu13p* ..... 26

*II.1.A. La protéine Nop1p* ..... 27

*II.1.B. Les protéines Nop56p et Nop58p* ..... 28

*II.3.A. La protéine Rrp9p, spécifique de la snoRNP U3* ..... 29

**II.4. Déterminants nécessaires aux interactions entre les différents composants de la snoRNP U3** ..... 29

*II.4.A. L'association de la protéine Snu13p au snoARN U3 ..... 29*

*II.4.B. L'association des protéines Nop56p et Nop58p ..... 33*

*III.1.A. L'association de la protéine Nop1p ..... 34*

*III.1.B. L'association de la protéine Rrp9p ..... 35*

**III.2. Biogenèse de la snoRNP U3 ..... 35**

*III.2.A. Maturation du snoARN U3 et assemblage des protéines cœur de la snoRNP U3 ..... 35*

*III.2.B. Facteurs impliqués dans la biogenèse de la snoRNP U3 ..... 38*

*III.2.C. Transport et localisation de la snoRNP U3 ..... 40*

# Chapitre 2 : Clivages exo- et endonucléolytiques menant à la formation des ARNr matures

I. **Clivages précoces conduisant à la formation de la petite sous-unité ribosomique 40S ..... 43**

**I.1. Rôle de la snoRNP U3 dans les étapes précoces de maturation ..... 48**

*I.1.A. Appariements entre le snoARN U3 et la région 5'-ETS du pré-ARNr 35S ..... 49*

*I.1.B. Appariements entre le snoARN U3 et la région de l'ARNr 18S au sein du pré-ARNr ..... 51*

*I.1.C. La formation du pseudonoeud central au sein de l'ARNr 18S ..... 51*

**I.2. Rôles des snoRNP snR10, snR30, snR35 et U14 ..... 52**

*I.2.A. La snoRNP snR10 ..... 53*

*I.2.B. La snoRNP snR30 ..... 54*

*I.2.C. La snoRNP snr35 ..... 56*

*I.2.D. La snoRNP U14 ..... 57*

**I.3. Cas particulier du pré-ARNr 23S ..... 58**

II. **Clivages tardifs menant à la formation de la grande sous-unité ribosomique 60S ..... 58**

III. **Transcription, production et rôle de l'ARNr 5S ..... 61**

# Chapitre 3 : Le processome, lieu des clivages précoces A0, A1 et A2

I. **Composition du processome** ..... 63

II. **Assemblage séquentiel du processome** ..... 65

**II.1. Association du sous-complexe t-UTP/UTP-A** ..... 65

**II.2. Association des sous-complexes UTP-B et Bms1/Rcl1, de la snoRNP U3 et du complexe Mpp10** ..... 66

**II.3. Association du sous-complexe UTP-C et de la protéine Rrp5** ..... 67

**II.4. Existence de deux voies d'assemblage indépendantes du processome** ..... 69

III. **Rôle des composants du processome** ..... 70

**III.1. Intervention d'hélicases** ..... 70

**III.2. Intervention d'une GTPase (complexe Bms1p/Rcl1p)** ..... 73

**III.3. Intervention d'endonucléases** ..... 75

**III.4. Intervention du facteur Rrp5** ..... 77

**III.5. Intervention de la snoRNP U3 et du complexe Mpp10** ..... 78

*III.5.A. Intervention du complexe Mpp10 dans la stabilisation des appariements formés entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3* ..... 78

*III.5.B. Dissociation de la snoRNP U3 du processome par l'ARN hélicase Dhr1p* ..... 80

# Chapitre 4: La protéine Rrp9p, composant indispensable à la fonction de la snoRNP U3

I. **Présentation de la protéine Rrp9 de *S. cerevisiae* et de son homologue humain, la protéine U3-55K** ..... 84

**I.1. Le domaine N-terminal** ..... 84

**I.2. Le domaine « hélix propeller »** ..... 87

**I.3. L'association de la protéine Rrp9p au sein de la snoRNP U3 ..... 89**

II. **Fonction de la protéine Rrp9 ..... 91**

**II.1. Rôle dans la formation de la snoRNP U3 ..... 91**

**II.2. Rôle dans la maturation du pré-ARNr 35S au sein du processome .. 93**

## Objectifs

# MATERIELS & METHODES

I. **Matériel ..... 99**

**I.1. Souches de cellules ..... 99**

*I.1.A. Souches de bactéries E. coli ..... 99*

*I.1.B. Souches de levures S. cerevisiae ..... 99*

**I.2. Plasmides ..... 100**

**I.3. Oligonucléotides ..... 103**

II. **Méthodes ..... 109**

**II.1. Techniques de génie génétique ..... 109**

*II.1.A. Technique de clonage ..... 109*

*II.1.A.a. Sous-clonage et clonage ..... 109*

*II.1.A.b. Clonage GateWay ..... 111*

*II.1.B. Mutagenèse dirigée par PCR ..... 112*

*II.1.B.a. Technique des amorces chevauchantes ..... 112*

*II.1.B.b. Par délétion ..... 112*

**II.2. Techniques d'étude de complexes *in vitro* chez E. coli ..... 113**

*II.2.A. GST-pulldown ..... 113*

*II.2.A.a. Production et purification sur billes de protéines étiquetées GST ..... 113*

*II.2.A.b. Production in vitro de protéines radiomarquées ..... 114*

*II.2.A.c. Etude de l'interaction par GST pull-down* ..... *115*

*II.2.B. Co-expression* ..... *116*

**II.3. Techniques d'analyse chez la levure** ..... **117**

*II.3.A. Transformation de la levure* ..... *117*

*II.3.B. Modification génétique des souches de levure* ..... *117*

*II.3.C. Culture des souches de levure / Répression de l'expression de gènes essentiels* ..... *118*

*II.3.D. Analyse de la croissance des souches exprimant des variants de la protéine Rrp9 et/ou des mutants du snoARN U3 (tests de croissance et synthétique létal)* ..... *119*

**II.4. Techniques d'extraction de matériel biologique** ..... **120**

*II.4.A. Extraction d'ADN génomique* ..... *120*

*II.4.B. Préparation d'extraits cellulaires* ..... *121*

*II.4.C. Extraction des ARN totaux* ..... *121*

*II.4.D. Extraction des protéines totales et des ARN totaux présents dans les fractions issues du gradient de saccharose* ..... *121*

*II.4.D.a. Extraction des protéines totales* ..... *121*

*II.4.D.b. Extraction des ARN totaux* ..... *122*

**II.5. Technique de détection à partir d'échantillons biologiques** ..... **122**

*II.5.A. Western-blot* ..... *122*

*II.5.B. Nothern-blot* ..... *123*

*II.5.B.a. Détection des snoRNA U3 et U6* ..... *123*

*II.5.B.b. Détection des intermédiaires de maturation et des formes matures des ARNr* ..... *124*

*II.5.C. Transcription inverse* ..... *125*

**II.6. Techniques d'étude de complexes chez Saccharomyces cerevisiae** ..... **126**

*II.6.A. Immunoprécipitation du snoARN U3 par ProtA-Rrp9* ..... *126*

*II.6.B. Double hybride* ..... *126*

*II.6.C. Gradients de saccharose 5-45%* ..... *127*

# RESULTATS & DISCUSSION

I. **Identification de résidus de la protéine Rrp9p impliqués dans sa fonction ..... 129**

II. **Analyse de la fonctionnalité des mutants de la protéine Rrp9p ..... 130**

**II.1. Génération et validation de la souche W303::pGAL-*RRP9* ..... 130**

**II.2. Etude de la fonction des mutants de la protéine Rrp9p ..... 132**

III. **Caractérisation du mutant Rrp9p R289A ..... 133**

**III.1. Le résidu Q294 ne semble pas interagir avec le résidu R289 ..... 136**

## Publication

**III.2. En présence de la protéine Rrp9p R289A, la snoRNP U3 pourrait être bloquée au sein du processome ..... 137**

**III.3. La protéine Rrp9p est impliquée dans la formation et la stabilisation des hélices formées entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S ..... 139**

*III.3.A. Génération et validation de la souche JH84::pGAL-RRP9 ..... 139*

*III.3.B. Analyse par test de létalité synthétique du lien pouvant exister entre la protéine Rrp9p et les appariements formés entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S ..... 141*

*III.3.B.a. L'hélice VI ..... 142*

*III.3.B.b. Le segment 4 ..... 142*

*III.3.B.c. L'hélice V ..... 143*

*III.3.B.d. Le segment 3 ..... 143*

*III.3.B.e. L'hélice I ..... 144*

*III.3.B.f. Le segment 2 ..... 145*

*III.3.B.g. L'hélice II ..... 145*

*III.3.B.h. Le segment 1 ..... 145*

*III.3.B.i. L'hélice III ..... 145*

*III.3.B.j. L'ensemble des motifs établis entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 ..... 146*

IV. **Réseau d'interaction de Rrp9 au sein du processome ..... 148**

**IV.1. Recherche de partenaires potentiels de la protéine Rrp9p par double hybride ..... 148**

**IV.2. Identification des domaines d'interaction ..... 151**

**IV.3. Tests visant à confirmer des différentes interactions détectées par double hybride et à définir si celles-ci sont directes ..... 156**

*IV.3.A. Tests de co-expression ..... 156*

*IV.3.B. Tests de « GST pull-down » ..... 157*

# DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

I. **Mis en évidence d'un réseau d'interaction impliquant la protéine Rrp9p et ses nouveaux partenaires au sein du processome ..... 164**

II. **Peu des résidus mutés de Rrp9p se sont avérés avoir un effet négatif sur sa fonction ..... 167**

III. **Le résidu R289 de Rrp9p est important pour les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 du pré-ARNr 35S ..... 169**

IV. **Le résidu R289 de la protéine Rrp9p est nécessaire à l'association de Rrp9p avec Rrp36p et indirectement dans la stabilisation du réseau d'interaction que nous avons identifié ..... 171**

V. **L'accumulation de la mutation Rrp9p R289A et de la mutation affectant la région 5'-terminale du snoARN U3 conduit à un fort renforcement des défauts de croissance ..... 174**

# Abréviations

## ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

ψ : pseudouridine

3-AT : 3-aminotriazole

$^{32}P$ : Phosphore 32

A : Adénine

A ou Ala : Alanine

Ac : Anticorps

AD : Activation Domain

ADN ou DNA : Acide DésoxyriboNucléique

ADNg : ADN génomique

Amp : Ampicilline

AMV : Avian Myeloblastosis Virus

ARN ou RNA : Acide RiboNucléique

ARNr ou rRNA : Acide RiboNucléique ribosomique

ATP : Adénosine TriPhosphate

BD : Binding Domain

BSA : Bovine Serum Albumin

C : Cytosine

Ci/mCi : curie/millicurie

CIAP : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase

Db : double brin

Da/kDa : Dalton/kiloDalton

DNAse : Déoxynucléase

DO : Densité Optique

DTT : DiThioThréitol

*E.coli* : *Escherichia coli*

EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétate

ETS : « External Transcribed Spacer »

G : Guanine

g/mg/ g/ng : gramme/milligramme/microgramme/nanogramme

h/min/sec : heure/ minute/seconde

IgG : Immunoglobuline G

ITS : « Internal Transcribed Spacer »

K : acide aminé Lysine

Kb : kilobase

K-turn : Kink-turn

l/ml/ l : litre/millilitre/microlitre

LB : Luria Bertani

M/mM/ M/nM : molaire/millimolaire/micromolaire/ nanomolaire

mA : milliampère

MCS : Multi Cloning Site

$^{m2,2,7}G$ : (2,2 ,7) tri-méthyl guanosine

$^{m7}G$ : 7-méthyl guanosine

mol/ fmol : mole/femtomole

NLS : Nuclear Localisation Signal

nt : nucléotide

ORF : « Open Reading Frame » (phase ouverte de lecture)

pb : paire de base

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : PolyEthylène Glycol

PNK : PolyNucleotide Kinase

Pfu : ADN polymérase extraite du micro-organisme *Pyrococcus furiosus*

pré-ARNr : précurseur de l'ARN ribosomique

Q : acide aminé Glutamine

p/v : poids/volume

| | |
|---|---|
| R | : purine |
| R ou Arg | : acide aminé Arginine |
| RBD | : RNA Binding Domain |
| rpm | : rotation par minute |
| RNAse | : Ribonucléase |
| RNP | : « RiboNucleoprotein Particles » |
| RT-PCR | : Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction |
| S | : unité de sédimentation Svedberg |
| SAM | : S-Adenosyl Methionine |
| *S. cerevisiae* | *: Saccharomyces cerevisiae* |
| SDS | : DodécylSulfate de Sodium |
| snoRNA | : « small nucleolar RNA » (petit ARN nucléolaire) |
| snRNA | : « small nuclear RNA » (petit ARN nucléaire) |
| snRNP | : « Small RiboNucleoprotein Particles » (petite particule ribonucléoprotéique nucléaire) |
| snoRNP | : « Small RiboNucleolarprotein Particles » (petite particule ribonucléoprotéique nucléolaire) |
| SSC | : Standard Saline Citrate |
| SSPE | : Standard Saline Phosphate EDTA |
| SSU | : Small SubUnit |
| T | : Thymine |
| Taq | : ADN polymérase extraite du micro-organisme *Thermococcus Aquaticus* |
| TBE | : Tris Borate EDTA |
| TE | : Tris EDTA |
| Tris | : tris (hydroxyméthyl) aminométhane |
| U | : Uracile |
| UE | : Unité Enzymatique |
| UV | : Ultra Violet |
| V | : Volt |
| v/v | : volume à volume |

| | |
|---|---|
| WT | : Wild Type (sauvage) |
| YPD | : « Yeast peptone D-dextrose » |
| YPG | : « Yeast peptone D-galactose » |

# Introduction

# Avant-propos

## I. Présentation des ribosomes et de leur biogenèse

Les ribosomes sont des composants fondamentaux nécessaires au fonctionnement des cellules, puisqu'ils sont responsables de la synthèse des protéines, composants à la base de chaque processus cellulaire et de l'architecture cellulaire. Le ibosome est l'une des plus imposantes et des plus importantes particule ribonucléoprotéique (ou particule RNP) présente dans la cellule. Chez *S. cerevisiae*, les ribosomes cytoplasmiques (80S) sont constitués de 4 ARN ribosomiques (ARNr) et de 79 protéines ribosomiques (pour revue, Lafontaine, 2015), répartis en 2 sous-unités, chacune contenant un ou plusieurs ARNr en association avec des protéines ribosomiques. Ainsi la petite sous-unité (SSU pour Small SubUnit) ribosomique 40S (≈ 1 MDa) est composée de l'ARNr 18S (1800 nts) en interaction avec 33 protéines ribosomiques, tandis que la grande sous-unité (LSU pour Large SubUnit) ribosomique 60S (≈ 2 MDa) est composée de 46 protéines ribosomiques assemblées avec les ARNr 5S (121 nts), 5,8S (environ 158 nts) et 25S (3396 nts) (pour revue, Woolford & Baserga, 2013). Chaque sous-unité possède une fonction spécifique dans le mécanisme de traduction. La petite sous-unité ribosomique 40S a un rôle dans la fonction de décodage de l'information génétique, puisqu'elle permet d'établir un contact entre les ARN messagers (ARNm) à traduire et les ARN de transfert (ARNt) porteurs de l'acide aminé à incorporer dans le polypeptide naissant. La grande sous-unité ribosomique 60S, quant à elle, joue un rôle dans la formation de la liaison peptidique grâce à son activité peptidyltransférase (pour revue, El Hage & Tollervey 2004) (pour revue, Woolford & Baserga, 2013).

La majorité des composants du ribosome sont cruciaux pour l'assemblage et la fonction du ribosome. Les 4 ARNr, ainsi que 64 parmi 79 des protéines ribosomiques sont essentiels à la survie cellulaire (Steffen *et al*, 2012). De plus les protéines ribosomiques non-essentielles peuvent également jouer un rôle dans la biogenèse et la fonction du ribosome (Baronas-Lowell & Warner 1990 ; Sachs & David 1990 ; Remacha *et al*, 1995 ; Briones *et al*, 1998 ; Yu & Warner 2001 ; DeLabre *et al*, 2002 ; Peisker *et al*, 2008 ; Babiano *et al*, 2012 ; Steffen *et al*, 2012). A noter que l'ARNr 5,8S est sépcifique des ribosomes eucaryotes cytoplasmiques et correspond à la

séquence en 5' de l'ARNr 23S bactérien qui s'est individualisée (Machatt *et al*, 1981). Il n'y a pas eu d'individualisation de cette extrémité dans le grand ARNr des ribosomes mitochondriaux.

Dans un premier temps, la structure tridimensionnelle à résolution atomique des sous-unités ribosomiques et des ribosomes a été établie chez les bactéries et les archées (Ban *et al*, 2000 ; Schluenzen *et al*, 2000 ; Wimberly *et al*, 2000 ; Yusupov *et al*, 2001 ; Steitz 2008 ; Korostelev *et al, 2008*). Des modèles de la structure tridimensionnelle complète des ribosomes eucaryotes ont alors été proposés, en combinant notamment la cryomicroscopie électronique et la modélisation par homologie des ARNr et des protéines ribosomiques (Gomez-Lorenzo *et al*, 2000 ; Spahn *et al*, 2001 ; Chandramouli *et al*, 2008 ; Taylor *et al*, 2009 ; Armache *et al*, 2010). La structure du ribosome de *Saccharomyces cerevisiae* a été obtenue plus récemment par radiocristallographie (Ben-Shem *et al*, 2010, 2011, 2012) **(Fig. 1)**, ainsi maintenant que la structure 3D des ribosomes dans différents états actifs et celles de la grande sous-unité ribosomiques 60S en cours d'assemblage (Llacer *et al*, 2015 ; Svidritskiy et al, 2014 ; Greber et al, 2012 ; Leidig et al, 2014 ; Hussain *et al*, 2014 ; Fernandez *et al*, 2013 ; Armache *et al*, 2010 ; Spahn *et al*, 2004 ).

La résolution de la structure tridimensionnelle des ribosomes a représenté une avancée considérable permettant d'améliorer notre capacité de mise au point et d'interprétation d'expériences visant à élargir la compréhension de la biogenèse et de la fonction du ribosome (Armache *et al*, 2010 ; Ben-Shem *et al*, 2011 ; Klinge *et al*, 2011, 2012 ; Jenner *et al*, 2012 ; Melnikov *et al*, 2012 ; Rabl *et al*, 2011). La forme globale de chaque sous-unité est en grande partie dictée par les différents ARNr possèdant des structures secondaires et tertiaires complexes et compactes **(Fig. 2)**. L'ensemble des protéines ribosomiques se fixe sur ces structures, permettant de les stabiliser (pour revue, Lafontaine, 2001). Ce qui était déjà suggéré il y a longtemps par notre équipe et celle de Noller (Machatt *et al*, 1981).

De plus, les ARNr constituent le cœur fonctionnel du ribosome jouant un rôle primordial dans les étapes critiques de décodage de l'ARNm et d'enchaînement des acides aminés (Dahlberg, 1989 ; Khaitovich *et al*, 1999 ; Veldman *et al*, 1981 ; Machatt *et al*, 1981 ; Voorhees & Ramakrishnan, 2013). En effet, l'analyse de la structure tridimensionnelle des ribosomes et des sous-unités ribosomiques révèle

**Figure 1 : Structure tridimensionnelle du ribosome de *Saccharomyces cerevisiae* obtenu par radiocristallographie (Ben Shem *et al*, 2012 ; PDB : 4V88, 3U5B et 3U5D).**

(**A.–D.**) Différentes vues de la structure 3D. (**B. et C.**) Des rotations de 180° et 90° autour de l'axe y ont été effectuées par rapport à **A.** respectivement. **D.** Une rotation de 90° autour de l'axe y a été effectuée par rapport à **B.** L'ARNr 18S et les protéines de la petite sous-unité ribosomique 40S sont respectivement représentés en bleu clair et bleu foncé. Les ARNr 25S, 5,8S et 5S et les protéines de la grande sous-unité ribosomique sont respectivement représentés en jaune et orange. Les représentations ont été réalisées avec le logiciel Pymol.

**A.**

796
766
759
632
974
619
578
541
28
466
436
420
414
100
106
302
120
211
999
1007
1126
1639
1290
1415
1428
1271
1269
1187
1181
1191
1575
1572
1781
1782
5'
3'

**B.**

**Figure 2 : Structure des ARNr 18S, 25S, 5,8S et 5S chez *Saccharomyces cerevisiae* (Ben Shem *et al*, 2012 ; PDB : 4V88, 3U5B et 3U5D).**

**A.** Structure secondaire de l'ARNr 18S présent au sein de la petite sous-unité ribosomique 40S. L'ARNr 18S est représenté en bleu clair. **B.** Structure secondaire des ARNr 25S, 5,8S et 5S présents au sein de la grande sous-unité ribosomique 60S. L'ARNr 25S est représenté en jaune, l'ARNr 5,8S en rouge, et l'ARNr 5S en orange. (**A. et B.**) Les nucléotides modifiés présents au sein des différents ARNr sont indiqués. L'identification des positions des nucléotides modifiés est basée sur des travaux antérieurs (Veldman *et al*, 1981 ; Bakin *et al*, 1994, 1995 ; Lane *et al*, 1995 ; Ofengand *et al*, 2001, 2004). Les interactions tertiaires entre certains nucléotides sont représentées par des lignes noires. M : 2'-O-méthylation (vert) , ψ : pseudouridylation (rouge), m : méthylation de la base azotée (orange). **C.** Structure tridimensionnelle de l'ARNr 18S présent au sein de la petite sous-unité ribosomique 40S (PDB : 4V88, 3U5B). **D.** Structure tridimensionnelle des ARNr 25S, 5,8S et 5S présents au sein de la grande sous-unité ribosomique 60S (PDB : 4V88, 3U5D). **(C. et D.)** Les structures secondaires avaient également été proposées dans des travaux antérieurs (Veldman *et al*, 1981). Les représentations ont été réalisées avec le logiciel Pymol

que l'interface entre les 2 sous-unités ribosomiques est principalement dépourvue de protéines ribosomiques, et que le site de formation des liaisons peptidiques est entièrement délimité par les ARNr. Ce qui est en accord avec l'idée émise depuis longtemps que le ribosome est en fait un ribozyme, dont l'ARN porte les fonctions catalytiques (Müller *et al*, 1981 ; Nissen *et al*, 2000).

La biogenèse des ribosomes eucaryotes cytoplasmiques est un processus multi-étapes dynamique, ordonné, coopératif et contrôlé. Le processus d'assemblage d'un ribosome entier est très complexe et très coûteux d'un point de vue énergétique. En effet, la biogenèse de ces ribosomes nécessite l'intervention des 3 ARN polymérases I, II, et III, qui transcrivent chacune une espèce d'ARN différente. L'ARN polymérase I est impliquée dans la transcription des ARNr matures 18S, 5,8S et 25S, l'ARN polymérase II transcrit les ARNm permettant l'expression de la totalité des protéines ribosomiques et des facteurs d'assemblage, ainsi que la transcription des petits ARN nucléolaires (snoRNA), tandis que l'ARNr mature 5S et les ARNt sont transcrits par l'ARN polymérase III. La machinerie d'épissage est également mise à contribution pour éliminer les introns des pré-ARNm, de même que la machinerie de traduction avec les ribosomes fonctionnels déjà présents dans la cellule devant traduire ces ARNm et ainsi produire l'ensemble des protéines fonctionnelles et nécessaires à la biogénèse des néo-ribosomes. En conséquence, chez S. cerevisiae où il y a peu d'introns, qui sont majoritairement localisés dans des gènes de protéines et facteurs du ribosome, près de 70% des évènements de transcription, 90% des évènements d'épissage et 25% des évènements de traduction sont dédiés à la biogenèse des ribosomes (pour revue, Woolford & Baserga, 2013). Ceci malgré le fait que jusqu'à 2000 ribosomes peuvent être produits par minute, pour une population de près de 200 000 ribosomes par cellule (Warner, 1999), Lewis & Tollervey 2000). Ce processus essentiel est donc très couteux pour la cellule.

En ce qui concerne les ribosomes bactériens, entre les années 1965 et 1975, la reconstitution des sous-unités des ribosomes a pu être réalisée *in vitro*, dans des conditions néanmoins éloignées de la physiologie normale, en présence des ARNr bactériens et des protéines ribosomiques purifiées. Ces travaux avaient permis de mettre en évidence des protéines capables de se lier directement avec les ARNr (protéines primaires) et de protéines se liant une fois que ces protéines étaient fixées. Ceci a ensuite permis d'identifier les sites de fixation de ces protéines

primaires (Held *et al*, 1973 ; Nierhaus & Dohme 1974 ; pour revue, Nierhaus 1991 ; Culver, 2003). Ensuite, les analyses des ARNr avaient mis en évidence la présence de nucléotides modifiés (Veldman *et al*, 1981) et des études biochimiques et génétiques ont permis d'identifier de nombreuses enzymes de maturation et de modification des différents ARNr interviennent lors de la biogenèse des ribosomes bactériens. En plus de ces enzymes, seul un nombre restreint de facteurs d'assemblage non-ribosomiques participent activement à la l'assemblage du ribosome bactérien (pour revue, Nierhaus 1991 ; Culver, 2003 ; Srivastava & Schlessinger, 1990). En effet, bien que ces facteurs soient importants, leur absence mène uniquement à un ralentissement de la biogenèse du ribosome. Leur présence n'étant pas indispensable, il a été proposé que leur rôle serait plutôt de faciliter l'assemblage du ribosome quand, par exemple, les conditions physiologiques ne sont pas optimales. L'ordre d'assemblage des protéines ribosomiques de la petite sous-unité a été ensuite défini en déterminant la nature des pré-ARNr associés avec les différentes protéines ribosomiques (Ferreira-Cerca *et al*, 2007). Chez les bactéries, il est admis que les protéines ribosomiques s'assemblent au niveau des transcrits naissants, et ce, de manière couplée au repliement et à la maturation des pré-ARNr. Ces événements induisent des changements de conformation majeurs des ARN permettant le recrutement ordonné des protéines ribosomiques et dirigeant alors l'organisation structurale des 2 sous-unités jusqu'à leurs formes finales (Spahn *et al*, 2001 ; Ferreira-Cerca *et al*, 2007 ; Kaczanowska & Ryden-Aulin, 2007 ; Jomaa *et al*, 2011 ; Rabl *et al*, 2011 ; Ben Shem *et al*, 2011). Trois catégories de protéines ribosomiques ont ainsi été déterminées (Held & Nomura, 1974). Les ligands primaires, qui correspondent aux protéines se liant directement à l'ARNr identifié auparavant, interagissant directement avec les ARNr naissants, les ligands secondaires nécessitant la présence des ligands primaires, et les ligands tertiaires nécessitant la présence des deux types de ligands précédents. L'assemblage du ribosome se déroulerait alors de la manière suivante : (i) recrutement au niveau des ARNr naissants d'un premier lot de protéines, les ligands primaires ; (ii) événement de réarrangement structural, puis recrutement d'un deuxième lot de protéines, les ligands secondaires ; (iii) deuxième événement de réarrangement structural et recrutement d'un troisième lot de protéines, les ligands tertiaires (Ferrera-Cerca, 2007 ; Pöll 2009). Il semble donc que la biogenèse des ribosomes chez les bactéries dépende largement de la conformation des ARNr naissants, sur lesquels se fixent les

protéines ribosomiques selon le niveau de maturation de ces pré-ARNr, menant ainsi à un processus ordonné et coopératif (pour revue, Nomura, 1990 ; Nierhaus, 1991). Par ailleurs, l'étude des ARN bactériens a permis de mettre en évidence des structures homologues à celles présentées dans l'ARNr entrant en compétition pour la fixation des protéines ribosomiques, mécanisme à la base du rétrocontrôle traductionnel des protéines ribosomiques dans les bactéries (Branlant *et al*, 1977, 1980 ; Sloof *et al*, 1978 ; Krol *et al*, 1978 ; Baughman *et al*, 1983 ; Cole *et al*, 1987**).**

Contrairement, à ce qui a été observé pour les bactéries, la reconstitution de ribosomes eucaryotes *in vitro* est difficile, voir impossible, du fait de l'implication de trop nombreux facteurs d'assemblage et la nécessité de leur intervention à des localisations précises dans les différents compartiments cellulaires, augmentant ainsi sensiblement la complexité du mécanisme. Toutefois, la reconstitution *in vitro* d'un ribosome eucaryote fonctionnel a été effectuée à partir d'ARN et de protéines ribosomiques purifiés de *dictyostelium discoideum* (Mangiarotti & Chiaberge, 1997). Cette reconstitution *in vitro* s'est en outre montrée plus efficace en utilisant des intermédiaires de maturation d'ARNr plutôt que des ARNr matures. Elle a montré que certaines protéines ribosomiques de la grande sous-unité (L4, L17, L20 et L25) s'associent préférentiellement au niveau du transcrit pré-ARNr 35S, précurseur des ARNr matures 18S, 5,8S et 25S, plutôt qu'au niveau de l'ARNr mature 25S, la protéine ribosomique L4 interagissant même seulement avec le pré-ARNr 35S (Yeh & Lee, 1998). Ces résultats confirment bien que l'assemblage du ribosome commence directement sur les intermédiaires de maturation des ARNr.

Les données obtenues pour la biogenèse des ribosomes bactériens ont constitué une première base pour essayer de comprendre la biogenèse des ribosomes cytoplasmiques eucaryotes. Mais dès les années 1970, des expériences de gradients de saccharose, réalisées avec des extraits de levure, avaient permis d'identifier des particules contenant les ARN et protéines ribosomiques ayant des coefficients de sédimentation différents de ceux des sous-unités ribosomiques. Il s'est avéré que la particule 90S est un précurseur des particules 66S et 43S et que ces particules 66S et 43S sont elles-mêmes, respectivement les précurseurs des sous-unités ribosomiques matures 60S et 40S (Udem & Warner, 1972). Cette information a permis une avancée importante dans la compréhension de la biogenèse des ribosomes cytoplasmiques eucaryotes. Par la suite, le développement

et le perfectionnement d'outils de plus en plus performants (biochimiques, biophysiques, criblages génétiques des facteurs d'assemblage) a permis de purifier et de caractériser des complexes intermédiaires ARN/protéines via des protéines étiquetées et en utilisant des systèmes de purification performants, suivi d'analyses protéomiques par spectrométrie de masse à grande échelle et à haut-débit (Bassler *et al*, 2001 ; Harnpicharchai *et al*, 2001 ; Dragon *et al*, 2002 ; Gavin *et al*, 2002 ; Grandi *et al*, 2002 ; Ho *et al*, 2002 ; Nissan *et al*, 2002 ; Milkereit *et al*, 2003 ; Saveanu *et al*, 2003 ; Schäfer *et al*, 2003 ; Tschochner & Hurt, 2003).

La biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes ne se déroule pas exactement de la même manière que chez les bactéries, bien que des similitudes existent, notamment au niveau du rôle important de la conformation des pré-ARNr, qui évoluent dans certaines régions au cours de la maturation, guidant ainsi l'association des protéines ribosomiques. En effet, une grande différence réside dans le fait que l'assemblage des ribosomes eucaryotes nécessite un nombre impressionnant de facteurs d'assemblage, et le nombre de facteurs impliqués identifiés est en constante évolution depuis les dernières décennies. A ce jour, on compte environ 200 facteurs d'assemblage non-ribosomiques essentiels et conservés chez les eucaryotes (pour revue, Woolford & Basserga, 2013 ; Lafontaine, 2015). Dans un grand nombre de cas, l'absence d'un seul facteur d'assemblage ou son non-fonctionnement peut perturber l'assemblage entier des ribosomes. La fonction de certains de ces facteurs d'assemblage n'a pas encore été élucidée. En effet certaines protéines essentielles pour la biogenèse des ribosomes n'ont pas de rôle clairment identifié dans clairment identifié dans l'assemblage, la maturation, la modification ou le transport des pré-ribosomes (pour revue, Venema & Tollervey, 1999 ; Fatica & Tollervey, 2002 ; Tschochner & Hurt, 2003 ; Fromont-Racine *et al*, 2003). Une autre différence importante entre bactéries et eucaryotes est l'intervention de nombreuses snoRNP (proche de 80) lors de la biogenèse des ribosomes cytoplasmiques eucaryotes, où certaines ont un rôle essentiel (pour revue, Woolford & Basserga, 2013 ; Lafontaine, 2015). Les archaea utilisent également, comme les eucaryotes, des sRNP. Une autre différence non-négligeable entre les ribosomes bactériens et cyoplasmiques chez les eucaryotes est que la biogenèse des ribosomes cytoplasmiques eucaryotes ne requiert pas seulement la coordination des événements de maturation et d'assemblage, mais également une séquence spatio-temporelle supplémentaire à

travers plusieurs compartiments cellulaires. En effet, la biogenèse des ribosomes eucaryotes commence dans le nucléole, se poursuit dans le nucléoplasme pour se terminer dans le cytoplasme. L'export dans le cytoplasme à travers la membrane nucléaire est également une étape importante pour la biogenèse des ribosomes. Une telle hiérarchie permet d'augmenter l'efficacité et le contrôle des processus cellulaires en réunissant les différents acteurs sur leur site d'action.

Le nucléole est une région du noyau qui n'est pas délimitée par une membrane mais qui est définie par la localisation spécifique d'acides nucléiques et de protéines bien définis au sein du noyau. Le nucléole est le lieu de transcription des pré-ARNr. Il s'assemble sous la forme de pré-nucléoles formés autour des gènes exprimant les différents ARNr. Le nucléole comporte 3 régions distinguables par microscopie électronique : le centre fibrillaire (FC) où l'on retrouve majoritairement l'ADNr sous forme inactive, le composant fibrillaire dense (DFC) renfermant des transcrits naissants et correspondant au site des évènements de maturation précoces, et enfin le composant granulaire (GC) contenant des pré-ribosomes en formation, et constitue le site d'événements de maturation tardifs (**Fig. 3**) (Prieto & McStay, 2005 ; Thiry & Lafontaine, 2005 ; Raska *et al*, 2006).

Le nucléole est également le siège des modifications post-transcriptionnelles des pré-ARNr et de certaines modifications générées dans d'autres ARN non codants (ARNnc) (certaines modifications des ARNt et des UsnRNA, en particulier le snARN U6). L'ultrastructure du nucléole est censée participer activement à l'ordre spatio-temporel de la voie de synthèse des ribosomes en séquestrant les facteurs spécifiques de maturation en son sein (Sheer & Hock, 1999).

Malgré tout, des constantes dans la biogenèse des ribosomes sont retrouvées chez toutes les espèces (pour revue, Lafontaine & Tollervey, 2001 ; Symmons *et al*, 2002 ; El Hage & Tollervey, 2004), telles que l'organisation de l'ADN ribosomique (ADNr) avec en amont la région correspondant à l'ARNr de la petite sous-unité ribosomiques et en aval celle du ou des ARNr de la grande sous-unité. Par contre, la structure du ribosome mature, ainsi que la structure et le repliement des ARNr, des ARNr et des protéines ribosomiques sont très conservées.

Par rapport aux ribosomes bactériens, les ribosomes cytoplasmiques eucaryotes possèdent protéines ribosomiques supllémentaires (24) et des extensions dans les

ARNr très variables suivant les espèces supplémentaires par rapport au ribosome bactérien. Les protéines supplémentaires sont localisées hors du domaine cœur fonctionnel réparties à la périphérie du ribosome cœur fonctionnel fortement conservé au cours de l'évolution, en particulier au niveau de la face opposée aux 3 protubérances dans le cas de la grande sous-unité ribosomiques 60S, et elles apportent des fonctions additionnelles. Par ailleurs, les données actuelles montrent l'existence de populations hétérogènes de ribosomes dans les cellules (Ramagopal, 1992 ; Gilbert, 2011 ; Xue & Barna, 2012). Ces ribosomes dits « spécialisés » sont le fruit d'une expression spécifique de l'ADNr selon les conditions physiologiques de la cellule, de l'activation cellule-spécifique de voies alternatives ou cryptiques de maturation des pré-ARNr, des modifications différentielles des ARNr et des protéines ribosomiques, ou encore de l'assemblage de formes alternatives de protéines ribosomiques. En outre, le statut de ces ribosomes hétérogènes plus ou moins modifiés pourrait reflèter l'abondance relative des snoRNP responsables de leur modification ou impliquer des composants régulateurs additionnels. Il faut également souligner le fait qu'il existe 2 formes d'ARNr 5,8S, la forme courte ($5,8S_s$) et la forme longue ($5,8S_l$), qui, au sein du ribosome, mènent à la traduction de différents groupes d'ARNm (Selker *et al*, 1985 ; Schmitt & Clayton, 1993 ; Henry *et al*, 1994 ; Komili *et al*, 2007). Ce type de ribosome non-conventionnel est également retrouvé notamment dans des cancers, les ribosomopathies et d'autres pathologies (Ruggero & Pandolfi, 2003 ; Mayer & Grummt, 2006 ; Gilkes & Chen, 2007 ; Dai & Lu, 2008 ; Deisenroth & Zhang, 2010 ; Freed *et al*, 2010 ; Narla & Ebert, 2010 ; Van Riggelen *et al*, 2010). De plus, la production des ribosomes est étroitement corrélée avec les conditions environnementales et la disponibilité en nutriments (Loar *et al*, 2004 ; Liu *et al*, 2001). Les ribosomes sont également des composants clefs dans le cycle cellulaire et régule la taille et la croissance cellulaire (Dez & Tollervey, 2004 ; Warner, 1999 ; Lempiäinen & Shore, 2009 ; Jorgensen *et al*, 2004) grâce à un mécanisme de « sensing » du niveau de ribosomes matures présents dans la cellule, mais également de l'efficacité de leur biogenèse (Bernstein *et al*, 2007). En effet, si le ribosome ne peut être assemblé suite, par exemple, à la déplétion de facteurs impliqués dans sa biogenèse, il s'en suit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Bernstein & Baserga, 2004). Le processus de biogenèse du ribosome promeut donc l'enchainement des phases du cycle cellulaire. Dans les cancers ce phénomène est souvent dérégulé (Ruggero *et al*, 2003).

**Figure 3 : Visualisation du nucléole par microscopie électronique chez *S. cerevisiae***

Le nucléole est délimité par 3 régions : le centre fibrillaire (FC), le composant fibrillaire dense (DFC) et le composant granulaire (GC) (Prieto & McStay, 2005 ; Thiry & Lafontaine ; Raska *et al*, 2006 ; Sheer & Hock, 1999).

La biogenèse du ribosome est donc un processus complexe qui nécessite d'être élucidé précisément. Son étude a déjà été entreprise depuis de longues années et notre équipe y a participé depuis longtemps. Cependant, il reste encore de grandes questions à résoudre pour aboutir à une compréhension complète. En effet, bien que l'on ait beaucoup d'informations sur les composants impliqués, le rôle respectif de chacun, en particulier dans la biogenèse, n'est pas encore complètement élucidé et une question importante qui subsiste est d'établir la connectivité entre les différents systèmes impliqués.

# II. Maturation des ARNr chez *Saccharomyces cerevisiae*

## II.1. Organisation de l'ADN ribosomique

Chez *S. cerevisiae*, les loci d'ADNr sont regroupés dans le nucléole sur le chromosome XII, sous la forme de répétitions en tandem, allant jusqu'à un nombre de 200 **(Fig. 4)** (Thiry & Lafontaine, 2005).

Ces régions font partie des régions organisatrices du nucléole, ou NOR (Nucleolar Organizing Regions), qui participent à la formation du nucléole. Chaque répétition d'ADNr est composée de 9,1 kpb contenant deux unités transcriptionnelles, une pour le pré-ARNr 35S et une pour le pré-ARNr 5S en antisens. La séquence d'ADNr correspondant au pré-ARNr 5S, précurseur du futur ARNr mature 5S, est comprise entre les séquences non transcrites NTS1 et NTS2 (NonTrancribed Spacer). La séquence correspondant au pré-ARNr 35S, précurseur des futurs ARNr matures 18S, 25S et 5,8S, est constituée des 3 régions exprimant les différents ARNr matures 18S, 5,8S, ou 25S, séparées par 2 séquences internes transcrites ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Spacer) et bornées par 2 séquences externes transcrites 5'-ETS et 3'-ETS (External Transcribed Spacer) **(Fig. 4)**. La co-localisation des gènes des ARNr 18S, 5,8S et 25S et des gènes de l'ARNr 5S est une caractéristique propre de *S. cerevisiae*, et n'est pas observée chez d'autres eucaryotes, où les différentes répétitions d'ADNr sont souvent réparties sur plusieurs chromosomes chez les autres eucaryotes (chez l'homme, les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 pour les gènes des ARNr 18S, 5,8S et 28S et le chromosome 1 pour les gènes des ARNr 5S) **(Fig. 4)** (Thompson *et al*, 2003, Sirri *et al*, 2008). Par contre, l'enchaînement 5'-ETS ; 18S ; ITS1 ; 5,8S ; ITS2 ; 25S/28S ; 3'-ETS est conservé

A.
Saccharomyces cerevisiae
Chromosome XII
ADNr
ADNr
ADNr
150-200 répétitions d'ADNr
pré-ARNr 35S
18S
5,8S
25S
NTS1
NTS2
5S
5'-ETS
ITS1
ITS2
3'-ETS
pré-ARNr 5S
Unité d'ADNr (9,1 kpb)
Transcription
par l'ARN polymerase I
A0
A1
D
A2
A3
B1L
B1S
E
C2
C1
B2
B0
18S
5,8S
25S
5'-ETS
ITS1
ITS2
3'-ETS
pré-ARNr 35S
Maturation
18S
5,8S
25S
ARNr matures
B.
Autres eucaryotes
Plusieurs chromosomes
ADNr
répétitions d'ADNr
pré-ARNr 45S/47S
18S
5,8S
28S
5'-ETS
ITS1
ITS2
3'-ETS
ADNr
répétitions d'ADNr
5S
pré-ARNr 5S

**Figure 4 : Organisation génomique et transcription de l'ADNr chez *S. cerevisiae* et les autres eucaryotes.**

**A. et B.** Organisation génomique de l'ADNr chez *S. cerevisiae* et les autres eucaryotes respectivement. **A.** Chez *S. cerevisiae*, les unités d'ADNr sont retrouvées sous la forme de 150 à 200 répétitions en tandem au niveau du chromosome XII (Thiry & Lafontaine, 2005). Chaque unité d'ADNr de 9,1 kpb contient deux unités transcriptionnelles en sens opposé, donnant le pré-ARNr 35S transcrit par l'ARN polymérase I, et le pré-ARNr 5S transcrit par l'ARN polymérase III. Au niveau de l'ADNr, ces deux unités sont séparées par des régions non transcrites délimitant l'ARNr 5S, NTS1 et NTS2. Au niveau de l'unité transcriptionnelle donnant le pré-ARNr 35S, les séquences correspondant aux futurs ARNr matures sont bornées par des séquences transcrites externes, 5'-ETS et 3'-ETS, et séparées par des séquences transcrites internes, ITS2 et ITS2. Les sites de maturation endonucléolytiques permettant la production des ARNr matures sont indiqués en violet. **B.** Chez les autres eucaryotes, les unités d'ADNr sont également retrouvées sous la forme de répétitions en tandem, mais sont situées sur plusieurs chromosomes différents, et les deux unités transcriptionnelles sont indépendantes (Thompson *et al*, 2003 ; Sirri *et al*, 2008 ; Douet *et al*, 2007 ; Ciganda *et al*, 2011). NTS1/2 : Non Transcribed Spacer, 5'/3'-ETS : 5'/3'-External Transcribed Spacer, ITS1/2 : Internal Transcribed Spacer.

chez les eucaryotes, bien que les ETS et ITS varient en taille. En particulier, les séquences ITS1 et ITS2 ont subi une expansion de taille considérable au cours de l'évolution (de 2,5 kpb chez la levure à 30 kpb chez l'homme) et ces séquences pourraient avoir des fonctions. En effet, il a été observé que des ARNnc sens et antisens sont transcrits par l'ARN polymérase II à partir de ces séquences intergéniques chez la levure et chez les mammifères (Houseley *et al*, 2007). Ces transcrits sont rapidement ciblés par le complexe TRAMP-exosome et une de leur fonction serait de maintenir le nombre de copies d'ADNr (Houseley *et al*, 2007).

Au sein de l'ensemble des répétitions d'ADNr, il existe un ratio entre les formes transcriptionnellement actives et inactives (Sandmeier *et al*, 2002), ce qui peut réguler en partie le taux de synthèse des différents ARNr et ainsi contribuer à la régulation de la biogenèse des ribosomes. La proportion de régions transcriptionnellement actives peut être modulée en fonction des conditions de croissance, comme le souligne le fait que le nombre de régions actives diminue lors de la progression de la phase exponentielle vers la phase stationnaire (Dammann *et al*, 1993 ; Toussaint *et al*, 2005).

## II.2. Transcription du précurseur pré-ARNr 35S chez *Saccharomyces cerevisiae*

La biogenèse des ribosomes cytoplasmiques de levure *S. cerevisiae* démarre dans le nucléole avec la transcription par l'ARN polymérase I d'un long précurseur polycistronique pré-ARNr 35S, à partir des différentes répétitions d'ADNr décrites ce-dessus. Le pré-ARNr 35S contient les séquences des ARNr 18S, 5,8S et 25S, et les séquences additionnelles ITS1, ITS2, 5'-ETS et 3'-ETS **(Fig. 4 et 16)**. Le pré-ARNr 35S est le plus grand des pré-ARNr détectés dans la cellule. Il débute au site d'initiation de la transcription et inclus une partie de la région 3'-ETS. En effet, le site de terminaison de la transcription est prédit être localisé 200 nts en aval de l'extrémité 3' du pré-ARNr 35S. Le transcrit entier est difficilement détectable, car il existe un événement de clivage co-transcriptionnel très efficace survenant au niveau du site B0 au sein de la région 3'-ETS, réalisé par l'endonucléase Rnt1, homologue de la RNAse III bactérienne. Elle permet de produire le pré-ARNr 35S (Kempers-Veenstra *et al*, 1986 ; Elela *et al*, 1996 ; Kufel *et al*, 1999 ; King *et al*, 1984). Une fois

le clivage au site B0 réalisé, les exonucléases Rat1 et Xrn1 hydrolysent le fragment 3' libéré.

### II.3. Maturation du pré-ARNr 35S

Le pré-ARNr 35S est le précurseur des ARNr matures 18S, 5,8S et 25S. Afin de les libérer, il subit une série de clivages endo- et exonucléolytiques, ainsi que des modifications des nucléotides. Ces différents événements ne se déroulent pas sur un ARN nu, mais sont accompagnés par l'assemblage de certaines des protéines ribosomiques et fait intervenir un grand nombre de facteurs d'assemblage protéiques et ribonucléoprotéiques, l'ensemble formant des particules pré-ribosomiques de taille imposante. Au cours de ces événements de maturation, des réorganisations structurales correspondant à différents repliements successifs des pré-ARNr, permettant l'association des protéines ribosomiques, ont lieu. Des facteurs d'assemblage et des snoRNP s'associent pour participer à la biogenèse. Les pré-ARNr isolés peuvent adopter un grand nombre de structures secondaires retrouvées dans les ARNr matures. Cependant la formation de certaines de ces structures lors de la transcription doit parfois être ralentie afin de faciliter certaines étapes de maturation du pré-ARNr ou d'assemblage des protéines. Certains facteurs d'assemblage et les snoRNP pourraient servir à stabiliser des conformations optimales pour la maturation ou l'assemblage en fonctionnant comme des chaperonnes. De plus, la maturation des pré-ARNr suit un ordre strict, suggérant que certains facteurs inhibent l'utilisation de sites de maturation jusqu'au moment approprié de la biogenèse. La fixation de ces protéines peut moduler la structure des pré-ARNr localement ou à distance, afin de créer les sites de fixation pour l'assemblage ultérieur d'autres protéines (Jagannathan & Culver, 2004 ; Ramaswamy & Woodson, 2009). Dans les sous-unités ribosomiques assemblées, la majorité des protéines ribosomiques interagissent directement avec les ARNr et pénètrent profondément via des extensions dans le cœur structural des ARNr (Armache *et al*, 2010a ; Ben-Shem *et al*, 2011 ; Rabl *et al*, 2012). Les protéines ribosomiques peuvent également représenter des sites d'interactions directs pour les différents facteurs d'assemblage. Il a été montré qu'en l'absence de certaines protéines ribosomiques, des défauts dans des étapes distinctes de maturation étaient observés, montrant leur importance dans la maturation des pré-ARNr (Moritz

*et al*, 1990 ; Deshmukh *et al*, 1993 ; Van Beekvelt *et al*, 2001 ; Jakovljevic *et al*, 2004, 2012 ; Leger-Silvestre *et al*, 2004 ; Ferreira-Cerca *et al*, 2005, 2007 ; Martin-Marcos *et al*, 2007 ; Rosado *et al*, 2007 ; Zhang *et al*, 2007 ; Robledo *et al*, 2008 ; Poll *et al*, 2009 ; Babiano & De La Cruz, 2010 ; Neueder *et al*, 2010 ; Fernandez-Pevida *et al*, 2012 ; Gamalinda *et al*, 2013 ; Ohmayer *et al*, 2013). Les fcteurs d'assemblage ne se lient que transitoirement et permettent la libération successive et ordonnée des différents facteurs et des snoRNP (Ulbrich *et al*, 2009 ; Bassler *et al*, 2010 ; Kressler *et al*, 2012).

Ces différentes étapes de maturation initialement décrites comme se déroulant après la transcription du pré-ARNr 35S et le clivage par Rnt1 sont maintenant considérées comme ayant lieu de manière co-transcriptionnelle au sein de la particule 90S et des complexes formés par la suite (Udem & Warner, 1972 ; Venema & Tollervey, 1999 ; Trapman *et al*, 1975). En effet, les facteurs nécessaires aux différentes étapes de maturation s'associent précocement au transcrit naissant et la maturation de l'ARnr 18S est complètement indépendante de celle des ARNr 5,8S et 25S/28S, l'ensemble ne dépendant pas non plus du clivage initial de la région 3'-ETS, ni de la terminaison de la transcription (Henry *et al*, 1994 ; Nogi *et al*, 1991 ; Venema *et al*, 1995). L'argument le plus fort a été l'observation par microscopie électronique des boutons terminaux localisés aux extrémités 5' des transcrits naissants, se formant durant la transcription du pré-ARNr 35S (Fig. 5) (Miller & Beatty, 1969 ; Mougey *et al*, 1993 ; Liang & Fournier 1997 ; Dragon *et al*, 2002 ; Osheim *et al*, 2004 ; Kos & Tollervey, 2010).

On parle de structures en arbre de Noël, ou l'ADNr représenterait le tronc de l'arbre, les nouveaux transcrits les branches et les boutons terminaux représentant les boules. Ces boutons terminaux correspondent à des complexes de maturation précoces qui s'associent à la région en 5' du transcrit naissant, et où se déroulent les premiers évènements de clivages permettant la libération des particules pré-40S, précurseurs de la petite sous-unité ribosomique 40S. Chaque répétition d'ADNr est soumise à plusieurs cycles de transcription simultanées, qui en fonction de l'avancement de la transcription donnent naissance à des transcrits de tailles différentes, où s'assemblent alors de manière co-transcriptionnelle des complexes protéiques. Le premier macrocomplexe formé a été nommé le processome 90S. Ainsi, la maturation du pré-ARNr 35S se déroule co-transcriptionnellement, comme

**Figure 5 : Formation co-transcriptionnelle des particules pré-ribosomiques chez *Saccharomyces cerevisiae* (Osheim *et al*, 2004 ; Gallagher *et al*, 2004).**

Observation par microscopie électronique d'un gène d'ADNr en cours de transcription. Après démarrage de la transcription, un macro-complexe appelé le SSU-processome se forme à l'extrémité 5' des pré-ARNr naissants et forme les boutons terminaux. Les évènements de clivages précoces sur les pré-ARNr se déroulent alors au sein du processome, jusqu'au clivage au site A2, qui permet la libération de la particule pré-40S. Les boutons terminaux correspondants au processome ne sont alors plus visualisés, puis sont remplacés progressivement par un nouveau complexe de maturation formé pour la production de la particule pré-60S.

chez les bactéries et les archaea (Osheim 2004 ; Kos & Tollervey 2010). Cependant, une différence réside dans le fait que cette maturation peut également, en fonction des circonstances, se dérouler de manière post-transcriptionnelle. En effet, il a été montré que plus de 70% des pré-ARNr naissants subissaient des clivages précoces co-transcriptionnellement dans des conditions de croissance optimales (Osheim 2004 ; Kos & Tollervey 2010). Par contre, lorsque les conditions environnementales ne sont pas favorables (choc thermique, phase stationnaire), la maturation du pré-ARNr semble plutôt être post-transcriptionnelle (Osheim 2004 ; Kos & Tollervey 2010). Les levures semblent ainsi capables de réaliser la maturation du pré-ARNr 35S de manière co- ou post-transcriptionnelle, ce qui peut fournir un moyen de régulation supplémentaire lors de la biogenèse des ribosomes.

Les chapitres qui vont suivre décriront plus précisément les différents composants intervenant dans la maturation du pré-ARNr 35S qui permet d'aboutir à la formation de la petite sous-unité ribosomique 40S chez *S. cerevisiae*.

# Chapitre 1 : Les snoRNP impliquées dans la maturation du pré-ARNr 35S

## I. Modifications des résidus des ARNr

De manière précoce au cours de sa transcription, le pré-ARNr 35S est fortement modifié dans le nucléole au niveau des séquences correspondant aux futurs ARNr matures (Klootwijk *et al*, 1972 ; Brand *et al*, 1977 ; Maden, 1990 ; Ofengand *et al*, 1995 ; Maden & Hugues, 1997 ; Decatur & Fournier, 2003 ; Osheim *et al*, 2004 ; Kos & Tollervey, 2010 ;). Les deux plus fréquentes sont les pseudouridylations et les 2'-O-méthylations **(Fig. 6 et 7)** (Veldman *et al*, 1981 ; Balakin *et al*, 1996 ; Kiss-Laszlo *et al*, 1996 ; Ganot *et al*, 1997 ; Decatur & Fournier, 2002 ; Liang *et al*, 2009 ; Watkins & Bohnsack, 2012). Ces modifications sont respectivement catalysées par des complexes ARN/protéines, snoRNP à boîtes H/ACA et à boîtes C/D. Ces snoRNP, nommées d'après la présence de motifs conservés de leurs ARN caractérisés comme étant nucléolaires, sont constituées par le petit ARN nucléolaire associé à un ensemble constant de protéines dites cœur. Les snoRNP réalisent leurs fonctions dans le nucléole **(Fig. 6 et 7)** (Kiss *et al*, 2010 ; Watkins & Bohnsack, 2012). Leur mécanisme d'action repose sur une séquence spécifique du snoARN, qui sert de guide afin de cibler la séquence de l'ARNr à modifier. Ainsi, en utilisant les mêmes protéines cœur associées à plusieurs snoARN différents, un même type de modification peut être catalysé à différentes positions sur les ARNr **(Fig. 6 et 7)**.

Ces modifications sont plus fortement concentrées dans des régions universellement conservées des ARNr impliquées dans la fonction du ribosome (Veldman *et al*, 1981 ; Bakin *et al*, 1994). Elles sont particulièrement localisées au niveau du centre peptidyl transférase (PTC), essentiel à la fonction du ribosome, à l'interface entre les 2 sous-unités ribosomiques, (Decatur *et al*, 2007). De plus ces modifications de la nature chimique du nucléotide peuvent faciliter le repliement des ARN et favoriser les appariements entre les segments d'ARN, jouant ainsi un rôle également dans la conformation et la stabilisation des ARN ( Krol *et al*, 1981 ; Branlant *et al*, 1981 ; Kowalak *et al*, 1995 ; Green & Noller, 1996 ; Nissen *et al*, 2000).

Aucun mécanisme de régulation de l'activité des snoRNP ou de détection de la présence des modifications n'a été mis en évidence à ce jour. De plus, la délétion individuelle de la plupart des snoARN, qui sont seulement responsables de modification (nous verrons ultérieurement l'importance de ceux impliqués dans les clivages), n'ont pas d'effets notables sur la croissance, la biogenèse, la stabilité ou la fonction des ribosomes (Parker *et al*, 1988 ; Qu *et al*, 1999 ; Tollervey & Kiss, 1997). Par ailleurs, il peut arriver que des sites ne soient que partiellement modifiés au niveau des ARNr. Par exemple, seulement 68% de l'ARNr 18S est méthylé à la position A100 par la snoRNP snR51 (Buhhaupt *et al*, 2014). Néanmoins, l'importance de certaines des modifications est reflétée par le fait que la déplétion multiple de snoARN, en particulier ceux ciblant la région de décodage ou le PTC, conduit à une croissance ralentie voir abolie, un ralentissement de l'incorporation des acides aminés, une diminution de la fidélité et de l'efficacité de la traduction ou encore à une altération de la structure même des ARNr (King *et al*, 2003 ; Liang *et al*, 2007, 2009 ; Baxter-Roshek *et al*, 2007 ; Jack *et al*, 2011). La déplétion des protéines cœur associées aux snoARN provoque également une abolition de la croissance et des défauts dans la biogenèse des ribosomes mais il faut noter que ces protéines sont nécessaires pour former les snoRNP impliquées dans les étapes de clivages (Schimmang *et al*, 1989 ; Tollervey *et al*, 1991, 1993 ; Gautier 1997 ; Lafontaine & Tollervey,1999 ; Charrette & Gray, 2000). A noter aussi que l'absence de méthylation au niveau de certains sites peut entrainer l'inhibition d'autres évènements de modification, révélant une certaine interdépendance des différentes modifications (Birkedal *et al*, 2014). Ainsi, au moins certaines de ces méthylations et pseudouridylations sont importantes et essentielles pour le fonctionnement optimal du ribosome, et le fait que certaines n'aient pas toujours lieu à 100% dans les ARNr matures est aussi en accord avec la notion d'hétérogénéité des ribosomes et de « ribosomes spécialisés » énoncées précédemment. Comme nous le décrirons plus loin, certaines des snoRNP, aussi bien à boîtes C/D qu'à boîtes H/ACA, possèdent en plus un rôle essentiel dans les étapes de clivage.

De façon interessante, surtout chez les vertébrés, la biosynthèse des snoRNP est coordonnée avec celle des composants de la machinerie traductionnelle (Bachellerie *et al*, 2000). En effet, certains gènes des snoARN sont localisés dans des introns des ARNm permettant l'expression de protéines ribosomiques, tandis que d'autres

snoARN mono- ou polycistroniques sont transcrits à partir de régions promotrices contenant des sites de fixation de la protéine Rap1, connue pour contrôler l'activité transcriptionnelle des pré-ARNm codant les protéines ribosomiques de levure (Qu *et al*, 1999). De plus, la maturation des ARNr et des snoARN, qui sont aussi produits sous forme de précurseurs, font intervenir les mêmes enzymes de maturation (Rat1, Rnt1, Xrn1), des systèmes de co-régulation sont donc vraisemblablement mis en place afin d'assurer la coordination de la synthèse et de la maturation des différentes ARN, permettant d'assurer la biogenèse du ribosome.

## I.1. Les snoRNP à boîtes H/ACA guidant les pseudouridylations

Chez les eucaryotes, les snoRNP à boîtes H/ACA, nucléolaires, sont impliquées dans les réactions de pseudouridylation au niveau des ARNr. La réaction de pseudouridylation consiste en l'isomérisation d'un nucléotide uridine en pseudouridine, qui implique la coupure de la liaison N-osidique, suivi d'une rotation de 180° de la base azotée, et finalement établissement d'une nouvelle liaison C-osidique **(Fig. 6)**.

Les snoRNP à boîtes H/ACA sont composées d'un snoARN associé à 4 protéines « cœur » spécifiques conservées, retrouvées dans toutes les particules. Le snoARN à boîtes H/ACA, donnant son nom aux snoRNP à boîtes H/ACA, est constitué de 2 structures en tige boucle, séparées par une séquence contenant la boîte H conservée (5' – ANANNA – 3'), et se termine à l'extrémité 3' par la boîte ACA conservée (5' – ACA – 3') **(Fig. 6)** (Balakin *et al*, 1996, Ganot *et al*, 1997). Les boîtes H et ACA sont nécessaires à la stabilité et à la maturation du snoARN, ainsi qu'à l'activité de pseudourylation (Balakin et al, 1996 ; Bortolin et al, 1999 ; Ganot et al, 1997). Les snoARN à boîtes H/ACA d'archées se distinguent par la présence d'une à trois structures en tige boucle, possédant un motif en K-turn ou K-loop, et par l'absence de boîte H (Muller et al, 2008 ; Rozhdestvensky et al, 2003)

Les structures en tige boucle possèdent une région non-appariée, formant une boucle interne appelée poche de pseudourylation, où a lieu la modification (Ganot *et al*, 1997). Les ARN cibles s'y apparient par complémentarité avec le snoARN guide, laissant seulement 2 nucléotides non-appariés, dont l'un correspond à l'uridine cible

**A.**

**B.**

**Figure 6 : Formation des résidus pseudouridines et représentation de la structure 2D d'une snoRNP à boîtes H/ACA.**

**A.** La pseudouridylation consiste en une isomérisation du nucléotide uridine par une rupture de la liaision N-glycosidique (représentée en rouge) suivie d'une rotation de 180° de la base suivant l'axe N3-C6 (représentée en pointillé). Une nouvelle liaison carbonne-carbone (représentée en orange) est alors formée entre le C5 de l'uracile et le C1' du ribose. **B.** Représentation schématique d'une snoRNP à boîtes H/ACA. Cette particule est composée d'un snoARN à boîtes H/ACA (représenté en noir) et des 4 protéines « cœur », Cbf5, Nop10, Nhp2 et Gar1 (représentées en différentes teintes de gris). Le snoARN contient deux structures en tige-boucle, possédant chacune une région non-appariée appelée poche de pseudouridylation, ainsi que deux séquences conservées, les boîtes H et ACA (respectivement représentées en vert foncé et vert clair). Les particules H/ACA sont responsables de la pseudouridylation d'une uridine cible (représentée en orange) au sein des pré-ARNr. Pour cela, le snoARN, jouant le rôle de guide, s'apparie à l'ARN cible (représenté en rouge) par complémentarité de séquences au sein de la poche de pseudouridylation et la protéine Cbf5 catalyse la réaction.

à modifier **(Fig. 6)**. De plus, une distance de 14 à 16 nucléotides entre l'uridine cible et les boîtes H ou ACA est également importante et conservée (Ganot et al, 1997 ; Ni et al, 1997). La présence de 2 structures en tige boucle au sein de chaque snoRNP à boîtes H/ACA leur permet donc de catalyser 2 pseudouridylations par ARN cible. La protéine responsable de la réaction est la pseudouridine synthase Cbf5 (aussi appelée dyskérine chez l'humain et aCbf5 chez les archées). Les autres composants des snoRNP à boîtes H/ACA sont les protéines Nhp2 (L7Ae chez les archées), Nop10 (aNop10 chez les archées) et Gar1 (aGar1 chez les archées), toutes spécifiquement localisées dans le nucléole (**Fig. 6**) (Girard *et al*, 1992 ; Henras *et al*, 1998 ; Pogacic *et al*, 2000 ; Wang & Meier, 2004). La déplétion d'une des protéines cœur empêche la pseudouridylation des pré-ARNr (Bousquet-Antonelli *et al*, 1997 ; Henras *et al*, 1998 ; Lafontaine *et al*, 1998), et mise à part Gar1, ces protéines sont essentielles et nécessaires à la stabilité des snoARN à boîtes H/ACA chez la levure (Bousquet-Antonelli *et al*, 1997, Henras *et al*, 1998, Lafontaine *et al*, 1998, Watkins *et al*, 1998, Dez *et al*, 2001). La structure tridimensionnelle de snoRNP à boîtes H/ACA n'a pas encore été résolue chez la levure, mais des structures de sRNP actives catalytiquement chez les archées sont disponibles, pouvant servir de modèle (Li & Ye, 2006 ; Wu & Feigon, 2007 ; Duan *et al*, 2009 ; Liang *et al*, 2009 ; Hamma & Ferre-D'Amare, 2010 ; Zhou *et al*, 2011). Par ailleurs, les travaux mécanistiques réalisés chez les archaea par notre laboratoire et d'autres équipes ont permis de progresser dans la connaissance des interrelations entre protéines au sein des particules H/ACA, de leur spécificité d'action et des mécanismes catalytiques (Charpentier *et al*, 2007 ; Fourmann *et al*, 2013 ; Muller *et al*, 2007).

Les snoRNP à boîtes H/ACA jouent un rôle primordial dans les modifications des pré-ARNr, mais certaines particules ont également d'autres rôles dans la biogenèse des ribosomes.

### I.2. Les snoRNP à boîtes C/D guidant les 2'-O-méthylations

Chez les eucaryotes, les snoRNP à boîtes C/D sont responsables des réactions de 2'-O-méthylation au niveau des ARNr. La réaction de 2'-O-méthylation consiste en l'ajout d'un groupement méthyle en position 2' du ribose du nucléotide au niveau de

la fonction hydroxyle **(Fig. 7)**. Ce groupement méthyle provient du cofacteur SAM (S-Adenosyl Méthionine).

Tout comme les snoRNP à boîtes H/ACA, les snoRNP à boîtes C/D sont nucléolaires et sont composées d'un snoARN associé à 4 protéines cœur spécifiques conservées, retrouvées dans toutes les particules. Le snoARN à boîtes C/D, donnant ainsi son nom aux snoRNP à boîtes C/D, comporte 2 couples de boîtes C/D conservées : C/D et C'/D' **(Fig. 7)**. La boîte C (5' – RUGAUGA – 3') est localisée à l'extrémité 5' du snoARN tandis que la boîte D (5' – CUGA – 3') est localisée à l'extrémité 3'. Le second motif C'/D' est conservé et trouvé dans la majorité des snoARN mais dans certains snoARN il est dégénéré (Henras *et al*, 2004). Ces motifs s'arrangent en une structure en K-turn, permettant l'association de protéines spécifiques (Vidovic *et al*, 2000 ; Watkins *et al*, 2000, Marmier-Gourrier *et al*, 2003, Moore *et al*, 2004). Les ARN cibles s'associent par complémentarité avec le snoARN guide afin que le 5$^{ème}$ nucléotide en amont de la boîte D ou D' (lorsqu'elle est fonctionnelle) soit modifié **(Fig. 7)**. Chaque snoARN à boîtes C/D peut ainsi catalyser jusqu'à 2 réactions de méthylation, selon que le second couple C'/D' est fonctionnel ou non (Kiss-Laszlo *et al*, 1996, Nicoloso *et al*, 1996) (pour revues, Maden *et al*, 1996, Tollervey *et al*, 1996). Chez les eucaryotes, les 4 protéines cœur spécifiques des snoRNP à boîtes C/D sont les protéines Nop1 (ou fibrillarine chez l'humain et aNop1 chez les archées), Snu13 (15.5K chez l'humain et L7Ae chez les archées), Nop56 et Nop58 (NOP56 et NOP58 chez l'humain et Nop5 chez les archées) (**Fig. 7**). Ces protéines sont toutes importantes pour la localisation nucléolaire de la particule (Verheggen *et al*, 2001), tandis que seules Snu13 (Watkins *et al*, 2000) et Nop58 (Lafontaine *et al*, 1999) sont requises pour la stabilité de l'ensemble des snoARN à boîtes C/D. La protéine Nop1 quant à elle n'est indispensable que pour la stabilité d'un sous-ensemble particulier de snoARN. La méthyltransférase Nop1 est responsable de la réaction de méthylation avec le co-facteur SAM (Signh *et al*, 2008), et sa déplétion ou sa mutation bloquent la méthylation des ARN cibles (Tollervey *et al*, 1991, 1993). La protéine Snu13 reconnaît quant à elle spécifiquement le motif en K-turn, permettant le recrutement des autres protéines cœur (Watkins *et al*, 2000 ; Marmier-Gourier *et al*, 2003 ; Rothé *et al*, 2014).

Tout comme les snoRNP à boîtes H/ACA, il n'existe pas de structures tridimensionnelles établies pour les snoRNP à boîtes C/D entière de levure,

**A.**

**B.**

**Figure 7 : Formation des résidus 2'-O-méthylés et représentation de la structure 2D d'une snoRNP à boîtes C/D.**

**A.** La 2'-O-méthylation correspond à l'ajout d'un groupement méthyl au niveau de la fonction hydroxyl (représentée en orange) du ribose des nucléotides. Cette modification nécessite l'intervention du co-facteur SAM (S-Adénosyl Méthionine), jouant le rôle de donneur de méthyl. **B.** Représentation schématique d'une snoRNP à boîtes C/D. Cette particule est composée d'un snoARN à boîtes C/D (représenté en noir) et des 4 protéines « cœur », Snu13, Nop1, Nop56 et Nop58 (représentées en différentes teintes de gris). Le snoARN contient deux motifs, C/D et C'/D', composés des boîtes C, C', D, D' (représentées en vert foncé ou clair), qui s'organisent en K-turn, permettant le recrutement des protéines cœur. Les particules C/D sont responsables de la 2'-O-méthylation (représentée en orange) au sein des pré-ARNr. Pour ce faire le snoARN, jouant le rôle de guide, s'apparie avec l'ARN cible (représenté en rouge) par complémentarité de séquences et la protéine Nop1 catalyse la réaction au niveau du 5ème nucléotide apparié en amont des boîtes D et D'.

seulement une structure d'une partie de ses composants (Ye *et al*, 2009). Cependant, chez les archées, des structures de sRNP actives enzymatiquement ont été obtenues par cristallographie et microscopie électronique (Bleichert *et al*, 2009 ; Bleichert & Baserga, 2010 ; Xue et al, 2010 (mol cell) ; Lin *et al*, 2011 ; Bower-Phipps *et al*, 2012). Par ailleurs, notre équipe a produit un modèle de structure 3D de complexe formé autour d'une boîte C/D (Bizarro *et al*, 2014).

A l'image des snoRNP à boîtes H/ACA, les snoRNP à boîtes C/D jouent également un rôle essentiel dans les modifications des pré-ARNr. De plus, certaines particules, notamment la snoRNP U3, possèdent également d'autres rôles dans la biogenèse des ribosomes.

## II. Chaperonnes du repliement du pré-ARNr 35S

Les événements de maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S nécessitent l'intervention de près de 70 snoRNP à boîtes H/ACA ou à boîtes C/D. La plupart des snoRNP sont impliquées dans des modifications des nucléotides des ARNr mais certaines, telles que les snoRNP snR10, snR30, snR35, U14 ou U3, sont également impliquées dans les événements de clivages aux sites A0, A1 et A2 nécessaires à la formation de l'ARNr 18S. Ces différentes snoRNP appartiennent aussi à la famille des snoRNP à boîtes H/ACA qu'à celle à boîtes C/D et partagent donc des caractéristiques communes avec celles-ci. Ces différentes snoRNP seraient recrutées sur le pré-ARNr 35S afin de réguler son repliement, en induisant ou empêchant la formation de structures secondaires et tertiaires et participeraient sans doute à la formation d'architectures capables d'être clivées par les RNAses. Les snoRNP jouent donc un rôle supplémentaire et essentiel, en plus de la catalyse des réactions de modifications. De plus la réorganisation structurale des pré-ARNr, induite par la fixation de certaines des snoRNP, pourrait également faciliter l'assemblage des protéines ribosomiques (King *et al*, 2003, Liang *et al*, 2007, Rabl *et al*, 2011, Karbstein *et al*, 2011).

## III. La snoRNP U3

La snoRNP U3 appartient à la famille des snoRNP à boîtes C/D. Elle est ainsi constituée d'un snoARN à boîtes C/D, le snoARN U3, et des 4 protéines cœurs canoniques des snoRNP à boîtes C/D, les protéines Snu13, Nop1, Nop56 et Nop58. La snoRNP U3 est néanmoins une snoRNP à boîtes C/D particulière puisqu'elle n'est pas impliquée dans des événements de 2'-O-méthylation comme la plupart des snoRNP de cette famille, mais est impliquée dans les événements de clivages précoces A0, A1 et A2 nécessaires à la formation de l'ARNr 18S, et donc à la production de la petite sous-unité ribosomique 40S. Cette différence est possible grâce à certaines caractéristiques structurales et fonctionnelles propres, en particulier un domaine supplémentaire à l'extrémité 5' du snoARN, ou encore la présence d'une protéine spécifique, la protéine Rrp9 (Ségault *et al*, 1992 ; Watkins *et al*, 2000 ; Venema *et al*, 2000 ; Granneman *et al*, 2009 ; Zhang *et al*, 2013).

### III.1. Le snoARN U3

Le snoARN U3 a été découvert en 1968 lors d'une étude sur les petits ARN présents dans les cellules animales (Hodnett & Busch, 1968). C'est l'un des premiers snoARN à avoir été identifié, notamment de par sa grande abondance dans la cellule. Son rôle précis dans la biogenèse des ribosomes est longtemps resté incertain. Ce n'est qu'au cours des années 1970-1980 que, vue sa fixation aux ribosomes en formation, un rôle dans la maturation des pré-ARNr a été proposé puis démontré (Prestayko 1970, Zieve & Penman 1976, Epstein 1984). Ces données ont été confirmées, par l'identification de la formation d'hélices avec le pré-ARnr 35S par des expériences de pontage chimique ou la génération de mutants (Beltrame & Tollervey, 1992, 1995 ; Hughes *et al*, 1994 ; Mereau et al, 1997 ; Borovjagin & Gerbi 2001 ; Dutca *et al*, 2011 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011).

L'absence du snoARN U3 entraine un défaut de clivage aux sites A0, A1 et A2 et donc un arrêt de la maturation du pré-ARNr 35S en ARNr 18S, corrélé à une abolition de la formation de la petite sous-unité ribosomique 40S et à la mort cellulaire. Au sein de la particule, le snoARN possède donc une importance capitale.

Le snoARN U3 est conservé dans l'évolution et a été identifié chez tous les eucaryotes (Marz & Stadler, 2009 ; Charrette & Gray, 2009). Le nombre de copies de

gène U3 n'est par contre pas conservé. Par exemple, chez certains vertébrés, comme *Xenopus laevis,* il existe entre 14 et 20 copies de gènes actifs par génome (Savino *et al*, 1992), au moins 7 copies actives chez l'homme, additionnées d'un très grand nombre de pseudogènes (une centaine) (Suh *et al*, 1986, 1991 ; Mazan & Bachellerie 1988 ) et au moins 3 chez la souris ou le rat (Mazan & Bachellerie 1988 ; Myslinski *et al*, 1990 ; Suh *et al*, 1991 ; Bernstein *et al*, 1983 ; Reddy *et al*, 1985). Chez les levures, on observe une grande variabilité de ce nombre de gènes : 2 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Hughes *et al*, 1987 ; Myslinski *et al*, 1992 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2003), 2 chez *Saccharomyces Pombe* (Porter *et al*, 1988 ; Selinger *et al*, 1992), 12 chez *Saccharomyces florentinus* (Fournier *et al*, 1997) et une seule copie chez d'autres levures (Marmier-Gourrier *et al*, 2003). Les deux copies de gènes actifs chez *Saccharomyces cerevisiae* sont exprimées par les gènes SNR17A (U3A) et SNR17B (U3B) (Hughes *et al*, 1987 ; Myslinski *et al*, 1992). Ces deux formes de snoARN U3 présentant un degré élevé de similarité (92% d'identité et une taille comparable respectivement de 333 et 332 nucléotides). Le snoARN U3A est exprimé de manière dominante (90% de la totalité des snoARN U3 retrouvés dans la cellule) mais en absence d'activité du gène SNR17A, le gène SNR17B prend le relai exprimant un snoARN U3 fonctionnel (Hughes *et al*, 1987 ; Mougin *et al*, 1996).

Des modèles de structure secondaire de différents snoARN U3 matures, issus de différents organismes, ont également été établis sur une base expérimentale (Parker & Steitz, 1987 ; Ségault *et al*, 1992 ; Méreau *et al*, 1997 ; Jeppensen *et al*, 1988 ; Hartshorne & Agabian, 1994 ; Fournier *et al*, 1998 , Marshallsay *et al*, 1992 ; Greenwood *et al*, 1996). La résolution de ces structures a permis de mettre en évidence l'existence de 2 domaines au sein de chaque snoARN U3 : un domaine 3', similaire aux snoARN à boîtes C/D classiques, et un domaine 5', spécifique du snoARN U3 (**Fig. 8**).

Dans les différents organismes, le domaine 5' présente un plus grand degré de conservation de séquence et de structure que le domaine 3'. En effet, de grandes variations de séquence et de longueur peuvent être observées au sein du domaine 3', notamment chez les levures, conduisant à des différences de tailles importantes entre les différents snoARN U3 (Fournier *et al*, 1997, 1998). Ces variations correspondent généralement à des insertions de séquences formant des structures en tige-boucle, ou à l'allongement de structures en tige-boucle préexistantes. A noter

**Figure 8 : Représentation de la structure 2D du snoARN U3 de *S. cerevisiae* (Ségault *et al*, 1992) et de ses motifs C'/D et B/C, interagissant avec les protéines « cœur » et avec la protéine Rrp9p spécifique au snoARN U3.**

Le snoARN U3 est constitué de deux domaines. Le domaine 5', spécifique du snoARN U3 et responsable de l'appariement avec le pré-ARNr 35S, est composé des boîtes A et A' (représentées en bleu), tandis que le domaine 3' est responsable de l'interaction avec les protéines de la snoRNP U3 via ses deux motifs C'/D et B/C, structurés en K-turn (représentés en rouge et vert). Le motif C'/D permet l'ancrage des protéines coeur Snu13p, Nop56p, Nop58p et Nop1p, et le motif B/C de Snu13p et Rrp9p, protéine spécifique de la snoRNP U3 (Ségault *et al*, 1992, 2001 ; Watkins *et al*, 2000 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2001, 2003 ; Clery *et al*, 2007, Mougin *et al*, 1996 ; Méreau *et al*, 1997). Les (-) correspondent aux appariements canoniques Watson-Crick, tandis que les (•) correspondent aux appariements non-canoniques.

que les deux gènes de snoARN U3 de la levure S. cerevisiae et de quelques autres levures ont la particularité d'avoir un intron, éliminé par le spliceosome (Myslinski *et al*, 1990 ; Brulé *et al*, 1995 ; Mougin *et al*, 1996 ; Fournier *et al*, 1998)

### III.1.A. *Le domaine 3', contenant des motifs de type C/D*

Le domaine 3' du snoARN U3 de *S.cerevisiae* est très structuré (**Fig. 8**) (Segault 1992). Ce domaine possède 3 structures en tige-boucle (hélices 2, 3 et 4) dont les séquences ne sont pas conservées chez les levures et qui peuvent être, partiellement toutes ensemble ou entièrement individuellement, tronquées sans affecter la biogenèse de la particule U3 et sa fonction (Samarsky & Fournier, 1998). Le domaine 3' possède également 2 couples de boîtes de type C/D formant 2 motifs se structurant en K-turn (Watkins 2000, Marmier-Gourrier 2003, Moore 2004), retrouvés chez tous les snoARN à boîtes C/D. Ces 2 motifs sont conservés à travers l'évolution et sont nommés C'/D et B/C (**Fig. 8**) (Wise & Weiner 1980, Hughes 1987, Tycowski 1993 ; Watkins *et al*, 2000 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2001 ; Ségault *et al*, 2001). La structuration en K-turn dépend de la combinaison de 2 hélices stables et conservées (hélices I et II) séparées par une boucle interne asymétrique. Cette boucle est constituée de 5 nucléotides en 5' et de 2 nucléotides en 3', appartenant respectivement aux boîtes C' ou C et D ou B, et dont deux nucléotides forment deux appariements non-canoniques de type G-A qui s'empilent sur l'hélice II (**Fig. 8**). Cette structure en K-turn entraine la formation d'un angle de 60° entre les hélices I et II, permettant l'exposition de l'uridine en position 3 de la boîte C' ou C en dehors de la boucle interne. Ce nucléotide U3 joue ensuite un rôle dans le recrutement des protéines reconnaissant spécifiquement ce type de structure, comme les protéines de la famille L7Ae telles que Snu13P chez la levure et 15.5K chez l'homme (Watkins *et al*, 2000 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2001, 2003 ; Clery *et al*, 2007). La résolution de la structure tridimensionnelle de l'interaction entre la protéine 15.5K et le snRNA U4 contenant un K-turn a été résolue (Vidovic *et al*, 2000) (**Fig. 9**).

Dans le cas du snoARN U3, le motif C'/D s'associe aux protéines cœurs retrouvées dans les snoRNP à boîtes C/D (Snu13p, Nop1p, Nop56p et Nop58p), alors que le motif B/C recrute la protéine Snu13p et une protéine spécifique au snoARN U3, la protéine Rrp9p (**Fig. 8**) (Hartshorne & Agabian, 1994 ; Jeppesen *et al,* 1988 ; Mereau

**Figure 9 : Représentation tridimensionnelle du K-turn formé par le snARN U4 humain en complexe avec la protéine 15.5K (PDB : 1E7K ; Vidovic *et al*, 2000)**

La structuration en K-turn repose sur un arrangement hélice/boucle/hélice. La boucle interne asymétrique est constituée d'un côté de 5 nucléotides (boîte C), dont 3 non-appariés (A1, A2 et U3 représentés en orange et rouge) et 2 appariés (G4 et A5, représentés en jaune), et de l'autre côté de 2 nucléotides (boîte D) appariés (G6 et A7, représentés également en jaune). Au sein de cette boucle interne sont donc formés deux appariements non canoniques G-A et A-G consécutifs (représentés en jaune). Cette boucle est flanquée de deux hélices I et II (représentées en vert). La structuration en K-turn permet l'expulsion de l'uridine en position 3 (U3, représentée en rouge), qui vient s'insérer au sein de la protéine 15.5K (représentée en bleu) permettant son recrutement. Cette structuration en K-turn induit également une forte courbure du squelette phosphodiester de 60° entre les deux hélices.

*et al,* 1997 ; Parker & Steitz, 1987) (Watkins *et al*, 2000 ; Venema *et al*, 2000 ; Lukowiack *et al*, 2000 ; Granneman *et al*, 2002 ; Clery *et al*, 2007). L'ensemble de ces protéines participe à la formation et à la stabilité de la particule U3, à son adressage nucléolaire ainsi qu'à sa fonction.

Les motifs C'/D et B/C présents au sein du domaine 3' du snoARN U3 présentent quelques différences par rapport à la séquence canonique des motifs C/D classiques, mais ces différences ne perturbent pas la possibilité de former la structuration en K-turn. On note seulement une plus faible affinité du motif C'/D pour la protéine Snu13p chez *S. cerevisiae*, du fait de la présence d'une uridine à la place d'une adénine en postion 2 du K-turn (Marmier-Gourrier *et al*, 2003 ; thèse de N. Rolland) (**Fig. 10**).

Le motif C'/D du snoARN U3 humain présente lui aussi une différence de séquence par rapport au motif consensus. En effet, des nucléotides G3 et A8 sont retrouvés à la place de deux uridines, présentes à ces positions dans les motifs C/D **(Fig. 10)**. Ces différences de séquences ne sont donc pas sans conséquences puisqu'elles font des motifs C'/D des snoARN U3 des motifs sous-optimaux pour la fixation des protéines Snu13p chez la levure et son homologue humain 15.5K. Chez l'homme, la présence d'une guanine en position 3 comme nucléotide protubérant au lieu d'une uridine donne lieu à un mécanisme de régulation de l'assemblage de la snoRNP U3 (Knox *et al*, 2011). En ce qui concerne le motif B/C, la séquence de sa boucle interne est identique à celle des motifs C/D classiques, mais la séquence de l'hélice II est légèrement différente, avec la présence de deux appariements G9-C12 et A10-U11, retrouvés dans les motifs C/D canoniques, qui sont inversés (C9-G12 et U10-A11) aussi bien chez *Saccharomyces cerevisiae* que chez l'homme (**Fig. 10**). De plus, l'hélice I bordant le motif B/C n'est constituée que d'un seul appariement G-C, contrairement à ce qui est observé dans les motifs C/D classiques où la taille et la séquence de l'hélice I sont variables (**Fig. 10**) (Marmier-Gourrier et al, 2003). Les motifs C'/D et B/C du snoARN U3 ont également la particularité de posséder un nucléotide G en position 1 dans la boucle interne. Ce nucléotide est conservé au sein de la plupart des snoARN U3 mais pas dans les autres snoARN à boîtes C/D, où n'importe quel nucléotide peut être rencontré (**Fig. 10**). Ce résidu G1 dans le motif B/C est nécessaire comme nous le verrons, pour la fixation de la protéine Rrp9p (Clery *et al*, 2007). De plus, un appariement U8-U13 est présent au sein de l'hélice II dans les motifs C/D, alors qu'un appariement G8-C13 est retrouvé dans le motif en

**Figure 10 : Différences de séquences et de structures entre les motifs C/D, C'/D et B/C chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'homme**

Les séquences primaires et secondaires des motifs C/D canoniques, C'/D et B/C chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'homme sont représentées. Les boîtes C et C' (représentées en rouge), ainsi que D et B (représentées en vert) forment les différents motifs structurés en K-turn. Les positions des différents nucléotides sont annotées. Au niveau des tableaux les différences entre les séquences canoniques C/D et les séquences C'/D ou B/C sont surlignées en rouge, tandis qu'au niveau des structures secondaires, ces différences sont représentées en orange, vert clair ou gris.

K-turn du snARN U4. Il est intéressant de noter que suivant quelles protéines sont associées avec la protéine Snu13p sur un motif en K-turn, la séquence de l'hélice II varie, ce qui doit assurer la spécificité de reconnaissance des protéines se liant avec la protéine Snu13p. Nous venons de voir ce type de différence pour la boîte B/C du snoARN U3, mais c'est aussi le cas pour la structure en K-turn du snARN U4 qui fixe la protéine Snu13p et la protéine Prp31 (Schultz *et al*, 2006 ; Liu *et al*, 2007 ; Nottrott *et al*, 1999, 2002 ; Vidovic *et al*, 2000 ; Watkins *et al*, 2000)

La distance qui sépare les deux motifs C'/D et B/C est fortement conservée et primordiale à la fonction de la snoRNP U3 (Marmier-Gourrier & Rolland, com perso). Au laboratoire, des études génétiques visant à tester l'effet du raccourcissement ou de l'allongement d'un demi-tour (soit 5 pb) ou d'un tour complet d'hélice (soit 10 pb) entre les deux motifs C'/D et B/C ont été réalisées. Chez *S. cerevisiae*, le raccourcissement d'un demi-tour d'hélice conduit à une croissance normale à 30°C mais ralentie à 20 et 37°C. Un raccourcissement d'un tour complet, ou le rallongement quel qu'il soit, conduisent à l'abolition de la croissance, traduisant un défaut de fonction de la snoRNP U3 sans toutefois affecter sa stabilité. Il a ainsi été conclu qu'en plus de la stabilité du snoARN U3, l'intégrité du domaine 5' et la présence de la protéine Rrp9P, la distance entre les deux motifs C'/D et B/C est essentielle à la fonctionnalité de la snoRNP U3 (thèse de N. Rolland). Il semblerait également qu'une certaine flexibilité de l'hélice située entre les deux motifs soit requise pour une stabilité et une fonction optimales de la snoRNP U3. En effet, la rigidification de cette hélice, en permettant des appariements non retrouvés classiquement au niveau de l'hélice II, abolit la croissance tandis que la stabilité du snoARN U3 chute fortement (Thèse de N. Rolland et thèse de N. Marmier-Gourrier).

### *III.1.B. Le domaine 5', spécifique de la snoRNP U3*

Le domaine 5' du snoARN U3 est une région spécifique supplémentaire par rapport aux séquences trouvées dans les snoARN à boîtes C/D classiques. Cette extension en 5' est retrouvée dans l'ensemble des snoARN U3 de tous les organismes. Cette région a de plus un plus grand degré de conservation de séquence que le domaine 3' du snoARN U3. Cette extension en 5' est requise pour la fonction dans les clivages précoces A0, A1 et A2 nécessaires à la formation de l'ARNr 18S et ainsi à la production de la petite sous-unité 40S.

Au sein du domaine 5' sont également retrouvées deux boîtes conservées, les boîtes A et A', qui sont essentielles pour la fonction de la snoRNP U3. Lorsque la snoRNP U3 est sous forme libre dans la cellule, ces deux boîtes sont situées au sein d'une même tige-boucle **(Fig. 8)** (Wise & Weiner 1980 ; Myslinski 1990 ; Hughes 1987 ; Mereau 1987 ; Fournier *et al,* 1998 Parker & Steitz 1987, Jeppesen *et al,* 1988, Segault *et al,* 1992). Les boîtes A et A' sont complémentaires de régions de l'ARNr 18S au sein du pré-ARNr 35S (Hughes *et al*, 1987, 1996; Mereau *et al*, 1997 ; Sharma & Tollervey, 1999 ; Borovjagin & Gerbi, 2004, 2005 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; Dutca *et al*, 2011). Enfin, deux autres régions du domaine 5', les séquences 5'-hinge et 3'-hinge, complémentaires de la séquence 5'-ETS du pré-ARNr 35S, sont également importantes pour la fonction de la snoRNP U3 **(Fig. 8)** (Beltrame & TOllervey, 1995 ; Mereau *et al*, 1997 ; Sharma & Tollervey, 1999 ; Borovjagin & Gerbi, 2004, 2005 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; Dutca *et al*, 2011). Comme les autres snoARN à boîtes C/D, le snoARN U3 s'apparie avec le pré-ARNr 35S, mais dans ce cas, la région 5' du snoARN U3, complémentaire au pré-ARNr 35S, est située en amont de la boîte C et ces appariements ne conduisent pas à des évènements de 2'-O-méthylation.

### III.2. Les protéines de la snoRNP U3

Des purifications des snoRNP U3 humaine et de levure ont été réalisées afin d'identifier les protéines lui étant associées par spectrométrie de masse. Les 4 protéines coeur des snoRNP à boîtes C/D, 15.5kD/Snu13P, FIB/Nop1P, Nop56P et Nop58P, ont ainsi pu été identifiées (Lubben *et al*, 1993 ; Watkins *et al*, 2000). De plus, une protéine spécifique de la snoRNP U3 a également été identifiée. Il s'agit de la protéine U3-55K, ou Rrp9 chez la levure (Lubben *et al*, 1993 ; Venema *et al*, 2000 ; Watkins *et al*, 2000). Les 4 protéines cœurs retrouvées dans les snoRNP à boîtes C/D sont requises pour la maturation, la stabilité et la localisation nucléolaire des snoRNP à boîtes C/D (Tollervey and Kis 1997, Morlando 2004, Hirose 2003, revue reichow 2007 ; Verheggen 2001) tandis que la protéine Rrp9 est une protéine spécifique de la snoRNP U3 qui contribue probablement à sa spécificité de fonction.

### III.2.A. *La protéine Snu13p*

La protéine Snu13p est une protéine se liant de manière spécifique à des structures organisées en K-turn, comme c'est le cas pour les protéines ribosomiques S12, L7 et L30, la protéine Nhp2 des snoRNP à boîtes H/ACA et la protéine L7Ae d'archée trouvée dans les sRNP à boîtes H/ACA et C/D (Watkins et al, 2000). Très précisément, la protéine Snu13p et son homologue humain 15.5K appartiennent aussi à la famille des protéines L7Ae, reconnaissant le type de K-turn trouvé dans les snoARN à boîtes C/D, à savoir un nucléotide U protubérant et deux paires d'appariement A-G et G-A (Watkins *et al*, 2000 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2001 ; Mc Keegan *et al*, 2007). Cependant, la protéine L7Ae peut en plus reconnaître des structures en K-loop, ayant des caractéristiques communes des structures en K-turn retrouvées dans les snoARN à boîtes C/D (Charron *et al*, 2004).

La structure tridimensionnelle de la protéine 15.5K, en complexe avec le K-turn du snRNA U4, ainsi que la structure tridimensionnelle de la protéine Snu13 de *S. cerevisiae* sous forme libre ont été résolues (**Fig. 11**) (Vidovic *et al*, 2000 PDB : 1E7K; Oruganti *et al*, 2005 PDB : 2ALE).

Ces données ont permis de montrer qu'en plus d'une grande conservation de séquences entre Snu13 et 15.5K (71% d'identité), une grande conservation structurale était également observée. Les protéines Snu13 et 15.5K possèdent une structure globulaire compacte, avec une organisation du type hélice $\alpha$ / brin $\beta$ / feuillet $\alpha$ (**Fig. 11**). La comparaison des structures chez les eucaryotes (Snu13 et 15.5K) et chez les archées (L7Ae), ainsi que des expériences réalisées au laboratoire, ont permis de formuler des hypothèses quant à la différence de spécificité de reconnaissance des structures en K-turn et en K-loop (Oruganti et al, 2005 ; Charron *et al*, 2004). Bien que la surface d'interaction avec les ARN soit hautement similaire chez toutes les protéines de la famille de L7Ae, des différences dans des régions à proximité du site de liaison à l'ARN sont trouvées chez les protéines eucaryotes. Il en résulterait une plus grande rigidité de la structure, limitant ainsi les mouvements et donc l'adaptabilité de la zone de contact avec l'ARN.

La déplétion de la protéine Snu13p est  létale chez la levure. En effet, elle est requise pour l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D et par conséquent pour la stabilité des snoARN à boîtes C/D, y compris le snoARN U3. Elle est ainsi

**Figure 11 : Structures tridimensionnelles des protéines Snu13 et 15.5K (PDB : 2ALE (Dobbyn *et al*, 2007) et 1E7K (Vidovic *et al*, 2000).**

Les structures tridimensionnelles des protéines Snu13 de levure et son homologue humain 15.5K sont très similaires. Ces deux protéines appartiennent à la famille des protéines L7Ae et interagissent spécifiquement avec les motifs structurés en K-turn formés par les motifs C/D, C'/D et B/C et la tige boucle en 5' du snARN U4 (Mougin et al, 2002).

nécessaire pour qu'il y ait maturation des pré-ARNr au cours de la biogenèse des ribosomes Watkins *et al*, 2000).

### *III.2.B. La protéine Nop1p*

La protéine Nop1, homologue de la fibrillarine (FIB) chez l'homme (Henriquez *et al*, 1990), est majoritairement localisée dans le nucléole et les corpuscules de Cajal. Elle porte l'activité catalytique de 2'-O-méthylation, et utilise le cofacteur S-adenosyl méthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyl (Tollervey *et al*, 1993). La protéine Nop1p contient un motif caractéristique des methyltransférases de classe I dépendantes de la SAM (28, Niewmierzcycka & Clarke 1999) (Schubert et al, 2003). De plus, Nop1p/FIB contient un domaine GAR (Glycine and Arginine Rich) spécifique des eucaryotes, au niveau de sa région N-terminale. Au sein de la snoRNP U3, la protéine Nop1p/FIB ne semble pas catalyser de 2'-O-méthylation. La structure tridimensionnelle de la protéine FIB humaine a été résolue (**Fig. 12**) (Min et al, 2006 PDB : 2IPX).

La région responsable de l'activité catalytique de Nop1/FIB est localisée au niveau de la région C-terminale et se compose de 7 brins $\beta$ flanqués par 6 hélices $\alpha$. Au sein de cette région, le site actif consisterait en une triade catalytique KDK conservée et localisée dans la poche de fixation du substrat. L'aspartate jouerait un rôle important pour la déprotonation du groupement 2'-OH du ribose ou pour la stabilisation du cofacteur SAM (Feder et al, 2003 ; Aittaleb et al, 2003). La protéine Nop1/FIB contient également un petit domaine constitué de 5 brins $\beta$ relié à la région C-terminale par une hélice $\alpha$. La structure du domaine GAR de la protéine humaine FIB n'a pas pu être résolue et ne figure donc pas dans la structure tridimensionnelle.

Chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'homme, la délétion du gène exprimant la protéine Nop1/FIB est létale. La diminution de son taux d'expression conduit à une réduction des méthylations des pré-ARNr, ainsi qu'à un défaut de production de l'ARNr 18S, traduisant un défaut des clivages précoces A0, A1 et A2. La diminution de son taux entraine également une importante diminution du taux de nombreux snoARN à boîtes C/D, mais elle n'affecte pas la stabilité du snoARN U3 (Lafontaine & Tollervey, 2000 ; Tollervey et al, 1991 ; Watkins et al, 2004).

**Figure 12 : Structure tridimensionnelle de la protéine Fibrillarine (PDB : 2IPX ; Wu *et al*, non publié)**

La structure tridimensionnelle de la protéine humaine Fibrillarine (FIB) est présentée, celle de la protéine Nop1, homologue chez la levure, n'étant pas été résolue. La structure tridimensionnelle du domaine GAR, spécifique des eucaryotes et présent au sein de la région N-terminale, n'a pas été résolue. Les protéines FIB et Nop1 sont les enzymes retrouvées au sein les snoRNP à boîtes C/D responsables de la 2'-O-méthylation des ARNr. Les résidus K143, D236 et K265 forment la triade catalytique nécessaire à cette réaction. Le cofacteur SAM (S-Adenosyl-Méthionine), également nécessaire, est représenté au sein de la structure.

### III.2.C. *Les protéines Nop56p et Nop58p*

Les protéines Nop56p et Nop58p, majoritairement nucléolaires, sont fortement conservées dans l'évolution et présentent une forte homologie de séquence (45% d'identité et 63% de similarité). Leurs homologues humaines sont les protéines NOP56 et NOP58 et chez les archées, la protéine Nop5. De plus, ces protéines sont partiellement homologues à la protéine Prp31p retrouvée au sein de la snRNP U4. Chez les eucaryotes, l'homologie entre Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58 résulte probablement d'une duplication de gènes ancestraux communs (28, Gautier 1997). Cependant, la complémentation d'une des protéines n'est pas possible avec la seconde, témoignant de l'acquisition de fonctions spécifiques pour chacune d'entre-elles (28, Gautier 1997). En ce sens, bien que les deux protéines soient essentielles à la viabilité cellulaire, la diminution du taux de chacune des protéines Nop56p/NOP56 ou Nop58p/NOP58 indépendamment n'induit pas le même phénotype. En effet, la diminution du taux de Nop58p/NOP58 conduit à une inhibition des clivages précoces A0, A1 et A2 entrainant une perte de production de l'ARNr 18S, ainsi qu'une forte diminution des taux des snoARN à boîtes C/D. L'effet sur la maturation des pré-ARNr conduisant à la production de l'ARNr 18S est moins marquée suite à la déplétion de la protéine Nop56p/NOP56. Cette dernière n'est en outre pas requise pour la stabilité des snoARN à boîtes C/D (29, Lafontaine & Tollervey 1999, 2000 ; Watkins et al, 2004). Ces défauts sont comparables à ceux observés pour la protéine Nop1p/FIB, bien que la réduction du taux de Nop56p/NOP56 ou de Nop58p/NOP58 a un effet moins prononcé au niveau du taux de 2'-O-méthylation des pré-ARNr (29, Lafontaine & Tollervey 1999, 2000).

La structure tridimensionnelle des protéines Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58 n'a été résolue ni chez *Saccharomyces cerevisiae*, ni chez l'homme. Cependant de nombreuses structures tridimensionnelles de Nop5 en complexe avec différents composants des sRNP C/D existent chez les archées et peuvent être utilisées comme modèle (**Fig. 13**) (Alttaleb *et al*, 2003 ; Lin *et al*, 2011 ; Oruganti *et al*, 2007 ; Xue *et al*, 2010 ; Ye *et al*, 2009 PDB : 3ID6, 3NVI, 3NVK, 1NT2 fig 35).

La protéine Nop5 est composée de 2 brins $\beta$ et de 12 hélices $\alpha$, organisés en 2 domaines distincts reliés par 2 hélices $\alpha$, entrainant la formation d'un domaine coiled-coil. Chez les eucaryotes, les protéines Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58

**Figure 13 : Structure tridimensionnelle de la protéine Nop5 (PDB : 1NT2 ; Aittaleb *et al*, 2003).**

La structure tridimensionnelle de la protéine Nop5 d'archées est présentée, celles des protéines Nop56 et Nop58, homologues chez la levure, ainsi que NOP56 et NOP58, homologues chez l'homme, n'ayant pas été résolues. Le domaine coiled-coil est nécessaire à la dimérisation avec une autre protéine Nop5 au sein des sRNP à boîtes C/D, ou à la dimérisation entre Nop56/NOP56 et Nop58/NOP58 au sein des snoRNP à boîtes C/D chez la levure et l'homme. Le domaine NOP est requis pour l'association avec l'ARN et les protéines L7Ae/Snu13/15.5K, tandis que le domaine N-terminal pour l'association avec Nop1/FIB.

possèdent un domaine C-terminal supplémentaire spécifique, formé de répétitions de résidus KKE/D. Ce domaine ne semble toutefois pas conférer de spécificité de fonction aux protéines de levure Nop56p et Nop58p par rapport aux archées puisqu'il ne semble ni requis pour la localisation nucléolaire, ni pour la fonction des deux protéines (28, Gautier 1997). Il pourrait toutefois être impliqué dans l'interaction avec l'hyperméthylase Tgs1p, responsable de l'hyperméthylation de la coiffe du snoARN U3 (Mouaikel *et al*, 2002). Chez l'homme, en revanche, il a été montré que ce domaine contenait des séquences de localisation nucléaire (NLS) et nucléolaire (NoLS) (Pradet-Balade et al, 2011). D'autre part, la région C-terminale des protéines Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58 est composée de 7 hélices $\alpha$ et contient le domaine NOP, caractéristique des protéines Nop56p, Nop58p et leurs homologues humaines et d'archées. Ce domaine NOP est impliqué dans l'interaction avec le snoARN et la protéine Snu13p/15.5K simultanément (Ye *et al*, 2009 ; Omer *et al*, 2002 ; Watkins *et al*, 2002). La région N-terminale est quant à elle composée de 3 hélices $\alpha$ et 2 brins $\beta$ et est impliquée dans l'interaction avec Nop1/FIB (Aittaleb et al, 2003). Le petit domaine coiled-coil, formé par 2 hélices $\alpha$, est lui responsable de la dimérisation des protéines Nop56 et Nop58 (Ye et al, 2009).

#### III.2.D. *La protéine Rrp9p, spécifique de la snoRNP U3*

La protéine Rrp9 est une protéine spécifique de la snoRNP U3 qui contribue probablement à sa spécificité de fonction. Sa description détaillée est présentée dans le **chapitre 4.**

### III.3. Déterminants nécessaires aux interactions entre les différents composants de la snoRNP U3

#### III.3.A. *L'association de la protéine Snu13p au snoARN U3*

La protéine Snu13p reconnaît de manière spécifique les structures en K-turn formées par les motifs C'/D et B/C et peut s'y associer directement (Marmier-Gourrier *et al*, 2003 ; Cléry *et al*, 2007). L'association de la protéine Snu13p au niveau de ces motifs stabilise cette structure, qui dans le snoARN U3 n'est formée que partiellement (Charron *et al*, 2004 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2003). En effet, du fait de

différences par rapport à la structure canonique stable, la protéine Snu13p ne reconnaît que la conformation en K-turn, déplaçant l'équilibre vers cette conformation (Marmier-Gourrier *et al*, 2003 ; Clery *et al*, 2007).

La connaissance des interactions entre protéines de la famille L7Ae et la structure en K-turn a beaucoup reposé au départ sur la structure tridimensionnelle établie pour le complexe formé par la protéine 15.5K humaine associée au K-turn du snARN U4. Cette structure a permis d'identifier dans un premier temps les déterminants requis pour l'association du snARN U4 à la protéine 15.5K (**Fig. 9**) (Vidovic et al, 2000). Ces données complétaient celles déjà obtenues auparavant par approches biochimiques par l'équipe de R. Luhrmann (Nottrott *et al*, 1999, 2002). Un premier constat important est que l'ensemble des résidus de la protéine 15.5K impliqués dans l'interaction avec le K-turn du snRNA U4 interagissent préférentiellement avec les nucléotides de la boucle interne et avec le squelette ribose-phosphate des nucléotides de l'hélice II. Le nombre de nucléotides au sein de la boucle interne est un premier paramètre important pour la fixation de la protéine 15.5K. En effet, la délétion du nucléotide en position 1 affecte la formation du complexe (Nottrott et al, 1999). Par ailleurs, les travaux de l'équipe de R. Luhrmann sur l'interaction entre la protéine 15.5K et le snARN U4, ainsi que la structure tridimensionnelle établie par Vidovic, montrent que les résidus E59 et K86 de la protéine Snu13p, localisés dans la poche qui accueille le nucléotide U en position 3 du motif en K-turn, jouent un rôle essentiel dans l'interaction ARN/protéine (Nottrott *et al*, 1999 ; Vidovic *et al*, 2000 ; Dobbyn & O'Keefe, 2004). De la même manière, leurs homologues dans la protéine Snu13p, les résidus E61 et K84, localisés dans la poche supposée accueillir l'uridine en position 3 du motif en K-turn, sont requis pour la stabilité de l'interaction Snu13p/U4 (Nottrott et al, 1999). D'après la structure tridimensionnelle du complexe 15.5K/U4, la stabilité de l'interaction dépend également de contacts hydrophobes stables avec les chaines latérales des résidus I65 et I100. Les nucléotides G des appariements non-canoniques G-A et A-G de la boucle interne interagissent avec les résidus G38, N40, E41 et K44 de la protéine 15.5K. Le résidu G38 est le seul résidu strictement conservé au sein de la famille L7Ae/L30 et sa mutation abolit l'interaction entre la protéine 15.5K et le snRNA U4 (Nottrott et al, 1999). Contrairement à ce qui se passe pour les nucléotides G, aucune interaction n'a été observée entre des résidus de la protéine 15.5K et les bases des nucléotides A formant les

appariements non-canoniques G-A et A-G (Vidovic et al, 2000). D'autre part, les nucléotides non-appariés en position 1 et 2 interagissent avec les résidus R97, K37 et V95 de la protéine 15.5K. La substitution de ces deux nucléotides n'a d'effet sur l'interaction que s'ils sont remplacés par des pyrimidines (Nottrott et al, 1999). Enfin, de nombreux résidus de la protéine 15.5K (R36, K37, E41, K44 et R48) forment des liaisons hydrogène ou électrostatiques avec les groupements phosphates des nucléotides composant l'hélice II (Vidovic et al, 2000).

En absence de structure tridimensionnelle établie pour l'interaction C'/D/Snu13p, un modèle de motif C'/D associé aux 4 protéines cœurs a été établi au laboratoire par C. Charron. Il a permis de déterminer et de confirmer certains déterminants spécifiques requis pour l'interaction Snu13p/C'/D. Notre équipe avait montré par des expériences de retard sur gel que le remplacement de la purine en position 2, dans le K-turn formé par le couple de boîtes C'/D, par une uridine comme c'est le cas pour les motifs C/D (**Fig. 10**), diminue l'affinité pour la protéine Snu13p (Marmier-Gourrier et al, 2003). La mutation de ce nucléotide U2 en adénine, augmente fortement l'affinité du motif C'/D pour la protéine Snu13p. D'après le modèle 3D établi au laboratoire, le groupement guanidinium de l'arginine 95 de Snu13p interagit avec l'adénine en position 2 du K-turn, ce qui est impossible avec une uridine (thèse de N. Rolland), expliquant la plus faible affinité. Le motif B/C possède une adénine en position 2 qui permet l'interaction avec Snu13 via l'arginine 95 (thèse de N. Rolland).

Une autre caractéristique des motifs C'/D et B/C du snoARN U3 est la présence d'un résidu G conservé en position 1, contrairement à ce qui est observé pour les autres snoARN à boîtes C/D pour lesquels n'importe quel nucléotide peut être présent (**Fig. 10**). Au laboratoire, il a été montré que la nature de ce nucléotide dans la boîte C'/D est importante pour la stabilité du snoARN U3 et la croissance cellulaire, et ceci sans doute car ce nucléotide renforce l'affinité de la protéine Snu13p pour le motif C'/D. En effet, d'après le modèle 3D établi au laboratoire, l'arginine 95, en plus d'interagir avec la purine en position 2, interagit avec le nucléotide G en position 1 (thèse de N. Rolland). Ces données sont en accord avec les résultats obtenus pour le complexe 15.5K/U4 montrant que les deux nucléotides en 5' de la boucle interne interagissent avec le résidu arginine 97 et que leur remplacement par une pyrimidine abolit cette interaction (Nottrott et al, 1999). Das le cas du motif B/C, le nucléotide G en position 1 est requis pour l'association de la protéine Rrp9p (Clery *et al*, 2007). Les motifs

C'/D et B/C du snoARN U3 de levure contiennent aussi une paire de nucléotides hautement conservée U8-U13 au sein de l'hélice II, qui prolonge les appariements non-canoniques G-A et A-G (**Fig. 10**). Cette paire U8-U13 n'est pas retrouvée dans les motifs C/D canoniques et ces deux résidus ne semblent pas être essentiels à l'association avec la protéine Snu13p, puisque leur mutation n'affecte pas l'affinité de la protéine pour le K-turn. Par contre, les appariements G9-C12 et A10-U11 sont requis pour la fixation de la protéine Snu13p au niveau du K-turn, car leur mutation abolit l'interaction entre Snu13p et l'ARN. Des inversions de l'orientation des paires de bases impliquées dans ces appariements, réalisées au laboratoire, permettaient de restaurer la fixation de Snu13p, montrant que la fixation de Snu13p au niveau des motifs C'/D et B/C requiert une architecture définie de l'hélice II, mais pas une conservation de séquence. D'ailleurs, une inversion de ces appariements est observé au niveau du motif B/C au sein de l'hélice II (**Fig. 10**) (Clery *et al*, 2007 ; Thèse de N. Rolland). Ces données ont été confirmées par l'analyse par approche de SELEX des motifs en K-turn préférentiellement reconnus par Snu13p (Clery *et al*, 2007). Des observations similaires ont également été faites pour l'interaction entre la protéine 15.5K, dont l'interaction avec les hélices I et II ne semble pas dépendante de leurs séquences (Watkins et al, 2002). Le fait que l'identité des paires conservées U8-U13, G9-C12 et A10-U11 (**Fig. 8 et 10**) ne soit pas requise pour la fixation de la protéine Snu13 *in vitro*, mais que des mutations ou des inversions de ces nucléotides abolissent la croissance cellulaire et la stabilité du snoARN U3 (Clery *et al*, 2007 ; thèse de N. Rolland), suggérait que l'identité de ces nucléotides est importante pour la fixation des autres protéines. L'équipe a demontré par des approches génétique et cellulaire que les nucléotides conservés dans l'hélice II du motif C'/D sont requises pour la fixation de la protéine Nop58p (Thèse de N. Rolland). Ces données sont en accord avec celles obtenues pour le snoARN U3 chez l'homme (Watkins *et al*, 2000). Enfin, le modèle de de structure 3D de la snoRNP établi au laboratoire prédit une interaction entre la protéine Snu13p et le domaine C-terminal de Nop58p (thèse e N. Rolland). Une interaction du même type a été mise en évidence entre les protéines PRP31 et 15.5K dans le complexe formé avec le snARN U4 (Liu et al, 2007).

### *III.3.B. L'association des protéines Nop56p et Nop58p*

Les protéines Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58 ne s'associent pas directement avec les snoARN à boîtes C/D, mais sont recrutées sur le snoARN du fait de leur interaction avec la protéine d'assemblage Rsa1p/NUFIP liée à la protéine Snu13p/15.5K (Watkins *et al*, 2002 ; Rothé *et al*, 2014 ; Bizarro *et al*, 2014, 2015). Cependant, au sein de la snoRNP, elles établissent sans doute des contacts avec le snoARN, expliquant la conservation de certains nucléotides de l'hélice II, en particulier l'appariement G9-C12 et la paire U8-U13 (**Fig. 8 et 10**). Ainsi, dans le système humain, la mutation de l'uridine en position 13 mais pas en position 8, entraine l'abolition de l'interaction entre le snoARN U14 et les protéines FIB, NOP56 et NOP58 *in vitro*. Une absence d'association *in vitro* est aussi observée dans le cas d'une inversion G9-C12 vers C9-G12 (Watkins et al, 2002). Ainsi, bien que ces nucléotides de l'hélice II ne soient pas requis pour l'interaction avec la protéine 15.5K, ils sont nécessaires pour l'association des autres protéines coeur. Ces données sont en accord avec le fait que l'appariement G-C est conservé au sein des snoARN à boîtes C/D et que la protéine Nop58/NOP58 est essentielle à leur stabilité (Watkins et al, 2002 ; Marmier-Gourrier et al, 2003 ; Lafontaine & Tollervey, 1999). Au laboratoire, N. Rolland a montré que, chez la levure, où la mutation U13A, mais pas U8A, ainsi que l'inversion de l'appariement G9-C12 en C9-G12 (**Fig. 10**), abolissent la croissance cellulaire et la stabilité du snoARN U3, bien qu'un recrutement de la protéine Snu13 soit possible. Par ailleurs, le modèle structural de la snoRNP à boîtes C/D établi au laboratoire met en évidence la formation de contacts entre la protéine Nop58p et les nucléotides U13 et C12 de l'hélice II, les résidus S315 et Q318 de la protéine Nop58p étant impliqués dans la formation de ces contacts (thèse de N. Rolland). D'après le modèle établi, le nucléotide U8 est complètement libre et n'interagit avec aucun partenaire protéique. Ces prédictions ont pu être confirmés au laboratoire par l'observation de la perte d'association entre le motif C'/D du snoARN U3 et une protéine Nop58 mutée au niveau des deux résidus S315 et Q318 (thèse de N. Rolland). Les homologues de ces deux résidus dans la protéine Nop5 d'archées ont aussi été montré impliqués dans le recrutement de cette protéine au sein des sRNP (Hardin et al, 2009). De plus, les structures 3D établies pour les sRNP C/D ont confirmé l'interaction de Nop5 avec l'hélice II du K-

turn, au niveau des nucléotides C12 et U13 cités précédemment (Lin et al, 2011 ; Xue et al, 2010 ; Ye et al, 2009).

Les protéines Nop56p et Nop58p sont fusionnées en une seule protéine chez les archées, Nop5, capable de dimériser gràace à un domaine « coiled-coil ». Le positionnement relatif des protéines Nop56p et Nop58p dans le modèle de snoRNP à boîtes C/D eucaryotes a été basé sur cette structure établie pour Nop5.

Avant, on ne se basait que sur des données de reconstitution de complexes *in vitro*. En particulier, l'équipe de Watkins et nous-mêmes utilisions des extraits de cellules HeLa ou de levures, suggérant que la protéine Snu13p s'associe préalablement sur le snoARN, puis seulement ensuite les autres protéines cœur. Les données d'assemblage actuelles montrent que les protéines cœur forment de larges complexes avec les facteurs d'assemblage et sont sans doute associées pratiquement en même temps que la protéine Snu13p, permettant leur recrutement sur l'ARN. En parallèle, des protéines chaperonnes aident à l'adoption d'une conformation correcte pour médier leur association. La protéine Nop58p joue un rôle majeur dans l'assemblage en interagissant à la fois avec les facteurs d'assemblage Rsa1p et Pih1p.

### III.3.C. *L'association de la protéine Nop1p*

Comme les protéines Nop56p et Nop58p, la protéine Nop1p/FIB n'est pas capable d'interagir directement avec les snoARN à boîtes C/D, son association au snoARN dépend de l'interaction de la protéine Snu13p/15.5K avec le motif en K-turn (Watkins et al, 2002 ; Fatica et al, 2000 ; Omer et al, 2002). Un certain nombre de résidus de la protéine Nop1p/FIB sont néanmoins localisés à proximité du snoARN au sein de la snoRNP (Cahill et al, 2002 ; Granneman et al, 2009). En effet, des expériences de reconstitution *in vitro* de la snoRNP U3 humaine ont montré que la séquence de l'hélice II était essentielle à l'association de FIB au niveau de la particule (Watkins et al, 2002). Lors de cette étude, il a également été montré que la nature de l'appariement G9-C12 (**Fig. 10**) était essentielle pour l'association avec la protéine, puisqu'une inversion de séquence abolissait son interaction (Watkins et al, 2002). Or, il avait déjà été observé que cet appariement G-C était fortement conservé et essentiel à la fonction des snoRNP à boîtes C/D (Watkins et al, 2002 ; Marmier-

Gourrier et al, 2003 ; Schultz et al, 2006). Bien que cet appariement ne soit pas impliqué dans l'interaction avec la protéine 15.5K, il est tout de même requis pour la formation de la particule en permettant l'association de NOP56, NOP58 et FIB (Watkins et al, 2002). De la même manière, l'appariement U8-U13 (**Fig. 10**), conservé au sein de l'ensemble des snoARN, n'est pas spécifiquement requis pour l'association *in vitro* avec la protéine 15.5K. En revanche les résultats de l'équipe de Watkins démontrent que le nucléotide U13, contrairement au résidu U8, est nécessaire pour qu'il y ait association *in vitro* des protéines FIB, NOP56 et NOP58 (Watkins et al, 2002 ). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par N. Rolland au laboratoire montrant que le nucléotide U13 de la paire U8-U13, ainsi que l'appariement G9-C12 (**Fig. 10**), sont requis pour la croissance et la stabilité du snoARN U3, mais pas pour l'interaction avec la protéine Snu13p.

Enfin, il a été montré que chez les archées, le domaine C-terminal de la protéine Nop1, qui contient le site catalytique, interagissait avec la protéine Nop5, homologue de Nop56 et Nop58 chez la levure (Aittaleb et al, 2003).

De plus, il a été proposé chez les archées que les sRNP C/D peuvent exister dans une conformation ouverte non active et une conformation fermée active. Au laboratoire, C. Charron a modélisé la structure tridimensionnelle des formes ouvertes et fermées des snoRNP à boîtes C/D eucaryotes.

#### III.3.D. *L'association de la protéine Rrp9p*

Le cas particulier de l'association de la protéine Rrp9p au motif B/C sera traité plus loin dans le **chapitre 4**, puisque cette problématique était centrale à mon sujet de thèse.

### III.4. Biogenèse de la snoRNP U3

#### III.4.A. *Maturation du snoARN U3 et assemblage des protéines cœur de la snoRNP U3*

Comme nous l'avons déjà souligné, il existe deux copies du gène exprimant le snoARN U3 chez la levure, les gènes SNR17A et SNR17B, exprimant respectivement les snoARN U3A (90%) et U3B (10%) (Hughes et al, 1987). Les gènes de snoARN U3 constituent presqu'universellement des entités

transcriptionnelles indépendantes, transcrites par l'ARN polymérase II chez les animaux et les levures, et par l'ARN polymérase III chez les plantes. Le snoARN U3 est transcrit sous la forme d'un précurseur possédant une extension au niveau de son extrémité 3', ainsi qu'une coiffe monométhylée ($m^7G$) et un intron au niveau de son extrémité 5', entre les boîtes A et A' (**Fig. 14**) (Brule et al, 1995, 1996 ; Fournier et al, 1998 ; Myslinski et al, 1990 ; Kufel et al, 2000). Une fois mature, le snoARN U3 possède une coiffe triméthylée ($m^{2,2,7}G$) à son extrémité 5', après action de l'enzyme Tgs1 dans le noyau, mais n'est pas polyadenylé en 3', comme la majorité des ARN transcrits par l'ARN polymérase II (**Fig. 14**) (Reddy & Busch, 1983 ; Verheggen *et al*, 2002).

Une particularité de la séquence du gène exprimant le snoARN U3 chez un grand nombre d'éspèces de levures est la présence d'un intron, épissé par la machinerie d'épissage responsable de l'épissage des introns des ARNm (Myslinski *et al*, 1990 ; Brule *et al*, 1995, 1996 ; Fournier *et al*, 1998). La présence d'un intron dans un gène exprimant un snoARN était très inattendue quand notre équipe a fait cette observation, d'autant plus que la majorité des gènes de protéines chez *S. cerevisiae* ne possèdent pas d'introns. La structure secondaire du précurseur du snoARN U3 a été établie au laboratoire et montre que l'intron est situé à proximité de l'extrémité 5', entre les boîtes A et A' (**Fig. 8**), formant une grande structure en tige-boucle permettant de rapprocher les sites d'épissage 5' et 3' et le point de branchement (Mougin *et al*, 1996). Le repliement de l'intron montre que le site 5' d'épissage est piégé au sein d'une hélice et que le site de branchement est sous-optimal, ce qui module l'efficacité d'épissage (Myslinski *et al*, 1990 ; Brule *et al*, 1995, 1996 ; Mougin *et al*, 1996 ; Fournier *et al*, 1997, 1998). La formation de la longue structure en tige-boucle de l'intron n'influence pas la structure globale du domaine 3' du snoARN U3, suggérant que les protéines cœur peuvent s'associer sur le pré-snoARN U3 contenant l'intron (Mougin *et al*, 1996). Ce qui a été récemment observé au laboratoire par B. Rothé (Rothé *et al*, 2014).

Un modèle de maturation du pré-snoARN U3 conduisant à la formation de la particule snoRNP U3 avait été proposé chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kufel et al, 2000, 2003). La maturation se déroulerait de manière séquentielle au sein de plusieurs sous-compartiments cellulaires successifs (**Fig. 14**). Néanmoins, un certain

**Figure 14 : La voie de biogenèse de la snoRNP U3 de *Saccharomyces cerevisiae* qui avait été proposée par Kufel *et al*, 2000, 2003.**

Modèle de biogenèse pour la snoRNP U3 d'après Kufel *et al*, 2000, 2003 ; Verheggen *et al*, 2002 ; Qiu *et al*, 2008. Les différentes étapes sont décrites dans le texte. Nos données actuelles ne soutiennent pas l'ordre de certaines des étapes décrites dans ce modèle

nombre de données obtenues récemment au laboratoire vont à l'encontre de certaines parties du modèle proposé.

Un point est clair, le précurseur du snoARN U3 subit une série de clivages endonucléolytiques en 3' par l'enzyme Rnt1, impliquée également dans la maturation des précurseurs des ARNr. Le clivage a lieu au niveau de l'extension 3' aux positions +21 et +58 par rapport à l'extrémité 3' mature du snoARN U3, et ce au niveau d'une structure en tige-boucle reconnue par la protéine Rnt1 (**Fig. 14**) (Chanfreau et al, 1997 ; Abou Elela & Ares, 1998 ; Allmang et al, 1999 ; Seipelt et al, 1999 ; Kuffel et al, 2000, 2003). En absence de la protéine Rnt1, la synthèse du snoARN U3 n'est pas complètement abolie mais est réduite d'environ 30%, suggérant l'existence d'une voie alternative pour la maturation de l'extrémité 3' (Kufel et al, 2000). Les séquences éliminées sont hydrolysées par l'exonucléase Rat1/Xrn1, également impliquée dans la maturation des pré-ARNr. Plusieurs événements doivent ensuite avoir lieu et l'ordre de leur intervention tel que proposé dans le modèle est controversé par nos données actuelles (thèse de B. Rothé). Une digestion exonucléolytique doit être réalisée jusqu'aux positions +12 ou +18 dans l'extension 3' du précurseur. Elle est catalysée par l'exosome et/ou par les exonucléases de la famille Rex1-3 (**Fig. 14**). 2) Les protéines Lhp1 et Lsm2 à Lsm8 s'associent avec le précurseur du snoARN U3 au niveau de régions riches en résidus uridine, localisées dans l'extension en 3', en amont du site de coupure. Il a été proposé que l'ensemble de ces protéines soit impliqué dans le blocage des exonucléases (Kufel et al, 2000). 3) L'intron localisé à l'extrémité 5' du précurseur du snoARN U3 doit être éliminé par la machinerie d'épissage (**Fig. 14**). Il a été proposé que l'épissage intervienne après l'hydrolyse et l'association des protéines Lhp1 et Lsm. D'après nos données, des pré-snoARN U3 épissé et possédant l'extension 3' entière sont détectés, suggérant qu'il est possible que l'épissage intervienne plus précocement. Par ailleurs, nos données indiquent aussi une association très précoce des protéines cœur et de leurs facteurs d'assemblage avec le pré-snoARN U3. Au final, deux précurseurs sont formés, U3-I (+12) et U3-II (+18), et sont stabilisés par la présence des protéines Lhp1 et Lsm2 à Lsm8 (**Fig. 14**). En effet, la déplétion de ces protéines ne permet plus de détecter les deux précurseurs dans la cellule, mais n'affecte pas le taux de snoARN U3 mature (Kufel et al, 2003). Ensuite, les protéines cœur au départ simplement associées avec leurs facteurs d'assemblage pourraient se fixer de

manière stable et fonctionnelle sur l'ARN, ce qui provoquerait le départ des protéines Lhp1 et Lsm2 à Lsm8 (**Fig. 14**). Ceci entrainerait alors l'hydrolyse exonucléolytique de l'extrémité 3' du snoARN par l'exosome, suggéré par l'observation d'une accumulation des deux précurseurs si une sous-unité catalytique de l'exosome est déplétée (Kufel *et al*, 2003 ; Vidovic et al, 2000 ; Schultz et al, 2006 ; Liu et al, 2007). L'extrémité 5' du snoARN U3 est hyperméthylée par l'enzyme Tgs1, passant d'une coiffe monométhylée $m^7G$ à une coiffe triméthylée $^{m2,2,7}G$ (**Fig. 14**) (Verheggen et al, 2001, 2002). Cette étape doit être l'une des dernières étapes puisque la triméthylation de la coiffe n'est retrouvée sur aucun des différents précurseurs.

### III.4.B. *Facteurs impliqués dans la biogenèse de la snoRNP U3*

Tout comme la biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes, l'assemblage des snoRNP, notamment la particule U3, requiert un ensemble de facteurs d'assemblage qui ne sont pas retrouvés au sein de la particule mature. Le rôle de ces facteurs est de faciliter et contrôler la qualité de l'assemblage des particules en favorisant leur rapprochement spatial et en procédant à des remodelages dynamiques des différents composants.

Un complexe essentiel intervenant dans la formation des snoRNP à boîtes C/D est le complexe R2TP, composé des protéines Rvb1, Rvb2, Tah1 et Pih1, dont il tire son nom (**Fig. 15**) (Boulon et al, 2008).

Les protéines Rvb1 et Rvb2 (homologues des protéines TIP48 et TIP49 chez l'homme) appartiennent à la famille des hélicases AAA-ATPases (ATPase Associated with diverse cellular Activities) et sont organisées sous forme d'hexamères (Hanson & Whiteheart, 2005). Les protéines Tah1 et Pih1/Nop17 (homologues de RPAP3 et NOP17 chez l'homme) sont des cofacteurs de la protéine chaperonne Hsp82 (HSP90 chez l'homme), qui est s'associe au complexe R2TP (Zhao et al, 2005). Les protéines Tah1 et Pih1 interagissent entre elles, ainsi qu'avec les hélicases Rvb1 et Rvb2, et de façon transitoire avec la chaperonne Hsp82 (**Fig. 15**) (Tapia & Morano, 2010 ; Te et al, 2007 ; Zhao et al, 2005 ; Mc Keegan *et al*, 2007). La déplétion de la protéine Rvb2 affecte le taux de snoARN à boîtes C/D, mais pas celle du snoARN U3 (King et al, 2001 ; Gonzales et al, 2005). La déplétion

**Figure 15 : Facteurs d'assemblage impliqués dans la biogenèse de la snoRNP U3**

La protéine Snu13, associée spécifiquement au niveau du motif en K-turn du snoARN U3, recrute dans un premier temps le complexe Rsa1/Hit1 via le domaine PEP de Rsa1. L'association entre Rsa1 et Pih1, composant du complexe R2TP, permet alors le recrutement de celui-ci, ce qui permet à son tour l'assemblage des protéines cœur interagissant avec le complexe R2TP au niveau du snoARN pour former la snoRNP U3. Le complexe R2TP contient également deux AAA-ATPases, Rvb1 et Rvb2, permettant de médier les réarrangements conformationnels nécessaires à la formation d'une particule mature. De plus, la protéine Tah1 du complexe R2TP est capable de s'associer à la chaperonne Hsp82, responsable de la stabilisation des réarrangements. D'autre part, le facteur Bcd1 est également impliqué dans la biogenèse de la snoRNP U3 puisqu'il interagit avec les protéines Rsa1 et Rrp9. R2TP : Rvb1, Rvb2, Tah1, Pih1

de Rvb2 entraine également un défaut de production des ARNr matures. De plus, des expériences de double-hybride ont révélé que la protéine Pih1/Nop17 interagissait avec la protéine cœur Nop58 (**Fig. 15**). En outre, Pih1 est requise pour la localisation nucléolaire des 4 protéines cœur des snoRNP à boîtes C/D, Snu13, Nop1, Nop56 et Nop58 (Gonzales *et al*, 2005). Sa déplétion conduit également à une association plus forte entre Nop58 et le snoARN U3, témoignant de son rôle possible dans la régulation du processus d'assemblage des particules (Gonzales et al, 2005). Notre équipe a établi la structure tridimensionnelle de Tah1p de levure sous forme libre et en association avec le peptide C-terminal de Hsp90p (Back *et al*, 2013), ainsi que la structure tridimensionnelle du complexe Pih1p/Tah1p (Quinternet et al, 2015). Sous forme libre, Tah1p comporte un domaine C-terminal non structuré et un domaine N-terminal très structuré. C'est ce domaine qui lie l'extrémité C-terminale de Hsp90p et qui est responsable de la spécificité pour cette chaperonne par rapport à Hsp70p. Dans le complexe Pih1p/Tah1p, l'extrémité C-terminale de Tah1p est repliée et participe à l'interaction avec Pih1p. Plus précisément, elle particpie à la formation d'un feuillet β intermoléculaire.

Un autre facteur essentiel à l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D est la protéine Rsa1p chez la levure et son orthologue NUFIP chez l'homme (**Fig. 15**). La protéine Rsa1p n'est pas essentielle à la viabilité cellulaire mais sa déplétion entraine un ralentissement de la croissance. Elle est impliquée dans la stabilité de l'ensemble des snoARN à boîtes C/D, mais de manière limitée en ce qui concerne celle du snoARN U3 (Rothe et al, 2014). La protéine Rsa1p interagit directement avec la protéine Snu13p et cette interaction est compatible avec celle formée par Snu13p et les motifs C/D, C'/D ou B/C (**Fig. 15**). Cette interaction s'établit au niveau de la région C-terminale de Rsa1 grâce à son domaine PEP (Boulon et al, 2005, 2008). Notre équipe a établi la structure 3D de la protéine Snu13p en interaction avec Rsa1p ( et al, 2015). Notre équipe a également montré que la protéine Rsa1p nécessite pour être stable, l'interaction avec la protéine Hit1p ( ) et la structure de l'interaction a été établi (**Fig. 15**) (Rothe et al, 2014). La protéine Rsa1 s'associe aussi avec l'hyperméthylase Tgs1, impliquée dans la triméthylation de la coiffe du snoARN U3 (Boulon et al, 2005).

Dans l'état actuel des données que nous avons obtenues par nos études sur la levure et que l'équipe de E. Bertrand a obtenu par des études dans les cellules

HeLa, en particulier par l'emploi d'analyses protéomiques de type SILAC, il ressort que Snu13p est l'élément clé pour la reconnaissance de l'ARN et que Snu13p/15.5K et Nop58p/NOP58 forme déjà dans le cytoplasme un complexe avec plusieurs facteurs d'assemblage Rsa1p/NUFIP, Hit1p/TRIP3 et Bcd1p/BCD1. Ce complexe est transporté dans le noyau et s'associe sans doute avec l'ARN en cours de transcription, la fixation de Snu13p/15.5K induisant la libération de Hit1p/TRIP3.

De plus, il a été montré au laboratoire que les facteurs d'assemblages Rsa1p, Pih1p, ainsi qu'un autre facteur, Bcd1p, interagissent avec la protéine Rrp9 dans des tests de double hybride. Le rôle exact de Bcd1 n'est pas encore clairement identifié, mais ce facteur est essentiel à la viabilité cellulaire et impliqué dans la stabilité de l'ensemble des snoARN à boîtes C/D (Hiley et al, 2005 ; Peng et al, 2003). Il serait donc également impliqué dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D, notamment la snoRNP U3 par son association avec Rrp9p. Enfin, des travaux de N. Rolland et de V. Senty-Ségault montrent qu'en l'absence de la protéine Rsa1, la reconstitution *in vitro* d'un complexe entre le snoARN U3 et les protéines Snu13p et Rrp9p est possible, suggérant une plus faible dépendance de l'association des protéines du motif B/C vis à vis du facteur Rsa1p. Ceci pourrait avoir un lien avec la forte interaction observée Bcd1p. Par ailleurs, des expériences de co-expression de Rrp9p et de Rsa1p entière ou de ses deux domaines C- et N-terminaux, pros individuellement, ont montré une interaction de Rrp9p avec le domaine N-terminal de Rsa1p, mais pas le domaine C-terminal, contrairement à ce qui est observé pour Snu13p, Nop58p et Pih1p (Thèses de N. Rolland et R. Back). Ceci renforce l'idée d'un mécanisme différent mis en jeu pour l'association de Rrp9p par rapport à l'association des autres protéines cœur de la snoRNP U3. Cela suggère aussi un rôle possible de l'interaction de Rrp9p avec le domaine N-terminal de Rsa1p, soit dans la coordination de l'assemblage des protéines aux deux couples de boîtes C'/D et B/C de la particule U3, soit même dans le renforcement de l'assemblage des protéines cœur sur le motif C'/D du fait de sa faible affinité pour Snu13p.

### III.4.C. *Transport et localisation de la snoRNP U3*

La maturation de la snoRNP U3 semble se dérouler majoritairement dans le nucléoplasme et les corps nucléolaires (NB pour Nuclear Body) chez la levure, et les

corps de Cajal (CB pour Cajal Body) chez l'homme, pour finir dans le nucléole (**Fig. 14**) (Terns & Dahlberg, 1994 ; Verheggen et al, 2002). Les corps nucléolaires sont des sous-compartiments du nucléole comparables aux Cajal Bodies (CB) chez les vertébrés (Verheggen et al, 2001, 2002). Une fois la maturation des particules U3 achevée, celles-ci assureront leurs fonctions dans le nucléole. En effet, les intermédiaires du snoARN U3 non épissés ne sont détectés qu'au niveau du nucléoplasme, alors que les intermédiaires U3-I (+12) et U3-II (+18), plus tardifs, sont détectés à la fois dans le nucléoplasme et dans les corps nucléolaires (**Fig. 14**). Le snoARN U3 mature est quant à lui détecté transitoirement dans les corps nucléolaires mais principalement dans le nucléole (**Fig. 14**) (Verheggen et al, 2002). Il existe donc un lien entre la localisation du snoARN U3 et les différentes étapes de maturation et d'assemblage de la snoRNP U3, ce qui est le cas aussi chez les mammifères (Verheggen et al, 2002 ; Boulon et al, 2004 ; Pradet-Ballade et al, 2011).

Chez l'homme, différents facteurs intervenant dans ces étapes de transport ont été identifiés, tels que Nopp140, CRM1 et PHAX (Isaac et al, 1998 ; Boulon et al, 2004 ; Watkins et al, 2004). Ces facteurs seraient donc associés transitoirement aux particules naissantes puisqu'elles ne sont pas retrouvées au sein de la particule mature. La protéine Nopp140 (homologue de Srp40 chez la levure) est présente au sein du nucléole et des corps de Cajal (Isaac et al, 1998). Il a été montré que cette protéine s'associe au niveau des précurseurs du snoARN U3, ainsi qu'au niveau de sa forme mature snoARN (Watkins et al, 2004), jouant ainsi un rôle de transporteur des différentes espèces du snoARN U3 entre le nucléole et les corps de Cajal. Cette protéine n'étant pas retrouvée dans les particules matures dans le nucléole, elle serait dissociée lors des étapes tardives de maturation de la snoRNP U3 (Watkins et al, 2004). Chez la levure, la déplétion de la protéine Srp40, homologue de Nopp140, conduit à un défaut de localisation dans le nucléole des snoARN à boîtes C/D, montrant ainsi également son rôle dans leur trafic intranucléaire (Verheggen et al, 2001). Les deux facteurs CRM1 et PHAX humains, connus pour leur rôle dans l'export des UsnARN, semblent également interagir avec les différents intermédiaires du snoARN U3, ainsi que sa forme mature, et participe activement à l'adressage nucléolaire du snoARN U3. En effet, la protéine PHAX s'associe aux précurseurs avec une coiffe monométhylée $m^7G$, alors que la protéine CRM1 s'associe avec la

forme hyperméthylée $m^{2,2,7}G$ mature du snoARN U3 (Boulon et al, 2004). De plus, l'inactivation de la protéine PHAX bloque le transport des formes intermédiaires vers les corps de Cajal, tandis que l'inactivation de CRM1 bloque le transport entre les corps de Cajal et le nucléole. Cependant, si l'assemblage de la snoRNP U3 est est supposé être principalement nucléaire, des données expérimentales obtenues en cellules HeLa ont mis en évidence la présence de précurseur de la particule U3 associés avec les facteurs CRM1 et PHAX dans des extraits cytoplasmiques (Watkins & Bohnsack, 2011) (Boulon et al, 2004 ; Watkins et al, 2004, 2007). La question se pose donc de l'existence d'une éventuelle étape cytoplasmique qui pourrait dépendre des conditions physiologiques.

# Chapitre 2 : Clivages exo- et endonucléolytiques menant à la formation des ARNr matures

Comme nous l'avons déjà mentionné, le pré-ARNr 35S contient les séquences des ARNr 18S, 5,8S et 25S, interrompues par des séquences externes (5'-ETS et 3'-ETS) et internes (ITS1 et ITS2). Pour libérer et rendre fonctionnelles les ARNr matures, les séquences excédentaires doivent être éliminées par une série de clivages endo- et exonucléolytiques **(Fig. 16)**. La maturation est couplée au repliement des pré-ARNr, ainsi qu'à la fixation de facteurs protéiques et ribonucléoprotéiques et de protéines ribosomiques sur ces ARN, l'ensemble formant des particules pré-ribosomiques de tailles imposantes.

Bien que les intermédiaires de maturation correspondent à la progression de l'assemblage des sous-unités ribosomiques, il n'existe pas nécessairement une nécessité de succession pour toutes ces étapes de maturation. En effet, bien que certaines étapes de maturation soient indispensables à l'étape suivante (Vos *et al*, 2004 ; Lamanna & Karbstein, 2010), dans d'autres cas, le blocage d'une étape antérieure n'abolit pas forcément le déroulement de l'étape suivante (Torchet & Hermann-Le Denmat, 2000). On peut donc imaginer que l'ordre des étapes de maturation soit en partie dicté par la disponibilité des sites de maturation. D'autre part, il existe des voies alternatives de maturation pour former certains des ARNr matures. En particulier, l'extrémité 5' de l'ARNr 5,8S peut être générée par le complexe exonucléase 5'-3' Rat1p/Rai1p et l'exonucléase Xrn1p, ou générée par une voie parallèle impliquant la protéine Rrp17p ((Xue *et al*, 2000 ; Oeffinger *et al*, 2009 ; Schillewaert *et al*, 2012).

## I. Clivages précoces conduisant à la formation de la petite sous-unité ribosomique 40S

Après le clivage par l'enzyme Rnt1 au site B0, à l'extrémité 3' dans la séquence 3'-ETS, ce qui libère le pré-ARNr 35S, de nombreux clivages endo- et exonucléolytiques se déroulent au niveau du pré-ARNr 35S **(Fig. 16)**. Les facteurs responsables des différents clivages ne sont pas encore tous identifiés à ce jour. Les

**Figure 16 : Voies de maturation du pré-ARNr 35S chez *Saccharomyces cerevisiae.***

D'après Fatica & Tollervey, 2002. **A.** Structure du transcrit primaire issu de la transcription de l'ADNr et localisations des sites de maturation. Au niveau de ce transcrit, les régions correspondant aux futurs ARNr matures 18S, 5,8S et 25S sont flanquées par les séquences 5'-ETS et 3'-ETS et séparés par les séquences ITS1 et ITS2. **B.** Afin de former les ARNr matures, les différentes séquences excédentaires du pré-ARNr 35S, obtenu après le clivage endonucléolytique par Rnt1 du transcrit primaire, sont éliminées par une série d'étapes de maturation endonucléolytiques et exonucléolytiques (représentées en bleu), réalisées par des enzymes identifiées ou non (représentées en rouge). ETS : External Transcribed Spacer, ITS : Internal Transcribed Spacer.

trois premiers clivages A0, A1 et A2 se déroulent au sein du nucléole dans un macro-complexe constitué d'une multitude de facteurs, le processome. Le premier clivage a lieu dans la séquence 5'-ETS au niveau du site A0, localisé 90 nts en amont de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S. Il permet de libérer le pré-ARNr 33S **(Fig. 16)** (Hughes & Ares, 1991 ; Beltrame *et al*, 1994). Le fragment généré, allant du site d'initiation de la transcription jusqu'au site A0 est ensuite hydrolysé par l'exosome (De La Cruz *et al*, 1997). Ce clivage au site A0 est bien réalisé de manière endonucléolytiques, car dans des souches n'exprimant plus certains composants de l'exosome, ce fragment est toujours détecté. De plus, chez *S. cerevisiae*, ce site de coupure est au départ unique dans la région 5'-ETS (Allmang *et al*, 1999 ; De La Cruz *et al*, 1997 ; Zanchin & Goldfarb, 1999). Il a initialement été supposé que le facteur responsable des clivages soit l'endonucléase Rnt1, mais sa délétion ne supprimant pas la maturation en A0, le facteur impliqué reste indéterminé (Abou *et al*, 1996 ; Kufel *et al*, 1999). Le pré-ARNr 33S est ensuite rapidement clivé au niveau du site A1, libérant le pré-ARNr 32S, suivi par le clivage au site A2, libèrant les pré-ARNr 20S et 27SA2. Ces deux clivages se font de manière coordonnée, le clivage au site A2 étant bloqué si le clivage au site A1 n'a pas lieu. L'inverse est néanmoins faux (Torchet & Hermann-ledenmat, 2000 ; Bleichert *et al*, 2006). **(Fig. 16)** (Hughes & Ares, 1991 ; Beltrame *et al*, 1994 ; Udem & Warner, 1972). Les protéines Utp24 et Rcl1 sont proposées être respectivement impliquées dans les clivages aux sites A1 et A2 (Bleichert *et al*, 2006 ; Horn *et al*, 2011). Le fragment A0-A1 est hydrolysé par les exonucléases Xrn1 et Rat1, dont l'activité 5'-3' exonucléasique a pu être été démontrée *in vitro* (Stevens *et al*, 1987, 1995 ; Larimer *et al*, 1992 ; Kenna *et al*, 1993). Comme pour le site A0, le fait que les clivages aux sites A1 et A2 sont des clivages endonucléolytiques est prouvé par le fait que les fragments générés par ces coupures sont détectables dans des souches n'exprimant plus les exonucléases Rat1 et Xrn1 (Dichtl *et al*, 1997 ; Petfalsky *et al*, 1998). Le clivage au site A2 sépare la voie de maturation des pré-ARNr des étapes de maturation des particules pré-ribosomiques pré-40S et pré-60S **(Fig. 16)** (Udem & Warner, 1972). En effet, le clivage au site A2 libère d'un côté le pré-ARNr 20S, précurseur de l'ARNr 18S retrouvé dans la petite sous-unité ribosomique 40S, et le pré-ARNr 27SA2, à partir duquel les ARNr 5,8S et 25S retrouvés dans la grande sous-unité ribosomique 60S sont produits **(Fig. 16)**. Le pré-ARNr 20S est alors exporté sous la forme de pré-ribosome 40S à travers la membrane nucléaire dans le cytoplasme, où la fin de sa maturation a lieu (Udem &

Warner, 1973 ; Trapman *et al*, 1975). Une fois dans le cytoplasme, le pré-ARNr 20S subit une méthylation de deux nucléotides consécutifs (A1779/A1780) au niveau de l'extrémité 3' de la séquence correspondant à l'ARNr 18S (Brand *et al*, 1977). Cette modification est catalysée par la protéine Dim1, essentielle et conservée des bactéries aux eucaryotes (Lafontaine *et al*, 1994). Ces deux méthylations sont requises pour l'obtention d'une petite sous-unité ribosomique 40S fonctionnelle, puisqu'*in vitro*, en présence d'un extrait contenant un ARNr 18S non modifié, la traduction est inefficace (Brand 1977 ; Lafontaine *et al*, 1994, 1998). Bien que les méthylations se déroulent dans le cytoplasme, la protéine Dim1 est présente au sein du processome 90S dans le nucléole et est requise pour les étapes de clivages précoces A1 et A2, qui s'opèrent même si son site actif est altéré (Lafontaine *et al*, 1995, 1998). De plus, la particule pré-40S cytoplasmique contient différents facteurs, tels que Dim1, Dim2/Pno1, Enp1, Ltv1, Tsr1, Hrr25, Nob1, Fap7, Rio1, Rio2 et Rrp12, associés au pré-ARNr 20S (Schafer *et al*, 2003 ; Fatica *et al*, 2003 ; Oeffinger *et al*, 2004 ; Vanrobays *et al*, 2004). La déplétion de Dim2/Pno1 entraine des défauts dans la méthylation du pré-ARNr 20S et dans la maturation des pré-ARNr (Vanrobays *et al*, 2004), de manière similaire à ce qui est observé avec l'absence de la méthylase Dim1. Comme Dim2/Pno1 contient un domaine de fixation à l'ARN de type KH (K Homology), il a été proposé que ce soit Dim2 qui recrute Dim1 dans le processome au niveau du pré-ARNr 35S. De plus, l'association de la protéine Rps19 au niveau du pré-ARNr 20S requiert les protéines Enp1, Rio2 et Tsr1 (Leger-Silvestre *et al*, 2005).

La dernière étape de maturation du pré-ARNr 20S correspond au clivage endonucléolytique au niveau du site D, à l'extrémité 3' de la séquence correspondant à l'ARNr 18S mature **(Fig. 16)**. Ce dernier clivage est cytoplasmique et endonucléolytique puisque le fragment D-A2 s'accumule fortement dans des souches déficientes pour l'exonucléase cytoplasmique Xrn1 mais pas pour son équivalent nucléaire Rat1 (Stevens *et al*, 1991 ; Johnson, 1997 ; Petfalski *et al*, 1998 ; Dichtl *et al*, 1997). Des éléments additionnels en *cis* sont essentiels pour ce clivage et sont localisés à proximité du site de clivage D, comme en témoigne l'accumulation du pré-ARNr 20S et la perte du fragment D-A2 en présence de mutations d'un seul nucléotide à l'extremité 3' de l'ARNr 18S (Van Beekvelt *et al*, 2000, 2001 ; Jeeninga *et al*, 1997 ; Van Nues *et al*, 1995). L'altération ou le défaut

d'expression de certains facteurs présents dans la particule pré-40S induisent une accumulation du pré-ARNr 20S et semblent ainsi requis pour le clivage au site D (Fatica *et al*, 2003 ; Granneman *et al*, 2005 ; Vanrobays *et al*, 2003 ; Gelperin *et al*, 2001). Parmi eux, l'enzyme Nob1 avait été proposée comme candidate, son rôle dans ce clivage du pré-ARNr 20S e été démontrée récemment (Lamanna & Karbstein, 2009, Bleichert *et al*, 2006, Fatica *et al*, 2003, Mitchell *et al*, 1997). Cette protéine possède un domaine PIN, apparenté au domaine catalytique d'exonucléases 5'-3' dépendantes de $Mg^{2+}$, qui est crucial pour l'activité nucléase et donc pour la maturation du pré-ARNr 20S au niveau du site D (Fatica *et al*, 2004 ; Arcus *et al*, 2004). La protéine Nob1p s'associe sous forme d'homotétramère, via son domaine PIN, sur le pré-ARNr 20S au niveau du site D (Lamanna *et al*, 2009). Afin que Nob1 se fixe et que ce clivage se déroule correctement, la région cible dans le pré-ARNr 20S doit être en simple brin. Il est donc supposé que Nob1 agirait de manière couplée avec un complexe permettant de maintenir ou convertir l'ARN sous une forme simple brin (Lamanna *et al*, 2009). Il a été montré que Nob1 interagit avec les protéines ribosomiques Rps5p et Rps14p (Lamanna *et al*, 2009), ainsi qu'avec le facteur Dim2p (Tone *et al*, 2002). Son activité semble donc pouvoir être modulée par ces facteurs auxiliaires. En effet, la queue C-terminale de Rps14p se fixe au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S et une mutation ponctuelle dans la protéine abolit le clivage au site D (Jakovljevic *et al*, 2004).

Un autre facteur essentiel au clivage au site D est la protéine Fap7p, qui interagit transitoirement avec la particule pré-40S. Une interaction directe a même été identifiée *in vitro* entre Fap7p et Rps14p, suggérant que Rps14p recruterait Fap7p au sein de la particule pré-40S (Granneman *et al*, 2005) La déplétion de Fap7p entraine une inhibition du clivage au site D et donc l'accumulation du pré-ARNr 20S mais n'inhibe pas l'assemblage ou le transport de la particule pré-40S (Granneman *et al*, 2005). Le facteur Fap7p ne présente pas d'homologie avec des nucléases connues mais pourrait appartenir à la famille des P-loop kinase, apparentée aux nucléoside diphosphate kinases (Granneman *et al*, 2005). Il ne possède pas d'activité enzymatique *in vitro* mais l'altération de son site catalytique potentiel (motifs Walker A et B) inhibe la croissance et la maturation du pré-ARNr 20S. Ainsi, il est probable que le clivage au site D requiert l'hydrolyse de NTP, catalysée par Fap7.

Deux autres kinases, Rio1p et Rio2p de la famille des protéines RIO, seraient également impliquées dans la maturation du pré-ARNr 20S. En effet, leur déplétion

entrainent l'accumulation de ce dernier (Vanrobays *et al*, 2001, 2003). Les protéines Rio1p et 2 présentent des homologies de structures primaires et tertiaires mais ne sont pas fonctionnellement redondantes (Vanrobays *et al*, 2003). Ainsi, Rio2 s'associe de façon stable à la particule pré-40S tandis que Rio1 interagit probablement plus transitoirement (Schafer *et al*, 2003 ; Gavin *et al*, 2002). Ces deux facteurs présentent une activité kinase *in vitro*, qui *in vivo* est essentielle pour le clivage au site D (Angermayr *et al*, 2002 ; Geerlings *et al*, 2003) mais leurs substrats demeurent inconnus.

Plusieurs protéines ribosomiques jouent également un rôle important dans la maturation du pré-ARNr 20S et donc dans la formation de la petite sous-unité ribosomique, les protéinesRps0p, Rps2p, Rps3p, Rps10p, Rps14p, Rps20p, Rps21p, Rps26p et Rps28p (Ford *et al*, 1999 ; Tabb-Massey *et al*, 2003 ; Ferreira-Cerca *et al*, 2005). La protéine Rps14p est requise pour les étapes de maturation tardives dans le cytoplasme, mais également pour certaines étapes précoces dans le noyau. En effet, l'altération de la région C-terminale de la protéine Rps14p entraine une accumulation forte du pré-ARNr 20S (Jakovljevic *et al*, 2004), alors que sa déplétion provoque un défaut des clivages précoces menant à une perte du pré-ARNr 20S (Ferreira-Cerca *et al*, 2005). Les régions C-terminales de Rps14p, de Rps0p et de Rps2p semblent être localisées à proximité de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Spahn *et al*, 2001), suggérant un rôle dans le clivage au site D. Ces protéines ne possédant toutefois pas de domaines nucléase connus, elles seraient plutôt impliquées dans la stabilisation d'une conformation du pré-ARNr 20S spécifique et/ou dans le recrutement des facteurs nécessaires à ce clivage.

De plus, la protéine ribosomique Rps3p n'est pas associée de manière aussi stable dans la particule pré-40S que dans la petite sous-unité ribosomique 40S (Schafer *et al*, 2006). Une différence entre ces deux particules correspond à la formation de la structure en « bec » de la petite sous-unité 40S, formée grâce à l'hélice 33 de l'ARNr 18S, à la base de laquelle se fixe la protéine Rps3. Dans le noyau, Rps3p fait partie du complexe Enp1p/Ltv1p/Rps3p au sein des particules pré-40S, où Enp1p et Rps3p sont phosphorylés par la kinase Hrr25p. Après l'export du noyau au cytoplasme, la déphosphorylation du complexe entraine un réarrangement structural qui permet la formation du bec, de manière concomitante à l'association stable de Rps3p et à la formation d'une petite sous-unité 40S fonctionnelle (Schafer *et al*, 2006). D'autres

protéines subissent des changements conformationnels permettant d'interagir de manière plus stable avec l'ARNr 18S qu'avec le pré-ARNr 20S, permettant ainsi leur intégration efficace dans la petite sous-unité 40S mature (Ferreira-Cerca *et al*, 2007).

### I.1. Rôle de la snoRNP U3 dans les étapes précoces de maturation

La snoRNP U3 n'est pas impliquée dans des réactions de modification mais est nécessaire aux évènements de maturation des pré-ARNr aux sites A0, A1 et A2, qui permettent la production du pré-ARNr 18S (20S) au sein du processome (Hughes & Ares, 1991 ; Kass et al, 1990 ; Li et al, 1990 ; Zagorski et al, 1988).

La snoRNP U3 est un composant essentiel du processome et joue un rôle primordial dans sa formation et son architecture au niveau de l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S, comme en témoigne la disparition des boutons terminaux correspondants au processome lors de la déplétion du snoARN U3 (Osheim et al, 2004 ; Dragon et al, 2002). La snoRNP U3 existe ainsi sous la forme de deux complexes qui peuvent être séparés par gradients de sédimentation. La première est une forme libre (12S) correspondant au snoARN U3 associé aux seules protéines spécifiques de la particule, et la seconde correspond à la forme trouvée au sein du processome (90S). Au sein du processome, des appariements entre certaines régions complémentaires du domaine 5' du snoARN U3 et du pré-ARNr 35S sont établies. Ces interactions correspondent à la formation de 5 appariements intermoléculaires, appelées hélices I, II, III, V et VI, requises pour les clivages précoces A0, A1 et A2 (**Fig. 17**) (Antal *et al*, 2000 ; Beltrame & Tollervey, 1992Borovjagin & Gerbi, 1999, 2000 ; Huhes, 1996 ; Mereau et al, 1997 ; Marmier-Gourrier et al, 2011, Dutca et al, 2011).

Ces différents appariements sont conservés chez les eucaryotes. De plus, la formation de ces hélices conduit à des réarrangements structuraux au niveau du pré-ARNr 35S, permettant d'exposer de manière optimale les différents sites de clivages A0, A1 et A2, de réguler le repliement du pseudonoeud central du futur ARNr 18S ainsi que de recruter de multiples facteurs impliqués dans la maturation et l'assemblage des pré-ribosomes (Beltrame & Tollervey, 1995 ; Hughes, 1996 ; Mereau et al, 1997 ; Sharma & Tollervey, 1999 ; Dutca et al, 2011 ; Marmier-Gourrier et al, 2011). Ainsi, la snoRNP U3 joue un rôle de chaperonne du pré-ARNr

**Figure 17 : Représentation schématique des appariements intermoléculaires entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S de *Saccharomyces cerevisiae* au sein du processome et des appariements intramoléculaires de l'ARNr 18S formant le pseudonoeud au sein de la petite sous-unité ribosomique 40S (Méreau *et al*, 1997 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2003, 2011)**

Le snoARN U3 est représenté en noir et les boîtes A et A' du domaine 5' du snoARN U3 en gris. Le pré-ARNr 35S est représenté en orange et l'ARNr 18S en jaune. Les sites de clivages A0, A1 et A2, menant à la production de l'ARNr 18S sont indiqués en rouge. **A.** Appariements entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S au sein du processome. L'association entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S conduisent à la formation 5 appariements intermoléculaires nommés hélices I, II, III, V, VI (représentées en violet). Les régions 3'-hinge et 5'-hinge du snoARN U3 s'apparient avec la région 5'-ETS du pré-ARNr 35S, formant les hélices VI et V respectivement, tandis que les boîtes A et A' s'apparient avec l'ARNr 18S, formant les hélices I, II et III. Les séquences non-appariées du snoARN U3 sont appelées segment 3 et 4 (représentés en violet). Le segment 4 se structure en une tige-boucle nommée 1b'. **B.** Appariements s'établissant au niveau de l'ARNr 18S au sein de la petite sous-unité ribosomique 40S et conduisant à la formation du pseudonoeud central. Les séquences du pré-ARNr 35S (entourées en marron) impliquées dans les hélices I, II et III avec le snoARN U3 sont également impliquées dans les appariements nécessaires à l'établissement du pseudonoeud au sein de l'ARNr 18S.

permettant sa structuration correcte, ce qui constitue un élément crucial pour la maturation et l'assemblage des pré-ribosomes. Ainsi, la formation de ces appariements constitue une étape clé pour la formation des clivages précoces A0, A1 et A2. Par ailleurs, certains facteurs contenus dans le processome, tels que le complexe Mpp10, contenant les protéines Mpp10p, Imp3p et Imp4p, interviennent dans la formation et la stabilisation de certaines de ces hélices intermoléculaires et sont essentiels pour la production de la petite sous-unité ribosomique 40S.

### I.1.A. *Appariements entre le snoARN U3 et la région 5'-ETS du pré-ARNr 35S*

Le domaine 5' du snoARN U3 établit deux appariements au niveau de ses deux régions appelées 3'-hinge et 5'-hinge avec la région 5'-ETS du pré-ARNr 35S. Ces deux appariements forment les hélices VI (positions 62 à 72 pour le snoARN U3 et 281 à 291 pour le pré-ARNr 35S) et V (positions 39 à 48 pour le snoARN U3 et 470 à 479 pour le pré-ARNr 35S) respectivement (**Fig. 17**) (Marmier-Gourrier et al, 2011 ; Dutca et al, 2011).

L'existence de l'appariement correspondant à l'hélice VI a été découvert récemment chez *Saccharomyces cerevisiae* (Marmier-Gourrier et al, 2011 ; Dutca et al, 2011), ce qui est en accord avec les appariements identifiés auparavant chez *Xenopus laevis* entre les régions 3'-hinge et 5'-ETS. Il a été montré que la formation de l'hélice VI était un événement préalablement requis pour la formation des autres hélices (Dutca et al, 2011). En effet, la formation de cette hélice est requise pour la croissance, la stabilité du snoARN U3 et les clivages précoces A0, A1 et A2, ce qui traduit son importance fonctionnelle dans la biogenèse des ribosomes (Marmier-Gourrier et al, 2011). De plus, il a été montré par la réalisation de mutations compensatoires dans le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S que les régions importantes étaient principalement localisées au niveau de la partie 3' de l'appariement (correspondant aux positions 68 à 72 pour le snoARN U3 et 281 à 285 pour le pré-ARNr 35S) (**Fig. 17**). La séquence de de ces segments complémentaires est importante puisque des mutations compensatoires ne restaurent que partiellement la croissance (Marmier-Gourrier et al, 2011). Ces données sont en accord avec ce qui avait été observé chez *Xenopus laevis* (Hartshorne & Toyofuku, 1999 ; Hartshorne, 1998 ; Borovjagin & Gerbi, 2000).

L'hélice V, la première identifiée, localisée entre les régions 5'-hinge et 5'-ETS (**Fig. 17**) (Beltrame & Tollervey, 1995) est également requise pour la croissance, la stabilité du snoARN U3 ainsi que pour la maturation du pré-ARNr aux sites A0, A1 et A2 chez la levure *S. cerevisiae* (Beltrame & Tollervey, 1995 ; Marmier-Gourrier et al, 2011). La capacité de former cette hélice est conservée par l'existence de mutations compensatoires chez les autres espèces de levures (Brulé *et al*, 1996). Chez *Xenopus laevis*, bien que cet appariement se forme également, il a été démontré qu'il n'était pas essentiel pour les étapes de clivages précoces aux sites A0, A1 et A2, contrairement à l'hélice VI, suggérant des différences fonctionnelles entre différents organismes (Borovjagin & Gerbi, 2000). Une explication possible serait que chez *Xenopus laevis*, le recrutement de la snoRNP U3 soit favorisé par une protéine, la nucléoline, associée à la séquence 5'-ETS. La nucléoline permettrait le recrutement de la snoRNP U3 au niveau du pré-ARNr 35S, ne nécessitant pas l'intervention de l'hélice V dans ce recrutement (Ginisty et al, 1998). L'implication de la protéine homologue à la nucléoline, Nsr1, chez la levure, dans la stimulation du recrutement de la snoRNP U3 au niveau du pré-ARNr n'a pas encore été étudiée, mais pourrait expliquer que l'appariement correspondant à l'hélice V soit nécessaire au recrutement de la snoRNP U3 (Ginisty et al, 2000). De plus, la formation de l'hélice V ne requiert pas de séquence spécifique mais simplement une complémentarité de séquence, permettant d'expliquer les différences de séquences observées dans d'autres espèces (Hartshorne & Toyofuku, 1999 ; Beltrame et al, 1995 ; (51, Brule 1996).

Au niveau du snoARN U3, la séquence séparant les deux hélices V et VI, appelée segment 4 (positions 49 à 61 pour le snoARN U3), peut former une petite structure en tige boucle, l'hélice 1b (**Fig.** 17). Notre équipe a été montré que ni la longueur, ni la séquence du segment 4 n'avaient de rôle dans l'activité de la snoRNP U3, contrairement à ce qui avait été observé chez *Xenopus laevis*, où la distance, mais pas la séquence, a une importance fonctionnelle (Marmier-Gourrier et al, 2011 ; Borovjagin & Gerbi, 2000).

### *I.1.B. Appariements entre le snoARN U3 et la région de l'ARNr 18S au sein du pré-ARNr*

Le domaine 5' du snoARN U3 établit aussi des appariements avec la région correspondant au futur ARNr 18S. Ces appariements font intervenir les boîtes A et A' du snoARN U3 et conduisent à la formation des 3 hélices I, II et III, qui jouent un rôle crucial chez la levure (**Fig. 17**) (Morrissey et Tollervey, 1993, Hughes 1996, Mereau 1997, Borovjagin et Gerbi 1999 ; Myslinski 1990). L'hélice II (positions 15 à 21 pour le snoARN U3 et 10 à 16 pour l'ARNr 18S) et l'hélice III (positions 4 à 11 pour le snoARN U3 et 19 à 25 pour l'ARNr 18S) se forment au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S, tandis que l'hélice I (positions 23 à 27 pour le snoARN U3 et 1139 à 1143 pour l'ARNr 18S) se forme dans une région située en aval, au niveau de l'ARNr 18S (**Fig. 17**). La longueur précise des ces trois appariements a été redéfinie par notre équipe, par analyse directe de la structure de l'ARN au sein des levures (Mereau et al, 1997). Ces trois hélices interviennent dans la maturation du pré-ARNr 35S et sont ainsi requises pour les étapes de clivages précoces A1 et A2 et dans une moindre mesure pour le clivage au site A0 (Beltrame & Tollervey, 1994, 1995 ; Sharma & Tollervey, 1999 ; Hughes, 1996 ; thèse de N. Marmier-Gourrier). La séquence de l'hélice I n'est pas importante pour ces événements de maturation, tandis que pour les hélices II et III, une séquence précise est nécessaire (Sharma & Tollervey, 1999 ; thèse de N. Marmier-Gourrier).

Enfin, la longueur, plutôt que la séquence, de la région reliant les hélices V et I, appelée segment 3 (**Fig. 17**), est également critique pour la fonction de la snoRNP U3 dans la maturation du pré-ARNr 35S (Mereau et al, 1997 ; thèse de N. Marmier-Gourrier).

### *I.1.C. La formation du pseudonoeud central au sein de l'ARNr 18S*

Les segments de l'ARNr 18S engagées dans les trois appariements correspondant aux hélices I, II et III sont également impliqués dans deux appariements conduisant à la formation du pseudonoeud central au sein de l'ARNr 18S mature (**Fig. 17**) (Gutell et al, 1994 ; Neefs et al, 1993 ; Hughes et al, 1996). Cette structure repose sur des interactions à courte et longue distances hautement conservées au niveau de l'ARNr

18S. La quatrième séquence de l'ARNr 18S, non-engagées dans les hélices I, II ou III mais impliquée dans la formation de la structure en pseudonoeud (positions 4 à 8 de l'ARNr 18S) ne possède pas une séquence complémentaire au niveau du snoARN U3 (**Fig. 17**). Cependant, il avait été proposé, chez la levure, l'existence d'une hélice IV, mais elle chevauche la séquence impliquée dans l'hélice VI et la disruption de la complémentarité ne s'est néanmoins pas avéré avoir un effet sur la fonctionnalité du snoARN U3 (**Fig. 17**) (Mereau et al, 1997 ; Marmier-Gourrier et al, 2007, 2011).

Le pseudonoeud central est une caractéristique structurale clé de l'ARNr 18S au sein de la petite sous-unité ribosomique 40S, nécessaire à sa fonction. Les appariements formés entre le snoARN U3 et les séquences impliquées dans la formation du pseudonoeud (hélice I, II et III) sont mutuellement exclusifs de la formation irréversible du pseudonoeud central (Sharma & Tollervey, 1999 ; Hughes, 1996 ; Mereau et al, 1997). Il a ainsi été proposé que la snoRNP U3 contrôlerait la formation irréversible du pseudonoeud central en séquestrant les séquences impliquées dans sa formation. Ce délai supplémentaire pourrait permettre à d'autres facteurs du processome, ainsi qu'à certaines protéines ribosomiques, de venir s'associer au niveau du pré-ARNr, et ainsi permettre la maturation correcte de la petite sous-unité ribosomique 40S. En outre, plusieurs facteurs sont probablement requis pour l'établissement des appariements entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S (hélice I, II, III, V et VI). Ces facteurs pourraient participer au maintien du pré-ARNr dans une conformation compatible avec l'interaction avec la snoRNP U3.

## I.2. Rôles des snoRNP snR10, snR30, snR35 et U14

Chez *S. cerevisiae*, en plus de la snoRNP U3, d'autres snoRNP à boîtes H/ACA ou C/D sont nécessaires pour qu'il y ait maturation du pré-ARNr. Elles ont en plus une activité, soit de pseudouridylation, soit de 2'-O-méthylation. Leur rôle dans les étapes de clivages du pré-ARNr consisterait à s'associer au pré-ARNr 35S et à réguler son repliement, en induisant ou empêchant la formation de structures secondaires et tertiaires. Les événements de clivages A0, A1 et A2 ainsi que l'assemblage des facteurs protéiques et ribonucléoprotéiques et des protéines ribosomiques seraient ainsi facilités (King *et al*, 2003, Liang *et al*, 2007, Rabl *et al*, 2011, Karbstein *et al*, 2011).

Néanmoins, contrairement à la snoRNP U3, bien que ces snoRNP s'associent avec le pré-ARNr 35S et qu'elles soient essentielles pour les clivages précoces, elles ne sont pas significativement enrichies au sein du processome, qui est le macro-complexe, constitué d'une multitude de facteurs, se formant dans la région 5' du pré-ARNr 35S (Dragon *et al*, 2002 ; Grandi *et al*, 2002 ; Schafer *et al*, 2003). Il est donc parfois difficile de classer ces snoRNP en tant que membres à part entière du processome. Il est possible que ces snoRNP interagissent avec le pré-ARNr 35S de manière transitoire, échappant ainsi aux expériences visant à les détecter (Nissan *et al*, 2002 ; Schafer *et al*, 2003) (pour revue, Venema & Tollervey, 1999). Néanmoins, la présence des protéines cœur des snoRNP à boîtes H/ACA et à boîtes C/D dans le processome montre bien que ces snoRNP y ont une activité (Fromont-Racine *et al*, 2003 ; Takahaschi *et al*, 2003). Il a par ailleurs été montré que les protéines Rok1p et Rrp5p, composants du processome, sont liées fonctionnellement à la protéine Gar1, une protéine cœur des snoRNP à boîtes H/ACA, ainsi qu'à la boîte H/ACA de la snoRNP snR10 (Dragon *et al*, 2002 ; Grandi *et al*, 2002 ; Venema *et al*, 1997 ; Venema & Tollervey, 1996).

### *I.2.A. La snoRNP snR10*

La snoRNP snR10 appartient à la famille des snoRNP à boîtes H/ACA. Elle est requise pour les clivages précoces A0, A1 et A2 du pré-ARNr 35S (Tollervey 1987 ; Tollervey & Guthrie, 1985 ; Morissey & Tollervey, 1993). La snoRNP snR10 est une particule non essentielle dont la déplétion entraine toutefois un phénotype cryosensible, suggérant un défaut d'assemblage du processome, se caractérisant par un retard de maturation de l'ARNr 18S (Guthrie *et al*, 1969 ; Tollervey, 1987). La snoRNP snR10 joue un rôle double, puisqu'elle est également impliquée dans la pseudourylation de l'ARNr 25S au niveau du résidu U2923 (Garnot *et al*, 1997, Ni *et al*, 1997 ; (Dunbar & Baserga, 1998 ; King *et al*, 2003). Cinq séquences complémentaires au pré-ARNr 35S ont été trouvées au niveau du snoARN snR10, mais une seule située à l'extrémité 5', semble importante pour la croissance. La snoRNP snR10 possède ainsi deux fonctions distinctes, dépendante l'une de la région 3' et sa structure consensus de snoARN à boîtes H/ACA (rôle dans la pseudourylation), et l'autre de la région 5', impliquée dans la maturation du pré-ARNr 35S par les clivages A0, A1 et A2 (Liang *et al*, 2010).

D'autre part, la surexpression de la snoRNP snR10 peut corriger le défaut créé par une mutation dans la protéine Rrp5p du processome (Torchet et al, 1998 ; Torchet & Le Denmat, 2000). A 30°C et très fortement à 37°C, le mutant de Rrp5p entraine un ralentissement de la croissance cellulaire, accompagné d'une abolition du clivage au site A2 menant à la formation du pré-ARNr 21S et d'une diminution du taux de l'ARNr 18S et ainsi du taux de particules 40S (Torchet et al, 1998 ; Torchet & Le Denmat, 2000). De façon intéressante, la surexpression de la snoRNP snR10 permet la suppression de ce phénotype de défaut de croissance, bien que le clivage au site A2 soit toujours aboli et le niveau de sous-unité 40S diminué. Ainsi, il a été suggéré qu'une surexpression de snR10 améliore l'assemblage de la petite sous-unité 40S et donc des ribosomes (Torchet & Le Denmat, 2002), sans toutefois comprendre précisément comment snR10 intervient dans ce processus. Une hypothèse serait que snR10 améliorerait les événements de clivages A3, B1L et B1S, permettant de libérer plus rapidement les précurseurs de l'ARNr 18S bloqués par le défaut de clivage en A2. De plus, si la région de snR10 complémentaire à l'ARNr 25S est délétée, l'effet suppresseur n'est plus observé, suggérant que l'activité de pseudouridylation est nécessaire et contribue à l'assemblage des ribosomes (Torchet & Le Denmat, 2002), Ce qui est compatible avec certaines hypothèses sur le rôle de modifications post-transcriptionnelles du pré-ARNr dans la biogenèse des ribosomes (Kressler *et al*, 1999 ; Venema and Tollervey, 1999).

### I.2.B. *La snoRNP snR30*

Une autre snoRNP à boîtes H/ACA, la particule snR30 ou U17 chez les mammifères, est également requise pour les événements de clivages précoces A0, A1 et A2 (Morrissey & Tollervey, 1993 ; Enright *et al*, 1996 ; Atzorn *et al*, 2004 ; Fayet-Lebaron *et al*, 2009). Jusqu'à ce jour, aucune cible connue de modification ne lui a été associée (Atzorn *et al*, 2004 ; Fayet-Lebaron *et al*, 2009 ; Lemay *et al*, 2011). Le snoARN snR30 possède deux motifs conservés chez les eucaryotes, appelés m1 et m2, qui sont essentiels pour la production de l'ARNr 18S. La délétion du motif m1 est responsable de l'accumulation du pré-ARNr 35S, tandis que celle du motif m2 entraîne l'accumulation du pré-ARNr 23S (Atzorn *et al,* 2004). Ces deux motifs, localisés dans une des deux poches de pseudouridylation du snoARN, sont responsables de l'appariement de snR30 avec les séquences de l'ARNr 18S appelés

rm1 et rm2 (Fayet-Lebaron *et al,* 2009). Enfin, une autre région de l'ARN snR30 pourrait être le site potentiel de fixation de protéines (Fayet-Lebaron *et al,* 2009), autres que les protéines coeur Nop10p, Cbf5p, Gar1p ou Nhp2p. En effet, de façon interessante, l'hélicase Rok1p du processome intervient spécifiquement dans la dissociation de l'ARN snR30 du processome, mais pas dans celle d'autres snoARN. Ceci suggère que Rok1p reconnait spécifiquement snR30, ou appartient à la snoRNP elle-même (Bohnsack *et al*, 2008). L'hélicase Has1p s'associe également avec la particule snR30 mais est impliquée également dans la dissociation d'autres snoRNP (Liang & Fournier, 2006). Enfin, la snoRNP snR30 semble également interagir avec les histones H2B et H4, ainsi que les protéines ribosomiques Rps9p et Rps18p (Lemay *et al*, 2011). L'interaction de la particule snR30 avec les histones H2B et H4 pourrait médier son recrutement co-transcriptionnel au sein du futur processome (Lemay *et al*, 2011). Il a également été montré que l'ARN snR30 s'associe avec les protéines Kri1p et Utp23p du processome (Hoareau-Aveilla *et al,* 2011, Bohnsack *et al,* 2008) de manière mutuellement exclusive, ce qui suggère que ces protéines participent à des étapes distinctes de la fonction du snoARN. En effet, lors d'expériences préalables en gradient de sédimentation, il a été observé que la déplétion d'Utp23p, mais pas de Kri1p, entraine une accumulation de la particule snR30, mais pas d'autres snoRNP, dans des complexes de haut poids moléculaires correspondant au processome, indiquant qu'Utp23p doit être impliquée dans la dissociation de snR30 du processome (Hoareau-Aveilla *et al,* 2011). L'hélicase Rok1p est également impliquée dans la dissociation de snR30 des pré-ribosomes, mais Utp23p et Rok1p n'utiliseraient pas la même voie pour la dissociation de snR30, la protéine Utp23 n'étant pas requise pour le recrutement de Rok1 au sein du processome, et la protéine Rok1 étant toujours incorporée dans les pré-ribossomes par son association avec le pré-ARNr 35S en absence de Utp23 (Hoareau-Aveilla *et al,* 2011). La particule snR30 n'interagit plus avec le pré-ARNr 35S lorsque Utp23 est déplété, bien qu'elle soit encore recrutée dans les particules pré-ribosomiques (Hoareau-Aveilla *et al,* 2011). Ce recrutement serait possible grâce à l'interaction entre snR30 et certaines protéines ribosomiques, telles que celles citées précedemment. Il a été proposé qu'Utp23p induise un changement de conformation du pré-ribosome, essentiel à la dissociation de snR30 (Hoareau-Aveilla *et al,* 2011). D'autre part, en absence de snR30, les protéines Kri1p et Utp23p ne sont plus recrutées au sein du processome, suggérant que snR30 est impliquée dans leur

recrutement. Dans ce cas, les boutons terminaux observés normalement à l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S sont formés à un taux plus faible, traduisant le fait que la formation du processome est altérée (Hoareau-Aveilla *et al,* 2011). Enfin, les recrutements de la particule snR30 et du facteur Utp23p ne semblent pas dépendants du sous-complexe t-UTP/UTP-A, qui est l'un des premiers complexes à s'associer au niveau du pré-ARNr 35S afin d'initier la formation du processome (Hoareau-Aveilla *et al,* 2011). Ainsi, la snoRNP snR30 interviendrait très précocement dans l'assemblage du processome, notamment grâce à ses interactions avec les histones et le pré-ARNr 35S, indépendamment des facteurs Utp23 et Kri1 et du sous-complexe t-UTP/UTP-A. Elle jouerait ainsi un rôle de chaperonne dans les étapes d'assemblage et/ou de réarrangements structuraux permettant l'assemblage correct du processome et la réalisation des clivages précoces A0, A1 et A2 (Hoareau-Aveilla *et al,* 2011 ; Lemay *et al*, 2011).

### I.2.C. *La snoRNP snr35*

La snoRNP snR35 appartient également à la catégorie des snoRNP à boîtes H/ACA. Elle est impliquée dans la pseudouridylation de l'uridine 1191 au sein de l'ARNr 18S (Samarsky & Fournier, 1999). Par ailleurs, ce nucléotide est également méthylé et aminocarboxypropylé. La pseudouridylation dans le nucléole libère le N1 de la base azotée de l'uridine, qui est alors méthylée dans le noyau, puis le groupement aminocarboxypropyl est ajouté après export dans le cytoplasme, au niveau du N3 et ce avant le clivage au site D (Brand *et al*, 1978).

L'absence de la particule snR35 entraine un défaut dans l'hypermodification de l'uridine U1191 (Liang *et al,* 2009). La déplétion de snR35 conduit également à un fort retard de maturation du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme, où le clivage au site D est altéré, menant à une diminution de l'ARNr 18S et de la petite sous-unité 40S (Liang *et al,* 2009). Il a été montré que l'altération du clivage au site D est due à l'absence de modification ou d'hypermodification du résidu U1191, catalysée en partie par la particule snR35 (Liang *et al,* 2009). Cette observation est remarquable dans la mesure où il est rare qu'une simple modification soit impliquée à elle seule dans les étapes de maturation des pré-ARNr, puisque généralement, dans le cas du processome, c'est plutôt l'absence de la protéine responsable de la modification, en

tant que constituant structural, qui perturbe les étapes de clivages (Lafontaine *et al,* 1994, 1995 ; White *et al,* 2008).

### I.2.D. *La snoRNP U14*

La snoRNP U14 appartient à la famille des snoRNP à boîtes C/D et est essentielle à la viabilité cellulaire, comme la snoRNP U3 (Zagorski *et al*, 1988 ; Li *et al*, 1990). La particule U14 joue deux rôles distincts puisqu'elle est responsable de la méthylation de la cytosine 414 au sein de l'ARNr 18S et qu'elle intervient dans les étapes de maturation précoce A0, A1 et A2 permettant la production de l'ARNr 18S (Kiss-Laszlo *et al*, 1996 ; Dunbar & Baserga, 1998 ; King *et al*, 2003 ; Zagorski *et al*, 1988, Jarmolowski *et al*, 1990, Li *et al*, 1990, Huang *et al*, 1992, Li & Fournier, 1992). La particule U14 s'associe au niveau des séquences des ARNr 18S et 25S dans le pré-ARNr 35S, ce par le biais de deux motifs complémentaires et conservés, les boîtes A et B (Jarmolowski *et al*, 1991 ; Morrissey & Tollervey, 1993, 1997 ; Dez *et al*, 2004 ; Kudla *et al*, 2011). Le motif A s'apparie directement avec l'ARNr 18S et est crucial pour la fonction de la snoRNP U14 dans la maturation du pré-ARNr 35S. En effet, la mutation du motif A est létale mais peut être restauré par une mutation compensatoire dans l'ARNr 18S (Jarmolowski *et al*, 1990 ; Li & Fournier, 1992 ; Liang & Fournier 1995 ; Morissey & Tollervey, 1997). Le motif B n'est lui pas essentiel pour la viabilité cellulaire et guide probablement une réaction de méthylation (Li & Fournier, 1992 ; Bachellerie & Cavaillé, 1997 ; Dunbar & Baserga, 1998). Peu d'autres informations sont disponibles sur le rôle précis de la particule U14 dans les événements de clivage ou son incorporation dans le processome (Liang & Fournier, 1995 ; Phipps *et al,* 2011). Cependant, il a été montré que l'hélicase Dbp4p du processome est liée fonctionnellement à la snoRNP U14. En effet, de façon intéressante, une surexpression de Dbp4p permet de corriger le défaut de maturation de l'ARNr 18S induit par des mutations de U14 (Liang *et al*, 1997). De plus, en l'absence de Dbp4p dans des analyses en gradients de sédimentation, la snoRNP U14 est retenue dans les fractions de haut poids moléculaire. L'hélicase Dbp4 serait donc impliquée dans la dissociation de la particule U14 du pré-ARNr 35S (Kos & Tollervey, 2005).

### I.3. Cas particulier du pré-ARNr 23S

La maturation canonique du pré-ARNr 35S, décrite précédemment, débute par les évènements de clivages précoces aux sites A0, A1 et A2, puis dans la majorité des cas par le clivage au site A3, catalysé par la RNAse MRP (Henry *et al*, 1994 ; Mullineux & Lafontaine, 2012 ; Shuai & Warner, 1991 ; Lindhal *et al*, 1992 ; Schmitt & Clayton, 1993 ; Chu *et al*, 1994 ; Lygerou *et al*, 1996). Cependant, une voie alternatiive existe où le premier clivage correspond au clivage au site A3 dans la séquence ITS1. Deux pré-ARNr sont alors formés, les ARN 23S et le 27SA3 (Lygerou *et al*, 1996).

Les mutations qui affectent les clivages précoces A0, A1 et A2 conduisent généralement à la production du pré-ARNr 23S et le pré-ARNr 27SA3, qui est un intermédiaire retrouvé canoniquement, et qui est ensuite maturé en ARNr mature 25S et 5,8S, comme décrit auparavant. Le pré-ARNr 23S a initialement été considéré comme étant un intermédiaire aberrant non pris en charge par la machinerie de maturation et donc ne permettant pas de produire l'ARNr mature 18S (Allmang *et al*, 1999 ; Zanchin & Goldfarb, 1999), notament en raison de sa dégradation rapide par l'exosome (Allmang *et al*, 2000) (pour revue, Venema & Tollervey, 1999). Mais cet intermédiaire est souvent détecté dans des souches sauvages de levure et des expériences de « pulse-chase » ont permis de montrer que le pré-ARNr 23S peut-être efficacement maturé en ARNr 18S. De plus, les facteurs d'assemblage du processome, requis pour la biogenèse de la petite sous-unité, sont capables de s'associer au pré-ARNr 23S (Billy *et al*, 2000 ; Wehner & Baserga, 2002 ; Granneman & Baserga, 2005). Ces données suggèrent que l'intermédiaire 23S n'est pas une forme aberrante rencontrée lors de défauts de maturation, mais plutôt une espèce issue d'une voie alternative de maturation, faisant également intervenir le processome .

## II. Clivages tardifs menant à la formation de la grande sous-unité ribosomique 60S

Le clivage au site A2 permet de libérer les pré-ARNr 20S et 27SA2 et ainsi de séparer la maturation des ARNr en deux voies distinctes, l'une menant à la formation de l'ARNr 18S, l'autre menant à la formation des ARNr 25S et 5,8S, que nous allons

maintenant aborder. La maturation du pré-ARNr 27SA2 peut suivre 2 voies alternatives, une voie majeure (85-90% des cas) et une voie mineure (10-15% des cas) (**Fig. 16**). La première commence par le clivage endonucléolytique au site A3 par la RNAse MRP au niveau de l'ITS1, 70 nts en aval du site A2, et initie la maturation de la future grande sous-unité ribosomique (**Fig. 16**) (Henry *et al*, 1994 ; Mullineux & Lafontaine, 2012 ; Shuai & Warner, 1991 ; Lindhal *et al*, 1992 ; Schmitt & Clayton, 1993 ; Chu *et al*, 1994 ; Lygerou *et al*, 1996). Le fragment A2-A3 est ensuite hydrolysé par les exonucléases Xrn1p et Rat1p. Le pré-ARNr 27SA3 généré est hydrolysé par Xrn1p, Rat1p et Rrp17p (Henry *et al*, 1994), jusqu'au site B1S, correspondant à l'extrémité 5' de l'ARNr 5,8Ss, libérant ainsi le pré-ARNr 27SBs (**Fig. 16**) (Henry *et al*, 1994 ; Oeffinger *et al*, 2009 ; Geerlings *et al*, 2000). Le clivage par la RNAse MRP est endonucléolytique puisque l'on peut détecter les fragments A2-A3 dans des souches mutées pour les exonucléases Xrn1p et Rat1p (Dichtl *et al*, 1997 ; Petfalsky *et al*, 1998). De plus, des mutations dans les protéines Rat1p et Xrn1p entrainent une forte accumulation de l'ARNr 5,8S possédant encore une extension à l'extrémité 5' (Henry *et al*, 1994). La RNAse MRP est essentielle pour la viabilité cellulaire bien que le clivage au site A3 ne soit pas forcément requis pour la maturation deu pré-ARNr 27SA2, une voie de maturation alternative existant (Henry *et al*, 1994). Cette deuxième voie mineure commence par le clivage dans la séquence ITS1 par une endonucléase inconnue au site B1L, correspondant à l'extrémité 5' de l'ARNr 5,8Sl et libérant le pré-ARNr 27SBl (**Fig. 16**). Les deux extrémités 5' potentielles de l'ARN 27SB (27SBs et 27SBl) correspondent respectivement à celles des deux espèces d'ARNr 5,8S (5,8Ss et 5,8Sl,) présentes chez la levure et d'autres eucaryotes (Rubin, 1974 ; Henry *et al*, 1994). Ces deux ARN conservés peuvent être incorporés dans le ribosome mais leurs différences fonctionnelles restent obscures.

De manière concomitante aux clivages aux sites B1S ou B1L, un clivage a lieu au site B2 au sein de la séquence 3'-ETS à proximité de l'extrémité 3' de l'ARNr 25S mature (**Fig. 16**) (Kufel *et al*, 1999 ; Veldman *et al*, 1981). Les étapes de maturation au site B2, ainsi qu'au site B1L, ne sont pas encore bien décrites et aucun élément en *cis* ou en *trans* permettant de réaliser ces étapes n'a été identifié. Récemment, il a été montré que l'exonucléase Rex1p participait à la maturation du pré-ARNr 27SB par une hydrolyse exonucléolytique de 3' vers 5' permettant de former l'extrémité 3' de l'ARNr 25S mature (Van Hoof *et al*, 2000). Ce qui explique le fait que la formation

de l'extrémité 3' de l'ARNr 25S est inhibée par des mutations dans la protéine Rex1p (Van Hoof *et al*, 2000). Les pré-ARNr 27SBs et 27SBl obtenus par les deux voies suivent ensuite des étapes de maturation identiques. Un clivage au site C2 a lieu au niveau de la séquence ITS2, l'endoribonucléase responsable est inconnue. Ce clivage permet de libérer le précurseur du futur ARNr 25S ainsi que les pré-ARNr 7Ss ou 7Sl (selon la voie empruntée auparavant), qui sont respectivement les précurseurs des ARNr 5,8Ss et 5,8Sl (**Fig. 16**). Chez le rat, il a été observé que la protéine nucléolaire B23 permet de réaliser un clivage au centre de la séquence ITS2 *in vitro* (Savkur & Olson, 1998). Cependant, il n'est pas certain que cela corresponde au site C2 clivé *in vivo* (Savkur & Olson, 1998). Aucun homologue de B23 n'a été identifié chez la levure. Par contre le site C2 est bien le lieu d'un clivage endonucléolytique puisque des souches mutées pour certains composants de l'exosome accumulent le pré-ARNr 7S (Mitchell *et al*, 1996, 1997). Après le clivage au site C2, les exonucléases Xrn1p et Rat1p hydrolysent le pré-ARNr jusqu'au site C1, correspondant à l'extrémité 5' de l'ARNr 25S mature, conduisant à la formation de l'ARNr 25S (**Fig. 16**) (Geerlings *et al*,, 2000). Le fragment C2-C1 n'est toutefois pas détecté dans des souches déficientes pour Xrn1p et Rat1p (Petfalsky *et al*, 1998 ; Dichtl & Tollervey, 1997). Le clivage à ces deux sites semble couplée puisque des mutations en *cis* d'un des deux sites bloque le clivage au deuxième site (Van Nues *et al*, 1995). De plus, les séquences environnant les sites C1 et C2 sont importantes puisque toute substitution de nucléotide abolit la formation de l'ARNr 25S (Van Nues *et al*, 1995 ; Peculis & Greer, 1998). Il semble que l'hydrolyse par Xrn1p et Rat1p jusqu'à l'extrémité 5' du futur ARNr 25S puisse se dérouler en 2 étapes successives : une première hydrolyse jusqu'au niveau d'un site C', menant au pré-ARNr 25S', puis une autre digestion jusqu'au site C1 comme décrit précédemment (Fatica & Tollervey, 2002 ; Granneman & Baserga *et al*, 2004).

La maturation en 3' de l'ARNr 5,8Ss ou 5,8Sl se déroule séquentiellement dans le noyau, puis dans le cytoplasme et requiert au moins 4 étapes et différentes exonucléases (**Fig. 16**) (Henry *et al*, 1994 ; Mitchell *et al*, 1996 ; Thomson & Tollervey, 2005, 2010). La première étape fait intervenir l'exosome qui hydrolyse 110 nts à partir du site C2 pour obtenir un pré-ARNr possédant 30 nts supplémentaires à l'extremité 3' (Mitchell *et al*, 1996, 1997 ; Allmang *et al*, 1999 ; Liu *et al*, 2006). Puis Rrp6p, un composant nucléaire spécifique de l'exosome, assisté des hélicases Dob1p et Mtr4p permet de former le pré-ARNr 6S contenant 8 nts supplémentaires

par rapport à l'ARNr 5,8S mature (Briggs *et al*, 1998 ; De La Cruz *et al*, 1998 ; Allmang *et al*, 1999). En suivant l'export dans le cytoplasme, les exoribonucléases Rex1p et Rex2p continuent de raccourcir le pré-ARNr 6S jusqu'à une forme contenant 5 nts excédentaires à l'extrémité 3' (Van Hoof *et al*, 2006).

Les pré-ARNr 25S et 6S sont alors exportés dans le cytoplasme sous la forme de pré-ribosomes 60S à travers la membrane nucléaire, où la suite de la maturation a lieu (Udem & Warner, 1973 ; Trapman *et al*, 1975).

La dernière étape de maturation du pré-ARNr 6S, précurseur de l'ARNr, se déroule dans le cytoplasme, où la nucléase cytoplasmique Ngl2p (Faber *et al*, 2002) hydrolyse les nucléotides restants à l'extrémité 3' de la séquence ITS2, ceci pour produire les ARNr matures 5,8Ss ou 5,8Sl **(Fig. 16)** (Faber *et al*, 2002 ; Thomson & Tollervey, 2010).

## III. Transcription, production et rôle de l'ARNr 5S

Chez *S. cerevisiae*, le gène correspondant à l'ARNr 5S est situé entre les séquences NTS1 et NTS2 au niveau des régions d'ADNr répétées du chromosome XII **(Fig. 4)**. L'ARNr 5S est transcrit par l'ARN polymérase III sous la forme d'un précurseur possédant 10 nts supplémentaires à son extrémité 3'. La maturation de cette extension est réalisée par l'exonucléase 3'-5' Rex1 (Piper *et al*, 1983). Cependant, cette maturation ne semble pas être essentielle et son absence n'a pas d'impact sur la fonction du ribosome. Au sein du ribosome mature, l'ARNr 5S est localisé au sommet de la grade sous-unité ribosomiques 60S à la jonction entre la petite et la grande sous-unités ribosomiques et il établit des interactions avec les autres ARNr et les protéines ribosomiques (Spahn *et al*, 2001). L'ARNr 5S facilite ainsi la communication entre les deux sous-unités ribosomiques et coordonne leurs actions lors de la traduction (Smith *et al*, 2001). En plus d'être important pour la fonction des ribosomes, l'ARNr 5S est également essentiel pour la biogenèse des ribosomes, et plus précisément pour la maturation de la grande sous-unité ribosomiques 60S (Dechampesme *et al*, 1999, Kiparisov *et al*, 2005). En effet, des mutants de l'ARNr 5S affectent la maturation de l'intermédiaire 27SB et la localisation intranucléaire des particules pré-60S, ce qui conduit à une diminution des ARNr 5,8S et 25S et donc à une réduction du taux de la grande sous-unité ribosomique 60S (Dechampesne *et al*, 1999).

L'ARNr 5S interagit avec la protéine ribosomique Rpl5p sous la forme d'un petit complexe isolé, indépendant des pré-ribosomes (Steitz *et al*, 1988 ; Deshmukh *et al*, 1993). Il a également été montré par double hybride et GST-pulldown que la protéine ribosomique Rpl5p interagit directement avec la protéine ribosomique Rpl11p et deux autres protéines, Rpf2p et Rrs1p (Miyoshi *et al*, 2002 ; Morita *et al*, 2002 ; Zhang *et al*, 2007), formant ainsi un complexe de 4 protéines associé à l'ARNr 5S. Ce complexe se retrouve au sein des particules pré-60S (Zhang *et al*, 2007). Il n'a toutefois pas été déterminé si ce complexe 5S s'assemble au sein des particules pré-60S sous la forme d'un complexe pré-formé. L'étape à laquelle le complexe ARNr 5S/Rpl5 s'associe au sein des particules pré-ribosomiques lors de la maturation des pré-ARNr n'a pas été clairement identifiée. Cependant, il semblerait qu'il s'associe au niveau de particules dans lesquelles les étapes de maturation conduisant au pré-ARNr 27SB n'ont pas encore eu lieu (Dechampesne *et al*, 1999 ; Zhang *et al*, 2007).

# Chapitre 3 : Le processome, lieu des clivages A0, A1 et A2

Le pré-ARNr 35S interagit avec un ensemble de protéines et de snoRNP dès le début de sa transcription afin de permettre sa maturation en ARNr matures. Un complexe important de part sa taille (90S) se forme alors au niveau de l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S et est requis pour la production de la petite sous-unité ribosomique 40S. Ce macrocomplexe est appelé le SSU processome pour Small SubUnit processome car il joue un rôle essentiel dans les étapes précoces de clivages A0, A1 et A2 permettant de libérer l'ARNr 18S de la petite sous-unité ribosomique 40S. Le processome peut être visualisé dans le nucléole par microscopie électronique sous forme de boutons terminaux localisés à l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S naissant. (**Fig. 5**) (Osheim *et al*, 2004). On parle de structure en arbre de Noël, où l'ADNr représente le tronc de l'arbre, les transcrits naissants les branches et les boutons terminaux les boules.

Depuis les dernières années, de grandes avancées ont été effectuées en termes de connaissance de la composition des différents composants du processome, bien que la liste ne soit probablement pas exhaustive. Cependant, de nombreux défis doivent encore être relevés. En effet, la fonction de ces facteurs dans le mécanisme de maturation, ainsi que l'identification des substrats des différentes activités enzymatiques ne sont pas totalement connues. Par ailleurs, la détermination précise des mécanismes d'assemblage, de l'arrangement structural du processome et de l'interactome complet restent encore vague, bien que leur élucidation ait progressé (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011 ; Lim *et al*, 2011).

## I. Composition du processome

Le processome mature est principalement composé du pré-ARNr 35S associé à plus de 70 facteurs impliqués dans la maturation et l'assemblage **(Fig. 18)**, un grand nombre de protéines ribosomiques de la petite sous-unité 40S, quelques protéines ribosomiques de la grande sous-unité 60S, ainsi que des snoRNP telles que la

| Listing des composants du processome | | | |
|---|---|---|---|
| Pol5 | Nop1 | Dbp4 | Pfa1 |
| Utp4 | Nop56 | Dbp8 | Prp43 |
| Utp5 | Nop58 | Dhr1 | Rok1 |
| Utp8 | Rrp9 | Dhr2 | Rrp3 |
| Utp9 | Snu13 | Emg1 | Rrp5 |
| Utp10 | Imp3 | Enpf1 | Sen1 |
| Utp15 | Imp4 | Esf1 | Sgd1 |
| Utp17 | Mpp10 | Esf2 | Slx9 |
| Pwp2 | Bms1 | Fal1 | Sof1 |
| Utp6 | Rcl1 | Fyv7 | Utp2 |
| Utp12 | | Gno1 | Utp3 |
| Utp13 | | Has1 | Utp7 |
| Utp18 | | Kre33 | Utp11 |
| Utp21 | | Krr1 | Utp14 |
| Cka1 | | Lcp5 | Utp16 |
| Cka2 | | Ltv1 | Utp20 |
| Ckb1 | | Mdr1 | Utp23 |
| Ckb2 | | Noc4 | Utp24 |
| Rrp7 | | Nop9 | Utp25 |
| Rrp36 | | Nop19 | Utp30 |
| Utp22 | | Nsr1 | |
| t-UTP/UTP-A | | Hélicase | |
| UTP-B | | | |
| UTP-C | | Endonucléase | |
| snoRNP U3 | | | |
| Complexe Mpp10 | | GTPAase | |
| Complexe Bms1/Rcl1 | | | |

**Figure 18 : Tableau récapitulatif et interactome des composants du processome (Lim *et al*, 2011)**

Le processome contient environ 72 protéines, qui peuvent s'organiser en sous forme de complexe. Le processome est défini par un ensemble de 6 sous-complexes constituant son cœur structural : le sous-complexe t-UTP/UTPA (représenté en vert), le sous-complexe UTP-B (représenté en bleu), le sous-complexe UTP-C (représenté en jaune), la snoRNP U3 (représenté en gris), le complexe Mpp10 (représenté en rouge) et le complexe Bms1/Rcl1 (représenté en marron). Ces sous-complexes sont également associés à d'autres facteurs qui ne sont pas assignés à un complexe connu (représentés en rose). L'interactome connu est présenté sous le tableau, les lignes représentant les interactions. Certains composants du processome possèdent des rôles connus ou putatifs. Les ARN-hélicases sont entourées en bleu dans le tableau et représentées par des losanges dans l'interactome, les endonucléases sont entourées en rouge dans le tableau et la GTPase Bms1 est entourée en jaune dans le tableau.

snoRNP U3 (Dragon *et al*, 2002, Grandi *et al*, 2002 ; (Bernstein *et al*, 2004 Kressler 2010 ; pour revue, Phipps *et al*, 2011).

La proportion élevée de protéines ribosomiques de la petite sous-unité 40S par rapport aux protéines ribosomiques de la grande sous-unité 60S au sein du processome est en accord avec le fait que le processome est un macrocomplexe dédié aux événements de clivages précoces A0, A1 et A2 dans le nucléole, menant par la suite à la synthèse de l'ARNr 18S de la petite sous-unité. Cela confirme également que la maturation de la petite et celle de la grande sous-unité peuvent être physiquement séparées et sont quasi-indépendantes (Liang *et al*, 1997). La grande majorité des composants du processome sont essentiels à la croissance cellulaire et conservés phylogénétiquement chez tous les eucaryotes (Marz *et al*, 2009 ; Charrette & Gray, 2009). L'absence de chacun d'entre eux entraine l'abolition des clivages précoces A0, A1 et A2. L'appartenance au processome d'un facteur peut ainsi se caractériser par une localisation nucléolaire, une association avec le pré-ARNr 35S de levure, le snoRNA U3 et le complexe Mpp10, mais également le fait d'être requis pour la maturation de l'ARNr 18S. On peut noter que plusieurs protéines ribosomiques de la petite sous-unité 40S répondent à ces critères, traduisant leur rôle potentiels dans la maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S (Bernstein *et al*, 2004 ; Ferreira-Cerca *et al*, 2005).

Le processome 90S peut ainsi être considéré comme un des premiers intermédiaires de maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S. La plupart de ses composants sont en fait présents dans différentes particules pré-ribosomiques, formées successivement lors de la maturation de la petite sous-unité ribosomique 40S.

Le processome est un complexe multi-modulaire, son assemblage étant réalisé à partir de sous-complexes pré-formés (Gallagher *et al*, 2004 ; Krogan *et al*, 2004 ; Perez-Fernandez *et al*, 2007). Un nombre de 6 sous-complexes ont ainsi été bien définis : les sous-complexes t-UTP ou UTP-A (Gallagher *et al*, 2004, Krogan *et al*, 2004), UTP-B (Grandi *et al*, 2002, Dosil & Bustelo *et al*, 2004, Krogan *et al*, 2004), UTP-C (Krogan 2004), la snoRNP U3 (Dragon *et al*, 2002, Grandi *et al*, 2002), le complexe Mpp10 (Wehner *et al*, 2002) et enfin le complexe Bms1/Rcl1 (Billy *et al*, 2000, Wegiersky *et al*, 2001, Karbstein & Doudna *et al*, 2006) **(Fig. 18)**. Ces sous-

ensembles sont absolument essentiels à la maturation du pré-ARNr 35S. Les protéines de ces 6 sous-complexes ne représentent néanmoins que 31 des 72 facteurs identifiés comme appartenant au processome. Les autres facteurs, non identifiés au sein des sous-complexes, pourraient former des sous-complexes supplémentaires ou intervenir de manière isolée (Perez-Fernandez *et al*, 2011).

## II. Assemblage séquentiel du processome

Les sous-complexes énoncés précédemment s'assemblent au niveau de l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S dans le nucléole de manière séquentielle, l'association de chaque composant permettant le recrutement du suivant (**Fig. 19**) (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011). Leur recrutement permet l'association de l'ensemble des autres facteurs du processome. Les voies d'assemblage commencent à être caractérisées plus précisément mais ne sont pas encore intégralement élucidées (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011). Au cours de l'assemblage, au fur et à mesure de l'association des sous-complexes et des autres facteurs, des changements conformationnels ont lieu, permettant le recrutement des composants suivants et de former le processome compétent pour les étapes de clivages précoces A0, A1 et A2 (Perez-Fernandez *et al*, 2011).

### II.1. Association du sous-complexe t-UTP/UTP-A

Le sous-complexe t-UTP/UTP-A, composé des facteurs Utp4p, Utp5p, Utp8p, Utp9p, Utp10p, Utp15p, Utp17p et Pol5p **(Fig. 18)** est le premier à s'associer au niveau de l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S **(Fig. 19)** (Gallagher *et al*, 2004, Perez-Fernandez *et al*, 2007, Wery *et al*, 2009). Il ne nécessite pas la présence des autres sous-complexes pour s'y associer puisque la déplétion d'un des composants d'UTP-B (Pwp2p), d'UTP-C (Rrp7p) ou de la snoRNP U3 (Nop58p) n'empêche ni la fixation de t-UTP/UTP-A au niveau du pré-ARNr 35S, ni sa localisation dans des complexes de haut poids moléculaire correspondant au processome naissant lors d'expériences de centrifugation en gradient de saccharose (Gallagher *et al*, 2004 ; Krogan *et al*, 2004 ; Perez-Fernandez et al, 2007, 2011). Par contre, la déplétion d'un des composants de t-UTP/UTP-A (Utp4p ou Utp17p) entraine un défaut d'élongation de la transcription par l'ARN polymérase I, entraînant une diminution du taux du pré-

**Figure 19 : Modèle d'assemblage séquentiel du SSU-processome (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011).**

Le processome est formé de plusieurs sous-complexes indépendants qui s'associent au niveau du pré-ARNr 35S de manière hiérarchique. L'association du sous-complexe t-UTP/UTP-A initie la formation du processome et est requise pour le recrutement des autres composants du processome. Plusieurs voies possibles d'assemblage du processome semblent pouvoir se mettre en place. Une de ces voies implique l'assemblage de la snoRNP U3 et du sous-complexe UTP-B de manière coopérative, permettant ainsi le recrutement de nombreux facteurs tels que la GTPase Bms1 du sous-complexe Bms1/Rcl1. Le facteur Bms1 est ensuite requis pour le recrutement des facteurs Utp20, Kre33 et Rrp36. Le complexe Mpp10, ainsi que le facteur Enp2 sont alors recrutés par Utp20. Une autre voie possible implique dans un premier temps l'association du facteur Rrp5, qui est requis dans un deuxième temps pour le recrutement du sous-complexe UTP-C et de l'ARN-hélicase Rok1. Une dernière voie possible impliquerait l'assemblage précoce des facteurs Mrd1 et Sof1 suite à la fixation du sous-complexe t-UTP/UTP-A.

ARNr 35S et donc une inhibition de la synthèse des sous-unités ribosomiques 40S et 60S (Gallagher *et al*, 2004). Or, nous avons vu que l'élongation de la transcription, ainsi que la maturation du pré-ARNr 35S et la formation du processome sont des processus co-transcriptionnels coordonnés (Gallegher *et al*, 2004 ; Shneider *et al*, 2007). Le sous complexe t-UTP/UTP-A est ainsi requis pour la transcription optimale du pré-ARNr 35S, par son association avec l'ADNr. Cette association avec l'ADNr est en revanche indépendante de la transcription dans le sens où même si la transcription du pré-ARNr 35S est inhibée, l'association de t-UTP/UTP-A avec l'ADNr est conservée (Mougey *et al*, 1993 ; Gallagher *et al*, 2004, Krogan *et al*, 2004). Ainsi, dès le début de la transcription du pré-ARNr 35S, le sous-complexe t-UTP/UTP-A s'associe au transcrit naissant et initie l'assemblage du processome (**Fig. 19**) (Gallagher *et al*, 2004 ; Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011).

### II.2. Association des sous-complexes UTP-B et Bms1/Rcl1, de la snoRNP U3 et du complexe Mpp10

Le sous-complexe UTP-B est composé des protéines Pwp2p, Utp6p, Utp12p, Utp13p, Utp18p et Utp21p **(Fig. 18).** La déplétion d'un composant du sous-complexe t-UTP/UTP-A (Utp17p ou Utp4p) entraine l'absence d'association du sous-complexe UTP-B et de la snoRNP U3 avec le pré-ARNr 35S, comme le montre des expériences de centrifugation en gradient de saccharose. L'association du sous-complexe t-UTP/UTP-A permet donc dans un premier temps le recrutement du sous-complexe UTP-B et de la snoRNP U3 au sein du processome naissant au niveau de l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S **(Fig. 19)** (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011). De manière similaire, la déplétion d'un des composants du sous-complexe UTP-B (Pwp2p) abolit le recrutement de la snoRNP U3 au niveau du pré-ARNr 35S. Par ailleurs, la déplétion d'un composant de la snoRNP U3 (Nop58p) abolit le recrutement du sous-complexe UTP-B au niveau du pré-ARNr 35S. Le sous-complexe UTP-B et la snoRNP U3 semblent ainsi être recrutés simultanément au sein du processome naissant **(Fig. 19)** (Dunbar *et al*, 1997 ; Granneman *et al*, 2003 ; Lee & Baserga, 1999 ; Wehner *et al*, 2002 ; Dosil & Bustelo *et al*, 2004) (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011). De plus, lors de centrifugation en gradient de saccharose, la déplétion de Pwp2p (UTP-B) entraine l'absence de la protéine Bms1p, appartenant au sous-complexe Bms1p/Rcl1p, dans les fractions de haut

poids moléculaires correspondant au processome. Le complexe Bms1/Rcl1 n'interagit alors plus ni avec le snoARN U3, ni avec le pré-ARNr 35S, traduisant l'importance d'UTP-B et de la snoRNP U3 pour le recrutement du sous-complexe Bms1p/Rcl1p au sein du processome naissant **(Fig. 19)** (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011). Ce sous-complexe est ensuite nécessaire au recrutement de plusieurs facteurs, tels qu'Utp20p, Kre33p, Enp2p, Rrp36p et le complexe Mpp10p, lui-même composé des protéines Mpp10p, Imp3p et Imp4p **(Fig. 18)** (Perez-Fernandez *et al*, 2011). Plus précisément, il a été montré que le facteur Utp20p est impliqué dans le recrutement du facteur Enp2p et du complexe Mpp10p (Perez-Fernandez *et al*, 2011). Par contre, l'implication du complexe Bms1p/Rcl1p dans le recrutement de la protéine Rrp36p n'a pas été clairement démontrée. Néanmoins, UTP-B et la snoRNP U3 sont nécéssaires au recrutement de Rrp36 au sein du processome naissant, l'inverse étant faux (Gérus *et al*, 2010). L'association de la snoRNP U3 au sein du processome s'accompagne de l'établissement des appariements entre le domaine 5' du snoARN U3 et l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S (Wormsley *et al*, 2001, Dutca *et al*, 2011, Marmier-Gourrier *et al*, 2011). En absence de ces appariements, ou de Pwp2 (UTP-B), le complexe Mpp10 n'interagit plus avec le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S, et n'est plus retrouvé dans les fractions de haut poids moléculaire correspondant au processome (Dosil & Bustelo *et al*, 2004). De plus, la déplétion de la protéine Imp3, composant du complexe Mpp10, abolit les interactions des deux autres protéines de ce complexe, Mpp10 et Imp4, avec le snoRNA U3, suggérant que le facteur Imp3 est requis pour le recrutement du sous-complexe Mpp10 au sein du processome (Wehner *et al*, 2002). D'autre part, il semblerait que le recrutement du complexe Mpp10 soit un événement tardif dans l'assemblage du processome et que celui-ci ne soit pas requis pour le recrutement préalable de la snoRNP U3, ni d'ailleurs pour d'autres composants du cœur du processome (**Fig. 19**) (Perez-Fernandez *et al*, 2011).

### II.3. Association du sous-complexe UTP-C et de la protéine Rrp5

Le sous-complexe UTP-C est composé des protéines Cka1p, Cka2p, Ckb1p, Ckb2p, Rrp7p et Utp22p **(Fig. 18)**. Les protéines Cka1p, Cka2p, Ckb1p et Ckb2p forment le complexe caséine kinase II, qui n'est pas spécifique du sous-complexe UTP-C, mais

est retrouvé également dans d'autres complexes que le processome (Krogan *et al*, 2004). Ce complexe est notamment impliqué dans la phosphorylation des protéines ribosomiques de la petite sous-unité 40S (Wojda *et al*, 2002). Il pourrait également être impliqué dans la phosphorylation de certaines protéines du processome, afin de réguler leur fonction temporellement et spatialement. Lorsqu'un composant du sous-complexe t-UTP/UTP-A (Utp17p) est déplété, le sous-complexe UTP-C ne sédimente plus dans les fractions de haut poids moléculaires correspondant au processome et n'interagit plus avec le pré-ARNr 35S. Ainsi, comme auparavant, l'association du sous-complexe t-UTP/UTP-A est requise pour celle du sous-complexe UTP-C **(Fig. 19)** (Perez-Fernandez *et al*, 2007). Cependant, la déplétion de Pwp2p du sous-complexe UTP-B n'empêche pas UTP-C de s'associer avec le pré-ARNr 35S et UTP-C est toujours localisé dans les fractions de haut poids moléculaire correspondant au processome. Par contre, dans ces conditions, le snoRNA U3 n'est pas retrouvé au sein des complexes de haut poids moléculaire, suggérant que UTP-C n'est pas associé avec la snoRNP U3 (Perez-Fernandez *et al*, 2007, Krogan *et al*, 2004, Gerus *et al*, 2011). Ainsi le recrutement du sous-complexe UTP-C au sein du processome naissant requiert l'association préalable du sous-complexe t-UTP/UTP-A mais ne dépend pas de l'association du sous-complexe UTP-B et de la snoRNP U3 **(Fig. 19)**. Lorsque Pwp2p (UTP-B) ou Rrp7p (UTP-C) sont absentes, la protéine Rrp5p, appartenant au processome, est retrouvée associée au pré-ARNr 35S et sedimente dans des fractions de haut poids moléculaire correspondant au processome, suggérant que Rrp5p est tout de même recrutée au niveau du pré-ARNr 35S (Perez-Fernandez *et al*, 2007). Par contre, le facteur Rrp5p ne s'associe plus avec le pré-ARNr 35S et n'est plus retrouvée au sein de complexes de haut poids moléculaire si un composant (Utp17p) du sous-complexe t-UTP/UTP-A est absent. De plus, lors de centrifugation en gradients de saccharose, la déplétion de Rrp5p entraine une absence de localisation de la protéine Rrp7p du sous-complexe UTP-C dans les fractions de haut poids moléculaire, sans toutefois perturber l'assemblage des sous-complexes UTP-A, UTP-B et de la snoRNP U3 au niveau du pré-ARNr 35S. Finalement, le sous-complexe UTP-C est recruté au sein du processome au niveau du pré-ARNr 35S suite à l'association, dans un premier temps, du sous-complexe t-UTP/UTP-A, qui recrute à son tour, dans un deuxième temps, le facteur Rrp5p et ce indépendamment de l'association du sous-complexe UTP-B et de la snoRNP U3 **(Fig. 19)** (Perez-Fernandez 2007, 2011) (Vos *et al*,

2004 ; Perez-Fernandez *et al*, 2007). Il est intéressant de noter que la protéine Rrp5p est en outre requise pour le recrutement de Rok1p, une ARN-hélicase du processome ((Venema *et al*, 1997 ; Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011, Vos *et al*, 2007, Bohnsack *et al*, 2008). De plus, le facteur Rrp36p semble interagir fortement avec certains composants du sous-complexe UTP-C (Gérus *et al*, 2010).

### II.4. Existence de deux voies d'assemblage indépendantes du processome

L'assemblage du processome semble ordonné selon un processus en plusieurs étapes dépendantes ou non les unes des autres **(Fig. 19)**. Ainsi l'initiation de la formation du processome débute par l'association du sous-complexe t-UTP/UTP-A au niveau de l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S. Il semble ensuite que deux voies d'assemblage indépendantes soient possibles. D'un côté, le recrutement du sous-complexe UTP-B et de la snoRNP U3 de manière coopérative et concomitante, suivi du recrutement du sous-complexe Bms1p/Rcl1p, puis des facteurs Utp20p, Kre33p et Rrp36p. Le facteur Utp20p est ensuite impliqué dans le recrutement du complexe Mpp10p et du facteur Enp2p. Au niveau de la deuxième voie d'assemblage, le facteur Rrp5p est recruté au sein du processome par le sous-complexe t-UTP/UTP-A et permet par la suite le recrutement du sous-complexe UTP-C et du facteur Rok1p (**Fig. 19**) (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011). L'ensemble de ces complexes forme un cœur structural qui permet le recrutement d'une multitude d'autres facteurs, impliqués dans les clivages précoces A0, A1 et A2 nécessaires à la maturation de l'ARNr 18S de la petite sous-unité ribosomique 40S. Une troisième voie serait même envisagée avec le recrutement des facteurs Sof1p et Mrd1p au niveau du pré-ARNr 35S, induit par l'association préalable de t-UTP/UTP-A **(Fig. 19)** (Bax *et al*, 2006, Segerstolpe *et al*, 2008).

La question qui se pose maintenant est d'identifier s'il existe des relations entre ces différentes voies. Le recrutement de la protéine Rrp36p au sein du processome a été proposé comme étant dépendant de la voie UTP-B/snoRNP U3 plutôt que de la voie Rrp5p/UTP-C **(Fig. 19)** (Perez-Fernandez *et al*, 2011). Or, la protéine Rrp36p semble s'associer fortement avec le sous-complexe UTP-C (Gérus *et al*, 2010). De plus, les protéines Rrp36p et Sof1p semblent être associées au sein d'un même complexe (Lim *et al*, 2011). La protéine Sof1p semble s'associer au sein du processome par le

biais d'une voie indépendante des deux décrites précédemment, à savoir les voies UTP-B/snoRNP U3 et Rrp5p/UTP-C **(Fig. 19)** (Bax *et al*, 2006, Segerstolpe *et al*, 2008). Ces données suggèrent donc des interconnexions possibles entre les différentes voies initialement considérées comme indépendantes. Cependant, on ne peut pas exclure que certaines de ces interactions ne se produisent qu'une fois le processome mature formé et que certaines ne sont pas requises pour son assemblage.

## III. Rôle des composants du processome

Bien que le rôle de tous les facteurs du processome ne soit pas déterminé, la fonction de nombreux facteurs est déjà connue. Ces différentes fonctions sont essentielles pour la formation du processome et pour les événements de clivages précoces A0, A1 et A2 permettant la maturation du pré-ARNr 35S pour former l'ARNr 18S. Plusieurs réarrangements conformationnels ayant lieu au sein du processome sont requis pour d'une part permettre à l'ARN d'adopter des structures compatibles avec l'association de certains facteurs et/ou la réalisation des clivages, et d'autre part permettre la réorganisation des facteurs au sein du processome pour promouvoir leurs interactions. De plus, une fois les clivages effectués, certains facteurs doivent être dissociés, ce qui nécessite de nouveaux réarrangements structuraux. La plupart de ces événements requiert de l'énergie, apportée par certains facteurs du processome grâce à l'hydrolyse de NTP (Ulbrich *et al*, 2009 ; Bassler *et al*, 2010 ; Kressler *et al*, 2012).

Ainsi, au sein du processome, on retrouve des activités endonucléase, hélicase, kinase, phosphatases, ATPase ou encore GTPase. On trouve également des protéines importantes pour l'organisation de l'architecture structurale et des protéines régulatrices, telles que des co-facteurs ou des analogues de protéines ribosomiques (Strunk & Karbstein, 2009 ; Karbstein *et al*, 2005 ; Bleichert & Baserga, 2007 ; Granneman *et al*, 2006).

### III.1. Intervention d'hélicases

De nombreux facteurs appartenant au processome possèdent des activités ARN-hélicases. Il s'agit des protéines Dbp4p, Dbp8p, Dhr1p, Dhr2p, Fal1p, Rok1p et

Rrp3p, requises pour la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique 40S, et des protéines Has1p et Prp43p, impliquées dans la biogenèse des deux sous-unités **(Fig. 18)** (pour revue, Martin *et al*, 2012 ; Rodriguez-Galan *et al*, 2013). La plupart de ces protéines sont phylogénétiquement conservées et remplissent des fonctions spécifiques non-redondantes (Abdelhaleem *et al*, 2003 ; De La Cruz *et al*, 2004 ; Linder, 2006 ; Bleichert & Baserga, 2007). Alors que leurs activités sont relativement bien caractérisées (Granneman *et al*, 2006 ; Garcia & Uhlenbeck, 2008 ; Lebaron *et al*, 2009), peu d'informations sont disponibles sur leurs cibles et/ou leurs mécanismes d'action. Une hypothèse implique l'intervention de cofacteurs permettant le recrutement des hélicases au niveau de leur site d'action (Granneman *et al*, 2006). Le développement de la technique de CRAC (UV cross-linking and analysis of cDNA) a permis par exemple d'identifier certains sites potentiels d'interaction entre ARN-hélicases et pré-ARNr (Bohsack *et al*, 2009 ; Granneman *et al*, 2009).

Comme nous l'avons déjà indiqué précédemment, de nombreuses snoRNP, telles que les snoRNP U3, U14, snR10, snR30 ou snR35 interviennent dans les clivages précoces A0, A1 et A2 (Hughes et al, 1991 ; Li et al, 1990 ; Morrissey & Tollervey, 1993 ; Tollervey & Guthrie, 1985). Ces différentes snoRNP ne sont pas retrouvées dans le ribosome mature et doivent donc être dissociées des pré-ribosomes. Une dissociation spontanée ne permettant probablement pas d'assurer un taux de synthèse des ribosomes efficace, il a été proposé que différentes ARN hélicases assurent la dissociation des particules.

De manière générale, les ARN-hélicases peuvent être considérées comme des chaperones qui permettent de moduler la conformation des pré-ARNr, au sein du processome, ceci en consommant de l'énergie. Cette activité permet l'adoption de structures compatibles avec les clivages A0, A1 et A2 et l'organisation de la petite sous-unité 40S (Granneman *et al*, 2006) (pour revue, Phipps *et al*, 2011). Ces événements consistent en des changements de conformation des pré-ARNr (repliements et dépliements), des remodelages des interactions existant entre les pré-ARNr et les protéines ou encore l'association, la dissociation ou le déplacement de certains facteurs de maturation et de snoRNP intervenant dans la maturation des pré-ARNr (Rocak & Linder, 2004 ; Cordin *et al*, 2006 ; Bleichert & Baserga, 2007 ; Bohnsack *et al*, 2008 ; Lebaron *et al*, 2009 ; Linder & Jankowsky, 2011).

Les ARN-hélicases Dbp3p, Dbp4p, Has1p, Rok1p et Prp43p interviennent dans la dissociation de snoRNP du processome (Kos & Tollervey, 2005 ; Liang & Fournier, 2006 ; Bohnsack *et al*, 2008, 2009 Garcia *et al*, 2012). Le facteur Dpb4p, requis pour les clivages aux sites A0, A1 et A2, est notament impliqué dans la dissociation des snoRNP U14 et snR41, ceci après l'assemblage du sous-complexe UTP-B. En effet, lors d'expériences de gradients de sédimentation, lorsque le facteur Dbp4p est déplété, les snoRNP U14 et snR41 s'accumulent dans les fractions de haut poids moléculaires correspondant au processome et le taux de snoRNP libre diminue, ce qui traduit une rétention de ces snoRNP au sein du processome (Kos & Tollervey, 2005). Le même phénomène est observé pour la snoRNP snR10 en absence du facteur Rok1p (Bohnsack *et al*, 2008).

L'ARN-hélicase Dpb8p interagit avec le facteur du processome Esf2, qui est capable de s'associer au niveau du pré-ARNr 35 via son motif de reconnaissance de l'ARN (RRM). Il a été proposé que le cofacteur Esf2p confère une spécificité de substrat et stimule l'activité de Dbp8p (Granneman *et al*, 2006). De la même manière, l'ARN-hélicase Prp43p s'associe avec les facteurs du processome Pfa1p/Sqs1p et Gno1p, qui interagissent avec le pré-ARNr 35S via leurs motifs riches en Glycine (G-patch) (Lebaron *et al*, 2005, 2009 ; Pertschy *et al*, 2009 ; Lin *et al*, 2009). Ainsi, l'association de Pfa1p/Sqs1p et Gno1p avec Prp43p confère également une spécificité de substrat et stimule son activité hélicase (Lebaron *et al*, 2009 ; Lin *et al*, 2009). De plus, sur la base de données obtenues par la technique de CRAC, il a été proposé que le facteur Prp43p interagisse directement avec des snoARN impliqués dans les modifications des nucléotides du pré-ARNr 35S, tels que snR40, snR51, snR60, snR61, snR70 et snR71, mais également avec leurs séquences cibles au niveau du pré-ARNr 35S (Bohnsack *et al*, 2009). Le facteur Prp43p serait donc impliqué dans l'association/dissociation des snoRNP de leurs cibles sur le pré-ARNr 35S (Bohnsack *et al*, 2009). Par exemple, une séquence cible est située aux environs de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S, proche du site de clivage D où la maturation par Nob1p du pré-ARNr 20S en ARNr 18S doit avoir lieu. Or, cette région peut être non-accessible à Nob1p du fait qu'elle est 2'-O-méthylée par la snoRNP snR70. L'ARN-hélicase Prp43p et ses cofacteurs peuvent faciliter la dissociation de la snoRNP snR70, induisant un réarrangement conformationnel permettant l'action de Nob1p au site de clivage D (Pertschy *et al*., 2009).

L'ARN-hélicase Dhr1 est associée au snoARN U3 au sein du processome et serait spécifiquement requise pour la dissociation de la snoRNP U3 du pré-ARNr 35S (Colley et al, 2000 ; Sardana et al, 2015) Elle pourrait en même temps faciliter la formation du pseudonoeud dans l'ARNr 18S, ceci au niveau du pré-ARNr 35S (Colley et al, 2000 ; Sardana et al, 2015).

D'autre part, la déplétion de l'ARN hélicase Has1p entraine un retard de synthèse des ARNr 18S et 25S, ainsi qu'une rétention du snoARN U3 et de la snoRNP U14 dans des fractions de haut poids moléculaires correspondant au processome, suggérant que Has1 interviendrait également dans la dissociation de la snoRNP U3 et de la snoRNP U14 des particules pré-ribosomiques (Liang & Fournier, 2006 ; Emery *et al*, 2004).

La formation de l'hélice 44 de l'ARNr 18S, localisée au cœur du centre de décodage du ribosome, est un autre exemple de réarrangement structural indispensable (Dutca *et al*, 2011). En effet, une région de la séquence ITS1 s'apparie avec la future hélice 44, empêchant sa formation. L'hélice 44 se forme suite au clivage au site A2 qui permet de libérer la séquence ITS1 (Lamanna & Karbstein, 2011, Young & Karbstein, 2011). Cet événement nécessite une réorganisation structurale qui doit probablement être induite par une ARN hélicase présente au sein du processome.

### III.2. Intervention d'une GTPase (complexe Bms1p/Rcl1p)

Plusieurs GTPases participent à la biogenèse des ribosomes, notamment Bms1p, Efl1p/Ria1p, Lsg1p/Kre35p, Nog1p, Nug1p et Nug2p/Nog2p. Cependant, seule la GTPase Bms1p du processome (**Fig. 18**) est requise pour la formation de la petite sous-unité ribosomique 40S. Les GTPases sont caractérisées par la présence d'un domaine G, organisé en 5 motifs de séquences conservées G1 à G5 et incluant un motif « Walker A » caractéristique (Leipe *et al*, 2002). Les GTPases fonctionnent généralement avec l'aide de facteurs d'activation GAP, pour GTPase Activating Protein, et de facteurs d'échange GEF, pour GDP/GTP Exchange Factor. Dans le cas de Bms1p, ces facteurs n'ont pas encore été identifiés, mais le domaine C-terminal de la protéine semblerait agir comme un GAP intramoléculaire (Karbstein *et al*, 2005, 2006). Les GTPases sont des protéines régulatrices jouant des rôles clés dans de nombreux processus cellulaires, ceci en fournissant de l'énergie, procurée

par l'hydrolyse du GTP. Elles peuvent en particulier de médier des réarrangements conformationnels spatio-temporellement au sein de différents complexes. Ainsi le facteur Bms1p semble réguler l'assemblage ou l'activation du processome et donc la maturation du pré-ARNr 35S. Le facteur Bms1p est impliqué dans l'incorporation de Rcl1p dans le processome (Gelpern *et al*, 2001 ; Wegierski *et al*, 2001; Karbstein *et al*, 2005, 2006). En effet, Bms1p peut former un petit complexe indépendant avec Rcl1p, comme indiqué précédemment **(Fig. 18 et 19)** (Wegierski *et al*, 2001). Ces deux facteurs sont essentiels pour les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 permettant la production de l'ARNr 18S (Billy *et al*, 2000 ; Gelperin *et al*, 2001 ; Tanaka *et al*, 2011). La protéine Bms1p, sous forme complexée au GTP, possède une meilleure affinité pour la protéine Rcl1p que sous forme complexée au GDP, tandis que l'association de Rcl1p à Bms1p augmente l'affinité de cette dernière pour le snoARN U3 (Karbstein *et al*, 2005). De plus, l'incorporation du facteur Rcl1p au niveau du snoARN U3 au sein du processome requiert son interaction avec Bms1p (Gelperin *et al*, 2001 ; Wegierski *et al*, 2001 ; Karbstein *et al*, 2005, 2006). Ainsi, il est proposé que le facteur Rcl1p s'associe au facteur Bms1p/GTP dans la cellule, ce qui permet le recrutement de ce complexe dans le processome par l'intermédiare du snoARN U3 (Karbstein *et al*, 2005). L'incorporation du sous-complexe Bms1p/Rcl1p au sein du processome a lieu après l'assemblage d'une partie des composants du cœur du processome, en particulier t-UTP/UTP-A et UTP-B/snoRNP U3, mais avant l'incorporation d'autres facteurs, tels que le complexe Mpp10p ou les protéines Utp20p, Kre33p et Enp2p **(Fig. 19)**. Le sous-complexe Bms1p/Rcl1p serait ainsi impliqué dans des étapes d'assemblage requises pour le recrutement de ces facteurs (Perez-Fernandez *et al*, 2011). Ce recrutement serait permis grâce à des changements conformationnels induits par l'hydrolyse du GTP. Il semblerait en outre que l'hydrolyse du GTP par le facteur Bms1p engendre un réarrangement structural permettant d'initier les clivages précoces A0, A1 et A2 (Wegierski *et al*, 2001). Une dernière hypothèse est que le facteur Bms1p soit impliqué dans la dissociation du facteur Rcl1p des pré-ribosomes de manière GTP-dépendante (Karbstein *et al*, 2005, 2006). En effet, après un réarrangement structural du processome, l'hydrolyse du GTP serait induite par Bms1p, provoquant la dissociation du facteur Rcl1p de Bms1p, suivie de celle de Bms1p des pré-ribosomes (Karbstein *et al*, 2005, 2006).

### III.3. Intervention d'endonucléases

A ce jour, les facteurs responsables de ces clivages endonucléolytiques A0, A1 et A2 n'ont pas été déterminés avec certitude. En effet, la plupart des facteurs appartenant au processome sont essentiels aux trois clivages A0, A1 et A2, rendant difficile l'identification d'un possible facteur spécifique à ces clivages. Cependant, deux facteurs semblent jouer le rôle d'endonucléases. Le premier est le facteur Rcl1p, cité précédemment, appartenant au sous-complexe Bms1p/Rcl1p **(Fig. 18 et 19)** (Billy *et al*, 2000 ; Horn *et al*, 2011). Rcl1p appartient à la famille des ARN 3'-terminal phosphate cyclase, comme le montrent les similarités de séquences observées avec ce type d'enzymes caractérisés chez les eucaryotes et les bactéries. Ces enzymes catalysent la formation d'une liaison phosphodiester cyclique 2'-3' à l'extrémité d'un ARN 3'-phosphate. La structure tridimensionnelle de Rcl1p présentant d'ailleurs des homologies avec celle de l'ARN cyclase RtcA bactérienne en dehors des résidus du site actif (Tanaka *et al*, 2011). Cependant, Rcl1p ne présente pas d'activité 2'-3' cyclase (Billy *et al*, 2000). La déplétion de Rcl1 conduit à l'abolition des clivages aux sites A1 et A2, le clivage au site A0 étant retardé, puisqu'une accumulation du pré-ARNr 22S, possédant des extrémités correspondant aux sites A0 et A3, est observée (Billy *et al*, 2000). Il a été montré aussi que la protéine Rcl1p recombinante est capable de réaliser le clivage au site A2 *in vitro* et *in vivo* (Horn *et al*, 2011). Des mutations dans son site actif potentiel conduisent à l'abolition du clivage au site A2 (Horn *et al*, 2011). Ces données suggèrent que le facteur Rcl1 pourrait être l'endonucléase responsable du clivage au site A2. Il a ainsi été proposé que Rcl1 pourrait faire partie d'une nouvelle classe d'endonucléases. Néanmoins, de nombreuses autres mutations ponctuelles dans la poche du site actif n'abolissent pas l'activité de Rcl1p, ce qui contredit ces hypothèses (Tanaka *et al*, 2011). D'autre part, le rôle de Bms1p dans ce clivage n'est absolument pas déterminé (Karbstein *et al*, 2005). Enfin, le domaine N-terminal du facteur Rrp5p du processome s'associe à proximité du site A2 et est impliqué dans le clivage à ce site, suggérant un lien fonctionnel possible entre Rrp5p et Rcl1p (Young & Karbstein, 2011 ; Torchet *et al*, 1998 ; Venema & Tollervey, 1996 ; Vos *et al*, 2004). Néanmoins, *in vitro*, Rrp5p ne promeut pas le clivage au site A2 de manière Rcl1-dépendante. De plus, Rrp5p

n'interagit pas directement avec Rcl1 et ne semble pas non plus augmenter la spécificité de Rcl1p pour le pré-ARNr (Horn *et al*, 2011).

Un autre facteur appartenant au processome, Utp24p **(Fig. 18)**, pourrait jouer également un rôle d'endonucléase (Bleichert *et al*, 2006). Ce facteur possède un domaine PINc (PilT N-terminus), caractérisé par la présence de 4 acides aminés acides conservés et impliqués dans l'activité enzymatique grâce à la fixation d'ions métalliques divalents. De plus, l'implication de ce domaine PINc dans des fonctions de nucléases a déjà été caractérisé (Clissold & Ponting, 2000 ; Arcus *et al*, 2004). Les protéines Rrp44p de l'exosome, Nob1p, impliquée dans le clivage au site D et Nmd4p, impliquée dans le mécanisme de Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) possèdent également un domaine PINc (He & Jacobson, 1995 ; Mitchell *et al*, 1997 ; Bleichert *et al*, 2006, Fatica *et al*, 2004,). La déplétion du facteur Utp24p entraine un défaut de clivages aux sites A0, A1 et A2, abolissant la production de l'ARNr 18S. Cependant, la mutation ponctuelle des deux résidus dans le site actif d'Utp24 conduisent à l'abolition des clivages aux sites A1 et A2 mais pas du site A0, conduisant à l'accumulation du pré-ARNr 22S, clivé aux sites A0 et A3. De plus, ces mutants du facteur Utp24p présentent un phénotype dominant-négatif plus ou moins marqué à certaines températures de croissance, en particulier à 17°C (Bleichert *et al*, 2006). Ainsi, Utp24p pourrait également être une endonucléase responsable des clivages aux sites A1 et/ou A2.

Les clivages A1 et A2 étant couplés, le clivage au site A2 n'a normalement pas lieu si le clivage au site A1 ne s'est pas produit. Ainsi, d'après les résultats énoncés précédemment, Utp24p pourrait être responsable du clivage au site A1 et le facteur Rcl1 du clivage au site A2.

Les deux facteurs Rcl1p et Utp24p posséderaient donc chacun un double rôle dans la maturation des pré-ARNr, un rôle structural au sein du processome et un rôle d'endonucléase nécessaire à un ou plusieurs clivages. Le phénotype dominant-négatif des mutants Utp24p est en accord avec ce phénomène. En effet, ce type de phénotype résulte souvent d'une compétition entre formes sauvages et mutantes d'une protéine, la forme mutante entrainant la formation de complexes non-fonctionnels, où la forme mutée a été incorporée mais est inactive.

### III.4. Intervention du facteur Rrp5

La protéine Rrp5p **(Fig. 18)** joue de nombreux rôles dans la maturation du pré-ARNr 35S et est impliqué à la fois dans la synthèse de la petite sous-unité ribosomique 40S et de la grande sous-unité ribosomique 60S, contrairement à la majorité des facteurs appartenant au processome. En effet, Rrp5p est requise pour l'assemblage du processome en permettant le recrutement du sous-complexe UTP-C **(Fig. 19)** et ainsi dans la production de l'ARNr 18S par les clivages A0, A1 et A2. Le facteur Rrp5p est également requis dans le clivage A3 permettant la production de l'ARNr 5,8S (Eppens *et al*, 1999, Venema & Tollervey, 1996).

La protéine Rrp5 possède deux régions fonctionnellement distinctes. Elle est composée d'un côté de 12 motifs S1 de fixation à l'ARN, et d'un autre côté de 7 domaines tétratricopeptides (TPR) d'interaction protéine/protéine (Subramanian *et al*, 1983 ; Lamb *et al*, 1995). Les 8 premiers motifs S1 possèdent un rôle dans le clivage A3, tandis que les motifs 10 à 12 et les 7 domaines TPR jouent un rôle dans les clivages A0, A1 et A2 (Vos *et al*, 2004 ; de Boer *et al*, 2006). Si la protéine Rrp5 est exprimée dans la cellule sous la forme de ces deux fragments distincts l'un de l'autre, la croissance et la maturation du pré-ARNr 35S demeurent correctes, tandis que l'expression d'une seule de ces deux formes abolit la croissance cellulaire (Torchet 1998 ; Eppens *et al*, 1999 ; Vos *et al*, 2004). Les 3 motifs S1 10 à 12 sont impliqués spécifiquement dans le clivage au site A2, leur délétion entrainant une abolition de celui-ci et l'accumulation du pré-ARNr 21S, allant du site A1 au site A3, ce qui limite la production de l'ARNr 18S (Vos *et al*, 2004). Au niveau du pré-ARNr 35S, le facteur Rrp5p s'associe à la séquence ITS1, 30 nts en aval du site de clivage A2, grâce aux 3 derniers motifs S1 et aux 7 domaines TPR. Ceci est possible indépendamment de la snoRNP U3 Vos *et al*, 2004 ; de Boer *et al*, 2006 ; Lamanna & Karbstein 2009 ; Young & Karbstein 2011). Ainsi, il a été suggéré un rôle pour Rrp5 dans la stabilisation d'une conformation du pré-ARNr nécessaire au clivage au site A2 (Venema & Tollervey, 2006 ; de Boer *et al*, 2006 ; Lamanna & Karbstein, 2011 ; Young & Karbstein, 2011).

D'autre part, le facteur Rrp5p co-précipite avec les particules pré-ribosomiques contenant le pré-ARNr 35S ou le pré-ARNr 27SA2, mais pas le pré-ARNr 27SB. Il semble donc qu'il soit dissocié de la particule pré-60S pendant ou légèrement après le clivage au site A2 (Nissan et al, 2002 ; de Boer *et al*, 2006).

## III.5. Intervention de la snoRNP U3 et du complexe Mpp10

La snoRNP U3 est un composant essentiel du processome. Elle est impliquée à la fois dans son assemblage et dans sa fonction. Pour cela, le snoARN U3 établit de multiples appariements avec le pré-ARNr 35S, jouant un rôle de guide et de chaperon pour le repliement du pré-ARNr 35S et permettant la réalisation des clivages précoces A0, A1 et A2 (**Fig. 16 et 17**) (Hughes, 1996 ; Henras *et al*, 2008 ; Méreau *et al*, 1997). Ces appariements empêchent également la formation prématurée du pseudonoeud, essentiel à la fonction de l'ARNr 18S mature (Hughes *et al*, 1996 ; Sharma & Tollervey, 1999 ; Kudla *et al*, 2011). La formation des appariements entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 et semble requis pour l'association du complexe Mpp10p (Méreau et al, 1997 ; Gerczei & Correll 2004 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011). Le complexe Mpp10p pouvant par ailleurs augmenter la stabilité de l'interaction entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S (Gerczei & Correll, 2004 ; Gerczei *et al*, 2009 ; Wehner *et al*, 2002, Mat Marmier-Gourrier *et al*, 2008 ; Perez-Fernandez *et al*, 2011).

### *III.5.A. Intervention du complexe Mpp10 dans la stabilisation des appariements formés entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3*

Le complexe Mpp10p du processome est constitué des protéines Mpp10p, Imp3p et Imp4p. La possibilité de formation d'un tel complexe a initialement été observé par double hybride (Lee & Baserga 1999). Il semble toutefois que les protéines Imp3p et Imp4p interagissent avec Mpp10p mais pas entre elles (Granneman et al, 2003). De plus, la protéine Mpp10p est requise pour la stabilité des protéines Imp3p et Imp4p (Lee & Baserga, 1997 ; Wehner et al, 2002). Les trois protéines qui constituent ce complexe sont essentielles pour la viabilité cellulaire et les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2. Chez la levure, le recrutement du complexe Mpp10p au sein du processome est en partie médié par l'ensemble des appariements établis entre le domaine 5' du snoARN U3 et le pré-ARNr 35S (Gerczei & Correll, 2004 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2003, 2011). Le complexe Mpp10 s'associerait de façon prédominante avec le snoARN U3 au sein du processome, plutôt qu'avec la snoRNP U3 isolée

(Granneman et al, 2003). En effet, il a été montré que la protéine Imp3p est responsable du recrutement des protéines Mpp10p et Imp4p au niveau des appariements formés entre le pré-ARNr et le snoARN U3 au sein du processome et que son absence empêche l'interaction de Mpp10p et Imp4p avec le snoARN U3 (Lee & Baserga, 1999 ; Wormsley et al, 2001 ; Wehner et al, 2002 ; Granneman et al, 2003). Lorsque l'appariement correspondant à l'hélice VI est destabilisé par des mutations, aucune des protéines du complexe Mpp10p n'interagit avec le snoARN U3, suggérant que l'hélice VI est requise pour le recrutement du complexe Mpp10p (**Fig. 20**) (Marmier-Gourrier et al, 2011 ; Dutca et al, 2011).

Ces résultats sont en accord avec le fait que la formation de l'hélice VI est un événement important et préalable à la formation des autres hélices en permettant notamment le recrutement du complexe Mpp10p qui renforce la stabilité de cette hélice (Dutca et al, 2011 ; Marmier-Gourrier et al, 2011). Une fois le complexe Mpp10p recruté au sein du processome, les protéines Imp3p, Imp4p et Mpp10p interviennent dans la stabilisation des autres appariements formés entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S (**Fig. 20**) (Dutca et al, 2011 ; Gerczei & Correll, 2004 ; Gerczei et al, 2009 ; Wormsley et al, 2001 ; Marmier-Gourrier et al, 2011). En effet, il a été montré que les protéines Imp3p et Imp4p stabilisent *in vitro* la formation de l'hélice VI, mais également de l'hélice V (**Fig. 20**) (Wehner et al, 2002 ; Perez-Fernandez et al, 2011). Par ailleurs, la présence des régions 5'-hinge (hélice V) et 3'-hinge (hélice VI) est nécessaire à l'association du complexe Mpp10p à la snoRNP U3 (Gerczei et al, 2004, 2009). Il est intéressant de noter que les protéines Imp3p et Imp4p sont capables d'interagir *in vitro* avec un fragment du snoARN U3 allant des positions 4 à 50, c'est-à-dire ne contenant pas la séquence nécessaire à la formation de l'hélice VI. Néanmoins, en ccord avec les résultats ci-dessus, leur affinité est meilleure avec un fragment du snoARN U3 contenant tout le domaine 5' (positions 1 à 72) (Gerczei & Correll, 2004).

De plus, l'un des rôles de la protéine Imp4p serait de remodeler l'hélice Ia, dans laquelle sont piégées les boîtes A et A' du snoARN U3 (**Fig. 8**), ceci afin de faciliter la formation des appariements entre ces boîtes et les séquences à l'extrémité 5' de l'ARNr 18S, correspondant aux hélices I, II et III (Gerczei & Correll, 2004). Il a également été montré *in vitro* que les protéines Imp3p et Imp4p peuvent favoriser la formation et stabiliser les hélices II et III (**Fig. 20**) (Gerczei & Correll, 2004).

**Figure 20 : Représentation schématique des interactions établies entre le complexe Mpp10 du processome et les hélices formées entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S**

Le complexe Mpp10, composé des protéines Mpp10, Imp3 et Imp4, participe à la stabilisation des appariements intermoléculaires formés entre le domaine 5' du snoARN U3 et le pré-ARNr 35S (encadrés en marron). Les trois protéines seraient requises pour la stabilisation de l'hélice VI et cette hélice VI semble nécessaire au recrutement du complexe Mpp10 en permettant l'interaction avec Imp3. Les protéines Imp3 et Imp4 interagissent également avec les hélices II, III et V (Lee & Baserga, 1999 ; Dutca *et al*, 2011 ; Marmier-Gourrier *et a*l, 2011 ; Gerczei & Correll, 2004 ; Gerczei *et al*, 2009 ; Wormsley *et al*, 2001 ; Granneman *et al*, 2003 ; Wehner *et al*, 2002).

Il avait été proposé que le segment 4 du snoARN U3, structuré en tige boucle (hélice 1b'), (**Fig. 17 et 20**) participe à la fixation de la protéine Mpp10p (Wormsley et al, 2001). Cependant, les données obtenues après mutations de cette région ne sont pas en accord avec cette hypothèse. En effet, ni la longueur, ni la séquence du segment 4 ne semblent avoir d'impact sur la croissance, la stabilité du snoARN U3 et la fonction de la snoRNP U3 (Wormsley et al, 2001 ; Marmier-Gourrier et al, 2011).

L'ensemble de ces résultats montre que le complexe Mpp10p participe activement à la formation et à la stabilisation des appariements qui s'établissent entre le domaine 5' du snoARN U3 et les régions 5'-ETS et le futur ARNr 18S. Ces appariements étant essentiels à la réorganisation structurale du pré-ARNr conduisant aux clivages précoces A0, A1 et A2, le complexe Mpp10p joue donc un rôle majeur dans la synthèse de la petite sous-unité 40S à l'instar de la snoRNP U3. De plus, l'intégrité du domaine 5' du snoARN U3 est nécessaire à l'association du complexe Mpp10p, mais pas suffisante puisqu'il a été montré que le motif B/C du snoARN U3 était également important pour la fixation du complexe Mpp10p au niveau du pré-ARNr 35S (Wehner etal, 2002 ; Granneman et al, 2004). Ce motif B/C recrute les protéines Snu13p et Rrp9p (Clery et al, 2007), d'où l'idée d'un lien fonctionnel possible entre le motif B/C, le complexe Mpp10p et la protéine Rrp9p

En plus du complexe Mpp10p, d'autres facteurs sont probablement requis pour la formation des interactions entre le snoARN U3, le pré-ARNr 35S et le complexe Mpp10p, tels que la protéine Utp25p ou l'ARN hélicase Dhr1p, qui interagissent avec la protéine Mpp10 (Colley et al, 2000 ; Goldfeder & Oliveira, 2010), ou encore des protéines interagissant avec le pré-ARNr 35S, telles que Rrp5p, Rrp7p ou Mrd1p (Granneman et al, 2004 ; pour revue, Fatica & Tollervey, 2002 ; Henras et al, 2008).

### III.5.B. *Dissociation de la snoRNP U3 du processome par l'ARN hélicase Dhr1p*

Il a été montré que l'hélicase Dhr1p, composant du processome, est responsable de la dissociation de la snoRNP U3 du processome (Colley et al, 2000 ; Sardana et al, 2015). L'hélicase Dhr1p appartient à la famille des DEAH-box ARN hélicases dépendantes de l'hydrolyse d'ATP. Elle présente donc une forte homologie avec les facteurs d'épissages Prp2p, Prp16p, Prp22p et Prp43p. Dhr1p n'est toutefois pas

impliquée dans l'épissage des pré-ARNm (Colley et al, 2000). Dhr1p est aussi capable de dissocier des duplex ARN mais cette activité de dissociation est indépendante de l'hydrolyse d'ATP, celle-ci étant uniquement nécessaire pour le départ rapide du produit de réaction et le recyclage de l'enzyme (Sardana et al, 2015). La déplétion de la protéine Dhr1p, qui n'altère pas la stabilité du snoARN U3, entraine néanmoins un défaut de maturation des pré-ARNr aux sites A1 et A2, qui est particulièrement prononcé au site A2 (Colley et al, 2000 ; Sardana et al, 2015). De plus, l'expression d'un mutant dominant négatif de Dhr1p conduit à une rétention forte du snoARN U3 au sein des pré-ribosomes, où il reste apparié au pré-ARNr, témoignant du rôle de l'hélicase Dhr1p dans la dissociation de la snoRNP U3. Il a été montré par différentes techniques que la protéine Dhr1p colocalise avec la protéine Nop1p dans le nucléole et qu'elle interagit efficacement et spécifiquement avec le snoARN U3 (Colley et al, 2000 ; Sardana et al, 2015). La protéine Dhr1p semble interagir avec la région localisée juste à l'extrémité 3' des boîtes A et A' du snoARN U3, qui est impliquée dans l'interaction avec l'ARNr 18S, conduisant à la formation les hélices I, II et III. La formation de ces appariements entre les extrémités 5' de l'ARNr 18S et du snoARN U3 serait l'événement déclencheur du recrutement de la protéine Dhr1 à ce niveau. La protéine Dhr1p n'est pas impliquée dans le clivage au site A0 mais dans les clivages aux sites A1 et A2, ce qui est en accord avec le fait que le clivage au site A0 nécessite la formation d'une interaction entre la région 5'-ETS et le snoARN U3 (hélices V et VI), tandis que les clivages aux sites A1 et A2 nécessitent la formation d'appariements entre l'ARNr 18S et le snoARN U3 (hélices I, II et III). De plus, il a également été montré que l'hélicase Dhr1p interagit avec les protéines Mpp10p, Rcl1p, Bud23p et Trm112p (Colley et al, 2000 ; Létoquart et al, 2014 ; Sardana et al, 2014). Un phénotype semblable, où les clivages A1 et A2 étaient fortement inhibés, avait déjà été observé dans une souche exprimant la protéine Mpp10p dépourvue de sa région C-terminale (Lee & Baserga, 1997) Ceci suggère que ce domaine pourrait être fonctionnellement relié à Dhr1p. De plus, un défaut de maturation au site A2 est également observé lorsque l'on effectue la déplétion de protéine Bud23p. Cette protéine associée à son cofacteur Trm112p est une methyltransferase permettant de modifier une guanine en position 1575 de l'ARNr 18S. Ainsi les protéines Bud23p et Trm112p pourraient également être liées à la fonction de la protéine Dhr1p Létoquart et al, 2014 ; Sardana et al, 2014).

D'autre part, l'analyse de la composition des particules pré-ribosomiques obtenues avec le mutant dominant négatif de Dhr1, dans lesquelles le snoARN U3 est bloqué, a révélé qu'une grande majorité des composants du processome (t-UTP/UTP-A, UTP-B, UTP-C, complexe Mpp10p, snoRNP U3, complexe Bms1p/Rcl1p, Rrp5p, et autres) et des protéines ribosomiques étaient présentes. Les composants de l'exosome étaient également retrouvés (Sardana et al, 2015). Cependant, certains facteurs du processome ainsi que des protéines ribosomiques intervenant tardivement dans la biogenèse n'ont pas été retrouvés dans cette particule pré-ribosomique, traduisant l'arrêt de l'assemblage de la pré-40S dans laquelle le snoARN U3 reste associé au pré-ARNr 35S. Des protéines ribosomiques mises en évidence dans le processome étaient néanmoins manquantes (Rps2, Rps3p et Rps23p). Dans le schéma d'assemblage, elles sont localisées au niveau du futur pseudonoeud central, indiquant que celui-ci n'est vraisemblablement pas formé correctement en absence d'activité de Dhr1p (Sardana et al, 2015). Or, la formation du pseudonoeud central au sein de l'ARNr 18S et les interactions établies par le snoARN U3 au niveau de la région 5' de l'ARNr 18S sont mutuellement exclusives. Lorsque le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S sont bloqués au sein de la particule pré-ribosomique, la formation du pseudonoeud central ne peut donc pas avoir lieu, ce qui entraine l'absence des réarrangements conformationnels requis pour le recrutement des protéines ribosomiques tardives, ainsi qu'un fort ralentissement des évènements de clivages aux sites A1 et A2 (Colley et al, 2000 ; Sardana et al, 2015).

Le rôle de l'hélicase Dhr1 serait donc de favoriser la formation du pseudonoeud central. Pour ce faire, les appariements établis entre l'ARNr 18S et le snoARN U3 au niveau de leurs extrémités 5' seraient associés à la protéine Dhr1, qui catalyserait alors la dissociation du snoARN U3, engendrant les réarrangements structuraux permettant de former le pseudonoeud et permettant ainsi le recrutement des dernières protéines ribosomiques, ainsi que certains facteurs du processome. De plus, ces réarrangements structuraux permettraient la réalisation des clivages aux sites A1 et A2 (Colley et al, 2000 ; Sardana et al, 2015). Une observation similaire a été faite chez *E. coli*, où une interaction entre l'ARNr 16S et la régions 5'-ETS retarde la formation du pseudonoeud. Des mutations bloquant la formation du pseudoneud ou l'absence d'hélicases empêche la maturation de l'ARNr 16S (Dammel & Noller, 1993 ; sardana Clatterbuck et al, 2013).

La dissociation de la snoRNP U3 du processome est donc une étape clef dans la maturation des pré-ARNr et dans la biogenèse des ribosomes.

Bien que l'hélicase Dhr1p soit considérée comme l'acteur principalement responsable de la dissociation du snoARN U3 des pré-ribosomes, une autre hélicase, la protéine Has1p, pourrait aussi intervenir dans sa dissociation. En effet, il a été montré qu'en l'absence de cette hélicase, le snoARN U3 est retenu au sein des particules pré-ribosomiques. La protéine Has1 est également impliquée dans la dissociation d'autres snoRNP et ne serait donc pas spécifique à la snoRNP U3 (Liang & Fournier, 2006).

# Chapitre 4 : La protéine Rrp9, composant indispensable à la fonction de la snoRNP U3

## I. Présentation de la protéine Rrp9 de *S. cerevisiae* et de son homologue humain, la protéine U3-55K

Comme nous l'avons déjà mentionné, la snoRNP U3 contient les quatre protéines Snu13p, Nop1p, Nop56p et Nop58p retrouvées au sein des snoRNP à boîtes C/D, ainsi qu'une protéine spécifique supplémentaire, la protéine Rrp9p (Watkins et al, 2000 ; Venema et al, 2000). Cette protéine avait initialement été identifiée en étudiant la snoRNP U3 de cellules CHO (protéine de 55 kDa) (Lubben et al, 1993). Puis l'homologue humain, U3-55K, a été identifiée à partir de snoRNP U3 purifiées (Pluk et al, 1998), ainsi que l'homologue de levure, Rrp9p (Venema et al, 2000). Des alignements de séquences réalisés pour plusieurs organismes ont par la suite permis d'observer que cette protéine de la snoRNP U3 est phylogénétiquement très conservée, bien que des régions supplémentaires puissent être observées chez certains organismes, notamment chez la levure (Pluk et al, 1998). Tout comme la snoRNP U3, la protéine Rrp9p/U3-55K est majoritairement localisée dans le nucléole (Pluk et al, 1998 ; Huh et al, 2003). Elle est essentielle à la viabilité cellulaire et est nécessaire pour que les étapes de clivages précoces A0, A1 et A2 aient lieu (Watkins et al, 2000 ; Granneman *et al*, 2004 ; Lukowiack *et al*, 2000 ; Venema *et al*, 2000). En tant que composant de la snoRNP U3, la protéine Rrp9p/U3-55K est retrouvée dans le processome. Il a même été montré que U3-55K est requise pour le recrutement de la snoRNP U3 dans le processome (Granneman et al, 2004). Les protéines Rrp9p et U3-55K présentent 33% d'identité de séquence et 58% de similarité de séquence (Zhang et al, 2013). Les protéines Rrp9p (573 résidus) et U3-55K (475 résidus) sont constituées d'un domaine « propeller », consistant en la répétition de motifs WD, précédés d'une courte région N-terminale (**Fig. 21**) (Pluk et al, 1998 ; Zhang et al, 2013).

### I.1. Le domaine N-terminal

La région N-terminale de la protéine U3-55K (résidus 1 à 116) contient un domaine NLS putatif (résidus 8 à 40) et une région riche en résidus Glu (résidus 64 à 73) (**Fig.**

**Figure 21 : Alignement des séquences des protéines homologues Rrp9p de *Saccharomyces cerevisiae* et U3-55K humaine.**

D'après Zhang *et al*, 2013. Un total de 131 séquences d'homologues de Rrp9 issus de différents organismes ont été alignées et seul l'alignement des séquences de Rrp9p de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) et U3-55K humain (*Hs*) sont montrées. Les résidus conservés à 97%, 80% et 60% des séquences alignées sont respectivement surlignés en noir, gris foncé et gris clair. Les protéines Rrp9 et U3-55K partagent 33% d'identité et 58% de similarité. Les structures secondaires correspondant à ce qui est observé dans la structure tridimensionnelle de Rrp9 et U3-55K sont affichées en haut des séquences, tandis que les lignes discontinues représentent les régions désordonnées. Les 7 motifs WD40 sont indiqués avec leur numéro. Les motifs NLS M1 et M2 sont indiqués, ainsi que l'hélice α1 retrouvées chez la levure, et la boucle 7bc.

**21**), dont la fonction n'a pas été caractérisée à ce jour. De plus, le domaine NLS prédit ne semble pas essentiel, puisque sa délétion n'empêche pas l'adressage nucléaire (Pluk et al, 1998). Les données actuelles suggèrent par contre que le domaine propeller soit requis pour cette localisation (Pluk et al, 1998 ; Lukowiak et al, 2000). Des alignements de séquences réalisés entre Rrp9p et U3-55K ont permis d'identifier un élément NLS bipartite dans le domaine N-terminal de la protéine Rrp9p (résidus 1 à 126) (Zhang et al, 2013). Cet élément est constitué de deux motifs conservés de type NLS (M1 et M2) (**Fig. 21**)

Le motif M1 (résidus 8 à 12) est composé de 5 résidus basiques et se comporte comme un motif NLS monopartite classique, comme c'est le cas pour celui décrit pour U3-55K (Chook & Suel, 2011 ; Pluk et al, 1998). Bien que riche en résidus basiques, le motif M2 (résidus 57 à 75) ne correspond pas à un motif NLS classique. La délétion indépendante de chacun des motifs M1 ou M2 permet toujours la localisation majoritaire de Rrp9p dans le nucléole. Par contre, la délétion des deux motifs entraine une forte localisation cytoplasmique de Rrp9p (Zhang et al, 2013). Des études similaires ont été réalisées avec le domaine N-terminal de la protéine Rrp9, c'est-à-dire sans le domaine propeller. En absence du motif M2, une très faible localisation nucléolaire du domaine N-terminal de Rrp9p est observée, la majorité de ce domaine étant localisée dans le cytoplasme. En absence du motif M1, une répartition uniforme du domaine N-terminal de Rrp9p est observée entre cytoplasme et noyau (Zhang et al, 2013). Ainsi, les auteurs concluent que la région N-terminale de Rrp9 contient bien un motif NLS bipartite fonctionnel. Cependant, le motif M2 n'est pas un motif NLS indépendant et n'a pas d'activité de localisation nucléaire intrinsèque. Il serait plutôt requis pour renforcer l'activité de localisation nucléolaire du motif M1, en améliorant par exemple l'affinité de ce dernier pour l'importine. D'autre part, il a également été montré par des tests de croissance que le motif M1 n'est pas essentiel à la fonction de la protéine mais qu'en revanche le motif M2 est lui requis pour assurer sa fonctionnalité, suggèrant que le motif M2 a une importance fonctionnelle, qui n'est pas corrélée à son rôle dans l'import nucléaire de la protéine (Zhang et al, 2013). De plus, la localisation de la protéine Rrp9 dans le noyau, bien que faible en absence de la région N-terminale contenant les deux motifs NLS, suggère, comme dans le cas de U3-55K, l'implication de son domaine propeller dans l'import dans le noyau. En effet, des délétions dans le domaine propeller de U3-55K abolissent sa localisation dans le noyau (Pluk et al, 1998 ; Lukowiak et al, 2000).

Néanmoins, ces délétions pouvant affecter la structure globale de la protéine, ce qui n'a pas été testé, il est difficile de conclure définitivement sur ce point.

En fait, la localisation de Rrp9p au sein de la snoRNP U3 dans le nucléole est le résultat de mécanismes complexes. Puisqu'il est considéré que, dans un premier temps, l'assemblage des protéines de la snoRNP U3 a lieu au sein des corps de Cajal (homme) ou des corps nucléaires (levure) et que seules les particules comportant les protéines Nop1p/FIB, Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58 sont adressées au nucléole (Terns & Dahlberg, 1994 ; Verheggen et al, 2001, 2002 ; Boulon et al, 2004 ; Pradet-Ballade et al, 2011). L'assemblage de la snoRNP U3 fait appel à un grand nombre de facteurs protéiques, comme c'est le cas pour les snoRNP à boîtes C/D impliquées dans la 2'-O-méthylation (ce que nous avons décrit précédemment dans le paragraphe III.4.). Les protéines NOP56 et NOP58 présentent des motifs de localisation nucléolaire au niveau de leur extrémité C-terminale qui doivent participer à l'adressage nucléolaire (Pradet-Balade et al, 2011). Par ailleurs, dès leur synthèse dans le cytoplasme, les protéines 15.5K et NOP58 interagissent avec des facteurs d'assemblage des snoRNP à boîtes C/D, comme nous l'avons décrit précédemment dans le paragraphe III.4. On peut donc se poser la question de savoir si Rrp9p est importée seule dans le noyau ou associée à d'autres protéines de la snoRNP, telles que NOP56, NOP58, FIB et/ou avec des facteurs d'assemblage. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'interaction possible entre U3-55K et les protéines NOP56 et NOP58, ce qui facilite leur recrutement au niveau du motif C'/D (Knox *et al*, 2011). Un rôle du domaine propeller dans l'adressage nucléaire pourrait être lié à son implication dans les interactions avec NOP56 et NOP58. Par ailleurs, une autre question pour laquelle aucune réponse définitive n'a été obtenue est de savoir s'il pourrait exister des étapes cytoplasmiques dans la synthèse de la snoRNP U3. Des résultats contradictoires ont été obtenus sans qu'aucune conclusion claire n'ait été tirée (Watkins & Bohnsack, 2011 ; Boulon et al, 2004 ; Watkins et al, 2004, 2007).

Par contre, ceci traduit probablement l'intervention d'un autre paramètre pour la localisation nucléolaire, tel que l'association de Rrp9/U3-55K à la particule U3. En effet, une boucle conservée au sein du domaine propeller, appelée boucle 7bc (Zhang et al, 2013), dont la délétion ne perturbe pas cette structuration globale, semble requise pour l'association de la protéine Rrp9 au sein de la snoRNP U3. Sa délétion provoque la disparition de la localisation majoritairement nucléolaire de la

protéine Rrp9P, montrant que l'association de la protéine Rrp9P au sein de la snoRNP U3 pourrait bien participer à sa localisation nucléolaire (Zhang et al, 2013).
Finalement, les déterminants requis pour l'import nucléolaire des protéines U3-55K et Rrp9P, associées ou non au sein de la particule U3, ne sont probablement pas tous encore déterminés. Le phénomène pourrait en outre faire appel à des voies alternatives, telles que la diffusion passive de la protéine Rrp9 à travers les pores nucléaires pour rejoindre le nucléoplasme où s'assembleraient ensuite les particules U3 avant d'être acheminées vers le nucléole, ou encore un import concomitant à d'autre protéines possédant un NLS (Watkins et al, 2004 ; Zhang et al, 2013). D'autre part, l'assemblage de la snoRNP U3 est principalement nucléoplasmique, mais pourrait comporter une étape cytoplasmique chez l'homme (Watkins & Bohnsack, 2011). En effet, certains précurseurs de la snoRNP U3 sont associées aux facteurs d'export nucléaire CRM1 et PAXH et une petite fraction ont été identifiées dans des extraits cytoplasmiques de cellules HeLa (Boulon et al, 2004 ; Watkins et al, 2004, 2007). Ainsi, si la formation de la particule U3 passe par une étape cytoplasmique, la protéine U3-55K/Rrp9 pourrait y être recrutée avant le ré-import dans le noyau avec la pré-snoRNP U3. Enfin, il a récemment été montré chez l'homme que la protéine U3-55K interagissait avec les protéines NOP56 et NOP58, participant à la formation de la snoRNP U3 en permettant leur recrutement au niveau du motif C'/D du snoRNA U3 (Knox et al, 2011). Les protéines NOP56 et NOP58 possédant des motifs de localisation nucléolaire au niveau de leur extrémité C-terminale pourraient ainsi participer à la localisation nucléolaire de la protéine U3-55/Rrp9 (Pradet-Balade et al, 2011).

### I.2. Le domaine « hélix propeller »

En plus d'une région N-terminale contenant des motifs NLS, Rrp9p/U3-55K possède une grande région C-terminale comprenant plusieurs domaines WD40 (**Fig. 21**).
Les analyses de séquences mettent en évidence 7 domaines WD40 dans chacune des deux protéines (**Fig. 21**) (Granneman et al, 2002 ; Venema et al, 2000 ; Zhang et al, 2013). Au laboratoire, un modèle de structure tridimensionnelle des régions C-terminales contenant les 7 domaines WD40 des protéines U3-55K et Rrp9 avait été établi avant mon arrivée au laboratoire par C. Charron et N. Rolland (thèse de N.

Rolland). D'autre part, la structure tridimensionnelle des protéines U3-55K et Rrp9, et plus particulièrement la structure tridimensionnelle de la grande région C-terminale contenant les domaines WD40, a depuis été résolue par radiocristallographie (Zhang et al, 2013) (**Fig. 22**).

Comme attendu, les structures tridimensionnelles des protéines U3-55K et Rrp9 obtenues par radiocristallographie sont très similaires (**Fig. 22**) et se superposent au modèle structural établi au laboratoire (**Fig. 22**). L'ensemble de ces données structurales a permis de confirmer que les 7 domaines WD40 présents dans la région C-terminale de la protéine s'organisaient en une structure de type « β-propeller » ou pâles d'hélices (**Fig. 22**) (Sondek *et al*, 1996). Chaque domaine WD40 est caractérisé par 4 brins β antiparallèles, appelés brins a, b, c et d, formant un feuillet β au sein duquel le brin d appartient au domaine WD40 suivant (**Fig. 22**).

Ce type d'arrangement structural en « hélix propeller » ne diffère souvent que par le nombre de domaines WD40 qui le composent, ce qui se traduit par une grande similitude de leur organisation tridimensionnelle. Ces structures de type « hélix propeller » constituent généralement des plateformes permettant d'établir des interactions entre de multiples partenaires protéiques au sein de macro-complexe. De nombreuses protéines eucaryotes contiennent des domaines « hélix propeller », telles que GBB1 (Heterotrimeric guanine nucléotide-binding protein ou G proteins), qui a servi de référence à l'établissement du modèle au laboratoire, le facteur de transcription TAFII, l'ubiquitine ligase E3 ou encore le facteur TLP1 associé à la télomérase. De nombreux composants du processome possèdent également une structuration en « hélix propeller », tels que les facteurs Utp5p, Utp7p, Utp12p, Utp15p, Utp17p, Utp18p, Utp21p, Pwp2p ou Sof1p. Ces différentes protéines possèdent donc des structures similaires mais des fonctions variées, de par la présence de certains résidus spécifiques, qui sont généralement retrouvés au sein de boucles localisées entre les différents domaines WD40, à la surface des protéines. C'est le cas d'une longue boucle trouvée dans Rrp9p/U3-55K, localisée entre les brins β 7b et 7c au niveau du domaine WD40 numéro 7, appelée boucle 7bc (Zhang et al, 2013). Cette boucle recouvre une extrémité du canal central formé par la structure en « hélix propeller » (**Fig. 22**). Elle possède une importance fonctionnelle importante puisque, par mutation de certains de ses résidus, il a été montré qu'elle est essentielle à la viabilité cellulaire. Elle contribue à la stabilité de

**Figure 22 : Structure tridimensionnelle du domaine propeller de la protéine Rrp9p de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB : 4J0X ; Zhang *et al*, 2013)**

**A.** Structure tridimensionnelle du domaine propeller de la protéine Rrp9p de *Saccharomyces cerevisiae*. Deux vues différentes sont présentées : vue du haut et vue de côté, après une rotation d'un angle de -90° par rapport à l'axe x. La chaîne polypeptidique est colorée du bleu au rouge en allant du N-terminal vers le C-terminal. Les 7 domaines WD40 sont numérotés de 1 à 7 et les 4 brins β composant chaque domaine WD40 sont indiqués (a à d). L'hélice α1 et la boucle 7bc est également indiquée. La région N-terminale de Rrp9p n'a pas été résolue. B. Superposition des structures des domaines propeller de Rrp9p (représentée en rouge) et U3-55K (représentée en vert, PDB : 4J0W ; Zhang *et al*, 2013). **B.** Superposition de la structure du domaine propeller de Rrp9p (représentée en rouge) et du modèle du domaine propeller (représenté en jaune) établi au laboratoire par C. Charron.

l'association entre la protéine Rrp9p et la snoRNP U3 (Zhang et al, 2013). Des délétions de différents sous-domaines WD40 entrainent une abolition de la croissance cellulaire, un défaut d'association au snoARN U3 et une perte de la localisation nucléolaire de la snoRNP U3 (Granneman et al, 2002 ; Lukowiak et al, 2000). Tous les résidus présents dans les boucles externes des sous-domaines WD40 de la structure « helix propeller » ne sont cependant pas essentiels à la fonction de la protéine Rrp9p/U3-55K. La mutation d'un certain nombre d'entre eux n'entrainant pas de défaut de croissance cellulaire marqué (Zhang et al, 2013).

### I.3. L'association de la protéine Rrp9p au sein de la snoRNP U3

La protéine Rrp9p/U3-55K s'associe au snoARN U3 au niveau du motif B/C (Clery et al, 2007 : Venema et al, 2000 ; Granneman et al, 2000, 2002 ; Lukowiak et al, 2000). Nous avons vu précédemment que les motifs C'/D et B/C spécifiques du snoARN U3, situés au niveau de son domaine 3', diffèrent légèrement des motifs canoniques C/D retrouvés au sein de l'ensemble des snoARN à boîtes C/D (**Fig. 10**). Ces différences entrainent des spécificités d'interactions propres à la snoRNP U3.

La protéine Rrp9p/U3-55K n'est pas capable de s'associer directement et efficacement au motif B/C. Elle requiert l'association préalable de la protéine Snu13p/15.5K au niveau du motif, ce qui permet d'améliorer son affinité pour ce dernier (Clery et al, 2007 ; Zhang et al, 2013 ; Lukowiak et al, 2000 ; Granneman et al, 2000, 2002). La protéine Rrp9p/U3-55K contacte donc simultanément le motif B/C et la protéine Snu13p/15.5K. Comme c'est le cas pour les protéines se fixant au niveau des motifs C/D, le rôle de la protéine Snu13p/15.5K serait de favoriser la formation de la structure en K-turn faisant ainsi apparaître les éléments de reconnaissance du snoARN U3 pour la protéine Rrp9p/U3-55K. L'association de la protéine Rrp9/U3-55K au niveau du motif B/C de la snoRNP U3 est dépendante de la présence des sous-domaines WD40 du domaine propeller (Lubben et al, 1993 ; Lukowiak et al, 2000 ; Venema et al, 2000 ; Granneman et al, 2002). Plus précisément, il a été montré *in vitro* par des expériences de retard sur gel (EMSA) que la boucle 7bc conservée (**Fig. 22**) est impliquée dans l'association de Rrp9p au niveau du complexe Snu13p/snoRNA U3 B/C (Zhang et al, 2013). De plus, la

délétion de cette boucle entraine de forts défauts de croissance, traduisant son importance pour la fonction de la protéine Rrp9 et son assemblage dans la particule U3 (Zhang et al, 2013).

Bien que l'interaction directe entre U3-55K et 15.5K soit de faible stabilité, il a pu être montré que les résidus A88 et R91 de 15.5K sont impliqués dans l'interaction avec U3-55K (Schultz et al, 2006). Au laboratoire, N. Rolland a montré que le résidus R89 de la protéine Snu13p, correspondant au résidu R91 de la protéine 15.5K chez l'homme, est essentiel à la croissance de la levure et requis pour l'association avec Rrp9p, confirmant les données obtenus chez l'homme (thèse de N. Rolland). De plus, les résidus Q18 et/ou Q19 de Snu13p sont également impliqués dans l'interaction avec Rrp9p, bien que leur délétion n'entraine pas de défaut de croissance. N. Rolland a également identifié deux mutants de la protéine Rrp9p incapables d'interagir avec la protéine Snu13p, ce qui a permis de conclure que certains des résidus D409/D410/F411/H412 et S484/N485/V486 sont sans doute requis pour l'association avec Snu13p (thèse de N. Rolland).
De nombreux éléments de reconnaissance du motif B/C sont également cruciaux pour l'association avec la protéine Rrp9p/U3-55K. Le motif B/C est conservé au sein de l'ensemble des organismes eucaryotes et présente des différences par rapport aux motifs C/D classiques, lui conférant une spécificité d'interaction avec la protéine Rrp9p. En effet, A. Clery a montré que la présence d'un résidu G en position 1, d'une hélice I très courte formée par un seul appariement, ainsi qu'un appariement C9-G12 au niveau de l'hélice II inversé par rapport à l'hélice II des motifs C/D sont nécessaires à l'association de la protéine Rrp9p au snoARN U3 et à la fonctionnalité de la snoRNP U3 (**Fig. 23**) (Clery et al, 2007).

Ces caractéristiques du motif B/C sont bien dédiées à la fixation de Rrp9p, puisqu'elles ne sont pas requises pour la fixation de Snu13p. En particulier, une extension de la taille de l'hélice I favorise l'association de Snu13p mais diminue les capacités de fixation de Rrp9p (Clery et al, 2007).
De plus, il a été montré que la protéine Rrp9p interagit également avec les hélices 2 et 4 localisées autour du motif B/C (**Fig. 23**) (Clery et al, 2007 ; Venema et al, 2000 ; Granneman et al, 2009). Cependant, les hélices 2 et 4 du snoARN U3 de levure ne sont pas requises pour la viabilité cellulaire et ne sont donc pas essentielles au recrutement de la protéine Rrp9 au sein de la snoRNP U3 *in vivo*, suggérant que ces

**Figure 23 : Déterminants requis pour l'association de la protéine Rrp9p au sein de la snoRNP U3**

Les déterminants nécessaires au recrutement de la protéine Rrp9p au sein de la snoRNP U3 sont encadrés en bleu et rappelés dans le petit encart (Cléry *et al*, 2007 ; Venema *et al*, 2000 ; Granneman *et al*, 2009). Les résidus des protéines Snu13p et Rrp9p importants pour leur association sont indiqués par une petite tige terminée par une boule.

interactions ont plutôt un rôle stabilisateur (Clery et al, 2007 ; Samarsky & Fournier, 1998 ; Venema et al, 2000).

On peut noter qu'en général, le domaine propeller retrouvé dans d'autres protéines possédant des fonctions différentes de celles de Rrp9/U3-55K, établit préférentiellement des interactions avec des partenaires protéiques et non pas des acides nucléiques. Le fait que les protéines Rrp9p et U3-55K interagissent directement avec des régions du snoARN U3 est un des rares exemples connus où un tel domaine s'associe avec des acides nucléiques (Granneman et al, 2002).

## II. Fonction de la protéine Rrp9

Dans une souche de levure n'exprimant plus la protéine Rrp9, la protéine U3-55K est capable de complémenter partiellement l'absence de celle-ci et permet la reprise de la croissance à 30°C (Venema et al, 2000). Des expériences de sédimentation en gradients de saccharose d'un extrait de levure ont montré que Rrp9p sédimente majoritairement au niveau de deux types de complexes : des complexes de faible poids moléculaire (12S), correspondants aux particules snoRNP U3 libres et des complexes de haut poids moléculaire (80-90S), correspondants aux processomes (Grandi et al, 2002). Un profil similaire est observé pour le snoARN U3 (Billy et al, 2000 ; Granneman et al, 2003 ; Tyc et al, 1989), confirmant l'implication de la protéine Rrp9 au sein du processome en tant que composant de la snoRNP U3. La protéine Rrp9p/U3-55K est vraisemblablement associée au snoARN U3 pour pouvoir jouer un rôle au sein du processome. La fonction précise de la protéine Rrp9/U3-55K demeure néanmoins méconnue. Mon travail de doctorat a en partie consisté à essayer de caractériser plus finement la fonction de la protéine Rrp9 de levure.

### II.1. Rôle dans la formation de la snoRNP U3

La protéine Rrp9 n'est pas décrite comme étant essentielle à la stabilité du snoARN U3 mais plutôt requise pour la fonction de la snoRNP U3 (Venema et al, 2000 ; Marmier-Gourrier et al, 2011 ; Clery et al, 2007 ; Samarsky & Fournier, 1998). Au contraire, chez l'homme, la protéine U3-55K est décrite comme essentielle à la stabilité du snoARN U3, ainsi qu'à la formation de la snoRNP U3 (Knox et al, 2011). Des altérations du motif B/C conduisent également à une diminution de la stabilité du

snoARN U3 des vertébrés (Knox et al, 2011). Le motif C'/D est sous-optimal chez l'homme, du fait de la présence d'une guanine en position 3 de la structure en K-turn au lieu d'une uridine et d'une adénine en position 8 au lieu d'une uridine (**Fig. 10**) (Turner et al, 2005 ; Watkins et al, 2000). L'association de la protéine 15.5K au niveau du motif C'/D structuré en K-turn est ainsi plus faible, ce qui entraine par la même occasion l'association moins efficace des autres protéines cœur au niveau du motif C'/D (Knox et al, 2011). Si l'on restaure la séquence consensus de la boîte C', l'affinité optimale des protéines cœur est retrouvée. D'autre part, il a été montré par immunosélection que la protéine U3-55K est capable d'interagir avec les protéines NOP56 et NOP58 (Knox et al, 2011). Ainsi, la protéine U3-55K, associée au niveau du motif B/C, pourrait favoriser et stabiliser l'association des protéines NOP56 et NOP58 au niveau du motif C'/D en établissant des interactions avec celles-ci (Knox et al, 2011). Nous avons déjà mentionné que le motif C'/D du snoARN U3 de levure est aussi sous-optimal (présence d'une uridine au lieu d'une purine en position 2 de la structure en K-turn (**Fig. 10 et 23**), ce qui diminue l'affinité pour Snu13p (Marmier-Gourrier et al, 2003 ; thèse de N. Rolland). Là aussi, l'association de Rrp9p au motif B/C doit renforcer la stabilité des protéines cœur sur le motif C'/D. Il s'agit sans doute d'une propriété commune à toutes les espèces. Ceci explique le fait que des mutations dans le site de fixation de Rrp9p sur le snoARN U3, comme la mutation de l'appariement G-C de l'hélice II ou le changement de la longueur de l'hélice I (**Fig. 10 et 23**), entraînent une diminution de 50% de la stabilité du snoARN U3 (Clery et al, 2007). De plus, au cours de mes travaux de thèse, j'ai montré que l'absence de la protéine Rrp9p conduit à une forte diminution du taux de snoARN U3. Un autre argument en faveur de cette hypothèse est l'observation du fait que la distance séparant les deux motifs C'/D et B/C doit être conservée pour que le snoARN U3 soit stable et fonctionnel, en étant compatible avec les interactions putatives entre Rrp9p et les protéines coeur (thèses de N. Marmier-Gourrier et N. Rolland). Il est vraisemblable que si la protéine Rrp9p est absente ou incapable de s'associer au snoARN U3, la snoRNP U3 n'est pas incorporée dans le processome et prise en charge par un système de dégradation. La présence de motifs C'/D sous optimaux dans le snoARN U3, nécessitant la coopération des protéines U3-55K et Rrp9p avec les protéines cœur, représente probablement un moyen de régulation du taux de synthèse de la snoRNP U3 (Knox et al, 2011).

## II.2. Rôle dans la maturation du pré-ARNr 35S au sein du processome

La déplétion de la protéine Rrp9/U3-55K conduit à l'accumulation des pré-ARNr 35S et 23S, ainsi qu'à la diminution des pré-ARNr 27SA2 et 20S et de l'ARNr mature 18S. Par contre, les taux du pré-ARNr 27SB et des ARNr matures 25S et 5,8S restent constants (Venema et al, 2000 ; Lukowiak et al, 2000 ; Granneman et al, 2000, 2002 ; Watkins et al, 2000, 2002). Ce phénotype est identique à celui obtenu en cas de déplétion de la majorité des composants du processome, y compris la snoRNP U3 (Hughes & Ares, 1991 ; Jansen et al, 1993; Dunbar et al, 1997 ; Lee & Baserga, 1999 ). Des mutants du snoARN U3 empêchant l'association de la protéine Rrp9p présentent le même phénotype, indiquant une implication forte de la protéine Rrp9p dans la fonction de la snoRNP U3 (Clery et al, 2007), en particulier pour les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 du pré-ARNr 35S. Par contre, elle n'est pas impliquée dans les étapes de maturation tardives permettant la production des ARNr 25S et 5,8S et la synthèse de la grande sous-unité ribosomique 60S.

Le rôle exact de la protéine Rrp9p/U3-55K dans la maturation du pré-ARNr 35S au sein du processome n'est cependant pas connu. Elle pourrait être impliquée dans le recrutement de la snoRNP U3 au sein du processome, afin que le snoARN U3 puisse établir les appariements nécessaires avec le pré-ARNr 35S. On peut aussi imaginer qu'elle soit impliquée dans la formation et la fonction du processome en permettant le recrutement de différents facteurs nécessaires, à l'organisation structurale du processome ou à la réalisation des clivages, ou encore à l'association de facteurs nécessaires à la stabilité des appariements formés entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S.

Chez l'homme, il a été montré que des mutations dans la boîte C du motif B/C, qui abolissent l'association de la protéine U3-55K, conduisent à l'abolition du recrutement de la snoRNP U3 au sein du processome (Granneman et al, 2004). En revanche, les appariements établis entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S ne semblent pas requis pour l'incorporation de la snoRNP U3 au sein du processome (Granneman et al, 2004). Ceci suggère que la protéine U3-55K, en interaction avec le motif B/C, est responsable du recrutement de la snoRNP U3 au sein du processome, et constitue une plateforme essentielle au recrutement d'autres facteurs du processome (Leary et al, 2004). Il a également été montré que le complexe

Mpp10 n'intervenait pas dans l'association de la snoRNP U3 au sein du processome, ce qui est en accord avec le fait que le complexe Mpp10 requiert les appariements entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S pour son association dans le processome et que cette association se déroulerait tardivement dans la formation du processome (Granneman et al, 2004 ; Perez-Ferandez et al, 2007, 2011 ; Marmier-Gourrier et al, 2011 ; Gerczei & Correll 2004). Par conséquent, la protéine U3-55K, en se fixant au niveau du motif B/C, permet sans doute le recrutement de la snoRNP U3 au sein du processome et ainsi la formation des appariements avec le pré-ARNr 35S, qui seraient ensuite stabilisés par le complexe Mpp10.

D'autre part, les partenaires de la protéine Rrp9/U3-55K au sein du processome ne sont pas identifiés précisément. Des analyses à grande échelle, basées majoritairement sur la purification de complexes à partir d'une protéine étiquettée, et l'emploi de la spectrométrie de masse, ont permis d'identifier des complexes de protéines où était présente la protéine Rrp9, permettant ainsi d'identifier des partenaires potentiels (**site SGD : http://www.yeastgenome.org/locus/S000006341/interaction**). La majorité des protéines identifiées correspondent aux composants du processome mais ces analyses ne permettent pas d'identifier avec précision les partenaires spécifiques de la protéine Rrp9. De plus, le caractère direct ou indirect des associations identifiées n'a pas été déterminé. Des comparaisons de banques de données d'interactions protéines/protéines (PPI) ont également été réalisées (**Fig. 18**) (Lim et al, 2011).

A ce jour, un seul partenaire spécifique a été identifié pour la protéine Rrp9p. Il s'agit de la protéine Sgd1 (Lim et al, 2011 ; Tarassov *et al*, 2008). Le fait que très peu de données soient disponibles sur les partenaires de la protéine Rrp9p complique la caractérisation de sa fonction.

Il est important de noter que, par co-immunoprécipitation, la protéine Rrp9p a été retrouvée associée aux pré-ARNr 27SA2, 27SB et 7S présents au sein des particules pré-60S. (Grandi et al, 2002). De plus, en purifiant des particules pré-60S à différents stades de maturation grâce à des protéines étiquetées, la protéine Rrp9p a également été retrouvée au sein d'une particule pré-60S précoce (Nissan et al, 2002). Ces résultats suggèrent qu'une fois que la snoRNP U3 est dissociée de la particule pré-40S suite au clivage au site A2, la protéine Rrp9p pourrait rester

associée aux intermédiaires de maturation impliqués dans la voie de synthèse de l'ARNr 25S et 5,8S et serait donc présente au sein du complexe de maturation de la pré-60S. Une autre protéine est, elle, clairement impliquée à la fois dans la maturation de la petite et de la grande sous-unité ribosomiques, la protéine Rrp5p. Elle est impliquée dans les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2, nécessaires à la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique 40S, et dans le clivage au site A3, nécessaire à la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique 60S. La protéine Rrp5p est d'ailleurs retrouvée dans les mêmes particules pré-60S que la protéine Rrp9p (Nissan et al, 2002). En revanche, ces deux protéines ne sont plus retrouvées au sein des particules pré-60S tardives, suggérant leur dissociation après les étapes précoces de maturation de la particule pré-60S. On peut ainsi se demander si la protéine Rrp9p n'a pas également un rôle dans la maturation de la particule pré-60S. Néanmoins, sa déplétion ne semble pas perturber la maturation de la particule pré-60S

# Objectifs

Comme nous venons de le voir, la biogenèse des ribosomes est un processus complexe et dynamique requérant l'intervention d'une multitude de facteurs d'assemblage et de maturation pour permettre la maturation du pré-ARNr et l'assemblage ordonné des protéines ribosomiques au niveau des pré-ARNr. Cette biogenèse débute par la transcription par l'ARNr polymérase I du pré-ARNr 35S, précurseur des ARNr 18S, 5,8S et 25S. Ce précurseur est alors soumis à une série de modifications enzymatiques et de clivages exo- et endonucléolytiques. Ces étapes de maturation dépendent d'un ensemble de snoRNP à boîtes H/ACA et C/D, la RNAse MRP, ainsi que de nombreux facteurs d'assemblage et de maturation. La formation des sous-unités ribosomiques matures 40S et 60S met en œuvre deux processus d'assemblage distincts l'un de l'autre. La formation de la petite sous-unité ribosomique 40S, contenant l'ARNr 18S, se déroule au sein du SSU-processome 90S, où ont lieu les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 (chez la levure). L'assemblage du SSU-processome 90S se déroule de manière séquentielle avec le recrutement successif de différents sous-complexes, formant un cœur structural, et de facteurs impliqués dans la maturation du futur ARNr 18S. La snoRNP U3, appartenant à la famille des snoRNP à boîtes C/D, est essentielle aux clivages précoces du pré-ARNr. Par rapport aux autres snoARN à boîtes C/D, elle a la particularité d'avoir une longue extension en 5', qui s'apparie au pré-ARNr, et de posséder une boîte B/C, qui fixe la protéine Snu13p et une protéine spécifique de la snoRNP U3, la protéine Rrp9p. La protéine Rrp9p présente deux régions, un domaine N-terminal contenant des sites NLS impliqués dans sa localisation nucléaire, et un domaine C-terminal structuré en « hélix propeller », pouvant former une plateforme d'interaction avec différents partenaires. Bien que l'implication du snoARN U3 dans les clivages A0, A1 et A2, par les appariements qu'il établit avec le pré-ARNr 35S formant les hélices I, II, III, V et VI, soit assez bien caractérisé, le rôle de la protéine Rrp9 n'a pas été clairement identifié. Ainsi, l'objectif principal de mon travail de doctorat a consisté en l'étude plus approfondie de la fonction de la protéine Rrp9 de *Saccharomyces cerevisiae*. Plusieurs questions se posaient à nous :

- La protéine Rrp9 est-elle impliquée dans la formation de la snoRNP U3 mature?

- La protéine Rrp9 est-elle impliquée dans le recrutement de la snoRNP U3 au niveau de l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S au sein du processome ?
- La protéine Rrp9 est-elle impliquée dans l'assemblage et la fonction du processome en permettant l'association d'autres facteurs via son domaine propeller, supposé être une plateforme d'interaction protéine/protéine ? Permettrait-elle ainsi de recruter des facteurs possédant des fonctions précises, nécessaires aux clivages aux sites A0, A1 et A2, tels que des endonucléases, des ARN hélicases, la GTPase Bms1 ou encore le complexe Mpp10 ?

Afin de répondre à ces questions et de progresser dans la connaissance du mode d'action de la protéine Rrp9, nous avons tout d'abord entrepris d'identifier des résidus de la protéine Rrp9 potentiellement impliqués dans sa fonction. Pour cela, un modèle du domaine « hélix propeller » a été proposé au laboratoire par C. Charron et N. Rolland. Ce modèle a été confirmé par la résolution de la structure tridimensionnelle par radiocristallographie (Zhang *et al*, 2013). Des résidus de surface conservés entre Rrp9p et U3-55K, situés au sein de boucles entre les différents domaines WD40, ont alors été mutés par série de deux ou trois, générant alors une petite bibliothèque de mutants de la protéine Rrp9p (thèse de N. Rolland). Afin d'étudier directement la fonctionnalité de ces mutants, nous avons généré une souche de levure, où l'expression de la protéine Rrp9p endogène peut être réprimée. Ce qui permettait de n'exprimer que les mutants de Rrp9p. En réalisant des tests de croissance, nous avons ainsi identifié un résidu important pour la fonction de la protéine Rrp9p, le résidu R289.

Une première question qui se posait était d'identifier à quel(s) niveau(x) ce résidu intervenait dans la fonction de la protéine Rrp9p. Il s'est avéré qu'en présence de la mutation, la maturation du pré-ARNr 35S était fortement perturbée au niveau des sites de clivages A1 et A2, conduisant à l'accumulation du pré-ARNr 22S, corrélée à une diminution importante de l'ARNr 18S et donc de la petite sous-unité 40S.

Une deuxième question qui se posait était de savoir si ce défaut de maturation était du à une instabilité du mutant de la protéine Rrp9p ou bien à un défaut de d'assemblage de la snoRNP U3.

Une troisième question qui se posait était de déterminer où et à quelles étapes le résidu R289 intervenait dans la maturation du pré-ARNr 35S. La protéine Rrp9p étant un composant essentiel du processome, on pouvait imaginer que le résidu R289 soit impliqué dans l'association avec un ou plusieurs partenaires requis pour les clivages aux sites A1 et A2. Cependant, les partenaires de la protéine Rrp9p au sein du processome n'étaient pas identifiés clairement. Nous avons alors tout d'abord déterminé quels pourraient être les partenaires potentiels de Rrp9p au sein du processome. Une fois ces partenaires identifiés, nous avons analysé si le résidu R289 de Rrp9p était impliqué dans leur interaction avec Rrp9p. Dans la même logique, la snoRNP U3 étant impliquée dans des appariements avec le pré-ARNr 35S, le résidu R289 de Rrp9p pouvait être impliqué directement, ou indirectement, via l'association avec un facteur du processome, dans la formation ou la stabilisation de ces appariements, requis pour les clivages aux sites A0, A1 et A2. Nous avons alors déterminé s'il existait un lien fonctionnel entre ces appariements et le résidu R289.

# Matériels et Méthodes

# I. Matériel

## I.1. Souches de cellules

### *I.1.A. Souches de bactéries E. coli*

| Souches : | Génotype : | Utilisation : |
|---|---|---|
| DH5α | *sup*E44, Δ*lac*U169 (Φ80 *lac*ZΔM15), *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *rel*A1 | Préparation de plasmides |
| DB3.1 | F-*gyr*A462 *end*A1Δ(*sr*1-*rec*A) *mcr*B *hsd*S20(rb$^-$, mb$^-$) *sup*E44 *ara*-14 *gal*K2 *lac*Y1 *pro*A2 *rps*L20(smR) *xyl*-5 λ-*Leu mtl*1 | Préparation de plasmides contenant le gène CcdB |
| BL21 DE3 pRARE2 | F$^-$ *omp*T *hsd*S (rb$^-$, mb$^-$) *dcm* + Tet$^r$gal λ (DE3) *end*A Hte [*arg*U *ile*Y *leu*W Cam$^r$] | Surproduction de protéines |

### *I.1.B. Souches de levures S. cerevisiae*

| Souches : | Génotype ; | Utilisation : |
|---|---|---|
| W303 (Mat a) | *trp1*-Δ63; *his3*-Δ200; *ura3*–52; *lys2*–801; a*de2*– 101; *leu2*-Δ1 | Souche de départ pour générer la souche W303::pGAL-RRP9 |
| W303::pGAL-RRP9 (Mat a) | *trp1*-Δ63; *his3*-Δ200; *ura3*–52; *lys2*–801; a*de2*– 101; *leu2*-Δ1; *HIS3::GAL10::*RRP9 | Caractérisation phénotypique du mutant Rrp9 R289A |
| JH84 (Mat a) | snr17a.Gal$^d$:*URA*3; snr17b::*LEU*2 ; *his*3; *ade*2; *can*1 | Souche de départ pour générer la souche JH84::pGAL-RRP9 |
| JH84::pGAL-RRP9 (Mat a) | snr17a.Gal$^d$:*URA*3; snr17b::*LEU*2 ; *his*3; *ade*2; *can*1; *trp3*::KanMX6; HIS3::GAL10::RRP9 | Etude de liens fonctionnels entre les appariements snoARNU3/pré-ARNr 35S et le mutant Rrp9 R289A par synthétique létal |
| Y187 (Mat α) | *gal4*Δ *gal80*Δ *ade2*-101 *his3*-200 *leu2-3,*112 *lys2*-801 *trp1*-901 *ura3*-52, *URA3*::Gal1UAS GAL1TATA-*LacZ*, *LYS2*::GAL1UASHisTATA-*HIS3* | Etude des partenaires de Rrp9 WT et R289A par double hybride |
| CG1945 (Mat a) | *gal4*Δ *gal80*Δ *ade2*-101 *his3*-200 *leu2-3,*112 *lys2*-801 *trp1*-901 *ura3*-52, *URA3*::Gal1UAS GAL1TATA-*LacZ*, *LYS2*::GAL1UASHisTATA-*HIS3* | Etude des partenaires de Rrp9 WT et R289A par double hybride |

## I.2. Plasmides

**pCR®-Blunt** (3,5 kpb ; Invitrogen Life Technologies) : Ce plasmide a été utilisé dans un premier temps pour sous-cloner des fragments PCR correspondant à l'ORF de la protéine Rrp9 WT, puis dans un deuxième temps réaliser des mutagenèses dirigées pour obtenir les mutants de la protéine Rrp9. Après digestion par des enzymes de restriction, ces ORF ont été clonés dans le plasmide pG1::PROTA. Le plasmide pCR®-Blunt est commercialisé sous forme linéarisée portant des extrémités franches permettant l'insertion de fragment PCR à bout francs. Il contient une origine de réplication High copy *rep*, des gènes de résistance à la kanamycine et à la zeocine, le gène toxique *ccdB*, ainsi qu'une région du gène *lacZ*, permettant l'expression de la β-galactosidase, sous le contôle du promoteur P*lac* et interrompu par la cassette de clonage en 5'.

**pDONR™ 207** et **pDONR™ 221** (5,6 kpb ; Invitrogen Life Technologies) : Ces plasmides ont été utilisés pour cloner par la technique Gateway® des fragments PCR correspondant aux ORF des protéines du processome, ainsi que des domaines de ces protéines. Après une première réaction de recombinaison (BP), ces ORF ont été clonés par la technique Gateway® dans divers plasmides compatibles et permettant l'expression des protéines chez la levure. Les plasmides pDONR™ 207 et pDONR™ 221 contiennent une origine de réplication High copy *rep*, un gène de résistance à la gentamycine, le gène toxique *ccdB* suivi du gène de résistance au chloramphénicol, bordés par les séquences de recombinaison attP1 et aatP2.

**pG1::PROTA** (7,4 kpb ; Addgene) : Ce plasmide a été utilisé pour cloner les fragments ADN provenant du pCR®-Blunt correspondant aux ORF de la protéine Rrp9 WT et mutants, digérés par les enzymes de restriction BamHI et SalI. Il permet alors l'expression chez la levure de la protéine Rrp9 WT ou mutant étiquettée ProtA afin d'étudier sa fonction par diverses techniques expérimentales. Le plasmide pG1::PROTA contient une origine de réplication High copy *rep*, permettant son amplification chez la bactérie, ainsi qu'une origine de réplication low copy ARS/CEN, permettant quant à elle sa réplication chez la levure. Il contient également un gène

de résistance à l'ampicilline et un gène d'auxotrophie TRP1. De plus, il contient un promoteur GPD, suivi de l'étiquette PROTA, et un terminateur PGK.

**pASZ11** (9 kpb ; Stotz & Linder, 1990) : Ce plasmide a été utilisé pour l'expression du snoARN U3 WT et mutants chez la levure. Il contient une origine de réplication High copy *rep* et low copy ARS/CEN permettant sa réplication chez la bactérie et la levure respectivement. Il contient également un gène de résistance à l'ampicilline, un gène d'auxotrophie ADE2 et le promoteur du snoARN U3, permettant son expression.

**pACT2, PGBKT7** et **pAS2** (8,1 kpb, 7,3 kpb et 8,4 kpb ; Clontech) : Ces plasmides ont été utilisés pour tester les interactions entre les protéines d'intérêts par la technique de double hybride. Au laboratoire, ces plasmides ont été modifiés afin de les rendre compatible avec la technique de clonage Gateway®. Le plasmide pACT2 permet l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée au domaine d'activation de la transcription du facteur Gal4 (Gal4-AD) au niveau de la région N-terminale, tandis que les plasmides pGBKT7 et pAS2 permettent l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée au domaine de fixation à l'ADN du facteur Gal4 (Gal4-BD) au niveau de la région N-terminale. L'expression de ces protéines est sous le contrôle du promoteur ADH1 et du terminateur ADH1. Les plasmides pACT2 et pAS2 contiennent une origine de réplication High copy *ColE1* et high copy 2 permettant sa réplication chez la bactérie et la levure respectivement. Le plasmide PGBKT7 contient une origine de réplication High copy *rep* et high copy 2 permettant sa réplication chez la bactérie et la levure respectivement. Le plasmide pACT2 contient un gène de résistance à l'ampicilline et un gène d'auxotrophie LEU2 tandis que les plasmides pGBKT7 et pAS2 contiennent un gène de résistance à la kanamycine et l'ampicilline respectivement et un gène d'auxotrophie TRP1.

**pnEA-3CH** et **pnCS** (5,8 kpb, 3,5 kpb ; Diebold, 2011) : Ces plasmides ont été utilisés pour tester les interactions entre les protéines d'intérêts par la technique de co-expression. De plus, le plasmide pnCS a été utilisé pour la production de

protéines radiomarquées au $^{35}S$ dans des extraits S30 de *E. coli*. Ces plasmides ont été modifiés au laboratoire afin de les rendre compatibles avec la technique de clonage Gateway®. Dans ce cas, les plasmides contiennent alors le gène de résistance au chloramphénicol et le gène toxique *ccdB*, bordés par les séquences de recombinaison attR1 et attR2. Le plasmide pnEA-3CH permet l'expression de protéines étiquetées 6-His au niveau de l'extrémité N-terminale, tandis que le plasmide pnCS permet l'expression de protéines non étiquetées. Ces deux plasmides contiennent une origine de réplication High copy *rep*, un gène lacI, un promoteur et un terminateur T7 et un site RBS (Ribosome Binding Site). Le plasmide pnEA-3CH contient un gène de résistance à l'ampicilline et contenait au départ un site de coupure à la protéase thrombine situé entre l'étiquette 6-His et l'ORF de la protéine d'intérêt, mais celui-ci a été modifié au laboratoire pour correspondre à un site de coupure à la protéase PreScission™. Le plasmide pnCS contient un gène de résistance à la spectinomycine.

**pDEST™ 15** et **pDEST™ 17** (7 kpb et 6,4 kpb ; Invitrogen Life Technologies) : Ces plasmides ont été utilisés pour la production et la purification des protéines d'intérêts chez *E. coli*. Le plasmide pDEST™ 15 permet l'expression de protéines fusionnées à l'étiquette GST alors que le plasmide pDEST™ 17 permet l'expression de protéines fusionnées avec l'étiquette 6-His. Ces plasmides sont compatibles avec le système Gateway® et contiennent ainsi le gène de résistance au chloramphénicol et le gène toxique *ccdB*, bordés par les séquences de recombinaison attR1 et attR2. De plus, ils contiennent une origine de réplication High copy *rep*, le promoteur et le terminateur T7, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline.

**pTL26** (5,6 kpb) : Ce plasmide a été utilisé comme matrice ADN pour amplifier par PCR un fragment contenant le gène d'auxotrophie HIS3 suivi du promoteur GAL10, bordés de séquences complémentaires à celles en amont de l'ORF des gènes. Ce fragment est ensuite inséré par recombinaison homologue dans le génome de la levure afin de placer l'expression de la protéine Rrp9 endogène sous le contrôle du promoteur GAL10. Il contient une origine de réplication High copy *rep* et low copy ARS/CEN permettant sa réplication chez la bactérie et la levure respectivement. Il

contient également un gène de résistance à l'ampicilline et un gène d'auxotrophie HIS3.

## I.3. Oligonucléotides

| N° | Séquence | Utilisation |
|---|---|---|
| 2128 | GGATCCTCTAGAAAAGATGTCAGA | oligo 5' pour amplifier le gène RRP9 sans son promoteur en amont avec une extrémité BamHI |
| 2134 | GTCGACCTAAAAGCCTGTTTGGTC | oligo 3' pour amplifier le gène RRP9 avec une extémité SalI |
| 3165 | CATTTCAAAATTATAGAAAA | oligo pour séquencer promo+gène RRP9 : 30 nt en amont de l'ATG |
| 3166 | ATCGACGAGTACAACAATTT | oligo pour séquencer gène RRP9 : 300 nt en aval de l'ATG |
| 3249 | GCCATTATGACGAAATCTTA | oligo pour séquencer gène RRP9 : 700 nt en aval de l'ATG |
| 3250 | GCTACTAAGGAGATGGATGA | oligo pour séquencer gène RRP9 : 1100 nt en aval de l'ATG |
| 3251 | GCAGCCTCACCAGCTGGTGCAGCTGT TGTCACAGGTGG | Mutagenèse D247A,K249A et Y247A dans la protéine Rrp9p |
| 3252 | CCACCTGTGACAACAGCTGCACCAGC TGGTGAGGCTGC | Mutagenèse D247A,K249A et Y247A dans la protéine Rrp9p |
| 6203 | GTTGTCACAGGTGGAGCAGATGCGAA GTTAATTGTATGG | Mutagenèse R256A et R258A dans la protéine Rrp9p |
| 7207 | CCATACAATTAACTTCGCATCTGCTCC ACCTGTGACAAC | Mutagenèse R256A et R258A dans la protéine Rrp9p |
| 7208 | GTTTTATCGTTGGCTTTTGCAGCAAAT TCTGATCAGTTATAT | Mutagenèse R289A, K290A dans la protéine Rrp9p |
| 7209 | ATATAACTGATCAGAATTTGCTGCAAA AGCCAACGATAAAAC | Mutagenèse R289A, K290A dans la protéine Rrp9p |
| 7210 | ATATCTGCGTTGGCGGCGGCAAGGTG TGTTACCGTT | Mutagenèse M333, E334 dans la protéine Rrp9p |
| 7211 | AACGGTAACACACCTTGCCGCCGCCA ACGCAGATAT | Mutagenèse M333, E334 dans la protéine Rrp9p |
| 7212 | GTTACCGTTGGTGCCGCTGATGCAAC AGCTATGCTTTGG | Mutagenèse R342, R344 dans la protéine Rrp9p |
| 7213 | CCAAAGCATAGCTGTTGCATCAGCGG CACCAACGGTAAC | Mutagenèse R342, R344 dans la protéine Rrp9p |
| 7214 | GCTATGCTTTGGGCGATTCCTGACGC GACCGCACTAACATTTAGAGGT | MutagenèseK350, E354, R356 dans la protéine Rrp9p |
| 7215 | ACCTCTAAATGTTAGTGCGGTCGCGT CAGGAATCGCCCAAAGCATAGC | MutagenèseK350, E354, R356 dans la protéine Rrp9p |
| 7216 | TTTATAACAGGCTCCGCTGCTGGTAAT ATATGTCTATGG | Mutagenèse D418A, N419A dans la protéine Rrp9p |
| 7217 | CCATAGACATATATTACCAGCAGCGG AGCCTGTTATAAA | Mutagenèse D418A, N419A dans la protéine Rrp9p |
| 7218 | GAAATTGCTACAACCAGCTTGGATCAC ATCTCTT | Mutagenèse F473A dans la protéine Rrp9p |

| | | |
|---|---|---|
| 7219 | AAGAGATGTGATCCAAGCTGGTTGTAGCAATTTC | Mutagenèse F473A dans la protéine Rrp9p |
| 7220 | AATGTTTCAGGTGCCGCAGCTGGTATATATTCAGCT | Mutagenèse R560A, N561A dans la protéine Rrp9p |
| 7221 | AGCTGAATATATACCAGCTGCGGCACCTGAAACATT | Mutagenèse R560A, N561A dans la protéine Rrp9p |
| 7222 | CATCAATTCAAAGTTCTTTATTTCTTCTTTAGCATTTCAAAATTATAGAACTCTTGGCCTCCTCTAG | oligo 5' pour insertion du promoteur GAL en amont du gène RRP9 de S. cerevisiae (W303) par HIS3 + GAL 10 |
| 7223 | GATCTTTTCCTCTTTTTCTGTTGGGTAACATCTGACATCTTTTCTAGATTCGAATTCCTTGAATTTTCAAA | oligo 3' pour insertion du promoteur GAL en amont du gène RRP9 de S. cerevisiae (W303) par HIS3 + GAL 10 |
| 7224 | GGGGATCCCGATGGATCTGAAAACCTCATATAAAGGTA | oligo 5' de PCR utilisé pour cloner le gène codant la protéine Utp13 dans les vecteurs pACT2 et pGBKT7 en vue d'une expérience de double hybride avec Rrp9 |
| 7835 | GTCGACCTAGAATAGCTTATCCATTTCCACT | oligo 3' de PCR utilisé pour cloner le gène codant la protéine Utp13 dans les vecteurs pACT2 et pGBKT7 en vue d'une expérience de double hybride avec Rrp9 |
| 7836 | GTTTTATCGTTGGCTTTTGCAAAAAATTCTGATCAGTTATAT | oligo 5' de mutagenèse par PCR utilisé pour muter l'acide aminé R289A du gène codant la protéine Rrp9 |
| 8195 | ATATAACTGATCAGAATTTTTTGCAAAAGCCAACGATAAAAC | oligo 3' de mutagenèse par PCR utilisé pour muter l'acide aminé R289A du gène codant la protéine Rrp9 |
| 8196 | GTTTTATCGTTGGCTTTTAGAGCAAATTCTGATCAGTTATAT | oligo 5' de mutagenèse par PCR utilisé pour muter l'acide aminé K290A du gène codant la protéine Rrp9 |
| 8516 | ATATAACTGATCAGAATTTGCTCTAAAAGCCAACGATAAAAC | oligo 3' de mutagenèse par PCR utilisé pour muter l'acide aminé R290A du gène codant la protéine Rrp9 |
| 8517 | CAAGGAATTCGTCTTCTTTAGC | Oligo 5' (ANCIEN 2547) s'hybridant sur une partie du pGAL et une partie de la séquence en amont de l'ORF de Rrp9p. Vérification de la bonne insertion du pGAL en amont de l'ORF de Rrp9 |
| 8518 | GTAACACCTGGTCCTGTACCG | Oligo 5' (ANCIEN 3249) s'hybridant sur le promoteur de l'ORF de Rrp9p. Vérification de la bonne insertion du pGAL en amont de l'ORF de Rrp9 |
| 8519 | GTCTCTCGCCAATATTTAGC | Oligo antisens s'hybridant sur l'ARNr 25S (3571 à 3590) utilisé en Northern blot |
| 8520 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATCAGATGTTACCCAACAGAAAAAG | Oligo 5' Amplification ORF Rrp9 pour insertion dans plasmide donneur pDONR 207 (système GateWay) |
| 8521 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAAAAGCCTGTTTGGTCAATG | Oligo 3' Amplification ORF Rrp9 pour insertion dans plasmide donneur pDONR 207 (système GateWay) |
| 8522 | GGCTTTTAGAAAAAATTCTGAT**GCA**TTATATGCATCCTGCGC | Oligo 5' de mutagenèse **Q294A** au sein de la protéine Rrp9 (ATTENTION : ORF de départ : Rrp9 **WT** <--voir séquence oligo) |
| 8523 | GCGCAGGATGCATATAA**TGC**ATCAGAATTTTTTCTAAAAGCC | Oligo 3' de mutagenèse **Q294A** au sein de la protéine Rrp9 (ATTENTION : ORF de départ : Rrp9 **WT** <--voir séquence oligo) |
| 8524 | GGCTTTT**GCA**AAAAATTCTGAT**GCA**TTATATGCATCCTGCGC | Oligo 5' de mutagenèse **Q294A** au sein de la protéine Rrp9 (ATTENTION : ORF de départ : Rrp9 **R289A** <--voir séquence oligo) |
| 8525 | GCGCAGGATGCATATAA**TGC**ATCAGAATTTTT**TGC**AAAAGCC | Oligo 3' de mutagenèse **Q294A** au sein de la protéine Rrp9 (ATTENTION : ORF de départ : Rrp9 **R289A** <--voir séquence oligo) |
| 8663 | GAACAGCAAGGCCGAGTCTTCAG | Oligo 5' pour obtenir seulement le domaine propeller de Rrp9 (379-1722 nts / 127-573 aa) par mutagenèse par délétion |
| 8664 | CTGGATCCCCGGGGCCTCCATGGC | Oligo 3' pour obtenir seulement le domaine propeller de Rrp9 (379-1722 nts / 127-573 aa) par mutagenèse par délétion dans le pACT2 (hybridation en amont de l'ORF insérée) |
| 8665 | CATCGGGATCCCCGGGAATTCGGCC | Oligo 3' pour obtenir seulement le domaine propeller de Rrp9 (379-1722 nts / 127-573 aa) par mutagenèse par délétion dans le pGBKT7 (hybridation en amont de l'ORF insérée) |
| 8666 | TAAGCCTGCTTTTTTGTACAAAGTTGGC | Oligo 3' pour obtenir seulement le domaine propeller de Rrp9 (379-1722 nts / 127-573 aa) par mutagenèse par délétion dans le pDONOR207 (hybridation en amont de l'ORF insérée) |
| 8803 | GCTGTCATTGACCAAACAGGCTTTTAG | Oligo 5' pour obtenir seulement le domaine Nter de Rrp9 (1-378 nts / 1-126 aa) par mutagenèse par délétion |
| 8804 | CTAAGCAACGTCTTCTTTTAACCTGGACGC | Oligo 3' pour obtenir seulement le domaine Nter de Rrp9 (1-378 nts / 1-126 aa) par mutagenèse par délétion (codon stop rajouté) |

| | | |
|---|---|---|
| 8805 | GGGGGCCCGGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTCGTATTACTTTAAAAATCTGAAGCC | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Rrp36 avec un tag HA et un site de restriction pour SmaI |
| 8806 | CCCCCGTCGACCTACCTACGATTATGAAATTCAAATTGTTTAAAC | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Rrp36 avec un site de restriction pour SalI |
| 8838 | GGGGGCCCGGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTCAAAAAACAGATGGTATTAGAATTCC | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Sgd1 avec un tag HA et un site de restriction pour SmaI |
| 8839 | CCCCCGTCGACCTACGAATCTATATTTTCCAGTTCTTTGTC | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Sgd1 avec un site de restriction pour SalI |
| 8840 | GGGGGTCTAGAATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGTAGCTTCCACCAAAAGAAAGAGAG | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Rrp5 avec un tag HA et un site de restriction pour XbaI |
| 8841 | CCCCCATCGATTTATTCGTCTGCTTTTTGAGATTCATGGC | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Rrp5 avec un site de restriction pour ClaI |
| 8842 | GGGGGCCCGGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGTTAGAAAACTAAAGCATCATGAGC | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Imp3 avec un tag HA et un site de restriction pour SmaI |
| 8843 | CCCCCGTCGACTTATGAAAAATCAAAATCGTCGATTTGG | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Imp3 avec un site de restriction pour SalI |
| 8844 | GGGGGCCCGGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTCTAAGAAGACAAGCCCGTGAAAGGAG | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Imp4 avec un tag HA et un site de restriction pour SmaI |
| 8845 | CCCCCGTCGACTCACAAATAGTCTTTTTTATTGGCAGTCC | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Imp4 avec un site de restriction pour SalI |
| 8846 | GGGGGCCCGGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTCAGAACTCTTTGGAGTATTGAAATC | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Mpp10 avec un tag HA et un site de restriction pour SmaI |
| 8847 | CCCCCGTCGACTCAAAGTTTTATATTTGTGCTATCTGGCCC | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Mpp10 avec un site de restriction pour SalI |
| 8848 | GGGGGCCCGGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTACGCAATCCCTAGGTATCGAACAG | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Utp17 (UTP-A) avec un tag HA et un site de restriction pour SmaI |
| 8849 | CCCCCGTCGACCTATGTTAATACTTTCATCACACGATC | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Utp17 (UTP-A) avec un site de restriction pour SalI |
| 8850 | GGGGGCCCGGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAAATCCGATTTCAAGTTCTCTAACC | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Utp1/Pwp2 (UTP-B) avec un tag HA et un site de restriction pour SmaI |
| 8851 | CCCCCGTCGACTCAAGGAAGCTCTTTCTCATTTTCTTC | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Utp1/Pwp2 (UTP-B) avec un site de restriction pour SalI |
| 8852 | GGGGGCCCGGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGCTACAAGTGTTAAAAGAAAAGCATC | Oligo 5' pour amplifier l'ORF de Utp22 (UTP-C) avec un tag HA et un site de restriction pour SmaI |
| 8853 | CCCCCGTCGACCTAATCTGTCTCAAAATTTATAACCATG | Oligo 3' pour amplifier l'ORF de Utp22 (UTP-C) avec un site de restriction pour SalI |
| 8854 | ATTTCTTCCAATGGTAAACTGCTAGCGC | Oligo 5' pour séquencer Utp17 (UTP-A / hybridation 601-628) |
| 8855 | AGTTAACTATCAGTATTTAACATCAGGTG | Oligo 5' pour séquencer Utp17 (UTP-A / hybridation 1401-1429) |
| 8856 | CATGATCAGGAAAAAATCTACACTGTAAGC | Oligo 5' pour séquencer Utp1/Pwp2 (UTP-B / hybridation 601-630) |
| 8857 | GCTTTGTCCGGACATGAAGGCCCTGTTTCG | Oligo 5' pour séquencer Utp1/Pwp2 (UTP-B / hybridation 1402-1431) |
| 8858 | TCTTCCATTGATACTTTACTAACAATGCC | Oligo 5' pour séquencer Utp22 (UTP-C / hybridation 601-629) |
| 8859 | ATTTGATAAGTCAACCAAGGTCAATATTC | Oligo 5' pour séquencer Utp22 (UTP-C / hybridation 1401-1429) |
| 8860 | TGTTTGGTCTACATCCTCATCAGAGCCC | Oligo 5' pour séquencer Utp22 (UTP-C / hybridation 2001-2028) |
| 8861 | AGCGAATGCTAGGAATGAGTTGAAACCAG | Oligo 5' pour séquencer Utp22 (UTP-C / hybridation 2601-2629) |

| | | |
|---|---|---|
| 8862 | AGCTAAAGTA GCCGTGAATC TTTTACAGAC | Oligo 5' pour séquencer Utp22 (UTP-C / hybridation 3201-3230) |
| 8863 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGCTACAAGTGTTAAAAGAAAAG CATCTGAG | Oligo 5' Gateway pour amplifier l'ORF de Utp22 (UTP-C) |
| 8864 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTAATCTGTCTCAAAATTTATAA CCATG | Oligo 3' Gateway pour amplifier l'ORF de Utp22 (UTP-C) |
| 9358 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAAAATCCGATTTCAAGTTCTCTA ACCTTTTAGG | Oligo 5' Gateway pour amplifier l'ORF de Utp1 / Pwp2 (UTP-B) |
| 9359 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTCAAGGAAGCTCTTTCTCATTTT CTTCTTC | Oligo 3' Gateway pour amplifier l'ORF de Utp1 / Pwp2 (UTP-B) |
| 9360 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAACGCAATCCCTAGGTATCGAA CAGTATAAAC | Oligo 5' Gateway pour amplifier l'ORF de Utp17 (UTP-A) |
| 9542 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTATGTTAATACTTTCATCACAC GATC | Oligo 3' Gateway pour amplifier l'ORF de Utp17 (UTP-A) |
| 9543 | GAAAACGCTAAGGAGGGAGAAGATGG AG | Oligo 5' pour déléter complétement l'hélice α1 de Rrp9 (1093 - 1122 nts) par mutagenèse par délétion |
| 9544 | TTCATCGCCACCTCTAAATGTTAGTCT GG | Oligo 3' pour déléter complétement l'hélice α1 de Rrp9 (1093 - 1122 nts) par mutagenèse par délétion |
| 9624 | GCAGCAGCAGCAGCAGAAAACGCTAA GGAGGGAGAAGATGGAG | Oligo 5' pour muter l'hélice α1 de Rrp9 (1093 - 1122 nts) en une série de Ala par mutagenèse par délétion |
| 9660 | TGCTGCTGCTGCTGCTTCATCGCCAC CTCTAAATGTTAGTCTGG | Oligo 3' pour muter l'hélice α1 de Rrp9 (1093 - 1122 nts) en une série de Ala par mutagenèse par délétion |
| 9914 | GGTAGTATTGACGTTGTGAGTATGGT GG | Oligo 5' pour déléter la région supplémentaire de Rrp9 par rapport à 55K (1090 - 1197 nts / contenant l'hélice α1) |
| 9915 | ATCGCCACCTCTAAATGTTAGTCTGGT C | Oligo 3' pour déléter la région supplémentaire de Rrp9 par rapport à 55K (1090 - 1197 nts / contenant l'hélice α1) |
| 9921 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGCTGGTGATGTTTTCGAGGGT ACAATTAAAAGCG | Oligo 5' GateWay pour amplifier le sous-domaine 1 de Rrp5 (1264-1729 aa / 3789-5190 nts) |
| 9922 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTTATTCGTCTGCTTTTTGAGATT CATGGCTAGCG | Oligo 3' GateWay pour amplifier le sous-domaine 1 de Rrp5 (1264-1729 aa / 3790-5190 nts) |
| 9923 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTAAGTGTTGATATCAATGGTCT TATCCTGAAC | Oligo 3' GateWay pour amplifier le sous-domaine 2 de Rrp5 (1264-1455 aa / 3790-4365 nts) |
| 9924 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAAGGGCACCAGAATCTGTTGCC GATTTTGAACG | Oligo 5' GateWay pour amplifier le sous-domaine 3 de Rrp5 (1456-1729 aa / 4366-5190 nts) |
| 9925 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGTAGCTTCCACCAAAAGAAAGA GAGATGAAG | Oligo 5' GateWay pour amplifier le sous-domaine 4 de Rrp5 (1-241 aa / 1-723 nts) |
| 9926 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTATTCGATGGTTAACTCTATTC TCTTCTTTTTGG | Oligo 3' GateWay pour amplifier le sous-domaine 4 de Rrp5 (1-241 aa / 1-723 nts) |
| 9927 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTAATTTATTTCGGATTCTCTTA GGGTTAGAGAAATACG | Oligo 3' GateWay pour amplifier le sous-domaine 6 de Rrp5 (1-1250 aa / 1-3850 nts) |
| 9928 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGATTGGAATATTATCGCCAGAC AACAGCG | Nouveau Oligo 5' GateWay pour cloner le sous-domaine 5 de la protéine Sgd1p (région 1891 – 2700) dans des vecteurs GateWay (le 9928 commencait par une Proline) |
| 9929 | GCGTTGGCGATGGCAAGGTGTGTTAC CG | Oligo 5' Mutagenèse E334A dans la protéine Rrp9 |
| 9930 | CGGTAACACACCTTGCCATCGCCAAC GC | Oligo 3' Mutagenèse E334A dans la protéine Rrp9 |
| A011 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTATCAGAACTCTTTGGAGTA | Oligo 5' Amplification ORF Mpp10 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A012 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTCAAAGTTTTATATTTGTGCT | Oligo 3' Amplification ORF Mpp10 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |

| | | |
|---|---|---|
| A269 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTACTAAGAAGACAAGCCCGT | Oligo 5' Amplification ORF Imp4 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A270 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTCACAAATAGTCTTTTTTATT | Oligo 3' Amplification ORF Imp4 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A271 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTTAAAAGACATCTGGCAA | Oligo 5' Amplification ORF Utp24 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A272 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGGTAAAGCTAAGAAAACAAGA | Oligo 3' Amplification ORF Utp24 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A273 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTACGAATCTATATTTTC | Oligo 5' Amplification ORF Sgd1 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A274 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTACAAAAAACAGATGGTATTAGA | Oligo 3' Amplification ORF Sgd1 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A275 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTAGAATAGCTTATCCAT | Oligo 5' Amplification ORF Utp13 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A276 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGATCTGAAAACCTCATATAAA | Oligo 3' Amplification ORF Utp13 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A277 | GCTTAAAAGAACCAATAAAC | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Utp13 clonée dans le pDONOR 207, dans le cadre d'un clonage GATEWAY |
| A278 | ATTTTGCCACAGAAACTAAT | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Sgd1 clonée dans le pDONOR 207, dans le cadre d'un clonage GATEWAY |
| A279 | TCCTAATGAATTCACTACTG | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Sgd1 clonée dans le pDONOR 207, dans le cadre d'un clonage GATEWAY |
| A280 | CTGTGAAGAAGCACTCTGAC | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Utp24 clonée dans le pDONOR 207, dans le cadre d'un clonage GATEWAY |
| A281 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGTAGCTTCCACCAAAAGAAAG | Oligo 5' Amplification ORF Rrp5 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A282 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTTATTCGTCTGCTTTTTGAG | Oligo 3' Amplification ORF Rrp5 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A283 | CCGTCAACATATACGCAGAT | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Rrp5 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A284 | GGTCCTTGGTTATAGCCCTG | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Rrp5 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A285 | GTTATTGTTGAAATTCCTGA | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Rrp5 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A286 | ACAAAAAAGACGATGTCATC | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Rrp5 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A287 | CGAGATTGTAGATGGTATTG | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Rrp5 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A288 | GCTTCCATTTTGGATCAAGC | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Rrp5 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A289 | TGGTTGCTGATGCGCCAAAG | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Rrp5 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A290 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTATCGTATTACTTTAAAAATCTG | Oligo 5' Amplification ORF Rrp36 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A291 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTACCTACGATTATGAAATTC | Oligo 3' Amplification ORF Rrp36 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A292 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAAAGATTAAGACCATTAAAAG | Oligo 5' Amplification ORF Sof1 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A293 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTACTTTTCTTGAGTATCAC | Oligo 3' Amplification ORF Sof1 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A294 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAAGTGACAGTTCTGTGAGGGAA AAG | Oligo 5' Amplification ORF Utp25 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |

| | | |
|---|---|---|
| A295 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTTATTTAAATTCATAAATTTCC | Oligo 3' Amplification ORF Utp25 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A296 | CTGATCCATTGACTGCTTTG | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Utp25 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A297 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGGTCACAAGAAGAACGGTCAC | Oligo 5' Amplification Utp7 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A298 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTTAGCCGAATCTGCTCAATGCC | Oligo 3' Amplification ORF Utp7 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A299 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTATCTATCGACTTGAAAAAAAG | Oligo 5' Amplification ORF Utp21 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A300 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTCACGCGGTGGTCACAAAAGC | Oligo 3' Amplification ORF Utp21 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A301 | TTAAGATTCCGCAATCAAGA | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Utp21 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A302 | CGGTTCTTCTAACGGCTCTA | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Utp21 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A303 | ACATCATTGGAACAGATTGA | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Utp21 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A304 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGTACGCAAAGGCTCAAACAG | Oligo 5' Amplification ORF Utp3 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A305 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTTAATTCTTGAATTTAACAG | Oligo 3' Amplification ORF Utp3 pour insertion dans plasmide donneur pDONR (système GateWay) |
| A306 | AACTATTTAAGGACAATGTT | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Utp3 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A307 | GCTCGTAGAAGAACTTTGCG | Oligo 5' pour compléter le séquencage de la protéine Utp3 dans le plasmide pDONR 207 (GATEWAY) |
| A308 | CAAGCCTAGCAAGACCGCGC | Oligo NORTHERN-BLOT s'ybridant au niveau de l'ITS 1 du pré-ARNr 35S (remplacement du 4441) |
| A309 | CCCTCTCCGGAATCGAACCC | Oligo NORTHERN-BLOT s'ybridant au niveau de l'ARNr 18S (remplacement du 2132) |
| A310 | CCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTC | Oligo NORTHERN-BLOT s'ybridant au niveau de l'ITS 2 du pré-ARNr 35S (remplacement du 3430) |
| A311 | AGCAGTAAAAAAGAAAGAAACCGAAAT CTC | Oligo de RT pour identifier l'extrémité A0 du pré-ARNr 22S (hybridation à 36 nts du site A0) |
| A312 | GTCCACGAAGGGTTACTTCGCG | NORTHERN-BLOT : oligo anti-sens dirigé contre le snRNA U6 (remplace 943 et 944) |
| A313 | ACTTGCTGGGTATTATATGTGTGCCCA ATAGAAAGAGAACAATTGACCCGGAC ATGGAGGCCCAGAATACCC | Oligo 5' pour invalider le gène TRP1 chez la levure (hybridation sur le promoteur TEF du plasmide kanMX2 + une partie libre complémentaire du gène TRP1 (101-151) |
| A314 | GAACTATTTTTATATGCTTTTACAAGAC TTGAAATTTTCCTTGCAATAACCAGTA TAGCGACCAGCATTCAC | Oligo 3' pour invalider le gène TRP1 chez la levure (hybridation sur le terminateur TEF du plasmide kanMX2 + une partie libre complémentaire du gène TRP1 (151-200) |
| A315 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTAATCAAGGGCTTTACCGGTG G | Oligo 3' GateWay pour cloner le fragment gris de la protéine Rrp36p (région 1 – 507) dans des vecteurs GateWay |
| A316 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAAGTTCTATCATAAGAAAACG | Oligo 5' GateWay pour cloner le fragment rouge de la protéine Rrp36p (région 508 – 903) dans des vecteurs GateWay |
| A317 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTATTCACTATCATCCAATTTC | Oligo 3' GateWay pour cloner le fragment gris de la protéine Sgd1p (région 1 – 978) dans des vecteurs GateWay |
| A318 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTATCTGCGGAAGAAACAATG | Oligo 5' GateWay pour cloner le fragment orange de la protéine Sgd1p (région 391 – 609) dans des vecteurs GateWay |
| A319 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTACTTTTTTGCGTAATATTGC | Oligo 3' GateWay pour cloner le fragment orange de la protéine Sgd1p (région 391 – 609) dans des vecteurs GateWay |
| A320 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAAACAATAGTACTTTGTCTG | Oligo 5' GateWay pour cloner le fragment bleu de la protéine Sgd1p (région 979 – 1686) dans des vecteurs GateWay |

| | | |
|---|---|---|
| A321 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTAATTCAAAATGCTTTGCAAG | Oligo 3' GateWay pour cloner le fragment bleu de la protéine Sgd1p (région 979 – 1686) dans des vecteurs GateWay |
| A322 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTACCAGATTGGAATATTATCGCC | Oligo 5' GateWay pour cloner le fragment jaune de la protéine Sgd1p (région 1888 – 2700) dans des vecteurs GateWay |
| A323 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAATTCGAAGGGCTATATTTATAA G | Oligo 5' GateWay pour cloner le fragment rouge de la protéine Sgd1p (région 1933 – 2319) dans des vecteurs GateWay |
| A324 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTATAATTTCAAAATGTCATTAG C | Oligo 3' GateWay pour cloner le fragment rouge de la protéine Sgd1p (région 1933 – 2319) dans des vecteurs GateWay |
| A325 | CGCTGCTCACCAATGG | Oligo complémentaire à la région 5' ETS du pré-ARNr (033) |
| A764 | CCAGATAACTATCTTAAAAG | détection de l'intermédiaire de maturation ds ARN ribo : 026 |
| A765 | CCAGTTACGAAAATTCTTG | détection de l'intermédiaire de maturation ds ARN ribo : 001 |

# II. Méthodes

## II.1. Techniques de génie génétique

### *II.1.A. Technique de clonage*

#### *II.1.A.a. Sous-clonage et clonage*

Les fragments d'ADN correspondant aux protéines d'intérêts sont amplifiés par PCR en utilisant des oligonucléotides portant des sites de restriction à leurs extrémités. La PCR est réalisée à partir de 50 ng de matrice ADN, dans un volume de 50 µl contenant 2,5 U d'ADN polymérase *Pfu* (ThermoFisher Scientific), 0,2 µM de chaque oligonucléotide, 0,2 mM de chacun des quatre dNTP, le tout dans le tampon de l'ADN polymérase *Pfu* (Tris-HCl pH 8,8 20 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM, KCl 10 mM, BSA 0,1 mg/mL, Triton X-100 0,1% (v/v) $MgSO_4$ 2 mM). L'amplification se déroule selon le programme suivant : 10 min à 96°C ; 30 cycles : 30 sec à 96°C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 10 min à 72°C selon la taille du fragment ; 10 min à 72°C ; 5 min à 4°C. Le vecteur pCR-Blunt (ThermoFisher Scientific), commercialisé sous forme linéarisée permet la ligature du fragment d'ADN amplifié par PCR. La ligature est réalisée par l'incubation d'une nuit à température ambiante d'un mélange réactionnel de 10 µl contenant 50 ng de vecteur, 1 µl de produit PCR, 5 U de T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific), le tout dans le tampon de ligature (Tris-HCl pH 7,8 40 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM). Des cellules *E. coli* DH5α super-compétentes sont ensuite transformées par le mélange réactionnel. Pour ce faire, 50 L de cellules *E. coli* DH5α super-compétentes sont ajoutés à 1 et 5 L du mélange réactionnel puis l'ensemble est incubé dans la glace pendant 30 min, suivi d'un choc

thermique de 40 sec à 42°C, avant d'être incubé à nouveau 10 min dans la glace. Un volume de 500  L de milieu LB (Tryptone 10 g/L, Extrait de levure 5 g/L, NaCl 85 mM, pH 7,5) est ensuite ajouté au mélange, le tout incubé  pendant 1 h à 37°C sous agitation, avant d'être étalé sur des boîtes LB + antibiotiques et incubé une nuit à 37°C. Afin de vérifier que le fragment d'intérêt obtenu par PCR est bien inséré dans le vecteur pCR-Blunt , une réaction de PCR est réalisée. La matrice consiste en une pointe de colonie, à laquelle est ajoutée 0,3 U d'ADN polymérase DreamTaq (ThermoFisher Scientific), 0,2 µM de chaque oligodésoxyribonucléotide, 0,2 mM de chacun des quatre dNTP, le tampon de l'ADN polymérase DreamTaq (composition non spécifiée par le fournisseur) dans un volume final de 25 µL. L'amplification se déroule selon le programme suivant : 10 min à 96°C ; 30 cycles : 30 sec à 96°C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 3 min à 72°C selon la taille du fragment ; 10 min à 72°C ; 5 min à 4°C. Les clones positifs sont amplifiés par mini-préparation ou midi-préparation de plasmides, puis ceux-ci sont séquencés par la société GATC. Une fois que le séquençage de la séquence d'ADN d'intérêt validé, le fragment d'intérêt est digéré à 37°C par 1 µL de chaque enzyme de restriction FastDigest (ThermoFisher Scientific) à partir de 5 µg vecteur pCR-Blunt  recombinant dans du tampon FastDigest (ThermoFisher Scientific) pour un volume final de 20 µL. Les enzymes de restriction sont ensuite inactivées à une température et pendant un temps spécifiques de l'enzyme utilisée, en accord avec ce qui est préconisé par le fournisseur. Les échantillons, additionnés de bleu de dépôt (6X, 0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF, 30% glycérol dans l'eau), sont ensuite fractionnés sur un gel d'agarose 1%/TBE 0,5%. Les bandes observées sous UV, correspondant aux fragments d'intérêts, sont découpées sur le gel et les fragments sont purifiés par le kit GeneJet™ Gel Extraction (ThermoFisher Scientific). Concernant le plasmide de clonage, 1 µg de celui-ci est digéré par 1 µL de chaque enzyme de restriction FastDigest utilisée pour le fragment, mais également déphosphorylé par l'enzyme FastAP Alkaline Phosphatase (ThermoFisher Scientific) dans du tampon FastDigest à 37°C durant 10 min dans un volume final de 10 µL. Le plasmide est ensuite extrait par traitement au phénol/chloroforme (v/v) et précipité. Pour ce faire, le volume est tout d'abord ajusté à 200 µL, puis un volume équivalent de phénol/chloroforme est ajouté, le mélange est vortexé 1 min, avant d'être centrifugé 5 min à 13000 rpm. Une précipitation alcoolique est alors effectuée sur le surnageant, préalablement récupéré et placé dans un autre tube. Pour ce faire, 2 à 3 volumes d'éthanol 100% sont ajoutés en présence d'acétate de sodium 0,3 M. Le mélange est ensuite incubé à -80°C pendant 15 min, avant d'être centrifugé 15 min à 13000 rpm à

4°C. L'éthanol 100% est retiré et un volume de 500 µL d'éthanol 70% est ajouté pour réaliser un lavage, puis le tout est centrifugé 5 min à 13000 rpm à 4°C. L'éthanol 70% est retiré, suivi d'une incubation à 42°C pendant quelques minutes afin d'enlever toutes traces d'éthanol. Le culot est finalement repris dans 10 µL d'eau. La ligature des fragments d'intérêts et du plasmide purifiés est réalisée dans les conditions décrites précédemment en utilisant 50 ng de vecteur et un excès d'insert de trois fois par rapport à celui-ci. Les clones obtenus sont vérifiés par PCR comme précédemment afin de sélectionner les clones porteurs du plasmide contenant la séquence d'intérêt. Les clones positifs sont amplifiés par mini-préparation ou midi-préparation de plasmides, puis ceux-ci sont séquencés par la société GATC.

#### *II.1.A.b.* *Clonage GateWay*

Les fragments d'ADN correspondant aux protéines d'intérêts sont amplifiés par PCR en utilisant des oligonucléotides portant des sites de recombinaison AttB1 et AttB2. La PCR est réalisée à partir de 50 ng de matrice ADN dans un volume de 50 µl contenant 2,5 U d'ADN polymérase *Pfu* (ThermoFisher Scientific), 0,2 µM de chaque oligonucléotide, 0,2 mM de chacun des quatre dNTP, le tout dans le tampon de l'ADN polymérase *Pfu* (Tris-HCl pH 8,8 20 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM, KCl 10 mM, BSA 0,1 mg/mL, Triton X-100 0,1% (v/v) $MgSO_4$ 2 mM). L'amplification se déroule selon le programme suivant : 10 min à 96°C ; 30 cycles :de 30 sec à 96°C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 10 min à 72°C selon la taille du fragment ; 10 min à 72°C ; 5 min à 4°C. Une réaction de recombinaison est réalisée dans du tampon TE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM) pour un volume final de 5 µL entre 150 ng des vecteurs d'entrée pDONR™ 207 ou 221 (ThermoFisher Scientific), 15 à 150 ng de produits PCR et 1 µL de BP Clonase™ enzyme mix (ThermoFisher Scientific, composition non spécifiée par le fournisseur) précédemment placée 2 min dans la glace. Le mélange réactionnel est incubé pendant une nuit à température ambiante, puis des cellules super-compétentes DH5α sont ensuite transformées par 1 µL de ce mélange, comme décrit dans le paragraphe II.1.A.a. Les plasmides pDONR™ portant maintenant la séquence d'intérêt sont amplifiés par mini-préparation ou midi-préparation, puis ceux-ci sont séquencés par la société GATC. Une deuxième réaction de recombinaison est ensuite effectuée dans du tampon TE pour un volume final de 5 µL entre 150 ng des vecteurs pDONR™, 150 ng des vecteurs de

destination et 1 µL de LR Clonase™ enzyme mix (ThermoFisher Scientific, composition non spécifiée par le fournisseur) précédemment placée 2 min dans la glace. Les vecteurs de destination utilisés sont les plasmides commerciaux pDEST™15 et pDEST™17 (ThermoFisher Scientific), ainsi que les plasmides pACT2, pAS2, pGBKT7, pnEA, pnYK et pnCS, qui ont été modifiés pour être compatibles avec le système de clonage Gateway® en insérant les gènes Cm et CcdB, bordés des séquences de recombinaison AttR1 et AttR2. Le mélange réactionnel est incubé pendant une nuit à température ambiante, puis des cellules super-compétentes DH5α sont ensuite transformées par 1 µL de ce mélange, comme décrit dans le paragraphe II.1.A.a. Les différents plasmides d'expression portant maintenant la séquence d'intérêt sont amplifiés par mini-préparation ou midi-préparation.

### *II.1.B. Mutagenèse dirigée par PCR*

#### *II.1.B.a. Technique des amorces chevauchantes*

La réaction est réalisée dans un volume total de 50 µL, en présence de 2,5 U d'ADN polymérase *Pfu* (ThermoFisher Scientific) dans son tampon, de 0,2 mM de chaque dNTP, de 200 ng de plasmide recombinant et de 40 nM de chaque amorce complémentaire apportant les séquences mutées. La température et la durée de chaque étape réactionnelle sont ajustées en fonction du Tm des amorces et de la taille du plasmide, bien que le cycle de PCR se déroule toujours de manière similaire à ce qui est décrit dans le paragraphe I.1.A.a. Après 18 cycles réactionnels, 10 µl de mélange réactionnel sont traités par 1 µL de l'enzyme de restriction *Dpn*I FastDigest (ThermoFisher Scientific) dans son tampon FastDigest pour un volume total de 30 µL. Après transformation de cellules *E. coli* DH5α super-compétentes et sélection des clones recombinants sur milieu sélectif comme décrit dans le paragraphe I.1.A.a., les plasmides sont analysés par séquençage par la société GATC, puis amplifiés par mini-préparation ou midi-préparation.

#### *II.1.B.b. Par délétion*

La réaction est réalisée dans un volume total de 50 µL, en présence de 2,5 U d'ADN polymérase *Pfu* (ThermoFisher Scientific) dans son tampon, de 0,2 mM de chaque

dNTP, de 20 ng de plasmide recombinant et de 0,2 µM de chaque amorce s'hybridant de part et d'autre de la séquence à déléter. La température et la durée de chaque étape réactionnelle sont ajustées en fonction du Tm des amorces et de la taille du plasmide, bien que le cycle de PCR se déroule toujours de manière similaire à ce qui est décrit dans le paragraphe I.1.A.a. Après 18 cycles réactionnels, 10 µl de mélange réactionnel sont traités par 1 µL de l'enzyme de restriction *Dpn*I FastDigest (ThermoFisher Scientific) dans son tampon FastDigest pour un volume total de 30 µL. Les plasmides néosynthétisés sont ensuite purifiés par le kit GeneJet™ Gel Extraction (ThermoFisher Scientific) dans 43,5 µL d'eau. La phosphorylation des plasmides est réalisée pendant 45min à 37°C par 10 U d'enzyme T4 PNK (ThermoFisher Scientific) dans son tampon (Tris-HCl pH 7,6 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 5 mM, spermidine 0,1 mM) en présence de 1 mM d'ATP pour un volume final de 50 µL. L'enzyme est ensuite inactivée pendant 10 min à 65°C. Une nouvelle purification des plasmides est effectuée par le kit GeneJet™ Gel Extraction (ThermoFisher Scientific) dans 26 µL d'eau. La ligature est ensuite réalisée dans un volume final de 30 µL sur le volume réactionnel entier, avant de transformer des cellules *E. coli* DH5α super-compétentes par 3 µL et 15 µL du produit de ligature. Ces deux étapes sont décrites dans le paragraphe I.1.A.a. Après la sélection des clones recombinants sur milieu sélectif, les plasmides sont analysés par séquençage par la société GATC, puis amplifiés par mini-préparation ou midi-préparation.

## II.2. Techniques d'étude de complexes *in vitro* chez E. coli

Les conditions décrites ci-dessous correspondent aux conditions standard les plus couramment pour nos protéines d'intérêt. Cependant, dans certains cas, elles peuvent faire l'objet d'adaptations spécifiques permettant de répondre aux propriétés de certaines protéines.

### *II.2.A. GST-pulldown*

#### *II.2.A.a. Production et purification sur billes de protéines étiquetées GST*

Les cellules BL21-DE3 pRARE2 sont transformées selon le protocole décrit au paragraphe I.1.A.a. par un plasmide permettant l'expression d'une protéine d'intérêt

étiquettée GST. Ces cellules sont utilisées pour ensemencer, à 0,1 unité $DO_{600nm}$/mL,1 L de milieu de culture auto-inductible ZYM 5052 (Tryptone 10g/L, Extrait de levure 5g/L, $Na_2HPO_4$, $12H_20$ 25 mM, $KH_2PO_4$ 25 mM, $NH_4Cl$ 50 mM $Na_2SO_4$ 5 mM, $MgSO_4$ 1 mM, $FeCl_3$ 10 nM, $CaCl_2$ 2 nM, $MnCl_2$ 1 nM, $ZnSO_4$ 1 nM, $CoCl_2$ 0,2 nM, $CuCl_2$ 0,2 nM, $NiCl_2$ 0,2 nM, $Na_2MoO_4$ O,2 nM, $Na_2SeO_3$ 0,2 nM, $H_3BO_5$ 0,2 nM, Glycérol 0,5%, Lactose 0,2%, Glucose 0,05%, antibiotiques). Les cultures sont placées sous agitation à 37°C pendant une journée, puis la nuit à 20°C. La culture est ensuite centrifugée 30 min à 4000 rpm à 4°C, le culot cellulaire lavé avec 25 mL d'eau ou PBS 1X, avant une nouvelle centrifugation de 30 min à 4000 rpm à 4°C. Les culots cellulaires sont ensuite repris dans 25 mL de tampon RSB200 + protéases ? (Tris-HCl pH 7,4 10 mM, NaCl 200 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, NP-40 0,05%) à raison de 100 unités A600nm/mL. Une lyse cellulaire est alors réalisée à 4°C par traitement aux ultra-sons à l'aide d'un sonicateur Sonifer 250 (Branson) (duty-cycle 50%, Output 5, pulse 2 sec) selon le cycle 2 min de sonication, interrompues par 1 min de pause, et cela répété trois fois. Le lysat est centrifugé 30 min à 15000 rpm à 4°C et le surnageant recupéré. La purification des protéines fusionnées à la GST est réalisée sur la résine Gluthatione Sépharose (GE Healthcare). Pour l'équivalent de 1L de culture, 500 µL de résine sont équilibrées trois fois dans 1 mL de tampon RSB200, puis incubées sur roue pendant 2 h à 4°C avec le surnageant correspondant à l'extrait total de protéines. Trois lavages successifs de 20 min sur roue à 4°C avec 10 mL de tampon RSB200 sont réalisés, avant de déposer un aliquot de10 µL sur un gel SDS-PAGE 7,5% ou 10% (selon la taille des protéines) afin de vérifier la fixation correcte des protéines étiquetées GST. Une estimation de la quantité de protéines fixées à la résine Gluthatione Sépharose (GE Healthcare) est réalisée comparativement à différentes quantités de BSA déposées sur le gel.

#### *II.2.A.b.* *Production in vitro de protéines radiomarquées*

Les protéines d'intérêts ont été traduites *in vitro* à l'aide du kit *E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNA* (Promega) dans l'extrait cellulaire S30 d'*E. coli* fourni dans le kit. Ces productions ont été réalisées selon les instructions du fournisseur, en utilisant comme matrice ADN le plasmide pnCS (cf paragraphe I.2.), portant un promoteur T7 et un site RBS nécessaire à la transcription/traduction des protéines d'intérêts, et en incorporant de la méthionine marquée au $S^{35}$ comme acide aminé

radiomarqué. Pour ce faire, 2 µg de plasmide pnCS recombinant, 5 µL de mix d'acides-aminés sans méthionine (composition non spécifiée par le fournisseur), 20 µL de Premix S30 sans acide-aminés (composition non spécifiée par le fournisseur), 10 µCi de [$^{35}$S]-méthionine (PerkinElmer) et 15 µL d'extrait S30 sont mélangés ensemble dans un volume final de 50 µL, le tout est incubé 1 à 2 h à 37°C, avant que la réaction soit stoppée par une incubation de 5 min sur glace.

Afin d'analyser les échantillons sur gel SDS-PAGE, il est nécessaire de faire une précipitation à l'acétone pour éliminer le polyéthylèneglycol de l'extrait S30. On ajoute 20 µL d'acétone à un aliquot de 5µL de la réaction complète de traduction que l'on incube 15 min sur glace. Le mélange est ensuite centrifugé 5 min à 12000 x g. On élimine le surnageant et le culot est mis à sécher durant 15 min sous vide. Il est ensuite repris dans 20 µL de bleu de charge SDS-PAGE (Tris-HCl pH 6,8 45 mM ; SDS 8% ; bleu de bromophénol 0,02% ; glycérol 40% ; ß-mercaptoéthanol 20% (vol/vol)) et dénaturé à 96°C pendant 5 min avant d'être déposé sur gel SDS-PAGE.

### *II.2.A.c.* *Etude de l'interaction par GST pull-down*

Cette approche a été utilisée pour tester l'interaction entre une protéine étiquetée GST fixée sur de la résine Gluthatione Sépharose (GE Healthcare) et une protéine radiomarquée traduite en extrait cellulaire S30 d'*E.* coli (paragraphe II.2.A.a et II.2.A.b.). La formation de complexes est testée dans un volume de 400 µL de tampon RSB200, en présence de 5 µL de protéine radiomarquée et 1 µg de protéines étiquetées GST dont le volume est ajusté à 40 µL de résine. Après 2 h d'incubation sur roue à 4°C, 5 lavages rapides du tampon RSB200 à température ambiante sont effectués..L'ensemble des échantillons sont additionnés de bleu de charge (Tris-HCl pH 6,8 45 mM ; SDS 8% ; bleu de bromophénol 0,02% ; glycérol 40% ; ß-mercaptoéthanol 20% (vol/vol)), dénaturés à 96°C pendant 5 min, puis fractionnés sur un gel SDS-PAGE 7,5% ou 10% selon la taille de la protéine radiomarquée. En parallèle, 10% d'Input sont fractionnés sur gel SDS-PAGE, ce qui correspond à 2µL du mélange de traduction précipité à l'acétone. A l'issue de la migration, le gel est séché et la radioactivité est révélée à l'aide d'un appareil de détection Typhoon 9400 (GE Healthcare), après exposition sur un écran amplificateur.

### *II.2.B. Co-expression*

Les cellules BL21-DE3 pRARE2 sont transformées selon le protocole décrit au paragraphe I.1.A.a. par deux plasmides permettant l'expression d'une protéine d'intérêt étiquetée 6xHIS (pnEA) couplée à l'expression d'une protéine d'intérêt sans étiquette (pnCS). Les cellules transformées sont utilisées pour ensemencer 1,5 ml de milieu Graffinity I (Tryptone 20 g/L, Extrait de levure 10 g/L, Glucose 0,5%, antibiotiques) à 0,1 unité $DO_{600nm}$/mL. Les cultures sont réalisées dans des plaques 24 puits (Uniplate ®, Whatman®) sous agitation à 37°C. Lorsque la $DO_{600nm}$/mL atteint la valeur de 1,2 ; la surproduction des protéines d'intérêt est induite par l'ajout de 1,5 ml de milieu Graffinity II (Tryptone 20 g/L, Extrait de levure 10 g/L, HEPES pH 7,0 20 mM, IPTG 1mM, Lactose 0,6%, antibiotiques) et l'incubation à 20°C pendant une nuit. La suite des manipulations est réalisée sur l'automateEVO 200 (TECAN), mises à part les centrifugations et les sonications. Les cultures sont ainsi réparties sur deux plaques 24 puits, puis centrifugées pendant 10 min à 2500 rpm à 4°C. Les culots cellulaires de chaque plaque sont ensuite repris indépendamment dans 1 ml de tampon BS ou HS possédant deux concentrations salines différentes (Tris-HCl pH 8,0 20 mM, NaCl 50 mM (BS) ou 400 mM (HS), Imidazole 7 mM). Les cellules sont ensuite lysées à 4°C par traitement aux ultra-sons à l'aide d'un sonicateur Sonifer 250 (Branson) (duty-cycle 50% ; Output 5, pulse 2 sec) selon le cycle 1 min de sonication, interrompue par 1 min de pause, et cela répété deux fois. Le lysat est centrifugé pendant 20 min à 4000 rpm à 4°C. Les surnageants de sonication sont ensuite répartis dans une plaque 96 puits contenant 50 µL de résine magnétique Sépharose TALON (Novex®, Life Technologie) et sont incubés pendant 1h à 4°C sous agitation. Après avoir éliminé le surnageant par une centrifugation de 10 min à 1000 rpm, la résine est lavée deux fois avec 600 µL des tampons BS ou HS, suivi d'une centrifugation de 5 min à 1000 rpm à 4°C. Le surnageant est alors éliminé et 30 µL de bleu de dépôt sont ajoutés sur la résine. La suite des manipulations est réalisée cette fois-ci par l'expérimentateur. Les échantillons sont chauffés à 96°C pendant 5 min, avant d'être fractionnés sur un gel SDS-PAGE 7,5% ou 10% selon la taille de la protéine.

## II.3. Techniques d'analyse chez la levure

Préparation levure compétenteUne souche de levure est ensemencée dans du 10 mL de milieu YPD (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Glucose 2%) ou YPG (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Galactose 2%) et mise sous agitation pendant 48h à 30°C. A partir de cette culture en phase stationnaire ,on ensemence 50 mL de milieu YPD ou YPG à 0,1 u$DO_{600nm}$/mL. mis sous agitation à 30°C jusqu'à obtenir une concentration cellulaire située entre 0,5 à 0,8 u$DO_{600nm}$/mL. La culture est alors centrifugée pendant 10 min à 2500 rpm à 4°C, puis le culot est repris et lavé dans 30 ml de tampon (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM, LiAc 100 mM). Une centrifugation de 10 min à 2500 rpm à 4°C est effectuée et le culot est repris dans 500 µL du même tampon (volume permettant de réaliser 10 réactions de transformation).

### *II.3.A. Transformation de la levure*

Pour chaque transformation, un volume de 50 µl de suspension cellulaire est incubé 30 min à 30°C, en présence de 1 µg d'ADN plasmidique, de 45 µg d'ADN de sperme de saumon ´(Invitrogen), préalablement dénaturé 15 min à 96°C, et de 300 µL de tampon (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM, LiAc 100 mM, PEG 4000 40%). A l'issue de cette étape, le mélange est ensuite incubé 10 min à 42°C en présence de DMSO 10%. Un volume de 600 µL d'eau stérile est ajouté au mélange, celui-ci est centrifugé 1 min à 6000 rpm, puis un volume de 800 µL est retiré. Finalement le culot est repris dans le volume restant, avant d'étaler le tout sur milieu sélectif solide YPD (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Glucose 2%, Agar 2%) ou YPG (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Galactose 2%, Agar 2%), suivi d'une incubation à 30°C pendant plusieurs jours.

### *II.3.B. Modification génétique des souches de levure*

Certaines souches de levure ont été modifiées génétiquement, dans le but de contrôler l'expression de gènes, et/ou de modifier leur profil d'auxotrophieTout d'abord, on réalise une réaction de PCR à partir du plasmide pTL26, contenant le gène d'auxotrophie HIS3 et un promoteur GAL10. avec des oligonucléotides portant les séquences de ces deux gènes bordés de séquences complémentaires à celles

en amont de l'ORFdu gène d'intérêt.. La réaction de PCR est effectuée en présence de 50 ng de matrice ADN, dans un volume de 50 µl contenant 2,5 U d'ADN polymérase *Pfu* (ThermoFisher Scientific), 0,2 µM de chaque oligonucléotide, 0,2 mM de chaquedNTP, en tampon de l'ADN polymérase *Pfu* (Tris-HCl pH 8,8 20 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM, KCl 10 mM, BSA 0,1 mg/mL, Triton X-100 0,1% (v/v) $MgSO_4$ 2 mM). L'amplification se déroule selon le programme suivant : 10 min à 96°C ; 35 cycles : 30 sec à 96°C, 30 sec à 55°C, 3 min à 72°C ; 10 min à 72°C ; 5 min à 4°C.Afin de vérifier la séquence amplifiée, le produit PCR est ensuite inséré par ligature (cf paragraphe I.1.A.a.) dans le plasmide pCR-Blunt, avant d'être séquencé par la société GATC. La souche de levure est́ transformée (cf paragraphe II.3.A.) avec 2 µg de fragment obtenu par PCŔ, qui doit s'insérer spécifiquement dans l'ADN génomique (ADNg) de levure par recombinaison homologue. Les clones font ensuite l'objet d'un génotypage par extraction de l'ADNg (cf paragraphe II.4.A.) suivi d'analyse par PCR. Cette PCR est effectuée en présence de 2 µg d'ADNg0,3 U d'ADN polymérase DreamTaq (ThermoFisher Scientific) ; 0,2 µM de chaque oligodésoxyribonucléotide ; 0,2 mM de chaque dNTP, le tampon de l'ADN polymérase DreamTaq (composition non spécifiée par le fournisseur) dans un volume final de 25 µL. L'amplification se déroule selon le programme suivant : 10 min à 96°C ; 30 cycles : 30 sec à 96°C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 72°C ; 10 min à 72°C ; 5 min à 4°C. Dans le cas de l'invalidation d'un gène d'auxotrophie, le même protocole que celui décrit précédemment est utilisé, à la différence du fragment d'ADN utilisé pour la recombinaison. Celui-ci est obtenu à partir du plasmide pAF6, porteur de la cassette Kan-MX6, procurant une résistance à la généticine G418.

### *II.3.C. Culture des souches de levure / Répression de l'expression de gènes essentiels*

Un volume de 10 mL de milieu YPG (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Galactose 2%) est ensemencé avec un clone de levure transformée par un plasmide exprimant laprotéine d'intérêt, puis les levures sont mises en culture à 30°C pendant 48 h sous agitation. Une culture est ensuite réalisée à partir de la pré-culture à saturation en ensemençant 50 mL de milieu YPD à 0,1 $uDO_{600nm}$/mL, suivi d'une incubation à 20°C, 30°C ou 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une concentration cellulaire située entre 0,5 à 0,8 $uDO_{600nm}$/mL (en règle générale 8h de culture à 30°C

et 37°C sont nécessaires tandis que 24 h sont nécessaires à 20°C). Les cultures sont alors diluées à 0,1 $uDO_{600nm}$/mL dans 100 mL de milieu YPD (pour les cultures à 30°C ou 37°C) ou 200 mL de milieu YPD (pour les cultures à 20°C) et les levures sont remises en culture une nuit à 30°C ou 37°C et 24 h à 20°C. A l'issue de ces cultures, on estime que la protéine Rrp9 ou le snoARN U3 endogènes, dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur inductible Gal10, n'est plus présent dans la cellule. Les cultures sont ensuite utilisées soit directement pour tester la croissance cellulaire en présence de mutants, soit pour prélever différentes quantités de levure afin de réaliser différentes expériences. Dans le deuxième cas, les levures sont centrifugées pendant 10 min à 2500 rpm à 4°C, avant d'être lavées avec 1 mL d'eau stérile, puis transférées dans un tube de 1,5 mL. Une centrifugation est réalisée pendant 1 min à 6000 rpm à 4°C et le surnageant est éliminé. Les culots cellulaires sont conservés à -80°C ou utilisés directement dans différentes expériences.

### *II.3.D. Analyse de la croissance des souches exprimant des variants de la protéine Rrp9 et/ou des mutants du snoARN U3 (tests de croissance et synthétique létal)*

Les cultures préparées dans le paragraphe II.3.C., sont diluées à différentes concentrations dans de l'eau stérile. En ce qui concerne les tests de croissance avec la souche W303::pGAL-RRP9, exprimant les mutants de la protéine Rrp9, 4 dilutions sont effectuées : 0,3 $uDO_{600nm}$/mL, 0,1 $uDO_{600nm}$/mL, 0,01 $uDO_{600nm}$/mL et 0,001 $uDO_{600nm}$/mL. En ce qui concerne la souche JH84::pGAL-RRP9, exprimant le mutant Rrp9 R289A et les mutants du snoARN U3, 6 dilutions sont effectuées : 0,5 $uDO_{600nm}$/mL, 0,2 $uDO_{600nm}$/mL, 0,05 $uDO_{600nm}$/mL, 0,01 $uDO_{600nm}$/mL, 0,001 $uDO_{600nm}$/mL et 0,0001 $uDO_{600nm}$/mL. Un volume de 5 µL de chaque dilution est déposé sur du milieu solide YPD (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Glucose 2%, Agar 2%) ou YPG (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Galactose 2%, Agar 2%). Une incubation de plusieurs jours à 20°C, 30° ou 37°C est ensuite réalisée afin d'évaluer la croissance des souches en présence des différents mutants.

## II.4. Techniques d'extraction de matériel biologique

### *II.4.A. Extraction d'ADN génomique*

Les clones issus de la recombinaison entre le fragment PCR et l'ADNg (cf paragraphe II.3.A.) sont ensemencés dans 20 mL de milieu YPG (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Galactose 2%) et mis en culture pendant 48 h à 30°C sous agitation. Les cultures sont ensuite centrifugées 10 min à 2500 rpm à 4°C, puis le culot est repris et lavé dans 30 mL d'eau stérile. Une nouvelle centrifugation de 10 min à 2500 rpm à 4°C est ensuite effectuée, avant de reprendre le culot avec 200 µL de tampon Triton (Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 2%, SDS 1%,) et d'ajouter 200 µL de phénol et 300 µL de billes de verre (SIGMA). Les tubes sont vortexés 2 fois 2 minutes avec un intervalle de 2 minutes dans la glace, puis centrifugés 5 minutes à 13000 rpm après avoir ajouté 200 µL de tampon TE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM). La phase aqueuse est récupérée et on réalise successivement une extraction au phénol/chloroforme puis au chloroforme afin d'éliminer les traces de phénol. Pour ce faire, dans un premier temps, un volume de 400 µL de phénol/chloroforme (vol/vol) est ajouté sur la phase aqueuse, puis, après avoir vortexer le mélange pendant 1 min, une centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min est réalisée. La phase aqueuse est à nouveau récupérée et, dans un deuxième temps, 400 µL de chloroforme est ajouté au mélange, qui est vortexé pendant 1 min. Une centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min est effectuée et le surnageant est récupéré. Une précipitation alcoolique est ensuite réalisée comme décrit dans le paragraphe II.1.A.a. Le culot est repris dans 400 µL de tampon TE et une incubation de 30 min à 37°C en présence de 20 µg de RNAse A (ThermoFisher Scientific) est effectuée, suivie d'une incubation de 30 minutes à 37°C en présence de 150 µg de Protéinase K (ThermoFisher Scientific). L'ADNg est ensuite extrait après deux nouvelles extractions au phénol-chloroforme dans un premier temps, puis au chloroforme dans un deuxième temps. L'ADNg est finalement précipité comme dans le paragraphe II.1.A.a., à la différence du sel utilisé qui est de l'acétate d'ammonium 125 mM. Le culot d'ADNg est repris dans 50 µL d'eau.

### II.4.B. *Préparation d'extraits cellulaires*

Un culot cellulaire correspondant à une quantité de 60 $uDO_{600nm}$/mL de levure (cf paragraphe II.3.C.) est repris dans 300 µL de tampon A (HEPES-KOH pH 7,9 20 mM, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 3 mM, DTT 500 µM, Triton X-100 0,1%, glycérol 10%) en présence de 300 µL de billes de verre (SIGMA). Après une série, répétée 3 fois, de 1 min de vortex, suivie de 2 min d'incubation dans la glace, le lysat est centrifugé pendant 5 min à 4000 rpm à 4°C et le surnageant récupéré.

### II.4.C. *Extraction des ARN totaux*

Un culot cellulaire correspondant à une quantité de 30 $uDO_{600nm}$/mL de levure (cf paragraphe II.3.C.) est repris dans 200 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 100 mM ; EDTA 10 mM), additionnés de 300 µL de billes de verre (SIGMA). Les échantillons sont vortexés 2 fois 1min, interrompues par 2 min d'incubation dans la glace. A l'issue de cette étape, 200 µL de tampon d'extraction, 50 µL de SDS 10% et 400 µL de phénol/chloroforme (vol/vol) sont ajoutés au lysat. L'échantillon est à nouveau vortexé pendant 1 min, puis incubé 10 min à 65°C. Après centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min, la phase aqueuse est récupérée et soumise à une seconde étape d'extraction au phénol/chloroforme comme précédemment (cf aussi paragraphe II.4.A.). Les ARN totaux sont ensuite isolés par précipitation alcoolique en présence d'acétate de sodium 0,3 M (cf paragraphe II.1.A.a.) puis repris dans 50 à 100 µL d'eau. Les ARN totaux sont finalement dosés en utilisant un appareil NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

### II.4.D. *Extraction des protéines totales et des ARN totaux présents dans les fractions issues du gradient de saccharose*

#### II.4.D.a. *Extraction des protéines totales*

Les protéines totales présentes dans les 250 µL de fraction sont précipitées par ajout de TCA 6,66% final (soit 1 volume de TCA 40% pour 5 volumes d'échantillon), après avoir vortexé pendant 10 sec et incubé les échantillons pendant 15 min sur glace. Une centrifugation à 13000 rpm à 4°C durant 20 min est réalisée et le surnageant

retiré. Le culot protéique est repris dans 15 µL de bleu de charge (Tris-HCl pH 6,8 100 mM ; SDS 8% ; bleu de bromophénol 0,02% ; glycérol 20% ; DTT 100 mM).

#### *II.4.D.b. Extraction des ARN totaux*

Les fractions de 250 µL sont additionnées de 750 µL de TRIzol® (ThermoFisher Scientific), puis vortexées 15 sec et incubées pendant 5 min à température ambiante. Un volume de 200 µL de chloroforme est ensuite ajouté sur les échantillons. Après les avoir vortexé pendant 15 sec, ceux-ci sont incubés pendant 15 min à température ambiante, puis centrifugés pendant 15 min à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré dans un autre tube et un volume de 450 µL d'isopropanol 100% est ajouté. Après avoir vortexé les échantillons pendant 15 sec, suivi d'une incubation à température ambiante pendant 10 min et d'une centrifugation à 13000 rpm à 4°C pendant 10 min, un volume de 1 mL d'éthanol 100%, préalablement placé à -20°C, est ajouté. Les échantillons sont ensuite mélangés par inversion puis centrifugés pendant 10 min à 13000 rpm à 4°C, avant d'ajouter sur le culot d'ARN totaux un volume de 1 mL d'éthanol 70%, préalablement placé à -20°C. Une dernière centrifugation pendant 10 min à 13000 rpm à 4°C est réalisée et le surnageant est éliminé. Les culots d'ARN totaux sont incubés pendant 10 min à température ambiante afin d'éliminer toutes traces d'éthanol, puis un volume de 30 µL d'eau est ajouté sur les culots. Après un temps d'incubation des échantillons de 30 min dans la glace, les culots d'ARN totaux sont repris dans les 30 µL d'eau, avant d'ajouter du bleu de formamide (EDTA 10 mM, bleu de bromophénol 0,05%, xylène cyanol 0,05% dans de la formamide désionisée).

## II.5. Technique de détection à partir d'échantillons biologiques

### *II.5.A. Western-blot*

La totalité du volume des échantillons contenant les protéines totales précipitées au TCA (cf II.4.D.a.) est dénaturée 5 min à 96°C puis fractionné sur un gel SDS-PAGE Criterion™ TGX™ Precast Gels (BIORAD), alors que les protéines totales présentes dans les extraits cellulaires (cf paragraphe II.4.B.) sont tout d'abord dosées en utilisant un appareil Qubit® 2.0 (Invitrogen by Life Tecnologies). Une quantité égale de chaque échantillon (environ 50 µg) est dénaturée 5 min à 96°C puis fractionnée

sur gel SDS-PAGE 10%. Après fractionnement, les protéines totales sont transférées électriquement sur une membrane de Nitrocellulose (BIORAD) pendant 1 h à 100 V dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, éthanol 20%) sous agitation et préalablement placé à 4°C. En ce qui concerne les échantillons provenant des expériences de sédimentation sur gradients de saccharose (cf II.4.D. et II.6.C.), les protéines totales sont transférées en utilisant un appareil Trans blot turbo (BIORAD) et un kit de transfert Trans blot turbo tranfert pack (BIORAD). A l'issue du transfert, la membrane est incubée à température ambiante pendant 1 h sous agitation dans un tampon PBS/Tween® 20 (pH 7,4, $Na_2HPO_4$, 12 $H_2O$ 10 mM, $KH_2PO_4$ 1,8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Tween-20 0,1%, lait en poudre 5% (écrémé, produit de grande distribution)). L'hybridation de l'anticorps primaire à la dilution souhaitée est réalisée sous agitation pendant 1 h à température ambiante dans le tampon PBS/Tween® 20. La membrane est ensuite lavée à température ambiante sous agitation à trois reprise pendant 15 min dans le tampon PBS/Tween® 20. L'hybridation de l'anticorps secondaire approprié, couplé à la péroxidase (Invitrogen), est réalisée sous agitation pendant 45 min à température ambiante dans le tampon PBS/Tween-20. Après trois nouveaux lavages de 15 min dans le tampon PBS-Tween® 20, les protéines d'intérêt sont détectées par chemiluminescence à l'aide du kit ECL+ (GE Healthcare) et de l'appareil Fusion Solo (Vilber Lourmat).

### *II.5.B. Nothern-blot*

#### *II.5.B.a. Détection des snoRNA U3 et U6*

La totalité du volume des échantillons contenant les ARN immunoprécipités par la protéine Rrp9 étiquetée ProtA (cf II.6.A.) ou présents dans les fractions issues du gradient de saccharose (cf II.4.D.b.) est dénaturée 2 min à 96°C puis fractionnée sur un gel de polyacrylamide dénaturant 6% dans du tampon TBE 0,5X (acrylamide/bisacrylamide (38:2) 6%, Urée 8 M, TBE 0,5X : Tris-HCl pH 8,0 45 mM, $H_3BO_3$ 45 mM, EDTA 1 mM). En ce qui concerne les ARN totaux issus des cultures (cf II.4.C.), une quantité de 1 µg est dénaturée 2 min à 96°C dans du bleu de formamide (EDTA 10 mM, bleu de bromophénol 0,05%, xylène cyanol 0,05% dans de la formamide désionisée), puis fractionnée sur gel de polyacrylamide dénaturant 6% dans du tampon TBE 0,5X. Après fractionnement, les ARN totaux sont transférés

électriquement sur une membrane de Nylon (Amersham Hybond™-$N^+$, GE Healthcare) à l'aide d'un appareil Trans-Blot® SD SemiDry Transfer Cell (BIORAD) pendant 30 min à raison de 3 mA/$cm^2$ de membrane en utilisant du matériel imbibé de tampon TBE 0,5X. Les ARN totaux sont ensuite fixés de façon covalente à la membrane par pontage photochimique aux UV pendant 5 min. La membrane est ensuite pré-hybridée 1 h à 37°C sous agitation dans un tube à hybridation en présence de 15 ml de tampon d'hybridation (SSPE 6X : NaCl 900 mM, $Na_2HPO_4$, 12 $H_2O$ pH 7,4 45 mM, EDTA 6 mM ; Réactif de Denhardt : Ficoll 1 g/L, polyvinylpyrolydone 1 g/L, BSA 1 g/L ; SDS 0,5%). En parralèle, 0,2 µM d'oligonucléotides sont radiomarqués au $^{32}P$ à leurs extrémités 5' pendant 1 h à 37°C, grâce à 10 U d'enzyme T4 PNK (ThermoFisher Scientific) dans son tampon (Tris-HCl pH 7,6 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 5 mM, spermidine 0,1 mM) en présence de 10 µCi de [$\gamma^{32}P$]-ATP (PerkinElmer) pour un volume final de 10 µL. Les sondes sont alors ajoutées au tampon et l'hybridation de la membrane se déroule pendant une nuit à 37°C. La membrane est ensuite lavée plusieurs fois à 42°C dans du tampon de lavage SSC 6X (pH 7,0, NaCl 900 mM, NaCi 90 mM). La révélation des signaux radioactifs est réalisée à l'aide d'un appareil de détection Typhoon 9200 (GE Healthcare), après exposition sur un écran amplificateur.

#### *II.5.B.b. Détection des intermédiaires de maturation et des formes matures des ARNr*

Une quantité de 10 µg d'ARN totaux sont dénaturés 1 h à 60°C dans du tampon MOPS (MOPS 20 mM, NaAc 5 mM, EDTA 1 mM) en présence de DMSO 50% et de Glyoxal désionisé 1 M, pour un volume final de 20 µL. Les échantillons sont ensuite additionnés de bleu de formamide (EDTA 10 mM, bleu de bromophénol 0,05%, xylène cyanol 0,05% dans de la formamide désionisée) avant d'être fractionnés sur un gel d'agarose/MOPS 1,5%. Le fractionnement est réalisé dans du tampon MOPS à 35 V pendant plus de 24 h, à la suite de quoi, le gel est lavé 10 min dans de l'eau. Le transfert des ARN totaux est ensuite réalisé sur une membrane de Nylon (Amersham Hybond™-$N^+$, GE Healthcare) à l'aide d'un système de pompe à vide, à une pression de 50 mbar. Pour ce faire, dans un premier temps, le gel est recouvert d'une solution de NaOH 75 mM pendant 20 min. Dans un second temps, le gel est recouvert de tampon (Tris/HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M) pendant 2 périodes de 15 min.

Dans un troisième temps le gel est recouvert de tampon SSC 10X (pH 7,0, NaCl 1,5 M, NaCi 150 mM) pendant 10 min. Enfin, le transfert se poursuit pendant 3 h avec un apport régulier de tampon SSC 10X. A l'issue du transfert, la membrane est traitée pendant 5 min aux UV, avant d'être pré-hybridée avec du tampon (SSPE 6X : NaCl 900 mM, $Na_2HPO_4$, 12 $H_2O$ pH 7,4 45 mM, EDTA 6 mM ; Réactif de Denhardt : Ficoll 1 g/L, polyvinylpyrolydone 1 g/L, BSA 1 g/L ; SDS 0,5%), puis hybridée avec les sondes d'intérêt, comme décrit précédemment (cf II.5.B.a.).

### *II.5.C.* *Transcription inverse*

Dans un premier temps, un oligonucléotide (1 µM), s'hybridant 40 nts en aval du site de clivage A0, est radiomarqué à son extrémité 5' avec du [$\gamma^{32}$P]-ATP (PerkinElmer) de la même manière que décrit dans le paragraphe II.5.B.a. Le volume est ensuite ajusté à 40 µL avec de l'eau et l'oligonucléotide est purifié par passage sur une colonne mini Quick Spin Oligo Columns (Roche) afin d'éliminer l'ADP et le $\gamma^{32}$P-ATP dont le [$\gamma^{32}$P] a été ou non transféré sur l'extrémité 5' de l'oligonucléotide. L'oligonucléotide radiomarqué est ensuite précipité à l'éthanol 100% en présence d'acétate de sodium 0,3 M (cf II.1.A.a.), puis repris dans 10 µL d'eau, avant de quantifier son activité au compteur à scintillations LS 6500 Multi-Purpose (Beckman Coulter). Par la suite, 2 µg d'ARN totaux (cf II.4.C.) et 200000 cpm d'oligonucléotide sont incubés en présence de tampon d'hybridation (Tris-HCl pH 8,3 50 mM, KCl 40 mM) dans un volume final de 2,5 µL pendant 2 min à 96°C, suivi de 5 min dans la glace. Sur ce mélange est ensuite ajouté chacun des quatre dNTP à 100 µM final et 0,5 U d'enzyme RT AMV (MP Biomedicals) dans son tampon (Tris-HCl pH 8,3 50 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, spermidine 0,5 mM, DTT 10 mM) pour un volume final de 5 µL. En parralèle, un séquençage est également réalisé en ajoutant en plus chacun des ddNTP à 50 µM final dans quatre tubes différents pour un volume final de 5,5 µL. L'ensemble des échantillons est incubé à 42°C pendant 30 min, avant de rajouter 4 µL de bleu de formamide (EDTA 10 mM, bleu de bromophénol 0,05%, xylène cyanol 0,05% dans de la formamide désionisée). Les échantillons sont alors dénaturés 2 min à 96°C puis remis dans la glace 2 min, puis fractionnés pendant 4 h100V sur un grand gel d'acrylamide dénaturant (acrylamide/bisacrylamide (38:2) 7%, Urée 8 M, TBE 0,5X : Tris-HCl pH 8,0 45 mM, $H_3BO_3$ 45 mM, EDTA 1 mM) dans du tampon TBE 0,5X. ). La révélation des signaux radioactifs est réalisée à l'aide d'un appareil

de détection Typhoon 9200 (GE Healthcare), après exposition sur un écran amplificateur.

## II.6. Techniques d'étude de complexes chez Saccharomyces cerevisiae

### *II.6.A. Immunoprécipitation du snoARN U3 par ProtA-Rrp9*

La résine Rabbit IgG-Agarose (SIGMA) est lavée à 3 reprises avec 1 mL de tampon IPP150 (Tris-HCl pH 8,0 10 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0,1%) en centrifugeant 2 min à 1200 rpm entre chaque lavage. A partir des extraits cellulaires (cf II.4.B.), les protéines totales sont dosées via un appareil Qubit® 2.0 (Invitrogen by Life Tecnologies) afin d'utiliser la même quantité d'extraits (environ 600 µg). Chaque extrait est ensuite incubé sur roue pendant 3 h à 4°C dans un volume total de 300 µL en présence de 20 µL de billes Rabbit IgG-Agarose (SIGMA) et du tampon IPP150. La résine est ensuite lavée trois fois 5 min sur roue avec 1 mL de tampon IPP150 à 4°C. En parallèle, un dixième de chaque extrait de départ est mis de côté, constituant l'input 10%. La résine et l'input 10% sont additionnés de 300 µL de tampon IPP150, de SDS 0,5% et de 150 µg de protéinase K (Roche), avant d'être incubés à 37°C pendant 30 min puis à 65°C pendant 10 min. Deux extractions successives par traitement au phénol/chloroforme sont ensuite réalisées sur les échantillons (cf II.4.A.). Enfin, les ARN immunoprécipités sont isolés par précipitation alcoolique (cf II.1.A.a.) en présence d'acétate de sodium 0,15 M et 1 µL de glycogène (ThermoFisher Scientific), avant d'être repris dans 10 µL de bleu de formamide (EDTA 10 mM, bleu de bromophénol 0,05%, xylène cyanol 0,05% dans de la formamide désionisée).

### *II.6.B. Double hybride*

La souche Y187 (*Mat α*) est transformée par le plasmide pGBKT7 (*TRP1*) exprimant la protéine "appât" tandis que la souche CG1945 (*Mat a*) est transformée par le plasmide pACT2 (*LEU2*) exprimant la protéine "proie" (cf II.3.A.). Les souches haploïdes transformées sont ensuite diluées séparément dans 50 µL d'eau stérile, avant d'être croisées par la superposition d'un volume de 8 µL de chaque sur milieu solide YPD (Extrait de levure 10 g/L, Bactopeptone 20 g/L, Glucose 20 g/L, Agar

2%). d'intérêt. Après 2 jours d'incubation à 30°C, les souches diploïdes potentiellement générées sont diluées séparément dans 50 µL d'eau stérile, avant d'être sélectionnées par le dépôt d'un volume de 8 µL de chaque sur un milieu solide sélectif ($Trp^-$, $Leu^-$). Après quelques jours d'incubation à 30°C, les souches diploïdes sont à nouveau diluées séparément dans 50 µL d'eau stérile, avant de tester l'interaction entre les deux protéines d'intérêt par des dépôts de 8 µL de chaque sur milieu solide sélectif (Trp-, Leu-, His-, différentes concentrations en 3-AT (SIGMA) : 0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 mM). His-). Le niveau de croissance est analysé après plusieurs jours d'incubation à 30°C.

### *II.6.C. Gradients de saccharose 5-45%*

Cette manipulation a été effectuée au sein du laboratoire de D. Lafontaine à l'université libre de Bruxelles (ULB) La première étape est de générer le gradient de saccharose 5-45% dans du tampon. Deux techniques ont été utilisées. La première consiste en la superposition de plusieurs couches de tampon contenant différentes concentrations en saccharose (Tris-HCl pH 7,4 20 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, saccharose 10 à 50%) avec une étape de congélation entre chaque. Pour ce faire, 2,2 mL de tampon à 50% de saccharose sont ajoutés dans un premier temps dans des tubes adaptés pour l'ultracentrifugation (Bekman Ultra-clear 14X89 mm), avant d'être incubés à -80°C pendant 15 min. Par la suite, 2,2 mL de tampon à 40% de saccharose est ajouté et les tubes incubés à -80°C pendant 15 min. Ces étapes sont répétées avec du tampon à 30%, 20% et 10% en saccharose. Une incubation des tubes d'une nuit à 4°C permet de générer le gradient en saccharose 5-45%.

La deuxième technique consiste tout d'abord en la préparation d'un tampon à 31% de saccharose (Tris-acétate pH 7,6 50 mM, $NH_4Cl$ 50 mM, $MgCl_2$ 12 mM, DTT 1 mM, saccharose 31%), répartis ensuite dans les tubes à ultracentrifugation. Les tubes sont congelés à -80°C pendant 30 min, puis décongelés sur glace pendant 30 min et cette étape est répétée deux fois, afin de générer le gradient en saccharose 5-45%.

En parallèle, les extraits cellulaires préparés (cf II.4.B.) sont dosés et une quantité de 30 $uDO_{260nm}$/mL est déposée délicatement au sommet des tubes contenant le gradient en saccharose, avant d'être centrifugés pendant 3h à 39000 rpm à 4°C à l'aide d'une ultracentrifugeuse L8-70M ultracentrifuge (BECKMAN) et en utilisant le

rotor SW41. Les différentes fractions sont collectées en utilisant le collecteur de fractions Foxy® R1 Teledyne ISCO (BRS) afin d'obtenir 24 fractions de 500 µL. La moitié de chaque fraction est ensuite répartie dans des séries de tubes, destinées soit à une expérience de Northern Blot, soit à une expérience de Western Blot (cf II.4.D. et II.5.)

# Résultats et Discussion

# Présentation de l'article soumis à Nucleic Acids Research

## I. Identification de résidus de la protéine Rrp9p impliqués dans sa fonction

Le rôle précis de la protéine Rrp9p n'étant pas connu, nous avons cherché à identifier des résidus pouvant être impliqués dans sa fonction, ce qui était susceptible de nous renseigner sur son/ses rôle(s) dans la cellule.

Ainsi, dans un premier temps, un modèle de la structure tridimensionnelle du domaine « hélix propeller » des protéines Rrp9p et U3-55K a été réalisé par C. Charron au laboratoire. Ce modèle a été établi par des logiciels utilisant l'homologie structurale avec la protéine GBB1 (Heterotrimeric guanine nucléotide-binding protein ou G proteins), qui contient également 7 domaines WD40 organisés en domaine « hélix propeller » et dont la structure tridimensionnelle avait été établie par radiocristallographie (PDB : 1GG2). Toutefois, GBB1 a une toute autre fonction que les protéines Rrp9p et U3-55K (Sprang *et al*, 1997), puisqu'elle est impliquée dans la signalisation cellulaire en réponse à des stimuli extérieurs. Afin d'identifier les résidus potentiellement impliqués dans la fonction de la protéine Rrp9p, un ensemble de mutants de Rrp9p ont été produits par N. Rolland, V. Igel-Bourguignon et E. Philippe, un à trois résidus étaient substitués par une alanine dans chaque mutant (**Fig. 24**). L'hypothèse que Rrp9p joue un rôle de plateforme en interagissant avec d'autres composants du processome a été formulée. L'idée était que l'interaction met en jeu les acides aminés accessibles à la surface des deux faces du domaine « hélix propeller ». Les acides aminés exposés à la surface au sein des boucles reliant les différents domaines WD40, non conservés dans GBB1 mais conservés entre Rrp9p et U3-55K, ont été mutés. On pouvait en effet supposer que ceux conservés dans GBB1 ont un rôle structural et que les acides aminés impliqués dans l'assemblage ou l'activité du processome soient conservés au cours de l'évolution. Les résidus structuraux formant les brins $\beta$ des domaines WD40 nécessaires à la structuration en « hélix propeller » n'ont pas été mutés (**Fig. 24**).

La structure tridimensionnelle du domaine « hélix propeller » des protéines Rrp9p et U3-55K a depuis été résolue par radiocristallographie par le groupe de Ye (Zhang *et*

**Figure 24 : Représentation des résidus de la protéine Rrp9p susceptibles d'être impliqués dans sa fonction.**

Différents résidus de la protéine Rrp9p ont été sélectionnés comme étant potentiellement importants pour sa fonction et ont été mutés en alanine, par série de une à trois substitutions simultanées, afin de générer les mutants de la protéine Rrp9p indiqués dans l'encart à droite. La fonctionnalité de ces mutants a été testée dans la souche W303::pGAL-RRP9. Les différents résidus mutés sont indiqués au sein de la structure tridimensionnelle de la protéine Rrp9p (Zhang *et al*, 2013 ; PDB : 4J0X). Ils sont sont représentés en orange, à part le résidu R289 qui a été montré important pour la fonction de la protéine Rrp9p qui est représenté en rouge. Ces images ont été réalisées à l'aide du logiciel Pymol.

*al*, 2013). Ceci nous a permis de confirmer que nos modèles reflétaient bien la structure 3D des deux protéines.

## II. Analyse de la fonctionnalité des mutants de la protéine Rrp9p

### II.1. Génération et validation de la souche W303::pGAL-*RRP9*

Afin de déterminer de manière directe si les résidus mutés avaient un rôle important pour la fonction de la protéine Rrp9p, nous avons tout d'abord dû générer une souche de levure, dans laquelle l'expression de la protéine Rrp9p endogène était placée sous le contrôle d'un promoteur GAL10 inductible en présence de galactose. Pour cela, nous avons utilisé la souche de levure *S. cerevisiae* W303, que nous avons convertie en une souche *S. cerevisiae* W303::pGAL-*RRP9.* Dans cette souche, en présence de galactose, la protéine Rrp9p endogène est exprimée, permettant une croissance optimale des levures, mais en présence de glucose, la protéine Rrp9p endogène n'est plus exprimée, provoquant une abolition de la croissance, qui peut toutefois être restaurée par l'expression en *trans,* à partir d'un plasmide, d'une protéine Rrp9p fonctionnelle. L'expression *en trans* d'une protéine Rrp9p non fonctionnelle ne permettant par contre pas de restaurer la croissance, ce qui nous a permis d'identifier les résidus mutés important pour la fonction de la protéine.

La souche W303 sauvage a donc été transformée avec un fragment d'ADN obtenu par PCR, contenant le gène d'auxotrophie *HIS3* suivi du promoteur GAL10, bordés par des séquences correspondant à deux segments de la région promotrice du gène *RRP9*. Les séquences correspondant à la région promotrice du gène *RRP9* ont été choisies afin de permettre l'intégration au génome du fragment, par recombinaison homologue, 40 pb en amont du codon d'initiation de la traduction du gène RRP9. Cette distance de 40 bp était requise puisque, sur l'autre brin, un gène potentiel (*YPR136C*) est chevauchant avec le gène *RRP9* à partir de la position 34 en amont de l'ATG. Bien que ce gène soit probablement un pseudogène ne permettant l'expression d'aucune protéine (Fisk *et al*, 2006), nous limitions le risque de l'observation d'un phénotype dû à son interruption. Après transformation de la souche W303, 6 colonies ont été obtenues sur milieu solide YPG HIS$^-$, traduisant

l'insertion du gène d'auxotrophie HIS3 dans le génome. Afin de vérifier que l'insertion avait bien eu lieu à l'endroit souhaité, nous avons réalisé un génotypage par PCR sur ADN génomique (ADNg) en utilisant deux couples d'oligonucléotides s'hybridant au niveau de différentes régions de l'ADNg (**Fig. 25**), ce qui nous permettait de vérifier que le promoteur GAL10 était bien inséré dans la région promotrice du gène *RRP9*.

Le couple de primers 3165/3166 permettait l'amplification de l'ORF de la protéine Rrp9p, tandis que le couple de primers 8517/3166 permettait l'amplification du promoteur GAL10 inséré et de l'ORF de la protéine Rrp9p. Le couple de primers 3165/3166 a bien permis de détecter une amplification de l'ORF de Rrp9p pour les 6 clones testés, alors qu'avec le couple de primers 8517/3166, une amplification n'était observée que pour les clones 2 et 6 (**Fig. 25**). Ces résultats montraient que, dans ces deux clones, le promoteur GAL10 était bien intégré en amont de l'ORF de Rrp9p. Nous avons sélectionné arbitrairement le clone 6 pour la suite des expériences. La répression de l'expression de la protéine Rrp9p endogène en présence de glucose a ensuite été vérifiée par des expériences de Western-blot (**Fig. 25**). En présence de galactose, nous détections bien une bande de faible intensité d'une taille légèrement supérieure à 70 kDa, correspondant à la protéine Rrp9p endogène, et nous observions bien sa disparition en présence de glucose, ce qui traduisait bien la répression de l'expression de la protéine endogène dans la souche (**Fig. 25**). Dans cette expérience, nous avons utilisé comme contrôle l'expression de la protéine de fusion ProteinA-Rrp9p (ProtA-Rrp9p) à partir du plasmide pG1. Ensuite, l'effet de l'absence de Rrp9p sur la croissance des levures a été étudiée (**Fig. 25**). Pour cela, des gouttes issues de cultures, à différentes concentrations cellulaires, ont été déposées sur milieu solide contenant soit du galactose (YPG) soit du glucose (YPD), et les boîtes de Petri ont été incubées à 30°C pendant 2 jours. En présence de galactose, nous observions une croissance uniforme pour les souches W303, W303::pGAL-RRP9 et W303::pGAL-RRP9 transformée par un plasmide vide ou exprimant la protéine de fusion ProtA-Rrp9p WT. (**Fig. 25**). En présence de glucose, nous observions une abolition de la croissance de la souche W303::pGAL-*RRP9* non transformée ou transformée par un plasmide vide, ceci contrairement à ce qui était observé pour la souche W303 (**Fig. 25**). Nous en avons conclu que l'expression de la protéine Rrp9p endogène était bien abolie en présence de glucose. Ces données confirmaient le caractère essentiel de la protéine Rrp9p (Venema *et al*, 2000). De

**Figure 25 : Validation de la souche W303::pGAL-*RRP9*.**

**A.** A droite est représentée schématiquement est représentée la région génomique du gène *RRP9* correspondant à la souche W303::pGAL-RRP9. Après l'évènement de recombinaison, la souche W303::pGAL-RRP9 a pu être sélectionnée par le marqueur d'auxotrophie HIS3 et le gène *RRP9* était ainsi placé sous le contrôle du promoteur GAL10, entrainant le déplacement en amont du promoteur endogène du gène RRP9 et ainsi son inactivation. Une réaction de PCR a été effectuée sur de l'ADNg en utilisant deux couples d'oligonucléotides (3165/3166 et 8517/3166). Ils permettaient de vérifier la présence de l'insertion du promoteur GAL10. **B.** Une expérience de Western-blot a également été réalisée à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine Rrp9p, ceci afin de vérifier que l'expression de la protéine Rrp9p endogène était bien réprimée en milieu solide YPD. Comme contrôle, nous avons utilisé le plasmide pG1::PROTA sans ((-)) et avec l'ORF de Rrp9p (Rrp9p). **C.** La comparaison de la croissance de la souche W303 et de la W303::pGAL-RRP9, transformée ou non par un plasmide vide ((-)) ou un plasmide exprimant la protéine Rrp9p (Rrp9), a été effectuée en milieu YPD à 3 températures (20°C, 30°C et 37°C) et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). YPG et YPD : milieu riche contenant respectivement du galactose ou du glucose.

plus, l'expression *en trans* d'une protéine ProtA-Rrp9p WT à partir d'un plasmide permettait de restaurer la croissance de la souche W303::pGAL-*RRP9* (**Fig. 25**). Nous avions donc bien réussi à générer une souche W303::pGAL-*RRP9* dans laquelle l'expression de la protéine Rrp9p endogène pouvait être modulée en présence de galactose/glucose. Ce système était en outre utilisable pour tester la fonctionnalité des mutants de Rrp9p en utilisant la protéine de fusion ProtA-Rrp9p sauvage ou mutée.

## II.2. Etude de la fonction des mutants de la protéine Rrp9p

Nous avons utilisé la souche W303::pGAL-*RRP9* pour déterminer la fonction de l'ensemble des mutants de la protéine Rrp9p qui avaient été générés. Cette souche a pour cela été transformée par des plasmides permettant l'expression de ces mutants et des analyses de la croissance ont été effectuées sur milieu solide à 3 températures (20°C, 30°C et 37°C) (**Fig. 26**).

Nous avons toujours réalisé un contrôle de croissance des souches exprimant les mutants de Rrp9p sur milieu solide YPG, ce qui nous permettait en plus de vérifier que des quantités similaires de cellules avaient bien été déposées sur le milieu solide. Dans un premier temps, nous avons déterminé si les domaines N-terminal et/ou « hélix propeller » de la protéine Rrp9p étaient capables à eux seuls d'assurer une croissance cellulaire. En exprimant seulement le domaine « hélix propeller », la croissance était comparable à celle obtenue avec Rrp9p WT, ceci aux 3 températures testées. Ceci suggérait que le domaine « hélix propeller » est suffisant pour la fonction de la protéine Rrp9p (**Fig. 26**). En revanche, en exprimant seulement le domaine N-terminal de la protéine, nous n'observions qu'une légère croissance par rapport à Rrp9p WT, ce qui suggèrait que ce domaine N-terminal seul est capable d'assurer une partie de l'activité de la protéine Rrp9p. Ces expériences, que nous avons répété au moins 3 fois, mettaient en lumière l'importance du domaine « hélix propeller » pour la fonction de la protéine Rrp9p (**Fig. 26**). Il faut noter que, récemment, l'équipe de Ye, en exprimant seulement le domaine « hélix propeller », a

**Figure 26 : Analyse de la fonctionnalité des différents mutants générés dans la protéine Rrp9p.** Afin de déterminer la fonctionnalité des différents mutants de la protéine Rrp9p qui avaient été généré, des analyses de croissance de la souche W303::pGAL exprimant ces mutants ont été réalisées sur milieu YPG et YPD à 3 températures (20°C, 30°C et 37°C) et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). Seul le mutant Rrp9p RK 289/290 AA s'est avéré présenter un défaut de croissance. YPG et YPD : milieu riche contenant respectivement du galactose ou du glucose.

observé une croissance quasiment nulle des cellules, ce qui est contraire à nos propres résultats (Zhang *et al*, 2013).

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé si les mutations de certains résidus de surface que nous avions généré, localisés au sein des boucles de surface situées entre les différents domaines WD40, entrainaient un défaut de croissance. La majorité des mutants testés avaient une croissance comparable à celle obtenue pour les plasmides exprimant Rrp9p WT, suggérant que ces résidus ne sont pas impliqués dans la fonction de la protéine Rrp9p (**Fig. 26**). Par contre, quand le mutant Rrp9p R289A/K290A était exprimé, un défaut de croissance important était observé aux 3 températures testées. Ce défaut était plus important à 30°C et surtout à 20°C, par rapport à 37°C (**Fig. 26**). La caractérisation de ce mutant et la détermination du rôle des résidus R289 et K290 dans la fonction de la protéine Rrp9p sont présentés dans un article soumis à Nucleic Acids Research, inseré dans ce chapitre à la fin de la partie III.

## III. Caractérisation du mutant Rrp9p R289A

Le défaut de croissance induit par le mutant ProtA-Rrp9p R289A/K290A révélait un rôle important des résidus R289 et/ou K290 dans la fonction de la protéine Rrp9p, nous avons donc entrepris une caractérisation plus fine de ce mutant.

Tout d'abord, nous avons dissocié la double mutation R289A/K290A en deux mutations ponctuelles R289A et K290A et analysé la croissance de la souche W303::pGAL-*RRP9* exprimant ces mutants individualisés. Seul le résidu R289 s'était avéré impliqué dans la fonction de la protéine Rrp9p, puisque sa mutation en alanine induisait un défaut de croissance identique, voir plus sévère, à celui observé pour le double mutant (**Fig. 1 publication**). La croissance en présence de Rrp9p K290A était identique à celle en présence de Rrp9p WT (**Fig. 1 publication**). Nous avons alors cherché à savoir à quel(s) niveau(x) le résidu R289 pouvait intervenir dans la fonction de la protéine Rrp9p. Dans un premier temps, nous avons vérifié par expériences de Western-blot, en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine Rrp9p, que la mutation de l'arginine 289 en alanine ne perturbait pas la stabilité de la protéine ProtA-Rrp9p R289A (**Fig. 2A publication**). Elle s'est avérée être aussi stable que la protéine sauvage (**Fig. 2A publication**). Dans un deuxième temps,

nous avons vérifié que la snoRNP U3 était toujours bien assemblée dans les cellules, en confirmant d'une part, que le snoARN U3 était stable en présence du mutant ProtA-Rrp9p R289A. D'autre part, les capacités d'association de la protéine de fusion ProtA-Rrp9p sauvage avaient déjà été démontrées par notre équipe (Clery *et al*, 2007). Nous avons donc vérifié que la protéine ProtA-Rrp9p R289A s'associait toujours efficacement au snoARN U3 (**Fig. 2B publication**). Le défaut de fonction du mutant Rrp9p R289A n'étant toujours pas expliqué, nous avons alors testé si la mutation pouvait conduire à un défaut de maturation du pré-ARNr 35S, puisque la protéine Rrp9p et la snoRNP U3, en général, sont impliquées dans ce processus. Nous avons ainsi montré qu'en présence du mutant ProtA-Rrp9p R289A, le taux de l'ARNr 18S diminuait tandis que les pré-ARNr 35S, 23S, 22S et dans une moindre mesure 33S, s'accumulaient, sans que le taux du pré-ARNr 20S ne semble affecté (**Fig. 3 publication**). Ce profil de maturation perturbé par rapport à ProtA-Rrp9p WT était plus marqué à 20°C, ce qui était en accord avec le défaut de croissance particulièrement important à cette température. Nous en avons alors déduit qu'en présence de ProtA-Rrp9p R289A, le défaut de croissance devait être dû à un défaut de maturation des pré-ARNr menant à la production de l'ARNr 18S, et plus précisément à un fort ralentissement des clivages précoces aux sites A1 et A2, reflété par la forte accumulation du pré-ARNr 22S (**Fig. 3 publication**). Les clivages aux sites A0 et A3 ne semblent eux pas affectés par la mutation. Ainsi, le résidu R289 de la protéine Rrp9p pourrait avoir une importance pour les étapes de clivages précoces aux sites A1 et A2. La question se posait alors d'identifier comment ce résidu pouvait intervenir dans les étapes de maturation du pré-ARNr 35S. Les étapes de clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 se déroulant dans le processome, dont la snoRNP U3 et la protéine Rrp9p font partie, nous avons émis l'hypothèse que le recrutement d'un ou plusieurs partenaires de Rrp9p pouvaient être plus lent lors de l'assemblage du processome en présence du mutant ProtA-Rrp9p R289A. Comme peu d'informations étaient disponibles sur les interactions de Rrp9p, nous avons alors réalisé des expériences de criblage à grande échelle des interactions possibles de Rrp9p avec les protéines du processome par la technique de double hybtride. Après avoir ainsi identifié deux partenaires potentiels de la protéine Rrp9p WT, les protéines Sgd1p et Rrp36p, nous avons montré par l'approche de double hybride que le mutant Rrp9p R289A interagissait toujours efficacement avec Sgd1p, alors que l'association entre Rrp9p R289A et Rrp36p était diminuée selon les données

obtenues par cette approche (**Fig. 4 publication**). Les capacités d'interaction des protéines observées entre les protéines Rrp36p et Rrp9p WT, ainsi que Rrp9p R289A ont été confirmées par la technique de GST pull-down, qui ont en outre permis de déterminer que ces interactions étaient directes. (**Fig. 4 publication**). En conclusion, nous avons mis en évidence que le résidu R289 de la protéine Rrp9p pourrait jouer un rôle dans l'association avec Rrp36p au sein du processome, et que l'efficacité de cette association semble nécessaire à la réalisation des clivages précoces aux sites A1 et A2.

En parallèle, nous avons mis en évidence par l'approche de double hybride un réseau d'interaction protéine/protéine encore non-identifié au sein du processome. Ce réseau inclut des interactions entre la protéine Rrp9p et les protéines Sgd1p et Rrp36p, ainsi qu'entre Sgd1p et Rrp36p et une interaction de chacune de ces protéines avec la protéine Rrp5p (**Fig. 4 et 5 publication**). L'interaction entre les protéines Rrp36p et Sgd1p semble néanmoins plus faible que les autres interactions observées (**Fig. 4 publication**). En revanche, aucune association entre les protéines Rrp9p et Rrp5p n'a pu être observée par l'approche de double hybride. Ainsi, ce réseau pourrait être fragilisé au sein du processome par la présence de la mutation R289A de Rrp9p, la protéine mutée interagissant plus faiblement avec Rrp36p. Ce qui pourrait expliquer le ralentissement de la cinétique de clivage aux sites A1 et A2. Le résidu R289 pourrait donc être important pour le recrutement de Rrp36p dans le processome, ou pour la mise en place d'une architecture bien définie, impliquant Rrp36p et la snoRNP U3 au sein du processome.

Il est intéressant de souligner le fait que lorsque la protéine Rrp9p n'est plus exprimée, de manière endogène et/ou en *trans* à partir d'un plasmide vide dans la souche W303::pGAL-*RRP9*, le taux du snoARN U3 diminue fortement dans les cellules (**Fig. 2B publication**). Ce résultat montre que la protéine Rrp9p est nécessaire à la stabilité de la snoRNP U3, comme cela a été décrit pour son homologue humain U3-55K, bien que ces données aient été controversées.

# PUBLICATION

**The R289A mutation in the *Saccharomyces cerevisiae* Rrp9p protein slows down early cleavages of pre-ribosomal RNA at sites A1 and A2 and decreases Rrp9p affinity for Rrp36p, another 90S processome component.**

Guillaume Clerget, Valérie Bourguignon-Igel, Nicolas Rolland, Christophe Charron, Ludivine Wacheul, Xavier Manival, Véronique Senty-Ségault, Denis Lafontaine, Mathieu Rederstorff* and Christiane Branlant*

mailto: christiane.branlant@univ-lorraine.fr or mathieu.rederstorff@univ-lorraine.fr

**Abstract**

In the nucleolus, maturation of yeast 35S pre-rRNA takes place in a large macrocomplex: the 90S pre-ribosome or Small Subunit (SSU) processome. U3 snoRNP is a key component of this catalytic machinery. By formation of 5 base-pair interactions with the pre-rRNA, the U3 snoRNA guides the pre-rRNA early cleavages at sites A0, A1 and A2. In addition, besides the 4 C/D box core proteins, the U3 snoRNP contains a specific protein, Rrp9p, which associates to the U3 B/C motif. It is essential for cell growth and is also required for cleavages at sites A0, A1 and A2. However, information on how it is involved in these early cleavages was lacking. Here, to fill this gap, we mutated surface residues of the Rrp9p helix propeller domain and identified Arginine 289 as a residue needed for correct maturation of the 35S pre-rRNA in the SSU processome. Its mutation into alanine reduces cell growth and specifically alters the kinetics of cleavages at sites A1 and A2, leading to a decreased 18S rRNA production. In addition, we showed the direct interaction of Rrp9p with another protein of the processome Rrp36p. This interaction is reduced in the presence of the R289A Rrp9p mutation, which possibly explains the observed pre-rRNA maturation defect. In addition, by the use of two hybrid assays, we identified a new network of protein-protein interactions within the SSU processome which includes proteins Rrp9p and Rrp36p as well as Sgd1p and Rrp5p.

## Introduction

In eukaryotes, synthesis of the RNA moiety of cytoplasmic ribosomes takes place in the nucleolus, except for the 5S rRNA which is transcribed by RNA polymerase III in the nucleoplasm. In the nucleolus, a long precursor RNA (35S pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*) containing the sequences needed for the production of the 18S, 5.8S and 25S/28S rRNAs is transcribed by RNA polymerase I and subjected to an ordered series of endo- and exo-nucleolytic cleavages leading to the three mature rRNAs. In yeast, the early cleavages at sites A0, A1 and A2 in the 5' part of the transcript liberate the 20S intermediate, a precursor of the 18S rRNA and the 27SA2 RNA intermediate, a precursor of the 5.8S and 25S rRNAs. Later cleavages in the 3' part of the transcripts give rise to the mature 5.8S and 25S rRNAs (Brand & Planta, 1975 ; Venema & Tollervey 1999 ; Phipps *et al*, 2011). Besides being cleaved, the pre-rRNA is 2'-O methylated and pseudouridylated at several positions and these modifications are catalyzed by small nucleolar Ribonucleoproteic particles (snoRNPs) and guided by the small nucleolar RNAs (snoRNAs) contained in these particles (Kiss, 2001 ; Bachellerie & Cavaillé, 1997, Ganot *et al*, 1997). H/ACA box snoRNPs catalyze pseudourydilations and C/D box snoRNPs catalyze ribose 2'-O-methylations. A limited set of these numerous snoRNPs, such as U3 or U14, are involved in the early cleavages of the pre-rRNA. Indeed, the U3 snoRNP, a C/D box snoRNP, has the unique feature to be required for early cleavages at sites A0, A1 and A2, and has no yet identified 2'-O-methylation activity (Hughes *et al*, 1987 ; Hughes & Ares, 1991 ; Hughes, 1996 ; Beltrame & Tollervey, 1992, 1995 ; Méreau *et al*, 1997). The U3 snoRNP was found to be required for assembly of a large complex, designated as the small subunit (SSU) processome or 90S pre-ribosomal particle on the pre-rRNA transcript, where the early cleavages of the pre-rRNA, its modification by snoRNPs and the assembly of several ribosomal proteins on the 18S rRNA tale place. The SSU processome contains more than 70 proteins as well as the snoRNP proteins (Phipps *et al*, 2011, Baserga *et al*, 1997 ; Dragon *et al*, 2002 ; Grandi et al, 2002 ; Bernstein *et al*, 2004 ; Kressler *et al*, 2010 ; Fatica & Tollervey, 2002 ; Granneman & Baserga, 2004 ; Henras *et al*, 2008 ; Mougey, 1993). After liberation of the 20S rRNA intermediate (18S rRNA precursor), new complexes are formed on the remaining part of the pre-rRNA that contains the 5.8S and the 25/28S rRNA sequences (Kressler et al, 2010 ; Granneman & Baserga, 2004 ; Fatica & Tollervey, 2002). The U3 snoRNP contains the U3 snoRNA and two sets of proteins that are respectively binding to the conserved C'/D and B/C motifs of the U3 snoRNA, each of these motifs forming a K-turn structure recognized by the Snu13p protein (Watkins *et al*, 2000, 2002, 2004 ; Clery *et al*, 2007 ;). The C'/D motif binds to the canonical set of C/D box

proteins Snu13p, Nop56p, Nop58p and Nop1p in yeast (Watkins *et al*, 2000, 2002, 2004 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2003 ; Charron *et al*, 2004), while the B/C motif binds to Snu13p and a U3 specific protein specific, which is called Rrp9p in yeast and is essential for cell growth (Lukowiak *et al*, 2000 ; Watkins *et al*, 2000, 2002, 2004 ; Venema *et al*, 2000 ; Clery *et al*, 2007). In addition to other C/D box snoRNAs, the U3 snoRNA features a large 5' extension (Gerbi *et al*, 2001 ; Steitz *et al*, 1990, Segault *et al*, 1992). This 5' extension forms five base-pair interactions with the pre-rRNA. Three of them involve the 18S rRNA sequences needed to form the central pseudoknot (Gutell *et al*, 1994 ; Neefs *et al*, 1993 ; Hughes *et al*, 1996). Formation of these heterologous base-pair interactions is required for cleavages at sites A0, A1 and A2 (Hughes *et al*, 1996 ; Beltrame & Tollervey, 1992, 1995 ; Méreau *et al*, 1997 ; Gerbi *et al*, 2001 ; Borovjagin & Gerbi, 2001, 2004, 2005). The 5' domain of the U3 snoRNA also binds to the Mpp10p-Imp3p-Imp4p protein complex, the association of which stabilizing the interaction with the pre-rRNA (Gallagher *et al*, 2004 ; Wormsley *et al*, 2001 ; Lee & Baserga, 1997, 1999 ; Shah *et al*, 2013 ; Gerczei *et al*, 2009 ; Gerczei & Correll, 2004 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011). The proteins Mpp10p, Imp3p, Imp4p as well as Rrp9p are also required for the cleavages at the A0, A1 and A2 sites and therefore for 18S rRNA production (Lee & Baserga, 1997, 1999 ; Dunbar *et al*, 1997 ; Baserga *et al*, 1997 ; Venema *et al*, 2000 ; Clery *et al*, 2007 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011).

The Rrp9p protein as well as its mammalian homolog, the U3-55kD protein, are members of the WD40 family of proteins (Pluk *et al*, 1998). Proteins of this family contain 4 to 8 WD repeats that fold into a helix propeller structure (Wall *et al*, 1995 ; Gardner *et al*, 1995). The helix propeller domains are considered to be protein-protein interaction domains and the 90S processome contains numerous proteins of this family (Smith *et al*, 1999 ; Zhang *et al*, 2013). The 3D structure of the Rrp9p and U3-55kD helix propeller containing 7WD motifs have been solved at high resolution by X-ray crystallography (Zhang *et al*, 2013). After the initial binding of Snu13p, Rrp9p is recruited on U3 snoRNA and binds to both Snu13p and to the B/C box of the U3 snoRNA. We previously established the sequence requirement for this association (Clery *et al*, 2007). Similarly, the human U3-55kD protein binds to the 15.5kd protein, the human counterpart of Snu13p, and to B/C box sequences (Lukowiak *et al*, 2000 ; Watkins *et al*, 2002 ; Granneman *et al*, 2002 ; Knox *et al*, 2011). Altogether, these published data reveal the high complexity of ribosome biogenesis in eukaryotes, which depends on the assembly of large macro-complexes.

During the recent years, various subcomplexes involved in the assembly of the SSU-processome have been identified (Utp-A, UtpB, UtpC, the Mpp10 complex completer) (Dosil

& Bustelo, 2004 ; Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011) However, all of the SSU processome components have probably not been identified yet, as illustrated by the recent discovery of a new protein component, the Rrp36p protein (Gerus *et al*, 2010). The order of assembly of the subcomplexes has been studied (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011), however, we are far from understanding the mechanisms of action of the components of the SSU-processome in pre-rRNA cleavage. This is particularky the case for the Rrp9p protein, which is essential for growth and required for the early cleavages.

In this study, we hypothesized that surface mutations in the helix propeller domain of the Rrp9p protein would affect its function in the yeast SSU-processome and that study of the generated defect would bring information on the mechanism of action of Rrp9p. Therefore, based on the Rrp9p 3D structure, we generated Rrp9p variants with single, double or triple mutations of surface residues. Then, by the use of yeast genetics and biochemical approaches, we identified one surface residue, R289, which mutation into an alanine affects the kinetics of the A1 and A2 early cleavages. We then hypothesized that this mutation could reduce the ability of Rrp9p to interact with some components of the SSU-processome. Through a wide screening of the interaction of WT and mutated Rrp9p with components of the SSU processome by two- hybrid assays, we showed that Rrp9p interacts with Rrp36p and that the stability of the interaction is decreased in the presence of the Rrp9p R289A mutation. We also confirmed the interaction of Sgd1p with Rrp9p, which is not affected by the R289A. Finally, yeast two hybrid assays allowed us to define a network of interactions that may be important for the processome activity, involving Rrp9p, Sgd1p, Rrp36p as well as Rrp5p, a protein which has the peculiarity to be involved both in 18S and 5.8S/25S processing (Vos *et al*, 2004 ; de Boer *et al*, 2006 ; Eppens *et al*, 1999 ; Venema & Tollervey, 1996). The possible implication of the identified network of interactions for pre-rRNA maturation will be discussed.

The interest of the present data are reinforced by the high degree of conservation of ribosome biogenesis in eukaryotes, the importance of this process in the regulation of cell cycle and for understanding an increasing number of diseases, including cancer, which are related to ribosome synthesis defects (Phipps *et al*, 2011).

## Results

### The R289A substitution in Rrp9p has a marked negative effect on yeast cell growth

As stated in the introduction, Rrp9p contains a helix propeller domain formed by 7 WD subdomains, which is expected to play an important role in Rrp9p activity. To test this hypothesis, we decided to mutate the surface residues of this domain. When we started this project, the 3D structure of the Rrp9p propeller was not solved. However, based on the great similarity of helix propeller 3D structures, by homology modeling, it was possible to propose 3D structure models with a high reliability for the Rrp9p and 55kD helix propeller domains. This reliability was confirmed by similarity of these models with the high resolution 3D structure established later on by X-ray crystallography (Zhang *et al*, 2013). We used the established models to define the best amino acids to mutate. We focused the mutational analysis on the surface amino-acids expected to be the site of contact with partner proteins. However, we discarded from the selection the surface amino acids conserved in several of the helix propeller domains with 7 WD subdomains, because they were likely to play structural roles. Interpretation of the mutation effect would have been too complex for such mutation. On the other hand, as we expected that important functional amino acids in Rrp9p would be conserved in protein 55 kD, we decided to substitute only surface amino acids conserved in Rrp9p and the 55kD protein, that additionally were not conserved in similar helix propeller domain proteins having a different function. All residues were substituted by alanine, which was expected to limit the effects on protein structure. As shown in Figure 1A and Supplementary Figure 1, each of the 9 mutants that were designed contained either a unique substitution, or two or three successive amino acid substitutions. To study the impact of each mutant on yeast growth, we generated a *S. cerevisiae* W303 strain derivative by insertion of the *S. cerevisiae* galactose promoter upstream of the endogenous *RRP9* ORF, so that in the resulting W303::pGAL-*RRP9* strain, this gene was expressed in the presence of galactose, but repressed in the presence of glucose (Supplementary Figure 2). Cells were transformed with a plasmid expressing the WT or mutant Rrp9p protein carrying a protein A tag at their N-terminus, or with an empty plasmid as a control. For each condition, 0.1 $A_{600nm}$ of a galactose pre-culture were used to inoculate a repressive glucose liquid medium for 24 h. Next, cells were subjected to serial dilutions and for each mutant, cell dilutions ranging from 0.001 to 0.3 $A_{600nm}$/ml were plated onto glucose Petri dishes (Figure 1 B and Supplementary Figure 1). To test for possible temperature effects, growth was tested at three different temperatures (20, 30 and 37°C). Interestingly, only cells expressing the R289A-K290A mutant (Figure 1B), but

none of the 8 other mutants (Supplementary Figure 1), showed a growth defect. While cells expressing the WT Rrp9p were growing at each of the tested dilutions and temperatures, at 30 and 37°C, a reduced growth was observed at the 0.01 $A_{600nm}$/ml dilution for cells expressing the R289A-K290A mutant and almost no growth was observed at the 0.001 $A_{600nm}$/ml dilution. The growth defect was even exacerbated at 20°C. At this temperature, almost no growth was observed at the 0.01 $A_{600nm}$/ml dilution. To determine whether the two mutations were required to observe this growth phenotype, or if only one of them was able to generate it, the two substitutions were individually generated in the *RRP9* gene. Growth tests on repressive glucose medium indicated that only mutation of the 289 amino acid is important to get the phenotype. Therefore, this amino acid is required for full Rrp9p activity, as the single mutant K290A generated no growth defect (Figure 1B). Interestingly, the phenotype observed for the single R289A mutation appeared to be even more severe than that found for the initial double mutant.

As Rrp9p is an essential protein, we verified that the growth defect observed for the Rrp9p K290A variant was not simply due to the instability of the mutant protein in yeast cells. Western blot experiments showed that the Rrp9p K289A mutant protein was efficiently expressed and as stable as the wild-type Rrp9p protein, even at 20°C (Figure 2A).

Altogether, our results indicated that the R289A Rrp9p mutant is stable and leads to a marked cell growth defect, especially at 20°C.

**U3 snoRNA associates with Rrp9p R289A and the U3 snoRNP formed is stable**

Mutations in the B/C motifs that alter the association of Rrp9p with U3 snoRNA had been identified (Cléry *et al*, 2007). Conversely, mutations in Rrp9p that may abolish this association had not been described. Therefore, we could not rule out that a decreased association of the Rrp9p R289A mutant with U3 snoRNA may generate U3 snoRNA instability in yeast cells. However, northern-blot analysis using a specific U3 snoRNA probe demonstrated the stability of U3 snoRNA in W303::pGAL-*RRP9* cells grown on glucose medium with ectopic expression of the R289A Rrp9p protein (Figure 2B). Indeed, in concordance with previous data (Venema *et al*, 2000), under repressive glucose conditions, a reduced level of U3 snoRNA was observed when Rrp9p was not expressed (Figure 2B, lane 1). However, we did not observe a reduced U3 snoRNA level when the Rrp9p R289A mutant was expressed, compared to WT protein expression (Figure 2B, compare lanes 2 and 3). This suggested that association between U3 snoRNA and Rrp9p was not impaired by the mutation, which was confirmed by pull-down experiments using specific antibodies directed against the

protein A tag carried by the ectopically expressed WT and R289A Rrp9p proteins (Figure 2B), showing that similar amounts of U3 snoRNA were immuno-selected when the WT or the mutated Rrp9p protein were expressed (Figure 2B). Additionally, no aberrant U3 snoRNA processing was detected in these experiments, indicating that U3 snoRNA was properly spliced and processed at its 3' end.

Hence, our results show that the reduced growth phenotype generated by the R289A mutation can neither be explained by a defect of the association of the mutant Rrp9p protein with U3 snoRNA, nor by the destabilization of the U3 snoRNA in presence of the mutant protein. Therefore, we could discard the possibility that the R289A Rrp9p mutation affects U3 snoRNP assembly and its stability, suggesting that the observed growth defect was linked to a defect of the U3 snoRNP function.

**Accumulation of a 22S pre-rRNA maturation intermediate upon R289A expression**

As protein Rrp9p was known to be required for early cleavages of the pre-rRNA (Figure 3C), we checked whether expression of the Rrp9p R289A mutant alters some of the pre-ribosomal RNA maturation steps. To this end, we analyzed the 35S pre-ribosomal RNA maturation profile upon ectopic expression of the R289A mutant (Figure 3). As expected in the negative control experiment where Rrp9p was not expressed, the 35S pre-rRNA accumulated, as well as the 23S RNA intermediate, resulting from a cleavage at the U3 independent A3 site. Furthermore, almost no 20S intermediate and 18S rRNA were detected (Figure 3A, lanes (-) compared to WT). Cleavages at positions A0, A1 and A2 were abolished, which confirmed the essential role of Rrp9p for these early cleavages (Venema *et al*, 2000). Interestingly, for growth at 30°C upon expression of the Rrp9p R289A mutant, we also observed some accumulation of the 35S pre-rRNA and of the 23S intermediate (Figure 3A, lane R289A), as well as a marked defect of the 18S rRNA production. Surprisingly, the 20S intermediate level did not seem to be affected, while a new intermediate, most likely the 22S RNA cleaved at sites A0 and A3, but not at sites A1 and A2, appeared . The same kind of profile was observed at 37°C, and in accordance with the observed reinforced growth defect at 20°C, a reinforced accumulation of the 35S pre-RNA, the 23S and 22S intermediates was detected, at this temperature, as well as a stronger decrease of the 18S rRNA production (data not shown, Figure 1B). Hence, the Rrp9p R289A mutation leads to a strong impairment of the pre-rRNA 35S processing, which explains the growth defects observed upon its expression in the W303::pGAL-*RRP9* cells. Indeed, in the presence of this mutant protein, the kinetics of early cleavages of the pre-rRNA is severely altered leading to a marked decrease of 18S rRNA

formation. This was confirmed by detection of a decrease in 40S small ribosomal subunit and 80S ribosome accumulations after centrifugation of the cellular extract of the W303::pGAL-*RRP9* cells expressing the mutant protein on glycerol gradient. This decrease was, as expected, correlated to a strong increase of the free 60S subunit sedimentation peak (Supplementary Figure 3).

In order to confirm that the new maturation intermediate which accumulated upon expression of Rrp9p R289A was indeed the 22S RNA intermediate, cleaved at position A0 and A3, but not at positions A1 and A2, we designed specific probes in order to determine the identity of the intermediate extremities by northern-blot experiments (Figure 3B, C) (sequences of the probes are given in the Supplementary Table 1). The binding site of probe 1 was located between sites A2 and D enabling detection of the 35S pre-rRNA and the 23S, 22S and 20S RNA intermediates. Probe 2 binding site was located between sites A2 and A3. This probe was dedicated to detection of intermediates that were not cleaved at site A2, namely the 35S pre-rRNA, the 23S and 22S intermediates, but not the 20S intermediate. Probe 3 hybridized between sites A0 and A1 and revealed the intermediates that were not cleaved at site A1, thus detecting the 35S pre-rRNA and the 23S and 22S intermediates. Probe 4 was binding upstream of site A0, revealing only the 35S pre-rRNA and the 23S intermediate that is not cleaved at site A0. Finally, probe 5 was binding downstream from site A3, and was only detecting the 35S pre-rRNA and intermediates involved in the 5.8S and 25S maturation. The absence of binding of probes 4 and 5 and the binding of probes 1, 2 and 3 to the abnormally accumulated intermediate species confirmed that it was the 22S intermediate cleaved at sites A0 and A3 but not at sites A1 and A2. Additionally, a primer extension experiment performed with a primer hybridizing 36 nucleotides downstream of the A0 site, completed the demonstration by showing the absence of cleavage at position A0 (Figure 3D).

Altogether our results clearly show that in the presence of the R289A Rrp9p protein, cleavages at sites A0 and A3 still occur, while the kinetics of cleavages at sites A1 and A2 are strongly reduced. Hence, residue R289 is required for correct A1 and A2 cleavages. Its mutation leads to reduced 18S rRNA production explaining the observed growth defect.

**Rrp9p Interacts with Sgd1p and Rrp36p**

Rrp9p is a U3 snoRNP specific protein. It contains a helix propeller domain, which frequently play a platform role for protein-protein interactions (Wall *et al*, 1995 ; Gardner *et al*, 1995). It was therefore reasonable to presume that Rrp9p might develop specific interactions with other

proteins in the processome. Furthermore, the phenotype observed with the R289A mutant of Rrp9p could result from defects in these interactions.

Therefore, to elucidate the mechanisms precluding the 18S maturation defects in presence of the Rrp9p R289A mutant, we first tried to identify novel Rrp9p partners within the processome. To this end, we used yeast two-hybrid assays, and tested the possible interaction of 34 proteins of the processome with Rrp9p. The different proteins were selected, based on their implication in defined processome sub-complexes such as UTP-B (lim *et al*, 2011). We also included the proteins of the Mpp10 sub-complex (Mpp10p, Imp3p and Imp4p), because of their implication in the early cleavages at positions A0, A1 and A2, as well as the proteins Utp3bp and Utp25p, because of their putative implication between the sub-complexes UTP-B and Mpp10. SnoRNP core proteins were tested as well, so as the proteins Sgd1, previously observed in association to Rrp9p (lim *et al*, 2011 ; Tarassov *et al*, 2008), Utp24p, putatively involved in early cleavages (Bleichert *et al*, 2006 ; Tomecki *et al*, 2015), and finally Rrp5p, which mutations were shown to inhibit cleavage at position A2 (Torchet *et al*, 1998 ; Eppens *et al*, 1999, 2002 ; Torchet & le Denmat, 2000, 2002 ; Vos *et al*, 2004 ; de Boer *et al*, 2006). The tests were systematically performed in the two orientations, as each protein was fused to both the activation domain (AD) or the DNA-binding domain (BD) of the Gal4 transcription factor. Altogether, this represented a lot of constructs to generate and more than 70 different yeast mating experiments (data not shown).

Among the 34 protein tested, only two gave a positive two hybrid signal with Rrp9p, the protein Sgd1p, which was already proposed to interact with Rrp9p based on protein fragment complementation assay (Lim *et al*, 2011 ; Tarrassov *et al*, 2008) gave a positive signal, as well as the newly identified processome component Rrp36p (Gerus *et al*, 2010) (Figure 4A). We completed the study by next testing the possible interaction between Sgd1p and Rrp36p and indeed got a positive two-hybrid signal, suggesting that they interact together as well (Figures 4 A and B). Furthermore, by testing the possible interaction between Sgd1p and Rrp36p with some other proteins of the processome, we found that they both give a positive two-hybrid signal with a fourth protein, Rrp5p (Figures 4 A and B). The interactions of Rrp5p both with Rrp36p and with Sgd1p appeared to be slightly more stable than those of Rrp9p with Rrp36p or Sgd1p as cells were growing in the presence of up to 40 mM of 3-AT (Figures 4 A and B). Taking into account the known interaction of the Mpp10p complex with the complex structure formed by base-pair interaction of the U3 snoRNA 5' domain with the pre-rRNA, one could have expected the observation of an interaction of Rrp9p with a least one protein of this complex. However, no interaction between Rrp9p and Imp3p, Imp4p or

Mpp10p was detected by two-hybrid assays. Altogether, our results reveal the existence of a yet not identified network of protein-protein interactions within the SSU-processome involving at least four proteins: Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p and Rrp5p (Figures 4 and 5).

**Direct Interaction of Rrp9p with Rrp36p is weakened by the Rrp9p R289A mutation**

To determine whether the newly identified interactions detected were direct or not, GST-pull down assays were performed using purified GST-tagged proteins and *in vitro* translated proteins that were labeled with $^{35}$S-methionine (Figure 4C). Our results showed that Rrp9p specifically and directly interacts with Rrp36p, even in the absence of RNAs (Figure 4C +/- RNase A). A direct interaction was also observed between Rrp5p and Rrp36p (Figure 4D). The interactions between Rrp36p and Sgd1p on one hand, and Rrp9p and Sgd1p on the other hand, did not appear to be direct (data not shown).

Next, to determine whether the R289 residue of Rrp9p was involved in the detected protein-protein interaction network, yeast two-hybrid assays were reproduced with the mutant Rrp9p protein (Figure 4A and B). While the Rrp9p-Sgd1p interaction was not affected in presence of the mutation, the Rrp36p-Rrp9p interaction was markedly reduced (Figure 4B, compare the wild-type and R289A mutant). This observation was confirmed by GST-pull down assays showing a weaker interaction of Rrp36p with the GST-Rrp9p R289A protein as compared to the GST-WTRrp9p protein (Figure 4C). Hence, the R289A mutation likely decreases the *in vivo* stability of the Rrp9p-Rrp36p interaction, which may explain the observed growth phenotype and defect of pre-rRNA maturation observed upon expression of the R289A Rrp9p mutant protein.

## Discussion

Pre-rRNA processing and ribosomal subunits assembly is a tremendously complex mechanism requiring a huge number of protein factors, and several RNAs, including snoRNAs. During the early steps of the process, these various factors assemble into the SSU processome complex carrying the catalytic activities for production of the 20S intermediate. U3 snoRNP is one of the most important components of the SSU processome, as by base-pair interaction with the pre-rRNA, the U3 snoRNA is directly involved in the early cleavages steps at positions A0, A1 and A2 (Beltrame & Tollervey 1992, 1995 ; Hughes *et al*, 1987, 1996, Hughes & Ares, 1991 ; Méreau *et al*, 1997 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011). However, whereas the mode of action of U3 snoRNA in the SSU processome is well documented, knowledge on the activity of the U3 snoRNP proteins, especially the Rrp9p U3 specific protein, was poorly understood. Here, by developing a strategy based on yeast genetic approaches, we were able to bring the first insight into the mechanism of action of Rrp9p during the early cleavage steps of the pre-rRNA. Indeed, we could demonstrate its role in the efficiency of cleavages at sites A1 and A2.

Based on our observations that the R289A Rrp9p mutation has a strong negative effect on cleavages at these two sites and reduces the capability of direct interaction of Rrp9p with another component of the processome, Rrp36p, we propose a functional importance of the Rrp9p-Rrp36p interaction for cleavages at sites A1 and A2. In addition, our data suggest that the Rrp9p-Rrp36p direct interaction may nucleate a network of protein-protein interactions involving Sgd1p and Rrp5p during processome assembly or activity.

**The R289A mutation leads to a cryo-sensitive phenotype.** Although the negative effect of the R289A mutation on yeast cell growth and cleavages at sites A1 and A2 was detected at all the temperatures tested, it was markedly reinforced at low temperature. Cryo-sensitive phenotypes are generally indicative of an increased energy requirement during one step of the affected process. Processome assembly and activity involve the formation and disruption of several protein-protein, RNA-RNA and RNA-protein interactions. Appearance of a cryo-sensitive phenotype may reflect the need for additional energy in the presence of the mutation in order to disrupt some pre-formed interactions and to remodel the structure of a processome component or its association with another component. For instance, the pre-ribosomal RNA is subject to several compaction events before cleavages at sites A1 and A2. They are mediated by RNA helicase activities (Phipps *et al*, 2011; Granneman *et al*, 2006), and one could imagine that the kinetics of one of these pre-rRNA conformational changes could be reduced

in the presence of the mutation. One open possibility upon Rrp9p mutation was to select mutations that destabilize the U3 snoRNA-pre-rRNA interaction as a consequence of a defect in recruiting proteins stabilizing this interaction. However, in this case, a thermosensitive phenotype was expected, which was not the case. One more likely explanation of the observed phenotype could be a defect in the recruitment and/or the positioning in the processome machinery of an RNA helicase activity required for cleavages at sites A1 and A2. Interestingly, disruption of two RNA helicase activities were found to have a specific effect on the cleavages at sites A1 and A2, the disruptions of Dbp8p, and to a larger extent the disruption of Rrp3p (Granneman *et al*, 2006). Defects in the recruitment or positioning of one of these RNA helicases might explain the observed processing defect. Dhr1p is also a possible candidate but its depletion also affects cleavage at site A0 (Colley *et al*, 2000 ; Sardana *et al*, 2015). Interestingly, cryo-sensitive phenotypes were also observed upon disruption of some of the intermolecular helices formed between the U3 snoRNA and the 35S pre-rRNA (Méreau *et al*, 1997 ; Dutca *et al*, 2011 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011), which may also be due to the requirement of U3-pre-rRNA interaction for the association and activity of the RNA helicases involved.

**Protein Rrp36p and Sgd1p but not proteins of the Mpp10 complex, were found to interact with Rrp9p.** Based on the well established interaction of the Mpp10 complex with the 5' functional region of U3 forming the intermolecular helices with the 35S pre-rRNA, the Mpp10p, Imp3p and Imp4p components of this complex were possible candidates for an interaction with Rrp9p. However, we did not detect any association when using yeast two-hybrid assays. Each protein was tested individually and our negative results do not preclude the establishment of any interaction with Rrp9p when the Mpp10 complex is bound to the structure formed by the U3 snoRNA and the pre-rRNA. Therefore, in the present stage of the study, we can exclude the possibility of a stable interaction of Rrp9p with each of the three proteins of this complex. This result is in agreement with the absence of proteins of the Mpp10 complex upon purification of the core U3 snoRNP particle (Gallagher *et al*, 2004 ; Wormsley *et al*, 2001 ; Lee & Baserga, 1997, 1999 ; Shah *et al*, 2013 ; Gerczei *et al*, 2009 ; Gerczei & Correll, 2004).

In contrast, among the 34 SSU-processome proteins that we tested, we identified an interaction between Rrp9p and Rrp36p on one hand, and between Rrp9p and Sgd1p on the other hand. Accordingly, a possible association between Sgd1p and Rrp9p had already been previously proposed based on a high-throughput fragment complementation experiment

(Tarrassov *et al*, 2008 ; Lim *et al*, 2011). Additionally, we further identified an interaction between Sgd1p and Rrp36p, as well as interactions between Rrp5p and e ach of the two Sgd1p and Rrp36p proteins, revealing a novel protein-protein interaction network within the processome (Figure 5).

Rrp36p is an essential protein that was recently shown to be involved in the early cleavages of the pre-rRNAs and also shown to interact with both the 90S pre-ribosomal particles and the pre-40S particles (Gerus *et al*, 2010 ; Henras *et al*, 2008). However, these interactions were found to be rather transitory. Like the Rrp9p depletion, depletion of Rrp36p decreases 18S rRNA production and blocks the three cleavages at sites A0, A1 and A2, so that the level of the 20S RNA intermediate is strongly decreased, while that of the 23S intermediate is strongly increased (Gerus *et al*, 2010). Here, with the R289A mutation in Rrp9p, we were able to uncouple the negative effect on the A1 and A2 sites from the one on the A0 site, while the three of them are affected upon complete Rrp9p or Rrp36p depletion. Different catalysts are expected to act at sites A1 and A2: Rcl1p in association with Bms1p was proposed to be involved in the catalysis at site A2 (Delprato *et al*, 2014), and Utp24p is essential for correct cleavage at the A1 site (Tomecki *et al*, 2015). Therefore, the fact to get a decreased cleavage of both the A1 and the A2 sites upon destabilizing the Rrp9p-Rrp36p interaction suggests that this interaction is required to recruit proteins that have a positive activity on the cleavages at both sites. Altogether, this reinforced the idea of the defect in the recruitment of a RNA helicase, maybe Rrp3p, which depletion leads to delayed A1 and A2 cleavages. A defect in RNA helicase recruitment may also explain the apparent stalling of the U3 snoRNA in heavy complexes upon centrifugation of cell extracts expressing the R289A Rrp9p mutant in glycerol gradient. The disruption of Dhr1p helicase was recently found to generate a similar phenotype as well (Sardana *et al*, 2015).

**Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p and Rrp5p are involved in a common network of interaction.** Rrp5p has the peculiarity to be a large protein involved both in the early cleavages of the pre-rRNA and in the production of the 5.8S and 25S rRNAs (Vos *et al*, 2004 ; de Boer *et al*, 2006 ; Eppens *et al*, 1999 ; Venema & Tollervey, 1996). Its CTD domain, involved in the early cleavages, was cross-linked to the sequence flanking the A2 site, and its NTD domain, involved in 5.8S production, was found to bind to sequences flanking the A3 site (Lebaron *et al*, 2013). Additionally, when associated with the pre-rRNA, Rrp5p contacts the U3 snoRNA (Lebaron *et al*, 2013). In agreement with these previous data, our results establish a connection between Rrp5p and proteins of the SSU processome. Interestingly, the UTP-A and

UTP-B modules of the processome were found to be required for Rrp36p association, while Rrp5p was not (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011 ; Gerus *et al*, 2010). This suggests that within the established network, the Rrp9p protein bound to the U3 snoRNA may recruit Rrp36p and Sgd1p, thus helping Rrp5p (UTP-C complex) association. It would therefore be interesting to test whether sub-complexes could be formed by interaction of some proteins of the network that we identified. It would also be interesting to define precisely the interacting domains in order to design mutants affecting these interactions and to test their effects on pre-rRNA processing. This is why we already started an identification of the domains involved in the interactions, which already showed that the helix propeller domain of Rrp9p is responsible for the interaction with Rrp36p, while the C-terminal domains of both Rrp36p and Sgd1p are responsible for the interaction with Rrp5p.

## Figure legends

**Figure 1 | Rrp9p residue R289 is essential for the protein function. (A)** Tridimensional representation of the Rrp9p protein structure. Surface residues that were mutated in this study are depicted with different colors depending on the protein face exposed to the solvent. Residues R289 and K290 that were mutated into alanine residues are indicated. **(B)** Growth of the yeast strain W303::pGAL-RRP9P expressing mutant or wild-type Rrp9p was monitored under repressive glucose medium condition (YPD) at 3 different temperatures and using 4 increasing dilutions.

**Figure 2 | Rrp9p mutant R289A is stable and associates to the U3 snoRNA. (A)** The stability of the mutant proteins was assessed by western-blot at the 20, 30 and 37°C using an antibody directed against the Protein A tag. GAPDH was used as a control. (-) corresponds to the negative control experiment performed with cells transformed with an empty pG1 plasmid. **(B)** The stability of the U3 snoRNA was monitored at 20, 30 and 37°C by northern blotting in the presence of the wild-type (WT) or mutant (R289A) Rrp9p protein or in the absence of protein (-) as a control. U6 snRNA was used as a loading control. **(C)** RNA pull-down assays were performed using wild-type (WT) or mutant (R289A) Rrp9p protein or without any protein (-) as a control. Co-precipitation of U3 and U6 was monitored by northern-blotting using specific oligonucleotide probes (supplementary Table 1).

**Figure 3 | The Rrp9p R289A mutation affects pre-rRNA processing. (A)** The different rRNA intermediates processed from the 35S pre-rRNA at 20, 30 and 37°C were detected by northern-blotting using specific probes (supplementary Table 1). Cells were transformed with an empty pG1 plasmid (-) or pG1 plasmids expressing wild-type (WT) or mutant (R289A) Rrp9p. The 35S, 23S, 20s and 18S as well as the putative 20S are annotated. **(B)** The identities of the cleavage sites occurring at 20°C in the pre-rRNA were identified by northern-blotting using 5 discriminating probes (Figure 3c and for probes complete sequences see Supplementary Table 1). **(C)** Simplified representation of the successive cleavage steps to obtain the mature 18S rRNA from the 35S pre-rRNA (see also Figure 3B). **(D)** A primer extension experiment was performed to precisely determine the 5' extremity of the 22S intermediate. Sequencing reactions were loaded on the left side of the gel as a control.

**Figure 4 | Rrp9p interacts with several protein partners within the processome. (A, B)** Yeast two-hybrid assays were performed between wild-type or R289A mutant Rrp9p proteins and a selection of processome proteins. Only positive results are represented. For a full list of proteins tested and results see Supplementary Figure 4. **(C)** GST-pull-down assays were performed to validate the interactions detected by two hybrid assay. Wild-type GST-tagged Rrp9p, R289A mutant GST-tagged Rrp9p, GST-tagged Rrp5p, a GST-tagged non-relevant protein or GST alone were bound on glutathione sepharose beads and incubated in the presence of $^{35}$S-methionine labeled Rrp36p. Protein-protein interactions were revealed by autoradiography.

**Figure 5 | Model of the Rrp9p interaction network within the processome.** The small interaction network identified in our study including Rrp9p and the three proteins Rrp5p, Sgd1p and Rrp36p is represented.

**Supplementary Figure 1 | Growth of the collection of Rrp9p mutants.** Growth of the yeast strains W303::pGAL-RRP9P expressing the various mutants generated was monitored under repressive glucose medium condition (YPD) at 3 different temperatures using 4 increasing dilutions.

**Supplementary Figure 2 | The yeast strain *S. cerevisiae* W303::pGAL-*RRP9*.** To study the impact of each mutant on yeast growth, we generated a recombinant yeast strain in which expression of the endogenous Rrp9p protein was placed downstream of a galactose inducible promoter. Cells were transformed with a plasmid expressing a tagged Rrp9p mutant or with a control construct and grown for 24 h in repressive glucose liquid medium.

**Supplementary Figure 3 | Sedimentation profiles of both Rrp9p protein and U3 snoRNA. (A)** Total extracts were loaded on 10-50% sucrose gradients and spun for 3 hours at 100.000 g. Absorbance at 260 nm was monitored during fraction collection.

**Supplementary Table 1 | Oligonucleotide probes and primers used in this study.**

**Acknowledgements**

We are thankful to Yves Henry, Natacha Dreumont and members of the IMoPA team 1 for helpful discussions. This project was financially supported by the CNRS and the Lorraine University, as well as by the IMTS project of the Plan Etat Région Lorraine. GC was a fellow from the French Ministry of Education and Research.

**Authors contributions**

GC, VBI and LW performed the experiments, CC performed the Rrp9p structure modeling, NR and VSS generated the Rrp9p mutants, GC, DL, MR and CB designed the research and interpreted the data, MR and CB wrote the manuscript.

**References**

Bachellerie, J.P., and Cavaillé, J. (1997). Guiding ribose methylation of rRNA. Trends Biochem. Sci. *22*, 257–261.

Baserga, S.J., Agentis, T.M., Wormsley, S., Dunbar, D.A., and Lee, S. (1997a). Mpp10p, a new protein component of the U3 snoRNP required for processing of 18S rRNA precursors. Nucleic Acids Symp. Ser. 64–67.

Baserga, S.J., Agentis, T.M., Wormsley, S., Dunbar, D.A., and Lee, S. (1997b). Mpp10p, a new protein component of the U3 snoRNP required for processing of 18S rRNA precursors. Nucleic Acids Symp. Ser. 64–67.

Beltrame, M., and Tollervey, D. (1992). Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. EMBO J. *11*, 1531–1542.

Beltrame, M., and Tollervey, D. (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. EMBO J. *14*, 4350–4356.

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

Bleichert, F., Granneman, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., and 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. U.S.A. *103*, 9464–9469.

De Boer, P., Vos, H.R., Faber, A.W., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2006). Rrp5p, a trans-acting factor in yeast ribosome biogenesis, is an RNA-binding protein with a pronounced preference for U-rich sequences. RNA *12*, 263–271.

Borovjagin, A.V., and Gerbi, S.A. (2001). Xenopus U3 snoRNA GAC-Box A' and Box A sequences play distinct functional roles in rRNA processing. Mol. Cell. Biol. *21*, 6210–6221.

Borovjagin, A.V., and Gerbi, S.A. (2004). Xenopus U3 snoRNA docks on pre-rRNA through a novel base-pairing interaction. RNA *10*, 942–953.

Borovjagin, A.V., and Gerbi, S.A. (2005). An evolutionary intra-molecular shift in the preferred U3 snoRNA binding site on pre-ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. *33*, 4995–5005.

Brand, R.C., and Planta, R.J. (1975). The molecular weights of yeast ribosomal precursor RNAs. Mol. Biol. Rep. *2*, 321–325.

Charron, C., Manival, X., Cléry, A., Senty-Ségault, V., Charpentier, B., Marmier-Gourrier, N., Branlant, C., and Aubry, A. (2004). The archaeal sRNA binding protein L7Ae has a 3D structure very similar to that of its eukaryal counterpart while having a broader RNA-binding specificity. J. Mol. Biol. *342*, 757–773.

Cléry, A., Senty-Ségault, V., Leclerc, F., Raué, H.A., and Branlant, C. (2007). Analysis of sequence and structural features that identify the B/C motif of U3 small nucleolar RNA as the recognition site for the Snu13p-Rrp9p protein pair. Mol. Cell. Biol. *27*, 1191–1206.

Colley, A., Beggs, J.D., Tollervey, D., and Lafontaine, D.L. (2000). Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. Mol. Cell. Biol. *20*, 7238–7246.

Delprato, A., Al Kadri, Y., Pérébaskine, N., Monfoulet, C., Henry, Y., Henras, A.K., and Fribourg, S. (2014). Crucial role of the Rcl1p-Bms1p interaction for yeast pre-ribosomal RNA processing. Nucleic Acids Res. *42*, 10161–10172.

Dosil, M., and Bustelo, X.R. (2004). Functional characterization of Pwp2, a WD family protein essential for the assembly of the 90 S pre-ribosomal particle. J. Biol. Chem. *279*, 37385–37397.

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

Dunbar, D.A., Wormsley, S., Agentis, T.M., and Baserga, S.J. (1997). Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. Mol. Cell. Biol. *17*, 5803–5812.

Eppens, N.A., Rensen, S., Granneman, S., Raué, H.A., and Venema, J. (1999). The roles of Rrp5p in the synthesis of yeast 18S and 5.8S rRNA can be functionally and physically separated. RNA *5*, 779–793.

Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. Curr. Opin. Cell Biol. *14*, 313–318.

Gallagher, J.E.G., and Baserga, S.J. (2004). Two-hybrid Mpp10p interaction-defective Imp4 proteins are not interaction defective in vivo but do confer specific pre-rRNA processing defects in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *32*, 1404–1413.

Ganot, P., Bortolin, M.L., and Kiss, T. (1997a). Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. Cell *89*, 799–809.

Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1997b). The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. Genes Dev. *11*, 941–956.

Gardner, K.H., Anderson, S.F., and Coleman, J.E. (1995). Solution structure of the Kluyveromyces lactis LAC9 Cd2 Cys6 DNA-binding domain. Nat. Struct. Biol. *2*, 898–905.

Gerbi, S.A., Borovjagin, A.V., Ezrokhi, M., and Lange, T.S. (2001). Ribosome biogenesis: role of small nucleolar RNA in maturation of eukaryotic rRNA. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *66*, 575–590.

Gérczei, T., and Correll, C.C. (2004a). Imp3p and Imp4p mediate formation of essential U3-precursor rRNA (pre-rRNA) duplexes, possibly to recruit the small subunit processome to the pre-rRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 15301–15306.

Gérczei, T., and Correll, C.C. (2004b). Imp3p and Imp4p mediate formation of essential U3-precursor rRNA (pre-rRNA) duplexes, possibly to recruit the small subunit processome to the pre-rRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 15301–15306.

Gérczei, T., Shah, B.N., Manzo, A.J., Walter, N.G., and Correll, C.C. (2009a). RNA chaperones stimulate formation and yield of the U3 snoRNA-Pre-rRNA duplexes needed for eukaryotic ribosome biogenesis. J. Mol. Biol. *390*, 991–1006.

Gérczei, T., Shah, B.N., Manzo, A.J., Walter, N.G., and Correll, C.C. (2009b). RNA chaperones stimulate formation and yield of the U3 snoRNA-Pre-rRNA duplexes needed for eukaryotic ribosome biogenesis. J. Mol. Biol. *390*, 991–1006.

Gérus, M., Bonnart, C., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y., and Henras, A.K. (2010). Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit. Mol. Cell. Biol. *30*, 1130–1144.

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

Granneman, S., and Baserga, S.J. (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. Exp. Cell Res. *296*, 43–50.

Granneman, S., Pruijn, G.J.M., Horstman, W., van Venrooij, W.J., Luhrmann, R., and Watkins, N.J. (2002). The hU3-55K protein requires 15.5K binding to the box B/C motif as well as flanking RNA elements for its association with the U3 small nucleolar RNA in Vitro. J. Biol. Chem. *277*, 48490–48500.

Granneman, S., Bernstein, K.A., Bleichert, F., and Baserga, S.J. (2006a). Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases required for small ribosomal subunit synthesis. Mol. Cell. Biol. *26*, 1183–1194.

Granneman, S., Lin, C., Champion, E.A., Nandineni, M.R., Zorca, C., and Baserga, S.J. (2006b). The nucleolar protein Esf2 interacts directly with the DExD/H box RNA helicase, Dbp8, to stimulate ATP hydrolysis. Nucleic Acids Res. *34*, 3189–3199.

Gutell, R.R. (1994). Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures: 1994. Nucleic Acids Res. *22*, 3502–3507.

Gutell, R.R., Larsen, N., and Woese, C.R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. Microbiol. Rev. *58*, 10–26.

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

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

Hughes, J.M. (1996). Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA. J. Mol. Biol. *259*, 645–654.

Hughes, J.M., and Ares, M. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in

the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. EMBO J. *10*, 4231–4239.

Hughes, J.M., Konings, D.A., and Cesareni, G. (1987). The yeast homologue of U3 snRNA. EMBO J. *6*, 2145–2155.

Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. EMBO J. *20*, 3617–3622.

Knox, A.A., McKeegan, K.S., Debieux, C.M., Traynor, A., Richardson, H., and Watkins, N.J. (2011). A weak C' box renders U3 snoRNA levels dependent on hU3-55K binding. Mol. Cell. Biol. *31*, 2404–2412.

Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2010). Driving ribosome assembly. Biochim. Biophys. Acta *1803*, 673–683.

Lebaron, S., Segerstolpe, A., French, S.L., Dudnakova, T., de Lima Alves, F., Granneman, S., Rappsilber, J., Beyer, A.L., Wieslander, L., and Tollervey, D. (2013). Rrp5 binding at multiple sites coordinates pre-rRNA processing and assembly. Mol. Cell *52*, 707–719.

Lee, S.J., and Baserga, S.J. (1997). Functional separation of pre-rRNA processing steps revealed by truncation of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein component, Mpp10. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *94*, 13536–13541.

Lee, S.J., and Baserga, S.J. (1999). Imp3p and Imp4p, two specific components of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein that are essential for pre-18S rRNA processing. Mol. Cell. Biol. *19*, 5441–5452.

Lim, Y.H., Charette, J.M., and Baserga, S.J. (2011). Assembling a protein-protein interaction map of the SSU processome from existing datasets. PLoS ONE *6*, e17701.

Lukowiak, A.A., Granneman, S., Mattox, S.A., Speckmann, W.A., Jones, K., Pluk, H., Venrooij, W.J., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2000). Interaction of the U3-55k protein with U3 snoRNA is mediated by the box B/C motif of U3 and the WD repeats of U3-55k. Nucleic Acids Res. *28*, 3462–3471.

Marmier-Gourrier, N., Cléry, A., Senty-Ségault, V., Charpentier, B., Schlotter, F., Leclerc, F., Fournier, R., and Branlant, C. (2003). A structural, phylogenetic, and functional study of 15.5-kD/Snu13 protein binding on U3 small nucleolar RNA. RNA *9*, 821–838.

Marmier-Gourrier, N., Cléry, A., Schlotter, F., Senty-Ségault, V., and Branlant, C. (2011). A second base pair interaction between U3 small nucleolar RNA and the 5'-ETS region is required for early cleavage of the yeast pre-ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. *39*, 9731–9745.

Méreau, A., Fournier, R., Grégoire, A., Mougin, A., Fabrizio, P., Lührmann, R., and Branlant, C. (1997). An in vivo and in vitro structure-function analysis of the Saccharomyces cerevisiae U3A snoRNP: protein-RNA contacts and base-pair interaction with the pre-ribosomal RNA. J. Mol. Biol. *273*, 552–571.

Mougey, E.B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O.L., Beyer, A., and Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin

spreads are rRNA processing complexes. Genes Dev. *7*, 1609–1619.

Neefs, J.M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., and De Wachter, R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. Nucleic Acids Res. *21*, 3025–3049.

Pérez-Fernández, J., Román, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X.R., and Dosil, M. (2007). The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. Mol. Cell. Biol. *27*, 5414–5429.

Pérez-Fernández, J., Martín-Marcos, P., and 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*, 8105–8121.

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

Pluk, H., Soffner, J., Lührmann, R., and van Venrooij, W.J. (1998). cDNA cloning and characterization of the human U3 small nucleolar ribonucleoprotein complex-associated 55-kilodalton protein. Mol. Cell. Biol. *18*, 488–498.

Sardana, R., Liu, X., Granneman, S., Zhu, J., Gill, M., Papoulas, O., Marcotte, E.M., Tollervey, D., Correll, C.C., and Johnson, A.W. (2015). The DEAH-box helicase Dhr1 dissociates U3 from the pre-rRNA to promote formation of the central pseudoknot. PLoS Biol. *13*, e1002083.

Ségault, V., Mougin, A., Grégoire, A., Banroques, J., and Branlant, C. (1992). An experimental study of Saccharomyces cerevisiae U3 snRNA conformation in solution. Nucleic Acids Res. *20*, 3443–3451.

Shah, B.N., Liu, X., and 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*, 1372–1383.

Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. Trends Biochem. Sci. *24*, 181–185.

Steitz, J.A., Bruzik, J.P., Tyc, K., Kass, S., and Sollner-Webb, B. (1990). Molecular analyses of the functions of SL and U3 snRNPs. Mol. Biol. Rep. *14*, 123.

Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Serna Molina, M.M., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., and Michnick, S.W. (2008). An in vivo map of the yeast protein interactome. Science *320*, 1465–1470.

Tomecki, R., Labno, A., Drazkowska, K., Cysewski, D., and Dziembowski, A. (2015). hUTP24 is essential for processing of the human rRNA precursor at site A1, but not at site A0. RNA Biol *12*, 1010–1029.

Torchet, C., and Hermann-Le Denmat, S. (2000). Bypassing the rRNA processing endonucleolytic cleavage at site A2 in Saccharomyces cerevisiae. RNA *6*, 1498–1508.

Torchet, C., and Hermann-Le Denmat, S. (2002). High dosage of the small nucleolar RNA snR10 specifically suppresses defects of a yeast rrp5 mutant. Mol. Genet. Genomics *268*, 70–80.

Torchet, C., Jacq, C., and Hermann-Le Denmat, S. (1998). Two mutant forms of the S1/TPR-containing protein Rrp5p affect the 18S rRNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae. RNA *4*, 1636–1652.

Venema, J., and Tollervey, D. (1996). RRP5 is required for formation of both 18S and 5.8S rRNA in yeast. EMBO J. *15*, 5701–5714.

Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Annu. Rev. Genet. *33*, 261–311.

Venema, J., Vos, H.R., Faber, A.W., van Venrooij, W.J., and Raué, H.A. (2000). Yeast Rrp9p is an evolutionarily conserved U3 snoRNP protein essential for early pre-rRNA processing cleavages and requires box C for its association. RNA *6*, 1660–1671.

Vos, H.R., Bax, R., Faber, A.W., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2004a). U3 snoRNP and Rrp5p associate independently with Saccharomyces cerevisiae 35S pre-rRNA, but Rrp5p is essential for association of Rok1p. Nucleic Acids Res. *32*, 5827–5833.

Vos, H.R., Faber, A.W., de Gier, M.D., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2004b). Deletion of the three distal S1 motifs of Saccharomyces cerevisiae Rrp5p abolishes pre-rRNA processing at site A(2) without reducing the production of functional 40S subunits. Eukaryotic Cell *3*, 1504–1512.

Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. Cell *83*, 1047–1058.

Watkins, N.J., Ségault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C., and Lührmann, R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleoar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. Cell *103*, 457–466.

Watkins, N.J., Dickmanns, A., and Lührmann, R. (2002). Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. Mol. Cell. Biol. *22*, 8342–8352.

Watkins, N.J., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hossbach, M., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2004). Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. Mol. Cell *16*, 789–798.

Wormsley, S., Samarsky, D.A., Fournier, M.J., and Baserga, S.J. (2001). An unexpected, conserved element of the U3 snoRNA is required for Mpp10p association. RNA *7*, 904–919.

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

# Données complémentaires à celles incluses dans l'article

## III.1. Le résidu Q294 ne semble pas interagir avec le résidu R289

En analysant la structure tridimensionnelle du domaine « hélix propeller » de la protéine Rrp9p, aussi bien le modèle, que celle établie par l'équipe de Ye (Zhang *et al*, 2013), nous avons observé que deux résidus sont très proches du résidu R289. Nous nous sommes demandés s'ils pouvaient de ce fait interagir avec celui-ci et peut-être être aussi impliqués dans la fonction de la protéine Rrp9p. Il s'agit des résidus Q294 et E334 (**Fig. 27**), qui sont en outre des résidus conservés dans la protéine humaine.

Le résidu E334 avait déjà été muté dans notre criblage initial, conjointement avec le résidu M333 (mutant Rrp9p M333A/E334A) mais n'avait pas entraîné l'apparition d'un phénotype (**Fig. 26**). On aurait pu imaginer la formation d'un pont ionique entre le résidu basique R289, mais il semble plutôt d'après la structure 3D que le résidu E334 soit empilé sur R289, ce qui n'est pas favorable à la formation d'un pont ionique. Par ailleurs, dans les cristaux utilisées pour la résolution de la structure tridimensionnelle de Rrp9p, celle-ci est présente sous la forme d'un dimère à l'intérieur de la maille, et le positionnement du résidu E334 n'est pas identique d'un monomère à l'autre, suggérant une certaine flexibilité de ce résidu. Nous l'avons donc écarté de l'étude. Le résidu Q294 semblait lui positionné de telle façon que le groupement carbonyle de sa chaîne latérale puisse interagir avec le groupement amine de la chaîne latérale du résidu R289 (**Fig. 27**).

On pouvait donc imaginer que sa présence influence le positionnement du résidu R289. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé de nouvelles mutations et généré les deux mutants Rrp9p Q294A et Rrp9p R289A/Q294A, dont nous avons ensuite étudié l'activité en analysant la croissance des cellules comme précédemment (**Fig. 28**).

La croissance en présence du mutant ProtA-Rrp9p Q294A était comparable à celle observée en présence de ProtA-Rrp9p WT, suggérant que le résidu Q294 n'a pas

**Figure 27 : Visualisation des résidus Q294 et E334 au sein de la structure tridimensionnelle du domaine « helix propeller » de la protéine Rrp9p (Zhang *et al*, 2013).**

Les résidus Q294 et E334 de la protéine Rrp9p sont situés à proximité du résidu R289. Le résidu E334 semble s'empiler sur le résidu R289, tandis que le groupement carbonyle de la glutamine 294 semble établir une liaison hydrogène avec le groupement amine de l'arginine 289 située à une distance de 2,52 Å. Le résidu Q294 a été muté afin de déterminer s'il joue un rôle dans la fonction de la protéine Rrp9p conjointement au résidu R289. Le résidu E334 fait partie des acides aminés qui ont été mutés au début de notre travail. Il ne semble pas être important pour la fonction de la protéine Rrp9p.

**Figure 28 : La mutation du résidu Q294 de Rrp9p en alanine n'a aucun effet négatif sur la croissance cellulaire.**

Afin de vérifier si le résidu Q294 était impliqué dans la fonction de la protéine Rrp9p conjointement au résidu R289, des analyses de croissance de la souche W303::pGAL exprimant la protéine Rrp9p WT ou les mutants Rrp9p R289A, Q294A et R289A/Q294A ont été réalisées sur milieu YPG et YPD à 3 températures (20°C, 30°C et 37°C) et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). YPG et YPD : milieu riche contenant respectivement du galactose ou du glucose.

une importance marquante pour la fonction de Rrp9p (**Fig. 28**). En effet, la croissance en présence du mutant Rrp9p ProtA-R289A/Q294A est comparable à celle en présence du mutant ProtA-Rrp9p R289A (**Fig. 28**). Nous avons en outre analysé par double hybride si les mutants Rrp9p Q294A ou Rrp9p R289A/Q294A étaient affectés dans leurs capacités d'interaction avec les protéines Rrp36p et Sgd1p (**Fig. 29**). L'interaction entre la protéine Rrp36p et le mutant Rrp9p Q294A ne semble pas affaiblie par rapport à celle avec Rrp9p WT. Les cellules présentent des croissances comparables même à de fortes concentrations en 3-AT (**Fig. 29**). Le résidu Q294 ne semble donc pas jouer de rôle dans la fonction de la protéine Rrp9p, et seul le résidu R289 apparait comme très important pour la fonction de la protéine.

### III.2. En présence de la protéine Rrp9p R289A, la snoRNP U3 pourrait être bloquée au sein du processome

Afin de confirmer que la snoRNP U3 était bien incorporée au sein du processome en présence de la mutation Rrp9p R289A et afin d'étudier les localisations de Rrp9p R289A et du snoARN U3 au sein des différents complexes formés lors du processus de maturation, j'ai effectué un stage au laboratoire de D. Lafontaine en Belgique afin de réaliser des expériences de centrifugation de gradients de saccharose. Des extraits cellulaires de cultures de levure, réalisées à 20°C et 30°C et dans lesquelles l'expression de la protéine Rrp9p endogène avait été réprimée dans le but de n'exprimer que le mutant Rrp9p R289A, ont été fractionnés sur des gradients de saccharose allant de 5 à 45%. Vingt-quatre fractions ont été collectées puis analysées. La présence de la protéine Rrp9p et du snoARN U3 au sein de différents complexes a été détectée respectivement par des expériences de Western-blot et par des expériences de Northern-blot.

Les profils de sédimentation en présence de Rrp9 WT à 20°C et 30°C nous permettaient d'observer des pics correspondant à des complexes de faible poids moléculaire (fractions 1 à 4), à la sous-unité ribosomique 40S (fractions 6 à 8), à la sous-unité ribosomique 60S (fractions 10-11), au ribosome 80S (fractions 12-13), ainsi qu'aux polysomes (à partir de la fraction 14) (**Fig. 30**). A 20°C, et dans une moindre mesure à 30°C, la protéine Rrp9p WT et le snoARN U3 étaient détectés au sein de complexes de faible poids moléculaire, correspondant à la snoRNP U3 libre,

**Figure 29 : La mutation Q294A dans Rrp9p ne perturbe pas l'interaction entre Rrp9p et Rrp36p**

La technique de double hybride a été utilisée pour tester les capacités d'interaction de Rrp36p et Sgd1p avec la protéine Rrp9p WT ou mutée (Rrp9p R289A, Q294A et R289A/Q294A). Différentes concentrations en 3-AT ont été utilisées afin de déterminer la force de l'interaction.

W303::pGAL-RRP9 + pG1::PROTA

30°C

W303::pGAL-RRP9 + pG1::PROTA-RRP9 WT

20°C

W303::pGAL-RRP9 + pG1::PROTA-RRP9 WT

30°C

W303::pGAL-RRP9 + pG1::PROTA-RRP9 R289A

20°C

W303::pGAL-RRP9 + pG1::PROTA-RRP9 R289A

30°C

**Taux de snoRNA U3 dans chaque fraction**

**Comparaison entre Rrp9 WT et Rrp9 R289A**

20°C

**Figure 30 : En présence de Rrp9p R289A, le défaut de production de la petite sous-unité ribosomique 40S se traduit par une accumulation de la grande sous-unité ribosomique 60S libre et une diminution du taux de ribosome 80S. Par ailleurs, à 20°C, la protéine Rrp9p R289A et le snoARN U3 sont retrouvés dans des fractions de haut poids moléculaires.**

Des extraits cellulaires ont été préparés à partir de cellules de la souche W303::pGAL-*RRP9* n'exprimant pas la protéine Rrp9p ( (-) ) ou exprimant seulement la protéine Rrp9p WT (WT) ou le mutant Rrp9p R289A (R289A), soit à 20°C, soit à 30°C. Les différents complexes contenus dans ces extraits ont été séparés par sédimentation en gradients de saccharose 5-45% et les fractions résultantes récoltées, tout en suivant l'absorbance à 254nm. Les spectres d'absorbance obtenus sont présentés dans cette figure avec la localisation des sous-unités ribosomiques. Les protéines totales et les ARN totaux ont ensuite été préparés à partir de chaque fraction. La localisation de la protéine Rrp9p et du snoARN U3 dans les fractions ont été révélées en utilisant respectivement un anticorps spécifique dirigé contre la protéine Rrp9p et un oligonucléotide spécifique du snoARN U3. Une quantification du taux relatif du snoARN U3 dans chaque fraction par rapport à la quantité totale de snoARN U3 dans l'ensemble des fractions, en présence de Rrp9p WT ou Rrp9p R289A est représenté sous forme d'histogramme en bas de la figure.

ainsi qu'au sein de complexes de haut poids moléculaire, correspondant au processome, ce qui était attendu (**Fig. 30**).

Nous observions également, à 20°C et à 30°C, qu'en présence du mutant Rrp9p R289A, le pic correspondant à la petite sous-unité ribosomiques 40S diminuait fortement, ce qui confirmait nos résultats précédents indiquant qu'en présence du mutant R289A de la protéine Rrp9, l'ARNr 18S de la petite sous-unité ribosomique n'était plus produit efficacement, ce qui impactait le taux de la petite sous-unité ribosomique 40S (**Fig. 30**). Des résultats similaires ont été obtenus en absence d'expression de Rrp9p à 30°C, ce qui était attendu du fait du caractère essentiel de la protéine et de l'abolition des clivages précoces dans ces conditions. A 20°C, en présence de Rrp9p R289A, nous observions que la protéine et le snoARN U3 étaient localisés au sein de complexes de faible poids moléculaire, correspondant certainement à la snoRNP U3 libre. On les retrouvait également au sein de complexes de haut poids moléculaire, correspondant au processome. Ce résultat montre que la snoRNP U3 est bien incorporée au sein du processome, y compris en présence de Rrp9p R289A et que la mutation R289A n'empêche pas ce recrutement.

Cependant, en comparant les profils de sédimentation en présence de Rrp9p WT et de Rrp9p R289A pour les cultures à 20°C, il semble que la protéine Rrp9p et le snoARN U3 s'accumulent légèrement plus au sein des complexes de haut poids moléculaires en présence du mutant, suggérant que la snoRNP U3 pourrait être bloquée au sein du processome ou au sein de complexes pré-ribosomiques (**Fig. 30**). L'absence de dissociation pourrait être en lien avec le défaut de clivages aux sites A1 et A2 observé en présence du mutant. De façon surprenante, à 30°C, la protéine Rrp9p R289A ne semblait pas s'accumuler dans des complexes de haut poids moléculaire, comme observé à 20°C (**Fig. 30**). Les mêmes expériences ont été répétées une seconde fois avec de nouveaux extraits cellulaires mais les résultats n'ont pas pu être reproduits. Ces expériences devront être répétées et approfondies. Je n'ai malheureusement pas eu les disponibilités nécessaires en temps pour effectuer un 3ème séjour chez D. Lafontaine en Belgique.

## III.3. La protéine Rrp9p est impliquée dans la formation et la stabilisation des hélices formées entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive, la snoRNP U3 joue un rôle de chaperon du pré-ARNr 35S en formant des appariements intermoléculaires avec le pré-ARNr 35S, ce qui permet d'établir un repliement du pré-ARNr permettant la réalisation des clivages précoces aux sites A0, A1 et A2. La formation des hélices I, II, III, V et VI (**Fig. 31**) joue un rôle clef dans le processus de maturation, et nous avons cru que plusieurs facteurs, tels que le complexe Mpp10, participent à leur formation et à leur stabilisation. On pouvait se demander si la protéine Rrp9p, composant essentiel de la snoRNP U3, ne pourrait pas également avoir un rôle, direct ou indirect, dans la formation ou la stabilisation de certaines de ces hélices hétérologues et si la mutation du résidu R289, que nous avons identifié comme très important pour la fonction de la protéine, ne pourrait pas conduire à la déstabilisation de certains de ces appariements. Ou encore si la présence de la mutation et de défaut de formation de ces appariements ne pourrait pas conduire à un plus gros défaut de croissance, voir à la létalité des souches de levure. Pour tester ces hypothèses, nous avons utilisé la technique recherche de synthétique létal, qui repose sur l'analyse de la croissance d'une souche exprimant simultanément le mutant Rrp9p R289A et une série de mutants du domaine 5' du snoARN U3, impliqué dans la formation des appariements avec le pré-ARNr 35S.

### *III.3.A. Génération et validation de la souche JH84::pGAL-RRP9*

Tout d'abord, nous avons dû générer une souche de levure dans laquelle les expressions endogènes de la protéine Rrp9p et du snoARN U3 pouvaient être réprimées, afin d'exprimer, en *trans* à partir de deux plasmides, la protéine Rrp9p sauvage ou R289A et un snoARN muté. Pour cela, nous avons utilisé la souche de levure JH84 (Hughes & Ares, 1991), dont le gène U3A est placé sous le contrôle du promoteur GAL10 et dont le gène U3B est interrompu par un marqueur d'auxotrophie *LEU2*. Nous avons également placé l'expression de la protéine Rrp9p endogène sous le contrôle du promoteur GAL10, inductible en présence de galactose. Ainsi, en présence de galactose, la protéine Rrp9p et le snoARN U3 endogènes étaient

**Figure 31 : Validation de la souche JH84::pGAL-*RRP9*.**

**A.** Expérience de Western-blot effectué à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine Rrp9p montrant que l'expression de Rrp9p endogène est bien réprimée en milieu solide YPD. **B**. Expérience de Nothern-blot réalisée à l'aide d'un oligonucléotide radiomarqué spécifique du snoARN U3 afin de vérifier que son expression endogène est bien réprimée en milieu YPD. La transformation par le plasmide pASZ11::snoARN U3 servait de contrôle positif de l'expression du snoARN U3. **C.** Analyse de la croissance de la souche JH84::pGAL-*RRP9*, transformée par un ou deux plasmides vides ((-)) et par un plasmide exprimant les versions sauvages ou mutées de la protéine Rrp9p ou exprimant le snoARN U3 en milieu YPG ou YPD à 3 températures (20°C, 30°C et 37°C) et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). En milieu YPD, comme attendu, seules les cellules JH84::pGAL-*RRP9* transformées par un plasmide exprimant Rrp9p WT et un snoARN U3 WT poussaient à toutes les concentrations testées. Un défaut de croissance était observé pour les faibles densités cellulaires lorsque le mutant Rrp9p R289A était exprimé. YPG et YPD : milieu riche contenant respectivement du galactose ou du glucose.

exprimés dans la levure, permettant sa croissance, tandis qu'en présence de glucose, la protéine Rrp9p et le snoARN U3 endogènes nétaient plus exprimés, provoquant une abolition de la croissance. La souche JH84 de départ a dû être d'abord invalidée pour le gène d'auxotrophie *TRP1*, afin de pouvoir sélectionner les souches contenant le plasmide à partir duquel la protéine Rrp9p est exprimée. Nous avons interrompu le gène *TRP1* par insertion d'un gène de résistance à la généticine Les levures contenant cette insertion au niveau du gène *TRP1* ont alors été transformées par un fragment d'ADN obtenu par PCR, permettant l'insertion du promoteur GAL10 en amont de l'ORF de *RRP9*. Pour confirmer que l'insertion du gène de résistance à la généticine G418 à la place du gène *TRP1* et que l'insertion du promoteur GAL10 en amont du gène *RRP9* avaient bien eu lieu, nous avons ensuite réalisé un génotypage par PCR sur l'ADNg, ceci en utilisant divers couples d'oligonucléotides s'hybridant au niveau de différentes régions de l'ADNg a ensuite été réalisé d'autre part. Les résultats de PCR n'ont pas été concluants et n'ont donc pas permis de confirmer l'insertion de ces régions dans le génome. Pour confirmer que la souche était valide, nous avons réalisé des expériences de Western-blot afin de détecter le taux de protéine Rrp9p endogène exprimée en présence de galactose ou de glucose, à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre Rrp9p. L'abolition de son expression en présence de glucose nous a permis de confirmer l'insertion du promoteur GAL10 en amont du gène *RRP9* (**Fig. 31**).

En effet, en présence de galactose (YPG), nous détections bien une bande d'une taille légèrement supérieure à 70 kDa, correspondant à la protéine Rrp9p endogène (taille théorique de 65 kDa), dans la souche JH84::pGAL-RRP9, ainsi que dans la souche témoin W303::pGAL-RRP9 (**Fig. 31**). En revanche, en présence de glucose (YPD), nous observions la disparition de cette bande dans les deux souches, montrant que la protéine Rrp9p endogène n'était pas exprimée (**Fig. 31**). Nous avons également vérifié par expériences de Northern-blot que la répression de l'expression du snoARN U3 était effective en milieu YPD. Pour ce faire, nous avons analysé le taux du snoARN U3 présent dans la souche JH84::pGAL-RRP9 et dans la souche témoin JH84 en présence de galactose ou de glucose (**Fig. 31**). En présence de galactose, nous détections bien une bande correspondant au snoARN U3 pour la souche JH84::pGAL-RRP9, ainsi que pour la souche témoin JH84. Par contre, en présence de glucose, le taux du snoARN U3 chutait fortement pour ces deux

souches, indiquant que l'expression du snoARN U3 endogène avait bien été réprimée (**Fig. 31**). La synthèse de snoARN U3 pouvait être restaurée en milieu YPD par transformation de la souche par le plasmide pASZ11 exprimant le snoARN U3 sous contrôle de son propre promoteur (**Fig. 31**). Notre système d'étude était donc adapté aux études de relation structure/fonction que nous souhaitions réaliser, à savoir tester les effets conjugués de la mutation R289A dans Rrp9p et de mutations dans le snoARN U3 affectant la formation des hélices intermoléculaires avec le pré-ARNr 35S.

### III.3.B. *Analyse par test de létalité synthétique du lien pouvant exister entre la protéine Rrp9p et les appariements formés entre le snoARN U3 et le pré-ARNr 35S*

Au laboratoire, N. Marmier-Gourrier, R. Fournier et A. Méreau (Méreau *et al*, 1997 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; thèse de N. Marmier-Gourrier) avaient produit et caractérisé un grand nombre de mutants du snoARN U3, dont les séquences affectaient la formation des hélices intermoléculaires avec le pré-ARNr ou les segments liant ces hélices (**Fig. 32**). Le taux de croissance en milieu YPD des souches JH84, exprimant ces snoARN U3 mutés, avait été établi, la stabilité du snoARN U3 également et les défauts de maturation du pré-ARNr avaient été caractérisés. La formation ou l'absence de formation d'hélices intermoléculaires avaient aussi été analysées (**Fig. 32**). L'idée était donc d'utiliser, parmi ce large ensemble de mutants bien caractérisées, ceux ayant une croissance non modifiée ou diminuée en milieu YPD, sans pour autant qu'il y ait blocage complet de la croissance, afin de déterminer si la mutation R289A dans Rrp9p pouvait encore renforcer le défaut de croissance. Des effets différentiels selon la partie du domaine 5' du snoARN U3 concernée étaient susceptibles d'apporter des informations sur une éventuelle participation de Rrp9p à la formation ou la stabilisation de certaines des hélices ou à l'association de certaines protéines, telles que les protéines du complexe Mpp10p, à ces hélices (**Fig. 32**).

L'analyse de la croissance a été effectuée à 3 températures (20°C, 30°C, 37°C) sur milieu solide YPG et YPD, par le dépôt de différentes concentrations cellulaires issues de différentes cultures où les expressions de la protéine Rrp9p et du snoARN

**Figure 32 : Les mutants du snoARN U3 déjà caractérisés (Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; thèse de N. Marmier-Gourrier) utilisés pour notre étude par la technique de synthétique létalité**

Les structures hélicoïdales formées entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 sont représentées schématiquement en haut (Hughes, 1996 ; Hughes & Ares, 1991 ; Méreau *et al*, 1997 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; Beltrame & Tollervey, 1992, 1995 ; Beltrame *et al*, 1994 ; Sharma & Tollervey, 1999 ; Granneman *et al*, 2009). Les différentes hélices et segments sont numérotés selon la nomenclature définie par Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. L'ensemble des mutants du snoARN U3, qui ont été utilisés et qui sont mutés dans ces séquences, sont représentés. Pour chaque mutant du snoARN U3 exprimé à partir des souches en milieu YPD, le taux de croissance, la stabilité du snoARN U3 et les défauts de maturation du pré-ARNr sont également indiqués à gauche (+, ++, +++) à gauche de la figure.

U3 endogènes ont été réprimées, pour n'exprimer en *trans* que la protéine Rrp9p sauvage ou R289A et les snoARN U3 mutés, à partir de leurs plasmides respectifs.

Nous décrirons l'effet combiné des mutations dans Rrp9p et dans le snoARN U3, motif par motif, en commençant par l'hélice VI.

### *III.3.B.a.* *L'hélice VI*

Trois des mutants du snoARN U3, affectant la formation de l'hélice VI (Marmier-Gourrier *et al*, 2011) ont été testés (**Fig. 32 et 33**).

En présence du mutant U3:VI-3 (2622) et de Rrp9p sauvage, la croissance en milieu YPD était très similaire à celle obtenue en milieu YPG. Par contre, une très faible croissance était obtenue en présence du mutant Rrp9p R289A, montrant un effet cumulatif négatif fort des deux mutations. Un effet cumulatif de l'effet négatif des deux mutations, bien qu'un peu moins marqué, était aussi observé pour le mutant U3:VI-4 (2624) et au contraire un effet négatif encore plus marqué U3:VI-6 (2879), pour lequel quasiment aucune croissance était observée en présence de Rrp9p R289A. Cela s'explique dans doute par l'effet négatif déjà marqué sur la croissance de la mutation du U3:VI-6 (2879) en présence de Rrp9p WT, comme l'avait déjà observé notre équipe (**Fig. 32 et 33**) (Marmier-Gourrier *et al*, 2011). En conclusion pour tous les mutants du snoARN U3 affectant la formation de l'hélice VI, nous avons observé que l'expression de Rrp9p R289A entrainait un très fort défaut de croissance en milieu YPD (**Fig. 33**).

### *III.3.B.b.* *Le segment 4*

Nous avons testé l'effet de 3 des délétions déjà produites dans le segment 4 du snoARN U3 (Marmier-Gourrier *et al*, 2011). Notre équipe n'avait pas observé d'effet de ces délétions sur la croissance (Marmier-Gourrier *et al*, 2011). Ce qui est en accord avec notre observation d'une forte croissance des levures en présence de Rrp9p sauvage en milieu YPD (**Fig. 32 et 34**).

Il est intéressant de noter que l'effet conjugué de ces 3 mutations du snoARN U3, en présence de Rrp9p R289A, est très différent : alors que pour les mutants U3:4-7

2624 — CCAUUGUCACC
2622 — CCUAAUGAACC
2879 — GGUAAGUCACC

**Figure 33 : La présence du résidu R289 dans Rrp9p entraine de forts défauts de croissance en présence des mutations du snoARN U3 qui diminuait la stabilité de l'hélice VI.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les différentes hélices et segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimée dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec des versions sauvage ou mutantes du snoARN U3. Les 3 mutations U3:VI-6 (2879), U3:VI-4 (2624) et U3:VI-3 (2622) affectent la formation de l'hélice VI. La croissance a été analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). Alors que les 3 mutations du snoARN U3 testées affectent peu la croissance à elles-seules, une fois combinée avec la mutation Rrp9p R289A, de très forts défauts de croissance sont observés, en particulier pour les mutants U3:VI-6 (2879) et U3:VI-3 (2622). YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

(2790) et U3:4-4 (2792), on note seulement une faible diminution de la croissance, identique à celle induite par l'expression de Rrp9p R289A en présence du snoARN U3 sauvage, aucune croissance n'est observée pour le mutant U3:4-2 (2788) en présence de Rrp9p R289A, ceci de manière reproductible (expériences réalisées en triplicata) (**Fig. 34**). Ceci est à mettre en relation avec ce qui avait été observé par N. Marmier-Gourrier pour le mutant U3:4-2, à savoir l'observation d'une très forte accumulation du produit de clivage en A0, suggérant un ralentissement des étapes de clivages aux sites A1 et A2 pour ce mutant, phénotype qui est similaire à celui que nous avons observé pour la mutation R289A de Rrp9p (Marmier-Gourrier *et al*, 2011). On peut ainsi comprendre qu'il puisse y avoir un effet cumulatif fort de ces deux mutations.

#### *III.3.B.c.* *L'hélice V*

Un seul mutant du snoARN U3, diminuant la stabilité de l'hélice V, mais affectant peu la croissance de la levure, était disponible. Seul le nucléotide en 5' du segment du snoARN U3 apparié est substitué dans ce mutant (**Fig. 32 et 35**).

La croissance cellulaire était peu affectée pour ce mutant en présence de Rrp9p WT et le défaut de croissance observé en présence de Rrp9p R289A était similaire en présence du snoARN U3 WT et su snoARN U3 muté (**Fig. 35**). Pour conclure sur un lien possible entre Rrp9p et la formation ou la stabilité de l'hélice V, il faudra tester d'autres mutants.

#### *III.3.B.d.* *Le segment 3*

Une série de 5 mutants du segment 3 du snoARN U3 (1033, 1034, 1035, 1193 et 1362) a été testée (**Fig. 32 et 36**). Ces mutants correspondent soit à un raccourcissement du segment 3 par la délétion de 4 ou 8 nt, soit en la substitution de la séquence du segment 3 de 2 ou 3 nt. Comme observé précédemment par N. Marmier-Gourrier, la présence des substitutions de 2 à 3 bases dans le snoARN U3 avait peu d'effet sur la croissance cellulaire (thèse de N. Marmier-Gourrier). Par ailleurs, la croissance en présence du mutant Rrp9p R289A et des mutants du

pré-ARNr 35S
5'
282
292
470
479
A0
A1
10
18S
25
GGAUUUGGUGG
UCAAAGAGUG
GAUCCUG
AGUAGUC
CC
U
A
3'
CCUAAGUCACC
AGUUUCUCAC
Boîte A
Boîte A'
72
3' - hinge
VI
60
50
5' - hinge
V
40
30
AUAUCUUUACUAGGAU
UCAUCAG
AGGAA
20
II
10
III
G-5'
1b'
1139
I
1143
A2
3'
3
4
snoARN U3
2792 — — — GAΔΔΔAACUUCUC — — — — — — — — — — — — — —
2790 — — — GAGAAΔΔΔΔUCUC — — — — — — — — — — — — — —
2788 — — — GAGAAAACUΔΔΔΔ — — — — — — — — — — — — — —
DO600nm / mL
pASZ11::
pG1::PROTA
0.5
0.2
0.05
10-2
10-3
10-4
snoRNA U3
Rrp9 R289A
snoRNA U3 2788
Rrp9 WT
snoRNA U3 2788
Rrp9 R289A
YPD
YPG
snoRNA U3
Rrp9 R289A
snoRNA U3 2790
Rrp9 WT
snoRNA U3 2790
Rrp9 R289A
YPD
YPG
snoRNA U3
Rrp9 R289A
snoRNA U3 2792
Rrp9 WT
snoRNA U3 2792
Rrp9 R289A
YPD
YPG
20°C
30°C
37°C

**Figure 34: Effet des mutations simultanées Rrp9p R289A et dans le segment 4 du snoARN U3.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les hélices et les segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimées dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec les versions sauvage ou mutantes du snoARN U3 (délétions dans le segment 4 (U3:4-4 (2792), U3:4-7 (2790) et U3:4-2 (2788)). La croissance a ensuite été analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). Aucun effet additionnel par rapport à l'effet négatif lié à l'expression de Rrp9p R289A est observé pour les mutants U3:4-7 (2790) et U3:4-7 (2790). Par contre, l'effet additif des mutations Rrp9p R289A et U3:4-2 (2788) conduit à une abolition totale de la croissance. YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

**Figure 35 : Test de l'effet d'une mutation dans le segment du snoARN U3 impliqué dans la formation de l'hélice V en présence de la protéine Rrp9p R289A.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les hélices et segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimées dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec les versions sauvage ou mutante du snoARN U3. La mutation du snoARN U3 (1188) affecte la stabilité de l'hélice V. La croissance a ensuite été analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). Aucun effet additionnel par rapport à l'effet négatif lié à l'expression de Rrp9p R289A est observé pour le mutant U3 1188. YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

snoARN U3 1034, 1035 et 1362 était comparable à celle en présence du snoARN U3 sauvage, montrant qu'il n'y a pas d'effet cumulatif des mutations dans le snoARN U3 et dans Rrp9p (**Fig. 36**).

Par contre, déjà en présence de Rrp9p sauvage, les délétions de bases des mutants U3 1033 et U3 1193 entrainaient un défaut de croissance marqué, en particulier à 37°C (**Fig. 36**). Ces données étaient en accord avec celles de N. Marmier-Gourrier pour le mutant U3 1193, mais pas pour le mutant U3 1033 (thèse de N. Marmier-Gourrier). Nous avons refait plusieurs fois le test et avons retrouvé de manière reproductible un défaut de croissance marqué à 20°C et 37°C pour cette grande délétion dans le segment 3. Il est intéressant de noter que, parmi les 5 mutants du snoARN U3 testés, une accumulation forte du produit de clivage au site A0, traduisant un ralentissement de la cinétique de clivage aux sites A1 et A2, était observé pour les deux mutants présentant un effet cumulatif négatif avec Rrp9p R289A, à savoir les mutants U3 1033 et U3 1193. Là encore, l'effet cumulatif le plus fort est observé pour les deux mutants du snoARN U3 conduisant au même phénotype que la mutation Rrp9p R289A. Par ailleurs, la croissance en présence du mutant Rrp9p R289A et de ces deux mutants U3 1033 et U3 1193 était abolie à toutes les températures testées (**Fig. 36**). Nous observons donc une forte augmentation de défaut de croissance en présence de ces deux délétions dans le segment 3 du snoARN U3 et de Rrp9p R289A.

#### *III.3.B.e.* *L'hélice I*

Un mutant du snoARN U3 (1191) abolissant la formation de l'hélice I par la substitution de 2 nt a également été testé (**Fig. 32 et 37**). En présence du mutant Rrp9p R289A et de ce mutant du snoARN U3, la croissance est très similaire à celle observée en présence du snoARN U3 sauvage (**Fig. 37**).

A noter que, dans le cas de ce mutant, aucune accumulation du produit de clivage en A0 avait été observé par N. Marmier-Gourrier (thèse de N. Marmier-Gourrier).

pré-ARNr 35S
5'
282
292
470
479
A0
A1
10
18S
25
GGAUUUGGUGG
UCAAAGAGUG
GAUCCUG
CC
AGUAGUC
U
A
3'
CCUAAGUCACC
AGUUUCUCAC
Boîte A
Boîte A'
72
3' - hinge
5' - hinge
60
50
40
30
VI
V
1b'
4
3
AUCUUU
CUAGGAU
UCAUCAG
AGGAA
20
II
10
III
1139
I
1143
A2
3'
5'
snoARN U3
1033 ΔΔΔΔΔΔΔΔΔAUA
1193 ΔΔΔΔAAGGAUA
1034 UGCAUΔGGAUA
1035 UGCUUUGGAUA
1362 AAAUAAGGAUA

DO600nm / mL
pASZ11::
pG1::PROTA
0.5 0.2 0.05 10-2 10-3 10-4
snoRNA U3 Rrp9 R289A
snoRNA U3 1033 Rrp9 WT
snoRNA U3 1033 Rrp9 R289A
YPD
YPG

DO600nm / mL
pASZ11::
pG1::PROTA
0.5 0.2 0.05 10-2 10-3 10-4
snoRNA U3 Rrp9 R289A
snoRNA U3 1034 Rrp9 WT
snoRNA U3 1034 Rrp9 R289A
YPD
YPG

DO600nm / mL
pASZ11::
pG1::PROTA
0.5 0.2 0.05 10-2 10-3 10-4
snoRNA U3 Rrp9 R289A
snoRNA U3 1035 Rrp9 WT
snoRNA U3 1035 Rrp9 R289A
YPD
YPG
20°C
30°C
37°C

**Figure 36 : Effet cumulatif sur la croissance de la mutation Rrp9p R289A et de délétions dans le segment 3 du snoARN U3.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les hélices et segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimées dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec les versions sauvage ou mutantes du snoARN U3 présentant des substitutions ou délétions dans le segment 3 (1033, 1034, 1035, 1362 et 1193). La croissance a été analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). La présence cumulée de la mutation Rrp9p R289A et des mutations U3 1033 et U3 1193 a un effet négatif très fort sur la croissance cellulaire. Les effets sont négligeables dans le cas des 3 autres mutants. YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

**Figure 37 : La présence du résidu R289 a peu d'influence sur la croissance de levures exprimant un snoARN U3 portant une mutation dans le segment nécessaire à la formation de l'hélice I.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les hélices et segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimées dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec les versions sauvage ou mutante du snoARN U3. La mutation concernait le segment responsable de la formation de l'hélice I (1191). La croissance a été ensuite analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). Aucun effet additionnel par rapport à l'effet négatif lié à l'expression de Rrp9p R289A est observé pour le mutant U3 1191. YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

### *III.3.B.f.* *Le segment 2*

Le segment 2 n'est constitué que d'un seul nucléotide, une adénine, qui a été substituée en cytosine (mutant U3 1032) (**Fig. 32 et 38**). En présence de ce mutant et du mutant Rrp9p R289A, la croissance était similaire à celle observée en présence du snoARN U3 sauvage (**Fig. 38**).

### *III.3.B.g.* *L'hélice II*

Deux mutants du snoARN U3 (1189 et 1190) affectant la formation de l'hélice II, du fait de la présence de substitutions de bases (respectivement 3 et 5 nt) ont été testés (**Fig. 32 et 39**). En accord avec les données de N. Marmier-Gourrier, en présence de Rrp9p WT, la mutation U3 1189 n'a pas d'effet sur la croissance alors que la mutation U3 1190 a un effet négatif à 37°C (thèse de N. Marmier-Gourrier). En présence de Rrp9p R289A, la diminution de croissance observée est identique pour les snoARN U3 sauvage et muté (U3 1189). Par contre, pour le mutant U3 1190, où la substitution abolit complètement la possibilité de former l'hélice II, un effet cumulatif très fort de la mutation dans le snoARN U3 et dans Rrp9p était observé (**Fig. 39**).

### *III.3.B.h.* *Le segment 1*

Nous avons testé l'effet du mutant U3 1036, dans lequel 2 des 3 résidus du segment 1 ont été mutés. Une extension de l'hélice II est possible pour ce mutant (**Fig. 32 et 40**). En accord avec les données de N. Marmier-Gourrier (thèse de N. Marmier-Gourrier), la mutation a peu d'effet sur la croissance des levures et l'expression de Rrp9p R289A, avec ou sans cette mutation dans le snoARN U3, conduit à un même taux de croissance (**Fig. 40**).

### *III.3.B.i.* *L'hélice III*

L'effet de 5 des mutants, affectant le segment du snoARN U3 impliqué dans la formation de l'hélice III, a été testé en présence du mutant de Rrp9p (**Fig. 32 et 41**).

| pASZ11:: | pG1:: PROTA | DO600nm / mL | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1032 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1032 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1032 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1032 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

YPD

YPG

**Figure 38 : La substitution A22C dans le snoARN U3 n'a pas d'effet négatif sur la croissance de levures exprimant le mutant Rrp9p R289A.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les hélices et segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimées dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec les versions sauvage ou mutante du snoARN U3 (substitution du segment 2 (1032)). La croissance a été analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). Aucun effet additionnel par rapport à l'effet négatif lié à l'expression de Rrp9p R289A est observé pour le mutant U3 1032. YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

**Figure 39 : Effet cumulatif très marqué de la mutation Rrp9p R289A et de la mutation dans le snoARN U3 abolissant la formation de l'hélice II.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les hélices et segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimées dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec les versions sauvage ou mutante du snoARN U3 (mutations dans la région responsable de la formation de l'hélice II (1189 et 1190)). La croissance a été analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). La présence cumulée de la mutation Rrp9p R289A et de la mutation U3 1190 a un effet négatif très fort sur la croissance cellulaire. L'effet est négligeable dans le cas de l'autre mutant 1189. YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

| | | DO$_{600nm}$ / mL | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pASZ11:: | pG1:: PROTA | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1036 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1036 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1036 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1036 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

YPD

YPG

**Figure 40 : Les souches de levure exprimant Rrp9p R289A ont des taux de croissance similaire en présence du snoARN U3 WT ou du mutant U3 1036.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les hélices et segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimées dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec les versions sauvage ou mutante du snoARN U3 (substitution du segment 2 (1032)). La croissance a été analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en DO$_{600nm}$/mL). Aucun effet additionnel par rapport à l'effet négatif lié à l'expression de Rrp9p R289A est observé pour le mutant U3 1036. YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

Comme attendu, d'après les données antérieures de N. Marmier-Gourrier, les mutations U3 1972, 1973 et 1187 affectaient peu la croissance en présence de Rrp9p sauvage (thèse de N. Marmier-Gourrier). Néanmoins, la croissance en présence de Rrp9p R289A était plus faible en présence du snoARN U3 1972 qu'en présence de l'ARN sauvage (**Fig. 41**).

Par ailleurs, aucune croissance n'était observée lorsqu'à la fois Rrp9p R289A et le snoARN U3 1187 étaient co-exprimés (**Fig. 41**). Comme observé précédemment par N. Marmier-Gourrier (thèse de N. Marmier-Gourrier), l'expression des snoARN U3 1192 et 1031 en présence de Rrp9p WT se traduit par des défauts de croissance marqués et une abolition totale de la croissance était observée en présence du mutant Rrp9p R289A. Ainsi, pour la plupart des mutants du snoARN U3 testés, pour lesquels les mutations affectaient la stabilité de l'hélice III, un fort effet cumulatif, voir synergique, de ces mutations et de la mutation Rrp9p R289A était observé (**Fig. 41**). C'est tout particulièrement le cas pour les deux mutants U3 1192 et 1031, pour lesquels une forte accumulation du produit de clivage en A0 avait été observé par N. Marmier-Gourrier (thèse de N. Marmier-Gourrier).

### *III.3.B.j. L'ensemble des motifs établis entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3*

En conclusion, nous avons bien observé un effet différentiel de l'expression simultanée de Rrp9p R289A et de snoARN U3 mutés dans leurs régions 5'-terminales. L'effet dépend du positionnement et de l'identité des mutations. Ainsi, en ce qui concerne les hélices, comme l'avait déjà observé N. Marmier-Gourrier (Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; thèse de N. Marmier-Gourrier), la mutation du segment du snoARN U3 impliqué dans la formation de l'hélice I n'a pas d'effet marqué sur la croissance et seul le défaut lié à Rrp9p R289A était detecté pour le double mutant. Il en est de même pour les substitutions du nucléotide qui relie les hélices I et III et du trinucléotide reliant les hélices II et III. Dans l'état actuel des données, il est difficile d'apporter des réponses en ce qui concerne l'hélice V, puisqu'un seul mutant présentant une seule substitution de base a été testé. Nous devrons tester l'effet cumulé de Rrp9p R289A avec d'autres snoARN U3 mutés dans le segment formant l'hélice V. Par contre, nous avons obtenu des résultats

| | |
|---|---|
| 1192 | AAAACAG |
| 1031 | UAAGCAG |
| 1972 | UAAUCAG |
| 1973 | UCAGCAG |
| 1187 | UCAUAUA |

## Hélice III

| pASZ11:: | pG1:: PROTA | $DO_{600nm}$ / mL | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | YPD |
| snoRNA U3 1192 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1192 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | YPG |
| snoRNA U3 1192 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1192 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| pASZ11:: | pG1:: PROTA | $DO_{600nm}$ / mL | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | YPD |
| snoRNA U3 1031 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1031 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | YPG |
| snoRNA U3 1031 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1031 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| pASZ11:: | pG1:: PROTA | $DO_{600nm}$ / mL | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | 0.5 | 0.2 | 0.05 | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | YPD |
| snoRNA U3 1187 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1187 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | YPG |
| snoRNA U3 1187 | Rrp9 WT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| snoRNA U3 1187 | Rrp9 R289A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

20°C 30°C 37°C

**Figure 41 : Effet négatif cumulatif très marqué de la mutation R289A dans Rrp9p et de la mutation du snoARN U3 déstabilisant l'hélice III.**

L'appariement formé entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 est représenté schématiquement en haut de la figure et les hélices et segments sont numérotés selon Méreau *et al*, 1996 et Marmier-Gourrier *et al*, 2011. Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été exprimées dans la souche JH84::pGAL-*RRP9* avec les versions sauvage ou mutante du snoARN U3 (mutations dans la région responsable de la formation de l'hélice II (1189 et 1190)). La croissance a été analysée en milieu solide YPG et YPD à 3 températures et à différentes concentrations cellulaires (exprimées en $DO_{600nm}$/mL). La présence cumulée de la mutation Rrp9p R289A et des mutations U3 1192, 1031 et 1187 a un effet négatif très fort sur la croissance cellulaire. L'effet est négligeable dans le cas des 2 autres mutants 1972 et 1973. YPG ou YPD : milieu riche contenant respectivement contenant du galactose ou glucose.

marquants pour les hélices II, III et VI. La présence simultanée de Rrp9p R289A et de mutations importantes dans les segments du snoARN U3, formant ces 3 hélices, conduisent à un phénotype synthétique létal. Il est important de noter que l'hélice VI est considérée comme étant la première mise en place dans l'appariement pré-ARNr/snoARN U3 et qu'elle est nécessaire à l'efficacité de la première étape de clivage précoce au site A0 (Wormsley *et al*, 2001 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; Dutca *et al*, 2011). Les étapes de clivage aux sites A1 et A2 dépendant du clivage en A0, un ralentissement du clivage en A0 ralentit donc les clivages en A1 et A2 (Hughes, 1996 ; Méreau *et al*, 1997 ; Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; Dutca *et al*, 2011). Or, la présence de Rrp9p R289A ralentit aussi fortement ces clivages, d'où sans doute l'effet cumulatif des mutations dans le snoARN U3 et dans Rrp9p. Par ailleurs, la formation de l'hélice VI est requise pour l'assemblage du complexe Mpp10p au sein du processome (Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; Dutca *et al*, 2011), lequel est nécessaire pour l'efficacité des clivages précoces. La substitution presque totale de la séquence du snoARN U3 nécessaire à la formation de l'hélice II, à elle seule, a un effet négatif sur la croissance qui devient presque quasiment nulle à 20°C et à 37°C en présence de Rrp9p R289A. De même, les substitutions de résidus, même de taille modestes, dans le segment du snoARN U3 requis pour former l'hélice III, ont un effet cumulé très marqué avec l'expression de Rrp9p R289A, entrainant un phénotype synthétique létal dans plusieurs cas. Cette dernière observation est en accord avec le fait que la séquence très conservée du segment du snoARN U3, requise pour former l'hélice III (motif A' ; Segault et al, 1992) est requise pour le bon fonctionnement du snoARN U3 dans le processus de maturation (Sharma & Tollervey, 1999). Contrairement à ce qui est observé pour l'hélice II, dans le cas de l'hélice III, des mutations compensatoires dans le pré-ARNr ne compensent pas le défaut de maturation du pré-ARNr, généré par des mutations du snoARN U3 (Sharma & Tollervey, 1999). Il est important de noter que la formation des hélices II et III est importante pour que les clivages aux sites A1 et A2 soient efficaces. En effet, on observe fréquemment, pour les mutations des segments du snoARN U3 impliqués dans la formation de ces hélices, une accumulation du produit de clivage en A0 (Sharma & Tollervey, 1999 ; thèse de N. Marmier-Gourrier). Ainsi, les mutations du snoARN U3, affectant ces deux hélices, et l'expression de Rrp9p R289A conduisent au même phénotype, expliquant sans doute l'effet très négatif observé.

Un lien étroit existe en plus entre ces deux hélices et le complexe Mpp10p. En effet, la protéine Imp4p de ce complexe est requise pour la formation de ces hélices et celles-ci semblent requises pour une association efficace du complexe Mpp10p dans le processome (Wormsley *et al*, 2001 ; Lee & Baserga, 1997, 1999 ; Dunbar *et al*, 1997 ; Wehner *et al*, 2002 ; Bernstein *et al*, 2004 ; Gerczei & Correll, 2004 ; Dutca *et al*, 2011).

Enfin, nous avons observé des effets négatifs conjugués importants sur la croissance, en lien avec des délétions dans les segments 3 et 4 liant les hélices. Comme notre équipe avait observé auparavant, la taille du segment 3 est importante pour que la maturation soit efficace (Méreau *et al*, 1997). Les délétions dans ce segment conduisent à une accumulation du produit de clivage en A0, reflétant une réduction de la cinétique de clivage en A1 et A2. De ce fait, le défaut entrainé en plus par Rrp9p R289A au niveau du clivage de ces sites doit expliquer les phénotypes synthétiques létaux observés. La situation est plus complexe pour le segment 4, où, comme observé par N. Marmier-Gourrier (Marmier-Gourrier *et al*, 2011), seule la délétion d'une séquence définie de ce segment ralentit la croissance et conduit à un phénotype synthétique létal avec Rrp9p R289A.

Le bilan de ces données révèle l'importance conjuguée de Rrp9p et des 3 hélices II, III et VI, ainsi que de la taille du segment 3 et de la séquence du segment 4. On peut imaginer que Rrp9p participe, soit directement, soit par interaction avec d'autres composants du processome, à la formation et/ou la stabilisation des éléments essentiels de l'architecture du complexe pré-ARNr/snoARN U3, ou encore au recrutement de composants du processome, nécessaires à l'efficacité des clivages aux sites A1 et A2. D'où l'importance de rechercher quels sont les partenaires de Rrp9p au sein du processome.

## IV. Réseau d'interaction de Rrp9 au sein du processome

### IV.1. Recherche de partenaires potentiels de la protéine Rrp9p par double hybride

Afin de déterminer si le résidu R289 pouvait être impliqué directement ou indirectement dans l'association avec un ou plusieurs partenaires au sein du processome, nous avons, dans un premier temps, tenter d'identifier les partenaires

de Rrp9p au sein du processome. Ils n'avaient en effet pas été clairement identifiés, à part la protéine Sgd1p (Lim *et al*, 2011). Pour cela, nous avons utilisé la technique de double hybride. L'équipe de Denis Lafontaine nous avait ainsi fourni des plasmides contenant les ORF de protéines du processome (Utp1p/Pwp2p, Utp4p, Utp5p, Utp6p, Utp12p, Utp14p, Utp16p, Utp18p, Bfr2p, Kri1p et Nsr1p). Ensuite, en nous basant sur les données de la littérature (Lim *et al*, 2011), nous avons sélectionné et cloné à partir d'ADNg de levure les ORF de nombreuses autres protéines du processome, permettant d'avoir l'ensemble des protéines de certains sous-complexes du processome (UTP-B et Utp14p/Sof1p/Rrp36p/Utp7p) (**Fig. 42**).

D'autre part, nous avons inclus dans le criblage des protéines du complexe Mpp10p (Mpp10p, Imp3p et Imp4p), puisque leur rôle fondamental pour les clivages précoces A0, A1 et A2 avait été démontré, les protéines Utp3p et Utp25p, qui sont supposées établir un lien entre le sous-complexe UTP-B et le complexe Mpp10p, ainsi que les protéines de la snoRNP U3 (Snu13p, Nop1p, Nop56p et Nop58p) (**Fig. 42**). Enfin, nous avons inclus 3 autres protéines qui nous semblaient être de bons candidats possibles pour l'interaction avec Rrp9, la protéine Sgd1p, décrite précédemment comme retrouvée au sein de complexes avec la protéine Rrp9p (Lim *et al*, 2011), la protéine Utp24p, potentiellement impliquée dans les clivages aux sites A1 et A2, voir seulement au site A1 (Bleichert *et al*, 2006 ; Tomecki *et al*, 2015), et enfin la protéine Rrp5p, dont certains mutants inhibent le clivage au site A2 (**Fig. 42**).

Nous avons alors analysé par double hybride les interactions potentielles entre toutes ces protéines et la protéine Rrp9p WT ou R289A.

Dans ces tests double hybride, un signal positif était obtenu lors des tests d'interaction de Rrp9p avec les protéines Rrp36p et Sgd1p, comme en témoigne la croissance observée, même à de fortes concentrations en 3-AT (**Fig. 4 publication**). En outre, le mutant Rrp9p R289A interagissait efficacement avec la protéine Sgd1p, mais l'interaction avec la protéine Rrp36p était fortement réduite, suggérant un rôle important du résidu R289 dans l'interaction avec Rrp36p (**Fig. 4 publication**). Ces interactions identifiées entre la protéine Rrp9p et les protéines Rrp36p et Sgd1p n'ont pu être observées que lorsque la protéine Rrp9p était exprimée à partir du plasmide pGBKT7, en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN Gal4-BD et les protéines Rrp36p et Sgd1p exprimées à partir du plasmide pACT2, en fusion avec le domaine

**Figure 42 : Sélection de protéines appartenant au processome dont nous avons décidé de tester les capacités d'interaction avec la protéine Rrp9p.**

Le réseau d'interaction global établi par comparaison de banques de données PPI par l'équipe de Baserga (Lim *et al*, 2011) est représenté. Parmi ces facteurs du processome, certains ont été sélectionnés afin de tester si elles peuvent être des partenaires de la protéine Rrp9p. Celle-ci est cerclée en rouge, les protéines exprimées à partir de constructions qui nous ont été fournies par l'équipe de Lafontaine sont cerclées en noir, et les protéines exprimées à partir de constructions générées au laboratoire sont cerclées en orange. Les protéines sur fond vert appartiennent au sous-complexe UTP-A, celles sur fond bleu au sous-complexe UTP-B, celles sur fond jaune au sous-complexe UTP-C, celles sur fond marron au complexe Bms1p/Rcl1p, sur fond rouge au complexe Mpp10p, sur fond gris à la snoRNP U3 et celles sur fond rose à aucun complexe connu à ce jour. Les protéines encadrées d'un losange sont des hélicases connues.

d'activation de la transcription Gal4-AD). Aucune croissance et ainsi aucune preuve d'interaction n'a ainsi pu être observée lorsque les domaines Gal-4 étaient interchangés. Ce type d'observation n'est pas rare lors de tests double hybride. En effet, les étiquettes Gal4-BD et Gal4-AD peuvent empêcher la formation des interactions, ou encore que le positionnement du domaine Gal4-AD au sein de la protéine de fusion peut ne pas être adéquate pour le recrutement du complexe de transcription.

Pour toutes les autres protéines testées, aucune croissance n'a pu être observée, suggérant que ces protéines n'interagissent pas avec Rrp9, quelque soit le plasmide dans lequel elles étaient intégrées. Cela ne signifie pas pour autant que les interactions ne soient pas mises en place dans le contexte du processome, les tests ayant été réalisés deux à deux dans le nucléoplasme. Des exemples de résultats pour les protéines Utp1p et Utp22p sont donnés dans la **figure 43**.

Nous avons réalisé, pour chaque test, un essai avec la protéine partenaire possible seule, c'est-à-dire en absence de Rrp9p. Lorsqu'une croissance était observée avec la protéine seule, nous avons considéré que les données de double hybride n'étaient pas significatives, comme c'est le cas pour les protéines Utp3p, Utp13p, Utp8p, Utp21p et Bfr2p. Des exemples de résultats pour les protéines Up8p et Utp21p sont donnés dans la **figure 43**.

Ayant observé que Rrp9p pouvait interagir avec Rrp36p et Sgd1p, nous avons testé, toujours par double hybride, si ces deux protéines partenaires pouvaient aussi interagir entre elles dans un test double hybride. Ce qui s'est avéré être le cas. Nous avons aussi pu montrer par ce même test double hybride que chacune de ces 2 protéines partenaires étaient capables d'interagir avec la protéine Rrp5p. Les interactions de Rrp36p et Sgd1p avec Rrp5p ont été observées dans les deux sens, c'est-à-dire quel que soit le domaine de Gal4 avec lequel elles étaient fusionnées. Au travers de ce travail, nous avons donc identifié un nouveau réseau d'interaction au sein du processome, mettant en jeu les protéines Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p (**Fig 4 et 5 publication**). Autant la littérature sur la protéine Rrp5p et son rôle essentiel dans l'activité du processome était abondante, autant celle sur les protéines Rrp36p et Sgd1p est limitée. En effet, la protéine Rrp36p a été découverte récemment par l'équipe de Y. Henry (Gérus *et al*, 2010) et la protéine Sgd1p est

**Figure 43 : Exemples de tests double hybride n'ayant pas donné de résultats informatifs.**

La technique de double hybride a été utilisée afin d'identifier les partenaires potentiels de la protéine Rrp9p parmi les protéines du processome que nous avons sélectionné. Sont illustrés ici quelques tests double hybride n'ayant pas donné de résultats significatifs. Par exemple, l'absence de détection d'interaction par cette technique (Utp1p et Utp22p), ou des témoins négatifs qui se sont révélés positifs (Utp8p et Utp21p).

principalement décrite comme un facteur affectant l'expression de la protéine GPD1 (Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase), impliquée ainsi dans une toute autre voie métabolique que la maturation des pré-ARNr (Akhtar *et al*, 2000 ; Lin *et al*, 2002). Cependant, nous pouvons noter que l'homologue humain NOM1, de la protéine Sgd1p de levure, a été décrit comme potentiellement impliqué dans des leucémies aigues chez l'enfant (Simmons *et al*, 2005).

## IV.2. Identification des domaines d'interaction

Nous avons ensuite cherché à identifier par la technique de double quels étaient les domaines d'interaction de la protéine Rrp9p et des partenaires que nous avons identifié.

La protéine Rrp9p est constituée d'un domaine N-terminal court et d'un domaine C-terminal structuré en « hélix propeller ». Nous avons alors, dans un premier temps, testé par double hybride les interactions de chacun de ces deux domaines avec les protéines Rrp36p et Sgd1p. Les structures tridimensionnelles des protéines Rrp36p et Sgd1p n'avaient pas été résolues et aucun domaine spécifique n'avait été identifié. La structure tridimensionnelle de Rrp5p n'avait pas non plus été résolue, mais plusieurs domaines spécifiques avaient été identifiés par analyse de la séquence en acides aminés. En effet, la région N-terminale de la protéine Rrp5p est composée de 12 sous-domaines susceptibles d'interagir avec l'ARN de type S1 (Lebaron *et al*, 2013 ; Eppens *et al*, 1999, 2002 ; Torchet *et al*, 1998). Elle contient par ailleurs 7 sous-domaines de type tétratricopeptide (TPR) au niveau de sa région C-terminale (Lebaron *et al*, 2013 ; Eppens *et al*, 1999, 2002 ; Torchet *et al*, 1998), ces domaines étant connus pour être des domaines impliqués dans des interactions protéine/protéine. De plus, il avait été montré qu'elle peut être subdivisée en deux domaines physiquement et fonctionnellement distincts, un domaine N-terminal, comprenant les acides aminés 1 à 1130 et contenant les 9 premiers sous-domaines S1, qui est impliqué dans la production des ARNr 25S et 5,8S, et un domaine C-terminal, comprenant les acides aminés 1132 à 1729 et contenant les 3 derniers sous-domaines S1 et les 7 sous-domaines TPR, requis pour la production de l'ARNr 18S (Lebaron *et al*, 2013 : Young *et al*, 2011 ; Vos *et al*, 2004 ; Eppens *et al*, 1999, 2002 ; Torchet *et al*, 1998 ; Venema & Tollervey, 1996). Pour tenter de subdiviser les

protéines Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p en plusieurs sous-domaines structuraux fonctionnels, nous avons soumis leurs séquences en acides aminés à une analyse par plusieurs logiciels de prédiction de structure 2D. Ainsi, les logiciels IUPred (Dosztanyi *et al*, 2005) et ANCHOR (Meszaros *et al*, 2009 ; Dosztanyi *et al*, 2009) nous ont permis de prédire d'une part quelles régions des protéines étaient désordonnées, et d'autre part quelles régions correspondaient à des surfaces potentielles d'interaction avec d'autres protéines (**Fig. 44**). Le logiciel ANCHOR permet en effet de prédire si les régions désordonnées et instables peuvent être stabilisées par l'interaction avec un partenaire (Meszaros *et al*, 2009 ; Dosztanyi *et al*, 2009). L'ensemble de ce travail de prédiction de structure 2D de protéines et de la définition de domaines a été réalisé sous l'encadrement de X. Manival au laboratoire.

La protéine Rrp36p semble majoritairement désordonnée et possède de courtes régions, localisées tout le long de la molécule, susceptibles d'établir des interactions avec d'autres protéines (**Fig. 44**). Il nous a donc été difficile de définir des domaines distincts au sein de cette protéine.

L'analyse de la séquence de la protéine Sgd1p montrait que sa région N-terminale (1-326) doit être désordonnée et constitue un domaine d'interaction possible, alors que la région C-terminale (327-899) est plus ordonnée (**Fig. 44**). Cette dernière n'était pas prédite par le logiciel constituer un domaine d'interaction possible (**Fig. 44**). La protéine Sgd1p pouvant donc posséder deux domaines, nous avons cloné les régions codant ces deux sous-domaines dans des vecteurs d'expression (**Fig. 46**).

Enfin, la protéine Rrp5p, présente une extrémité N-terminale s'étendant des acides aminés 1 à 250 environ et une région s'étendant des acides aminés 1300 à 1500 environ, prédites comme désordonnées et constituant des domaines d'interaction potentiels, (**Fig. 44**).

Nous avons également soumis la séquence de la protéine Rrp9p aux prédictions des logiciels IUPred et ANCHOR ce qui nous a permis de vérifier que la région N-terminale (1-126) est effectivement désordonnée, alors que la région C-terminale (127-573) structurée en propeller est ordonnée comme attendu (**Fig. 44**).

**Figure 44 : Prédiction par les logiciles IUPred et ANCHOR de régions désordonnées qui pourraient être favorables à la mise en place d'interaction avec d'autres protéines au sein des protéines Rrp36p, Sgd1p, Rrp5p et Rrp9p.**

Les logiciels IUPred et ANCHOR ont été utilisés afin d'essayer d'identifier des domaines d'interactions entre les protéines Rrp36p, Sgd1p, Rrp5p et Rrp9p en se basant respectivement sur la prédiction d'une absence de structuration favorable à la mise en place d'interactions avec d'autres protéines. Pour ces logiciels, une valeur supérieure à 0,5 est significative d'un désordre structural, corrélé à l'existence d'un domaine potentiel d'interaction avec d'autres protéines. La numérotation des acides aminés au sein des différentes séquences des protéines est indiquée, ainsi que des rectangles bleus correspondant aux régions d'interaction potentielles avec d'autres protéines (plus la couleur bleue est intense, plus la probabilité est forte).

Toujours dans le but de déterminer des domaines d'interaction potentiels, nous avons également utilisé le logiciel PsiPred (bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) pour identifier d'éventuelles structures secondaires (**Fig. 45 à 47**).

Deux régions majoritaires peuvent être distinguées au sein de la protéine Rrp36p, une région N-terminale essentiellement dépourvue de structures secondaires et une région C-terminale formée presque entièrement d'hélices $\alpha$ (**Fig. 45**). Nous avons donc cloné les segments d'ADN correspondant à chacun de ces deux sous-domaines de la protéine Rrp36p pour la suite de notre étude (**Fig. 45**).

En ce qui concerne la protéine Sgd1p, nous pouvons remarquer que la majorité de la protéine est composée d'hélices $\alpha$, localisées régulièrement tout le long de la séquence, ne faisant pas clairement apparaître de sous-domaines (**Fig. 46**).

Nous avons ainsi divisé la protéine arbitrairement en plusieurs domaines, en se basant sur les données obtenues avec les logiciels IUPred et ANCHOR montrant deux régions distinctes (1-326 et 327-899), que nous retrouvions d'ailleurs aussi avec le logiciel PsiPred (**Fig. 44 et 46**). Les différents segments d'ADN correspondant aux deux domaines de Sgd1p ainsi définis ont été clonés dans des plasmides d'expression. (**Fig. 46).**

Finalement, de l'extrémité N-terminale à la position 1340, la protéine Rrp5p apparait comme majoritairement composée de brins $\beta$, interrompus par de courtes hélices $\alpha$, tandis que la région C-terminale, à partir de la position 1341 est majoritairement composée d'hélices $\alpha$ (**Fig. 47**).

Ces deux régions coïncident avec la présence des domaines S1 dans la partie N-terminale et des domaines TPR dans la partie C-terminale. Nous avons donc cloné les segments d'ADN correspondant à ces deux sous-domaines de la protéine Rrp5p, contenant respectivement l'ensemble des domaines S1 et l'ensemble des domaines TPR ainsi qu'une courte région en amont. Cette petite région en amont correspond à la région précédemment décrite avec les logiciels IUPred et ANCHOR comme étant désordonnée et constituant une zone d'interaction potentielle (**Fig. 44**). Nous avons alors cloné les ADN codant correspondant à ces deux sous-domaines dans des plasmides d'expression. De plus, l'ADN codant deux autres domaines de la protéine Rrp5p, l'un contenant uniquement les domaines TPR, l'autre la région en amont des

Conf :
Pred :
Pred : CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

Conf :
Pred :
Pred : CCCCCCCCCCHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHH
AA : MQKTDGIRIPGVILDELKTLDYSQDERFSISEGKKRRRGNGKHLSRKEKRKMERADKKRKIISTREINSSRLKSAPTSEKRSANAGVKNVGKQANGKNPISSDESESNENWDSDEVLTDE
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Pred : HHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHCCCHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
AA : VAEESGEQAMSAEETMKKLESLKRKAKGIQGAENSGEIKGNSYEKKHIRNRDTNENFVSYPLAPSDRSAFERDEMDMQYYAKKLGLKGERKAIHAKDEFDAIGGLLEGLEYFENYGKSDE
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
Domaine N-ter (SD1, 1-326)
Pred : CCCCCCCCCCCCCCCHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

**Figure 46 : Représentation des structures secondaires de la protéine Sgd1p prédites par le logiciel PsiPred et représentation des domaines délimités pour cette protéine.**

Le logiciel PsiPred a été utilisé afin de rechercher des domaines d'interactions dans les protéines Rrp36p, Sgd1p, Rrp5p et Rrp9p en se basant sur la prédiction (Pred) de la présence de structures secondaires au sein de ces protéines. La fiabilité de la prédiction est indiquée par des histogrammes dont la hauteur représente la probabilité de la présence des structures secondaires. Les structures secondaires prédites sont représentées par des cylindres roses correspondant aux hélices α (H), des flèches jaunes correpondant aux brins β.(E). Les traits fins noirs correspondent aux régions non structurées (C). La séquence (AA) de la protéine Sgd1p et la numérotation des acides aminés sont indiquées. Les domaines que nous avons sélectionnés sur la base des prédictions par les logiciels IUPred, ANCHOR et PsiPred sont représentés schématiquement en bas de la figure.

Conf :
Pred :
Pred :
AA :
Domaine 4 (SD4, 1-241)
Domaine N-ter (SD6, 1-1250)
Domaine N-ter (SD6, 1-1250)
Domaine C-ter (SD1, 1264-1729)
Domaine 2 (SD2, 1264-1456)

**Figure 47 : Représentation des structures secondaires de la protéine Rrp5p prédites par le logiciel PsiPred et représentation des domaines délimités pour cette protéine.**

Le logiciel PsiPred a été utilisé afin de rechercher des domaines d'interactions dans les protéines Rrp36p, Sgd1p, Rrp5p et Rrp9p en se basant sur la prédiction (Pred) de la présence de structures secondaires au sein de ces protéines. La fiabilité de la prédiction est indiquée par des histogrammes dont la hauteur représente la probabilité de la présence des structures secondaires. Les structures secondaires prédites sont représentées par des cylindres roses correspondant aux hélices α (H), des flèches jaunes correpondant aux brins β.(E). Les traits fins noirs correspondent aux régions non structurées (C). La séquence (AA) de la protéine Rrp5p et la numérotation des acides aminés sont indiquées. Les domaines que nous avons sélectionnés sur la base des prédictions par les logiciels IUPred, ANCHOR et PsiPred sont représentés schématiquement en bas de la figure.

domaines TPR, a également été cloné dans des plasmides d'expression (**Fig. 47**). Nous n'avons dans un premier temps pas voulu subdiviser en plusieurs sous-domaines la région qui contient les différents domaines S1, afin de déterminer tout d'abord si celle-ci était déjà impliquée dans les interactions avec les protéines Sgd1p et Rrp36p. L'extrémité N-terminale de la région contenant les domaines S1 (résidus 1 à 250 environ) avait néanmoins été prédite par les logiciels IUPred et ANCHOR comme désordonnée et constituant potentiellement une zone d'interaction (**Fig. 44**). Le logiciel PsiPred prédisait en outre qu'une partie de cette extrémité N-terminale (résidus 120 à 250) présente des structures secondaires (**Fig. 47**). L'ADN codant ce dernier sous-domaine de la protéine Rrp5p a donc également été cloné dans des plasmides d'expression.

Grâce à la collection d'ADN codant, les différents domaines des protéines Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p que nous avons généré, nous avons tenté d'identifier les domaines impliqués dans les différentes associations au sein du réseau que nous avons mis en évidence. Afin d'étudier les interactions potentielles entre ces protéines, des plasmides d'expression, permettant d'exprimer des protéines fusionnées ou non à différentes étiquettes, ont été utilisés selon la technique employée : les plasmides pGBKT7 (Gal4-BD), pAS2 (Gal4-BD) et pACT2 (Gal4-AD) pour la technique de double hybride ; les plasmides pnEA-3CH (6-His) et pnCS ( - ) pour la technique de co-expression chez *E. coli* ; les plasmides pDEST15 (GST) et pDEST17 (6-His) pour la technique de « GST pull-down » chez *E. coli*.

Nos données de double hybride indiquent que le domaine N-terminal de la protéine Rrp9p n'interagit pas avec Rrp36p, suggérant qu'il n'est pas suffisant pour permettre l'association des deux protéines (**Fig. 48**).

En revanche, nous observons une croissance comparable des cellules en exprimant à partir des plasmides de double hybride, d'une part, la protéine Rrp9p entière ou son domaine « hélix propeller » et, d'autre part, la protéine Rrp36p, et ce même à de fortes concentrations en 3-AT (**Fig. 48**). Ce résultat indique que le domaine « hélix propeller » est suffisant pour permettre l'interaction de Rrp9p avec Rrp36p.

En ce qui concerne la protéine Sgd1p, aussi bien les tests double hybride réalisés avec le domaine N-terminal de Rrp9p, que son domaine « hélix propeller », se sont avérés négatifs en présence de 3-AT, suggérant que la protéine Rrp9p entière est

**Figure 48 : Le domaine propeller de la protéine Rrp9p est responsable de l'interaction avec la protéine Rrp36p.**

La technique de double hybride a été utilisée pour analyser les interactions entre les différents domaines sélectionnés des protéines Rrp9p, Rrp36p et Sgd1p. Des représentations schématiques de ces domaines sont données à droite des panneaux de résultats. Des concentrations croissantes en 3-AT ont été utilisées pour mesurer la force des interactions (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM).

nécessaire pour qu'il y ait interaction avec Sgd1p (**Fig. 48**). Les tests réalisés avec la protéine Rrp9p entière et les différents domaines des protéines Rrp36p et Sgd1p se sont avérés également négatifs (**Fig. 48**) et ne nous ont pas permis de délimiter les sous-domaines des protéines Rrp36p et Sgd1p, requis pour établir une interaction avec la protéine Rrp9p. Ceci suggère que les protéines entières sont nécessaires pour l'observation des interactions. Cela pourrait s'expliquer par un mauvais repliement des domaines exprimés de manière individuelle et/ou une instabilité des protéines de fusion, ou encore par la mise en jeu d'acides aminés des différents domaines dans l'interaction avec Rrp9p. Il est également possible que notre définition des domaines n'ait pas été optimale. De la même manière, pour l'interaction entre les protéines Rrp36p et Sgd1p, les tests réalisés avec des sous-domaines ont été négatifs (**Fig. 49**), ne permettant pas d'affiner notre compréhension du mode d'association de ces protéines.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux domaines nécessaires à l'interaction entre la protéine Rrp5p et les protéines Rrp36p et Sgd1p. Les tests réalisés avec la protéine Rrp5p entière et les domaines N-terminaux des protéines Rrp36p (SD1) et Sgd1p (SD1) étaient négatifs, suggérant qu'ils ne sont pas suffisants pour permettre l'interaction (**Fig. 50**). Par contre, les tests réalisés avec la protéine Rrp5p entière et les sous-domaines C-terminaux des protéines Rrp36p (SD2) et Sgd1p (SD3) ont été positifs (**Fig. 50**). Cependant la croissance cellulaire était légèrement plus faible que celle observée en présence des protéines Rrp36p ou Sgd1p entières, suggérant que ces domaines C-ter sont requis pour l'interaction avec Rrp5p, mais que d'autres régions sont impliquées pour permettre une association optimale.

Nous avons ensuite essayé d'affiner la détermination des régions d'interaction du domaine C-ter (SD3) de la protéine Sgd1p en subdivisant ce domaine en deux autres domaines plus réduits (SD4 et SD5). Lors des tests double hybride, une croissance faible des cellules était observée lorsque les régions (SD4 ou SD5) du domaine C-terminal (SD3) de la protéine Sgd1p étaient testées avec la protéine Rrp5p entière (**Fig. 50**). Ce résultat montre que les domaines SD4 ou SD5 de la protéine Sgd1p sont probablement impliqués dans l'interaction avec Rrp5p, mais ne sont pas suffisants, à eux seuls, pour médier une interaction optimale. D'autre part, nous n'observons aucune croissance lorsque les protéines Rrp36p ou Sgd1p entières étaient testées avec les différents domaines de la protéine Rrp5p (**Fig. 50**). Ainsi,

**Figure 49 : Les protéines Rrp36p et Sgd1p interagissent ensemble seulement lorsqu'elles sont entières.**

La technique de double hybride a été utilisée pour analyser les interactions entre les différents domaines sélectionnés des protéines Rrp36p et Sgd1p. Des représentations schématiques de ces domaines sont données à droite des panneaux de résultats. Des concentrations croissantes en 3-AT ont été utilisées pour mesurer la force des interactions (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM).

**Figure 50 : Les domaines C-terminaux des protéines Rrp36p et Sgd1p sont impliqués dans l'interaction avec la protéine Rrp5p.**

La technique de double hybride a été utilisée pour analyser les interactions entre les différents domaines sélectionnés des protéines Rrp5p, Rrp36p et Sgd1p. Des représentations schématiques de ces domaines sont données à droite des panneaux de résultats. Des concentrations croissantes en 3-AT ont été utilisées pour mesurer la force des interactions (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM).

nous n'avons pas réussi à identifier les régions de Rrp5p qui interagissent avec les protéines Rrp36p et Sgd1p, suggérant que la protéine entière est nécessaire pour l'interaction. Une possibilité est que les domaines générés n'étaient pas appropriés, sachant que la définition de domaines en absence de structure 3D reste difficile.

En conclusion, nous avons pu montrer que le domaine « hélix propeller » de la protéine Rrp9p est nécessaire et suffisant pour établir une interaction avec la protéine Rrp36p en test double hybride (**Fig. 51**). Cependant, cette dernière doit être entière pour que l'interaction double hybride soit efficace. D'autre part, nous avons également montré que les domaines C-terminaux des protéines Rrp36p (SD2) et Sgd1p (SD3) sont nécessaires à l'interaction avec la protéine Rrp5p (**Fig. 51**). De la même manière que pour Rrp36p, la protéine Rrp5p doit également être entière pour que l'interaction double hybride soit efficace (**Fig. 51**). Sachant que nous ne nous sommes basés que sur des prédictions afin d'établir les différents sous-domaines de l'ensemble des protéines, nous avons tout de même réussi à identifier plusieurs sous-domaines dans les protéines d'intérêt, ce qui est encourageant pour la suite des expériences.

## IV.3. Tests visant à confirmer des différentes interactions détectées par double hybride et à définir si celles-ci sont directes

Nous avons ensuite cherché à savoir si les interactions entre les protéines Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p étaient directes ou pouvaient être médiées par l'intermédiaire d'un ou plusieurs autres facteurs. Tout particulièrement lorsqu'on teste par la technique double hybride chez la levure des protéines de levure, cette technique ne permet en effet pas de s'affranchir de l'implication possible d'un partenaire cellulaire endogène dans l'association des deux protéines de fusion testées.

### *IV.3.A. Tests de co-expression*

Dans un premier temps, nous avons ainsi choisi de valider les différentes interactions identifiées par la technique de co-expression chez *E.coli*. Le principe de cette

**Figure 51 : Réseau d'interactions identifié au sein du processome impliquant les protéines Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p. Les domaines responsables ou impliqués dans les interactions sont indiqués.**

Le réseau d'interactions que nous avons identifié est représenté, ainsi que les domaines responsables ou impliqués dans ces interactions.

technique repose sur l'expression simultanée chez *E. coli* des deux partenaires, l'un d'eux portant une étiquette 6-His. L'extrait cellulaire, obtenu après sonication, est ensuite incubé sur des billes reconnaissant spécifiquement l'étiquette 6-His, ce qui permet de fixer le partenaire étiqueté. L'interaction directe avec le deuxième partenaire est confirmée si celui-ci est co-sélectionné. Des lavages plus ou moins stringents sont réalisés une fois l'extrait incubé sur billes, soit avec un tampon de faible concentration saline (BS), soit avec un tampon de haute concentration saline (HS). Tout d'abord, nous avons vérifié que les protéines non étiquetées ne se fixaient pas aspécifiquement sur les billes. Nous avons ainsi exprimé chez *E. coli* uniquement les protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p ou Sgd1p seules et non étiquetées, Rrp5p n'ayant pas été testée car nous ne l'avions encore pas identifiée comme partenaire au moment où nous avons réalisé ces l'expériences. Ces différentes protéines étaient bien exprimées et solubles dans les tampons BS ou HS, puisque nous observions par électrophorèse sur gel dénaturant, avant sonication (EB) et après sonication dans le surnageant de sonication (SSo), des protéines dont la taille correspondait bien à celle attendue et dont l'identité a été confirmé par spectrométrie de masse (**Fig. 52**). En revanche, pour la protéine Rrp36p, les résultats étaient inexploitables, même après avoir réalisé un triplicata des expériences (**Fig. 52**).

Malheureusement, lors de l'incubation du surnageant après sonication (SSo) avec les billes de cobalt-séphatose (Billes), nous observions, après traitement dissociant et électrophorèse sur gel dénaturant, des bandes correspondant aux différentes protéines exprimées, ceci aussi bien dans le tampon BS que HS (**Fig. 52**). Ce résultat montrait que les protéines non étiquetées Rrp9p WT, Rrp9p R289A et Sgd1p interagissaient de manière non spécifique avec les billes, rendant toutes les interprétations concernant les interactions potentielles, impossibles. Les expériences ont été reproduites trois fois et ont toujours donné les mêmes résultats.

### *IV.3.B. Tests de « GST pull-down »*

Les données obtenues par la technique de co-expression ne nous permettant, ni de confirmer les interactions observées par la technique de double hybride, ni de s'assurer que ces interactions sont directes, nous avons alors opté pour la technique de « GST pull-down ». Celle-ci repose, d'une part, sur l'expression chez *E. coli* d'une

**Figure 52 : Les protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p et Sgd1p interagissent de manière aspécifique avec les billes spécifiques de l'étiquette 6-His.**

Des échantillons collectés à certaines étapes du protocole de production/purification des protéines non étiquetées Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p et Sgd1p ont été effectués. EB : Extrait brut, correspondant au contenu cellulaire après une nuit d'induction de la protéine d'intérêt, SSo : Surnageant de Sonication, correspondant au contenu de l'extrait dans le surnageant après sonication suivie d'une centrifugation, Billes : Billes couplées aux ions Cobalt spécifiques de l'étiquette 6-His, correspondant aux protéines fixées aspécifiquement sur les billes. BS et HS : Bas Sel et Haut Sel, correspondant aux tampons utilisés de faibles et fortes concentrations salines respectivement. Les bandes correspondant aux protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p et Sgd1p sont indiquées

protéine étiquetée GST, et d'autre part, l'expression *in vitro* de l'autre protéine partenaire, sans étiquette et radiomarquée pour permettre sa détection. La protéine étiquetée GST était ensuite fixée sur des billes de glutathion-sépharose spécifiques de l'étiquette GST et, après incubation avec la protéine radiomarquée, l'interaction potentielle était révélée par autoradiographie du gel sur lequel les protéines ont été fractionnées.

Dans un premier temps, nous avons entrepris de surexprimer les protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p avec une étiquette GST, ainsi que la protéine GST seule comme témoin, pour les purifier ensuite à l'aide de billes de glutathion-sépharose. Après électrophorèse sur gel dénaturant, les bandes correspondant aux protéines surexprimées Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p n'apparaissaient pas clairement par comparaison des pistes avant (NI) et après (I) induction, de même que dans le surnageant (SSo) et le culot (CSo) après sonication (**Fig. 53**).

Cependant, après incubation des surnageants après sonication (SSo) sur les billes (Billes) suivi d'un traitement dissociant et d'une électrophorèse sur gel dénaturant, nous observions des bandes correspondant aux protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p, Rrp5p et GST, suggérant que les protéines avaient bien été exprimées, enrichies et purifiées spécifiquement sur billes grâce à leurs étiquettes GST (**Fig. 53**). La protéine GST-Sgd1p, en revanche, ne semblait pas surproduite et un grand nombre de protéines contaminantes apparaissaient sur le gel, traduisant leur fixation aspécifique sur les billes (**Fig. 53**). La même situation était constatée pour Rrp5p (**Fig. 53**). Dans les deux cas, nous ne pouvions pas exclure le fait que ces bandes additionnelles correspondent à une dégradation des protéines produites. Nous n'avons jusqu'à présent toujours pas réussi à exprimer la protéine GST-Sgd1p, ni à éliminer les bandes contaminantes co-retenues avec Rrp5p. Finalement, nous avons choisi d'utiliser les protéines GST-Rrp9p WT, GST-Rrp9p R289A, GST-Rrp36p et GST-Rrp5p, qui sont fixées sur les billes, et ce malgré les protéines contaminantes dans le cas de GST-Rrp5p (**Fig. 53**).

En parallèle, nous avons exprimé *in vitro*, à l'aide d'extraits S30 d'*E. coli* et en présence de $^{35}$S-méthionine, les différentes protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p, Sgd1p, Rrp5p, ainsi que des protéines choisies comme témoins, un fragment d'une protéine utilisée au laboratoire, Rtt106p (65-321), ou les protéines

## pDEST-15::GST-RRP9 WT

## pDEST-15::GST-RRP9 R289A

## pDEST-15::GST-RRP36

## pDEST-15::GST-RRP5

## pDEST-15::GST-SGD1

## pDEST-15::GST

## Quantification par rapport à la BSA

**Figure 53 : Production chez *E. coli* et fixation sur billes de Glutathion-sépharose des protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p et Rrp5p étiquetées GST, et de la protéine GST seule.**

Des électrophorèses d'échantillons prélevés lors de certaines des étapes du processus de production/purification des protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p et Rrp5p étiquetées GST, ainsi que de la protéine GST seule. NI : Non-Induit, correspondant au contenu cellulaire juste avant induction de la protéine d'intérêt, I : Induit, correspondant au contenu cellulaire après induction pendant une nuit de la production de la protéine d'intérêt SSo : Surnageant de Sonication, correspondant au contenu de l'extrait dans le surnageant après sonication suivie d'une centrifugation, CSo : Culot de Sonication, correspondant au contenu de l'extrait dans le culot après sonication suivie d'une centrifugation, NR : Non Retenu, correspondant aux protéines qui ne se sont pas fixées sur les billes spécifiques de l'étiquette GST, billes : billes couplées au glutathion spécifiques de l'étiquette GST, correspondant aux protéines fixées spécifiquement ou aspécifiquement sur les billes. Les bandes correspondant aux protéines Rrp9p WT, Rrp9p R289A, Rrp36p et Sgd1p étiquetées GST, ainsi qu'à la protéine GST sont indiquées. Une quantification du taux de protéines fixées sur les billes a été réalisée par comparaison avec des quantités connues de la protéine BSA (2, 5 et 10 µg).

CAT et β-lactamase exprimées depuis un plasmide fourni par le kit de traduction *in vitro* (*E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNA* (Promega)). L'ensemble de ces protéines produites étaient ainsi radiomarquées. Des signaux aux tailles attendues ont bien été observés après électrophorèse du gel dénaturant, indiquant que la production *in vitro* de ces protéines avait bien fonctionné, même si quelques contaminations ou sous-produits étaient visibles (**Fig. 54**).

Les signaux correspondant aux protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A étaient faibles par rapport à ces signaux parasites ou aux signaux correspondant aux autres protéines, suggérant que l'efficacité de traduction *in vitro* était plus faible pour ces deux protéines, sûrement dû au fait de leur taille plus importante, ou leur faible solubilité dans ces conditions (**Fig. 54**). Pour les protéines Rrp5p et Sgd1p, même après plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à obtenir de signaux à la taille attendue après électrophorèse (**Fig. 54**). Dans le même ordre d'idée que pour Rrp9p, l'efficacité de traduction *in vitro* pour ces deux protéines était nulle, sûrement dû au fait de leurs tailles trop importantes, ou leurs faibles solubilités dans ces conditions. Nous avons alors opté pour la production *in vitro* des deux domaines N- et C-terminaux de Sgd1 décrits précédemment (cf paragraphe IV.1.), qui en raison de leurs tailles plus réduites nous semblaient de meilleurs candidats. Comme nous n'avons pas pu définir de domaines fonctionnels de la protéine Rrp5p (cf paragraphe IV.1.), nous avons renoncé à la production *in vitro* de cette protéine. Après électrophorèse sur gel dénaturant, nous observions des signaux aux tailles attendues correspondant aux protéines Sgd1p N-ter et Sgd1 C-ter, suggérant que la production *in vitro* de ces deux domaines a fonctionné (**Fig. 54**).

Nous avons ensuite réalisé les expériences de « GST pull-down », en incubant les différentes protéines radiomarquées avec les différentes protéines fusionnées à la GST, qui avaient été purifiées et fixées sur billes. Nous avons ainsi pu montrer que la protéine Rrp9p interagit de manière directe avec la protéine Rrp36p et que la mutation du résidu R289 de la protéine Rrp9p en alanine entraine une diminution de la force d'interaction (**Fig. 4 et 5 publication**).

Lors de l'incubation de la protéine GST-Rrp5p fixée sur billes avec la protéine Rrp36p radiomarquée, nous observions la co-sélection de la protéine Rrp36 (**Fig. 55**). On peut noter que nous observions également un signal en présence de la protéine témoin, mais qui était de très faible intensité par rapport aux signaux de l'input et de la protéine Rrp36p, ne discréditant ainsi pas nos résultats (**Fig. 55**).

**Figure 54 : Electrophorèse en gel SDS-PAGE des protéines produites *in vitro* radiomarquées pour les expériences de « GST pull-down ».**

Les protéines Rtt106p, CAT, β-lactamase, Rrp36p, Rrp9p WT et Rrp9p R289A, ainsi que les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p ont été produites *in vitro* sous forme radiomarquée en utilisant de la $^{35}$S-méthionine. Les bandes correspondant aux différentes protéines sont indiquées. La production *in vitro* des protéines Sgd1p et Rrp5p entières s'est révélée inefficace.

**Figure 55 : La protéine Rrp36p semble interagir de manière directe avec la protéine Rrp5p.**

La présence d'une interaction directe entre les protéines Rrp36p et Rrp5p a été testée par la technique de « GST pull-down » en utilisant la protéine GST-Rrp5p fixée sur des billes glutathion-sépharose et la protéine Rrp36p produite *in vitro* sous forme radiomarquée. Des témoins ont été réalisés pour s'assurer de la spécificité de l'interaction. billes seules : billes spécifiques de l'étiquette GST sans protéine fixée, GST : billes spécifiques de l'étiquette GST sur lesquelles la protéine GST est fixée, GST-TRBP : billes spécifiques de l'étiquette GST sur lesquelle la protéine GST-TRBP est fixée. Les signaux correspondant aux différentes protéines sont indiqués.

Ce résultat suggère que ces deux protéines interagissent bien ensemble et ce de manière directe. Cependant, suivant les expériences, les résultats n'étaient pas toujours aussi significatifs et reproductibles, l'intensité du signal étant parfois relativement faible par rapport à l'input. Cela pourrait suggérer que, par la technique de « GST pull-down », l'interaction entre Rrp5p et Rrp36p est faible voir labile. En revanche, par la technique de double hybride, nous avions observé une forte interaction, ce qui pourrait indiquer que l'interaction entre Rrp5p et Rrp36p était potentiellement stabilisée ou favorisée par un facteur endogène chez la levure. Nous ne pouvons pas exclure non plus le fait que nos conditions expérimentales pour la technique de « GST pull-down » n'aient pas été optimales.

Lors de l'incubation de la protéine GST-Rrp5p avec les deux domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p (SD1 et SD3) radiomarqués, nous observions également un signal de très faible intensité correspondant au domaine C-terminal de Sgd1p (**Fig. 56**). Ce résultat suggère que les protéines Rrp5p et Sgd1p interagissent directement, mais probablement avec une faible affinité. Nous retrouvions bien le fait que le domaine C-terminal de Sgd1p a plus d'importance pour cette interaction que le domaine N-terminal, en accord avec nos données de double hybride. D'autre part, comme pour les protéines Rrp5p et Rrp36p, l'interaction entre les protéines Rrp5p et Sgd1p pourrait être stabilisée ou favorisée par un facteur endogène chez la levure. La présence de la protéine Sgd1p entière pourrait aussi être nécessaire, bien que ceci n'ait pas été particulièrement observé en double hybride. De plus, là encore, les conditions expérimentales n'étaient peut-être pas optimales. Ces données préliminaires devront être reproduites et les conditions expérimentales améliorées.

Lors de l'incubation de la protéine GST-Rrp36p avec les domaines de la protéine Sgd1p (N-ter et C-ter) radiomarqués, nous n'observions aucun signal (**Fig. 57**). Ce résultat suggère que les protéines Rrp36p et Sgd1p n'interagissent pas de manière directe, bien que nous ne puissions pas exclure, là encore, que les conditions expérimentales n'avaient pas permis pas de détecter ces interactions ou que la protéine Sgd1p entière soit nécessaire, comme observé par la technique de double hybride.

Finalement, lors de l'incubation des protéines GST-Rrp9p WT et GST-Rrp9p R289A avec les deux domaines de la protéine Sgd1p (N-ter et C-ter) radiomarqués, nous n'observions une interaction qu'avec le domaine C-terminal de Sgd1p et elle était de faible intensité (**Fig. 58**).

**Figure 56 : Les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p ne semblent pas interagir de manière directe avec la protéine Rrp5p.**

La présence d'une interaction directe entre les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p et la protéine Rrp5p a été testée par la technique de « GST pull-down » en utilisant la protéine GST-Rrp5p fixée sur des billes glutathion-Sépharose et les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p produits *in vitro* sous forme radiomarqués. Des témoins ont également été réalisés pour s'assurer de la spécificité de l'interaction. billes seules : billes spécifiques de l'étiquette GST sans protéine fixée, GST : billes spécifiques de l'étiquette GST sur lesquelles la protéine GST est fixée, GST-TRBP : billes spécifiques de l'étiquette GST sur lesquelles la protéine GST-TRBP est fixée. Les signaux correspondant aux différentes protéines ou aux domaines sont indiqués

**Figure 57 : Les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p ne semblent pas interagir de manière directe avec la protéine Rrp36p.**

La présence d'une interaction directe entre les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p et la protéine Rrp36p a été testée par la technique de « GST pull-down » en utilisant la protéine GST-Rrp36p fixée sur des billes glutathion-Sépharose et les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p produits *in vitro* sous forme radiomarqués. Des témoins ont également été réalisés pour s'assurer de la spécificité de l'interaction. billes seules : billes spécifiques de l'étiquette GST sans protéine fixée, GST : billes spécifiques de l'étiquette GST sur lesquelles la protéine GST est fixée, GST-TRBP : billes spécifiques de l'étiquette GST sur lesquelles la protéine GST-TRBP est fixée. Les signaux correspondant aux différentes protéines ou aux domaines sont indiqués

**Figure 58 : Les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p semblent faiblement interagir de manière directe avec la protéine Rrp9p.**

La présence d'une interaction directe entre les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p et la protéine Rrp9p WT ou R289A a été testée par la technique de « GST pull-down » en utilisant la protéine GST-Rrp9p WT ou R289A fixée sur des billes glutathion-Sépharose et les domaines N- et C-terminaux de la protéine Sgd1p produits *in vitro* sous forme radiomarqués. Des témoins ont également été réalisés pour s'assurer de la spécificité de l'interaction. billes seules : billes spécifiques de l'étiquette GST sans protéine fixée, GST : billes spécifiques de l'étiquette GST sur lesquelles la protéine GST est fixée, GST-TRBP : billes spécifiques de l'étiquette GST sur lesquelles la protéine GST-TRBP est fixée. Les signaux correspondant aux différentes protéines ou aux domaines sont indiqués

L'intensité du signal obtenu pour le domaine C-terminal de Sgd1p étant très faible par rapport à l'input, nous en déduisons que les protéines Rrp9p et Sgd1p pourraient ne pas interagir de manière directe, bien que nous ne puissions pas exclure le fait que les conditions expérimentales n'aient pas été adaptées à la détection de l'interaction, pourtant observé par double hybride.
L'utilisation des deux domaines de la protéine Sgd1p, plutôt que la protéine entière, n'a pas permis de vérifier convenablement si une interaction existe avec les protéines Rrp9p et Rrp36p. Cependant ces données étaient en accord avec celles obtenues par double hybride, renforçant l'idée que la protéine Sgd1p entière est requise pour l'interaction. Nous avons alors tenté de la produire et la purifier à nouveau, mais avec une étiquette 6-his cette fois (**Fig. 59**). Après l'incubation des surnageants après sonication (SSo) sur les billes Cobalt-sépharose (Billes) spécifiques de l'étiquette 6-His et électrophorèse sur gel dénaturant, nous observions un signal à la taille attendue correspondant à la protéine HIS-Sgd1p, suggérant ainsi que cette protéine était bien exprimée, enrichie et purifiée via son étiquette 6-His (**Fig. 59**).

Les protéines Rrp9p WT et Rrp9p R289A radiomarquées étant produites *in vitro* en trop faible quantité (**Fig. 54**), nous avions essayé de les produire *in vitro* avec une étiquette GST, qui était susceptible de stabiliser ou d'aider à la solubilisation de la protéine Rrp9p. Nous observions bien lors de la production un signal pour les protéines GST-Rrp9p WT et GST-Rrp9p R289A nettement plus important qu'en absence du domaine de fusion GST, confirmant la meilleure efficacité de la production (**Fig. 54 et 59**).
Malheureusement, lors de l'expérience de « GST pull-down », nous n'observions aucun signal correspondant aux protéines GST-Rrp9p WT, GST-Rrp9 R289A ou GST-Rrp36p après incubation avec la protéine His-Sgd1p fixée sur billes, suggérant que la protéine Sgd1p n'interagit pas directement avec les protéines Rrp9p et Rrp36p et confirmant ainsi les résultats observés précédemment (**Fig. 59**).

En conclusion, nous avons montré que les protéines Rrp36p et Rrp9p interagissaient de manière directe, et que la force de l'interaction est diminuée en présence du mutant Rrp9p R289A, ce qui révèle le rôle important du résidu R289 dans cette interaction (**Fig. 60**). De plus, nous avons également observé que les protéines

**Figure 59 : La protéine Sgd1p ne semble pas interagir de manière directe avec les protéines Rrp36p, Rrp9p WT ou Rrp9p R289A**

**A.** Production et fixation de la protéine Sgd1p sur billes spécifiques de l'étiquette 6-His. Des dépôts d'échantillons ont été effectués à certaines étapes de la production/purification de la protéine Sgd1p étiquetée 6-His. NI : Non-Induit, correspondant au contenu cellulaire juste avant l'induction de la protéine d'intérêt, I : Induit, correspondant au contenu cellulaire après l'induction une nuit de la protéine d'intérêt SSo : Surnageant de Sonication, correspondant au contenu de l'extrait dans le surnageant après sonication suivi d'une centrifugation, CSo : Culot de Sonication, correspondant au contenu de l'extrait dans le culot après sonication suivi d'une centrifugation, billes : billes couplées à des ions Cobalt spécifiques de l'étiquette 6-His, correspondant aux protéines fixées spécifiquement ou aspécifiquement sur les billes. La bande correspondant à la protéine HIS-Sgd1p est indiquées. **B.** Les protéines CAT, β-lactamase, GST-Rrp9p WT et Rrp9p R289A ont été produites *in vitro* de manière radiomarquée en utilisant de la $^{35}$S-méthionine. Les signaux correspondant aux différentes protéines sont indiqués. **C.** La présence d'une interaction directe entre la protéine Sgd1p et les protéines Rrp36p, Rrp9p WT et R289A a été testée par la technique de « GST pull-down » en utilisant la protéine HIS-Sgd1p fixée sur des billes couplées à des ions Cobalt et les protéines GST-Rrp36p, GST-Rrp9p WT et GST-Rrp9p R289A produites *in vitro* sous forme radiomarquées. Des témoins ont également été réalisés pour s'assurer de la spécificité de l'interaction. billes seules : billes spécifiques de l'étiquette HIS sans protéine fixée et HIS-TRBP : billes spécifiques de l'étiquette HIS sur lesquelles la protéine HIS-TRBP est fixée. Les signaux correspondant aux différentes protéines ou aux domaines sont indiqués.

**Figure 60 : Affinement du réseau d'interactions identifié au sein du processome impliquant les protéines Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p.**

Le réseau d'interactions que nous avons identifié par double hybride est représenté, ainsi que les domaines responsables ou impliqués dans ces interactions. Les interactions directes, montrées par « GST pull-down », sont maintenant indiquées par des flèches rouges en pointillés.

Rrp5p et Rrp36p d'une part, et Rrp5p et Sgd1p d'autre part semblaient interagir directement (**Fig. 60**), bien qu'un facteur intermédiaire puisse probablement intervenir pour stabiliser ou favoriser cette interaction. Enfin, la protéine Sgd1p ne semble pas interagir de manière directe avec les protéines Rrp36p et Rrp9p (**Fig. 60**). L'ensemble doit être reproduit à nouveau et amélioré au niveau avec une amélioration des conditions expérimentales. Une approche de purification plus poussée pourrait être envisagée pour chaque protéine afin de tester directement leur interaction *in vitro,* par co-sélection des deux protéines totalement purifiées. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps nécessaire pour débuter cette étude.

# Discussion générale et Perspectives

La biogenèse des ribosomes cytoplasmiques est un processus complexe et dynamique, impliquant d'une multitude d'étapes faisant intervenir de nombreux facteurs d'assemblage et de maturation nécessaires à la maturation du pré-ARNr et au recrutement des protéines ribosomiques. Les ARNr matures sont produits par une série de clivages exo- et endonucléolytiques à partir d'un long précurseur, le pré-ARNr 35S chez la levure. Ces facteurs incluent de nombreuses snoRNP à boîtes H/ACA et C/D qui sont impliquées dans la modification et la maturation des ARNr. L'une de ces snoRNPs, la snoRNP U3, est une snoRNP à boîtes C/D particulière, puisqu'elle est impliquée dans les étapes de clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 permettant la libération du futur ARNr 18S et nécessaire à la formation de la petite sous-unité ribosomiques 40S. Ces évènements de clivages se déroulent au sein d'un macro-complexe appelé le SSU-processome 90S, qui s'assemble de manière séquentielle. Le processome est constitué de plus de 70 facteurs ayant différentes activités, dont des activités nucléases, hélicases et GTPases. Ces facteurs peuvent être impliqués dans les étapes de clivages précoces aux sites A0, A1 et A2, la dégradation des segments excédentaires clivés, ou l'association des protéines. La snoRNP U3 a un rôle essentiel dans le processome, puisqu'elle y joue un rôle de chaperonne du pré-ARNr 35S par appariement du snoARN U3 avec le pré-ARNr. Les 5 hélices intermoléculaires I, II, III, V et VI formées permettent d'établir un repliement du pré-ARNr compatible avec la réalisation des événements de clivages précoces aux sites A0, A1 et A2. Etant donné que des endonucléases permettant d'assurer chacun des 3 clivages n'ont pas encore été toutes clairement identifiées, il n'est pas exclu que la structure formée par le pré-ARNr et le snoARN U3 participe directement à la génération de certains des clivages (activité de type ribozyme). La snoRNP U3 a la particularité par rapport aux autres snoRNP à boîtes C/D de comporter une protéine spécifique et essentielle à la croissance cellulaire et aux clivages aux sites A0, A1 et A2. La structure tridimensionnelle des protéines Rrp9p chez la levure et U3-55K chez l'homme a été résolue (Zhang *et al*, 2013). Elle montre que le domaine C-terminal s'organise en une structure de type « hélix propeller », formée par un ensemble de 7 domaines WD40. Ce type de domaine a été décrit comme constituant des plateformes d'interaction protéine/protéine (Smith et al, 1999).

La fonction de Rrp9p/U3-55K dans le mécanisme d'assemblage ou d'action du processome n'avait pas été établie. Mon travail de thèse, comme nous l'avons décrit, a porté sur la caractérisation de cette fonction.

## I. Mis en évidence d'un réseau d'interaction impliquant la protéine Rrp9p et ses nouveaux partenaires au sein du processome

Les différents partenaires de la protéine Rrp9p au sein du processome n'avaient jamais été clairement identifiés, mis à part la protéine Sgd1p, identifiée au cours d'analyses à grande échelle par Protein-fragment Complementation Assay (PCA) (Tarassov *et al*, 2008) ou par recoupement de bases de données d'interactions protéine/protéine (PPI) (Lim *et al*, 2011). Aucun test double hybride systématique des interactions possibles de Rrp9p avec les autres protéines du processome n'avait été réalisé. Aussi nous avons choisi cette approche beaucoup plus directe que celles mentionnées ci-dessus pour identifier des partenaires de Rrp9p au sein du processome. Pour cela, nous avons eu l'opportunité d'utiliser un certain nombre de constructions permettant d'exprimer des protéines du processome, que D. Lafontaine nous a fournies (**Fig. 42**). Nous avons du par ailleurs cloné les ORF de 18 autres protéines du processome (**Fig. 42**). Ceci nous a permis de tester l'ensemble des protéines des sous-complexes UTP-B et Utp14p/Sof1p/Rrp36p/Utp7p du processome qui sont supposées s'associer avec la snoRNP U3 (Lim *et al*, 2011). Nous avons également testé la protéine Utp24p, qui était supposée être impliquée dans les clivages aux sites A1 et A2 (Bleichert *et al*, 2006) au moment où nous avons fait la sélection des protéines à tester. Elle constituait donc un candidat intéressant puisque ces deux clivages sont ralentis en présence du mutant Rrp9p R289A que nous avons étudié. Depuis, l'implication de la protéine humaine hUTP24, homologue de Utp24p chez *S. cerevisiae*, dans le clivage en A1 (Tomecki *et al*, 2015), a d'ailleurs été démontrée (Tomecki *et al*, 2015). Ce qui justifie encore plus le choix que nous avons fait. Néanmoins, d'après les données de double hybride que nous avons obtenu, les protéines Utp24 et Rrp9p ne semblent pas interagir ensemble (**Fig. 20**). Nous avons également testé l'interaction possible de la protéine Rrp5p qui est impliquée dans les clivages aux sites A0, A1 et surtout A2, via ses 3 motifs S1 (10, 11, 12) en C-terminal (Torchet *et al*, 1998 ; Eppens *et al*, 1999, 2002 ;

Torchet & le Denmat, 2000 ; Vos *et al*, 2004 ; de Boer *et al*, 2006). Nos données ont montré que Rrp5p n'interagit pas directement par double hybride avec Rrp9p, mais que Rrp5p interagit avec des partenaires de Rrp9p (**Fig. 4 et 5 publication et Fig. 51 et 60**). Les protéines du complexe Mpp10p ont également été testées du fait de leur rôle dans la formation des appariements entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3. Aucune interaction n'a été détectée entre les protéines Imp3, Imp4p ou Mpp10 et Rrp9p. Il faut néanmoins noter dans le cas d'un tel complexe de 3 protéines, il est possible qu'un test de cgaque protéine prise individuellement ne soit pas suffisant, même si les 2 autres protéines endogènes sont présentes dans un test réalisé chez *S. cerevisiae*. Elles le sont à un taux plus faible que celui des protéines exprimées à partir des vecteurs utilisés pour les tests de double hybride. Le problème de l'expression d'une seule des 3 protéines est d'autant plus important que l'on sait que l'interaction de la protéine Imp4p avec le snoARN U3 dépend de son interaction avec Mpp10p qui modifie sa conformation. Par ailleurs, Imp3p est associé au complexe par interaction avec Imp4p. Il semble donc important pour conclure sur la non-interaction de Rrp9p avec ces 3 protéines de réaliser les tests avec en même temps co-expression des 2 autres protéines. Enfin, les protéines cœur des snoRNP à boîtes C/D avaient également été testées. L'absence d'interaction observée entre Rrp9p et Snu13p s'explique par le fait que cette interaction ne se met en place qu'après recrutement de Snu13p par le snoARN U3 (Clery *et al*, 2007) et que ce n'est donc qu'en présence d'un snoARN U3 disponible pour l'interaction avec ces 2 protéines qu'une interaction peut être détectée (thèse de N. Rolland). On aurait aussi pu imaginer une interaction possible entre Rrp9p et les protéines Nop56p et Nop58p, mais là aussi les interactions ne se mettent en place qu'au sein de la snoRNP U3 en présence de l'ARN. Au total, sur les 28 protéines testées, très peu ont donné des résultats clairement positifs, mises à part les protéines Sgd1p et Rrp36p (**Fig. 4 et 5 publication et Fig. 51 et 60**). Ceci confirme l'interaction décrite pour la protéine Sgd1p (Tarassov *et al*, 2008 ; Lim *et al*, 2011). Néanmoins, d'après les tests double hybride, l'association entre Sgd1p et Rrp9p semble moins forte que celle mise en évidence entre Rrp36p et Rrp9p. En plus, nos données de « GST pull-down » suggèrent qu'elle n'est pas directe (**Fig. 4 publication et Fig. 60**). D'autre part, nous avons pu montrer que le domaine « hélix propeller » de Rrp9p est responsable de l'interaction avec Rrp36 (**Fig. 48 et 51**), ce qui est en accord avec le fait que la mutation en alanine du résidu R289, localisé au sein du domaine « hélix propeller »,

limite les capacités d'association de Rrp9p avec Rrp36p. Par contre, nous n'avons pas réussi à identifier au sein de la protéine Rrp36p, un domaine responsable de l'interaction avec la protéine Rrp9p (**Fig. 48 et 51**). Néanmoins, nous avons constaté que Rrp36p peut être produite sous forme soluble chez E. Coli, ce qui pourrait permettre d'envisager d'établir sa structure 3D par RMN ou radiocristallographie et ainsi de pouvoir définir, comme nous l'avons fait pour Rrp9p, des résidus de surface susceptibles d'interagir avec Rrp9p. En ce qui concerne l'interaction détectée par double hybride entre Sgd1p et Rrp9p, aucun sous-domaine impliqué n'a pu être identifié. Nous avons également mis en évidence que les protéines Rrp36p et Sgd1p peuvent interagir entre elles, toujours d'après des tests double hybride. Cette interaction semble néanmoins plus faible que celle détectée entre Rrp9p et Rrp36p. Par contre, ces deux protéines peuvent établir des interactions fortes avec la protéine Rrp5p, médiée par leurs domaines C-terminaux (**Fig. 50 et 51**). Nous avons également montré que le domaine C-terminal de la protéine Sgd1p pouvait être séparé en deux sous-domaines chacun capable d'interagir avec la protéine Rrp5p, bien que ces associations soient beaucoup plus faibles que celles observée pour le domaine C-terminal entier (**Fig. 50**). Par contre, aucun sous-domaine plus restreint, nécessaire à l'interaction avec les protéines Rrp36p ou Sgd1 n'a été identifié dans la protéine Rrp5p. Notre étude par l'approche de « GST pull-down » a permis de vérifier que l'association entre Rrp36p et Rrp9p est directe (**Fig. 4 publication et Fig. 60**). Les données suggèrent aussi que l'interaction entre Rrp36p et Rrp5p est directe (**Fig. 55 et 60**). Néanmoins, le fort signal positif observé en double hybride pourrait s'expliquer par l'implication de facteur endogène, car l'interaction mise en évidence par « GST pull-down » semble plus faible que celle observée entre Rrp9p et Rrp36p (**Fig. 4 publication et Fig. 55**). Non seulement l'interaction entre Sgd1p et Rrp9p ne semble pas directe, mais aussi celle entre Sgd1p et Rrp36p, ainsi que celle entre Sgd1p et Rrp5p (**Fig. 56 à 60**), suggérant l'intervention d'un ou plusieurs autres facteurs intermédiaires permettant les associations observées par double hybride. Ces différents facteurs devront être identifiés.

D'autre part, la protéine Rrp5p est composée de 12 domaines S1 et 7 domaines TPR, qui sont reliés entre eux par une petite région et des domaines fonctionnels ont déjà été identifiés par différentes équipes : un domaine N-terminal contenant les 9 premiers domaines S1. Ce domaine est impliqué dans la synthèse de l'ARNr 5,8S,

puisqu'il est nécessaire pour qu'il y ait clivage au site A3. Le second domaine C-terminal qui contient les 3 derniers domaines S1 et les 7 domaines TPR est impliqué dans la synthèse de l'ARNr 18S car il intervient dans les clivages aux sites A0, A1 et A2, les 3 derniers domaines S1 étant plus particulièrement requis pour le clivage au site A2 (Torchet *et al*, 1998 ; Eppens *et al*, 1999, 2002 ; Torchet & le Denmat, 2000 ; Vos *et al*, 2004 ; de Boer *et al*, 2006). Le découpage que nous avons réalisé de la protéine Rrp5p était essentiellement basé sur des considérations structurales. Il sera nécessaire de produire les deux domaines fonctionnels et de les tester par nos approches de double hybride et « GST pull-down ». En effet, le domaine C-terminal de Rrp5p, impliqué dans la synthèse de l'ARNr 18S, exerce peut-être un rôle dans les clivages précoces par interaction avec les protéines Rrp36p, Sgd1p et indirectement Rrp9p. Une collaboration vient d'être établie dans ce cadre avec l'équipe de S Friebourg à Bordeaux, qui étudie la structure 3D du domaine C-terminal fonctionnel de Rrp5p.

## II. Peu des résidus mutés de Rrp9p se sont avérés avoir un effet négatif sur sa fonction

Afin de caractériser la fonction de la protéine Rrp9p, nous avions tout d'abord du identifier des résidus qui pouvaient avoir un rôle fonctionnel. Notre choix de résidus à muter ont été basés sur un modèle de la structure 3D du domaine « hélix propeller » établi au laboratoire, dont la validité a été confirmée lors de la détermination de la structure tridimensionnelle par radiocristallographie par l 'équipe de Ye (**Fig. 24**) (Zhang *et al*, 2013). Dans cette sélection, nous avions écarté les résidus responsables de la structuration en « hélix propeller », ainsi que les quelques résidus de surface conservés entre les protéines GBB1 et Rrp9p de fonction différente, et choisi les résidus de surface conservés entre les protéines U3-55K et Rrp9p de fonction identique (**Fig. 24**). Il est intéressant de noter que peu de résidus mutés individuellement ou par groupe de 2 ou 3 ont donné lieu à un effet négatif fort sur la croissance. Ceci bien que Rrp9p soit essentielle au processus de maturation du pré-ARNr et donc à la croissance cellulaire. Une explication possible peut être l'implication de plusieurs résidus avec des effets redondants dans les interactions mises en place entre Rrp9p et ses partenaires. Seule la détermination de la structure 3D de Rrp9p liée à ses partenaires, tels que Rrp36p qui interagit directement d'après

nos données, pourra fournir une réponse à cette question. Muter des résidus impliqués dans la formation de la structure en « hélix propeller » ne nous semble pas une approche à favoriser pour la suite de l'étude, du fait de la difficulté qu'il y aurait à interpréter les résultats. Il paraît beaucoup plus raisonnable pour la poursuite du projet de renforcer les études structurales avec les partenaires identifiés et nos travaux d'identification des domaines d'interaction sont un premier jalon dans cette voie, même s'ils ne sont pas complets. Néanmoins, étant donné que nous disposons déjà d'un grand nombre de mutations des résidus de surface de Rrp9p et, tenant compte du fait que l'effet de ces mutations pourrait être renforcé en présence de mutations du snoARN U3 affectant la formation des hélices intermoléculaires avec le pré-ARNr, il pourrait être intéressant d'étendre notre étude par l'approche de synthétiques létaux avec des mutants du snoARN U3 à un certain nombre des mutants de Rrp9p.

Afin d'analyser la fonctionnalité des mutants de Rrp9p générés, nous avons dû mettre en place un système génétique adéquat, qui impliquait la génération d'une souche W303::pGAL-RRP9 permettant de réprimer l'expression de la protéine Rrp9p endogène pour exprimer uniquement les mutants de Rrp9p. L'utilisation de ce système génétique a permis de montrer que, contrairement à ce qui était proposé dans la littérature, la protéine Rrp9p est requise pour la stabilité du snoARN U3 et donc la production de snoRNP U3 (**Fig. 2 publication**) (Venema et al, 2000 ; Samarsky & Fournier, 1998). A noter que Samarsky et Fournier avaient formulé cette hypothèse à partir de données obtenues en mutant les boîtes B/C requises pour la fixation de Rrp9p (Samarsky & Fournier, 1998). Notre observation est par contre en accord avec les données sur l'homologue humain, U3-55K, de Rrp9p, qui a été montrée participer dans la formation de la snoRNP U3 en favorisant l'association des protéines cœur sur le motif C'/D sous-optimal, ce qui diminue l'association de la protéine 15.5K et ainsi des autres protéines cœur (Knox *et al*, 2011). Chez la levure, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le motif C'/D est également sous-optimal (Marmier-Gourrier *et al*, 2003 ; Charron *et al*, 2004), il n'est donc pas surprenant que ce processus soit retrouvé également chez la levure.

## III. Le résidu R289 de Rrp9p est important pour les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 du pré-ARNr 35S

La mutation du résidu R289 entraine un défaut de croissance, qui est plus marqué à 20°C qu'à 30°C et 37°C (**Fig. 26 et Fig. 1 publication**). Par chance, pour le succès de cette étude, la seule mutation qui avait un effet sur la croissance, parmi les 9 mutations testées, n'affectait ni la stabilité du snoARN U3, ni la formation et la stabilité de la snoRNP U3 (**Fig. 2 publication**). Elle avait les propriétés requises pour essayer de progresser dans l'étude du mécanisme d'action de Rrp9p dans le processome, ce qui était notre objectif. Cette mutation affecte la production de l'ARNr 18S, du fait de l'accumulation d'un intermédiaire aberrant de maturation, le pré-ARNr 22S, clivé aux sites A0 et A3 mais pas aux sites A1 et A2 (**Fig. 3 publication**). Ceci montrait que, directement ou indirectement, Rrp9p a une implication dans le bon déroulement des clivages à ces sites Le fait d'observer un effet plus fort de la mutation aux basses températures suggère que la mutation rend plus difficile la disruption d'une interaction ou la mise en place d'une interaction nécessitant, soit une transition structurale requérant de l'énergie, soit la disruption d'une autre interaction nécessitant de l'énergie.

De façon intéressante, des défauts couplés ou découplés des évènements de clivages aux sites A1 et A2 avaient déjà été observés au laboratoire en présence de mutants du snoARN U3 (Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; thèse de N. Marmier-Gourrier). Ces mutants réduisaient la stabilité de l'hélice III ou de l'hélice VI, établie entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3, ou contenaient une délétion dans le segment inter-hélice 3 et 4 reliant respectivement les hélices V et I et les hélices VI et V. De plus, à l'image du mutant Rrp9p R289A, la croissance de certains de ces mutants était ralentie uniquement à certaines températures (Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; thèse de N. Marmier-Gourrier). D'autres mutants protéiques induisant un phénotype similaire à celui observé en présence du mutant Rrp9p R289A ont également été caractérisés par d'autres auteurs. En effet, l'expression d'une forme tronquée dans la région C-terminale de la protéine Mpp10p entraine aussi l'accumulation d'un intermédiaire pré-ARNr 22S, non clivé aux sites A1 et A2, reflétant un fort ralentissement de la cinétique de ces clivages (Lee & Baserga, 1997). Par ailleurs, l'expression d'une forme tronquée de la protéine Rrp5p délétée des 3 derniers domaines S1 (10 à 12) provoque l'accumulation du pré-ARNr 21S,

résultant d'un défaut de clivage au site A2. Cependant, de façon surprenante, ce mutant de Rrp5p n'entraine pas de retard de croissance, ni de diminution du taux d'ARNr 18S (Torchet & Hermann-Le Denmat, 2000 ; Torchet *et al*, 1998 ; Vos *et al*, 2004). Ainsi, des liens fonctionnels semblent exister entre ces différents composants du processome et Rrp9p pourrait jouer un rôle important dans l'organisation de ces composants. La mutation du résidu R289 affectant les étapes de clivages précoces aux sites A1 et A2, sur la base des données actuelles, on peut essayer de proposer comment ce résidu peut être directement ou indirectement en lien avec ces clivages aux sites A1 et A2.

En accord avec le fait que les souches portant la mutation n'ont qu'un défaut assez léger de croissance, le taux du pré-ARNr 20S, qui est l'intermédiaire de maturation du pré-ARNr 35S clivé en A0, A1 et A2, ne semble pas diminuer fortement en présence du mutant Rrp9p R289A (**Fig. 3 publication**). Ce qui suggère que, soit les évènements de clivages aux sites A1 et A2 ne sont pas complètement bloqués, mais seulement fortement ralentis, conduisant tout de même à la synthèse du pré-ARNr 20S. La cinétique des étapes de maturation de celui-ci, notamment le clivage cytoplasmique au site D permettant la libération de l'ARNr 18S dans le cytoplasme après l'export des particules pré-ribosomiques 40S pourrait avoir une cinétique plus lente lorsque les clivages aux sites A1 et A2 sont ralentis. Une autre hypothèse, beaucoup moins vraisemblable puisque les d'autres intermédiaires de maturation ne sont pas détectés, serait l'existence d'une voie alternative permettant la synthèse du pré-ARNr 20S même en absence des clivages aux sites A1 et A2.

Nous avons cependant noté qu'en présence de la mutation R289A, le taux de pré-ARNr 23S, issu du clivage direct du pré-ARNr 35S au site A3 sans clivage aux sites A0, A1 et A2 augmentait à 20°C, mais diminuait à 30°C et 37°C (**Fig. 3 publication**). L'accumulation du pré-ARNr 23S n'est pas surprenante, puisque lorsque les clivages aux sites A0, A1 et A2 sont fortement ralentis, une voie alternative où le pré-ARNr 35S est directement clivé au site A3 se met en place (Lygerou *et al*, 1996 ; Billy *et al*, 2000 ; Wehner & Baserga, 2002 ; Granneman & Baserga, 2005).

## IV. Le résidu R289 de la protéine Rrp9p est nécessaire à l'association de Rrp9p avec Rrp36p et indirectement dans la stabilisation du réseau d'interaction que nous avons identifié

Nous avons formulé l'hypothèse que le défaut de maturation aux sites A1 et A2 induit par le mutant Rrp9p R289A puisse être lié à un défaut d'association de un ou plusieurs facteurs au sein du processome, facteurs qui sont nécessaires aux clivages aux sites A1 et A2. En accord avec cette hypothèse : la protéine Rrp9p possède un domaine « hélix propeller », que l'on sait pouvoir être impliqué dans des interactions protéine/protéine. Il a été montré que la snoRNP U3 est recrutée précocement lors de l'assemblage du processome et il a été proposé qu'elle permette le recrutement d'autres facteurs du processome (Perez-Fernandez *et al*, 2007, 2011).

Cette hypothèse est renforcée par notre observation d'une association de Rrp9p avec Rrp36p et Sgd1p, le résidu R289 étant impliqué dans l'interaction directe que Rrp9p établit avec Rrp36p (**Fig. 4 publication**). Ainsi, le facteur Rrp36p, dont on connaît encore peu la fonction, pourrait être impliqué dans les clivages aux sites A1 et A2, par son interaction avec la protéine Rrp9p. En recrutant Rrp36p, la protéine Rrp9p pourrait favoriser l'association d'autres facteurs impliqués plus directement dans les clivages aux sites A1 et A2. Les protéines Sgd1p et Rrp5p qui, comme nous l'avons montré, forment un réseau d'interaction avec Rrp9p et Rrp36p pourraient elles aussi participer à l'efficacité de clivage aux sites A1 et A2 (**Fig. 4 et 5 publication**). Ainsi, lorsque l'association de la protéine Rrp36p serait compromise à cause de la mutation du résidu R289, l'ensemble du réseau d'interactions pourrait être fragilisé et ainsi conduire à un défaut de recrutement ou à un mauvais positionnement d'un ou de plusieurs facteurs impliqués dans les clivages aux sites A1 et A2. Il est intéressant de noter qu'il a déjà aussi été montré qu'une forme tronquée de la protéine Rrp5p entraine un défaut de clivage au site A2 ce qui est en accord avec notre hypothèse (Vos *et al*, 2004). Les facteurs recrutés par le réseau de protéines que nous avons identifié pourraient être les nucléases Utp24p ou Rcl1p, dont l'implication dans les clivages aux sites A1 ou A2 a été suggérée (Bleichert et al, 2006 ; Horn et al, 2011 ; Billy *et al*, 2000 ; Tomecki et al, 2015). Nous avons montré par double hybride que les protéines Rrp9p et Utp24p n'interagissaient pas ensemble (**Fig. 43**). Cependant, sur la base du réseau identifié, il nous faudra maintenant analyser l'interaction possible de la protéine Rcl1p avec les autres

protéines du réseau. Par ailleurs, la protéine Rcl1p est connue pour former un complexe avec la GTPase Bms1p (Billy *et al*, 2000 ; Wegiersky *et al*, 2001 ; Karbstein & Doudna *et al*, 2006) et il a été proposé que ce complexe soit impliqué dans le recrutement de facteurs du processome permettant d'initier les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 grâce à un changement conformationnel induit par l'hydrolyse du GTP par Bms1p (Wegierski *et al*, 2001, Perez-Fernandez *et al*, 2011). Avec l'idée que les clivages A1 et A2 nécessitent un réarrangement structural au sein du processome, des hélicases pourraient également faire partie des facteurs à recruter pour réaliser les clivages à ces deux sites. Ainsi, à cause de l'interaction affaiblie entre les protéines Rrp9p R289A et Rrp36p, et par extension à la fragilisation du réseau d'interaction identifié, ces hélicases pourraient ne plus être recrutées au sein du processome et le changement conformationnel requis pourrait ne pas s'opérer efficacement. Ainsi, on sait que l'hélicase Dhr1p est impliquée dans les clivages aux sites A1 et A2 en facilitant un réarrangement conformationnel qui permet de dissocier spécifiquement le snoARN U3 du pré-ARNr (Sardana *et al*, 2015). En présence d'un mutant de Dhr1p, le snoARN U3 reste bloqué au sein de particules de haut poids moléculaire, conduisant à un ralentissement des clivages A1 et A2 (Sardana *et al*, 2015). Or, ce phénotype est similaire à celui que nous avons observé en présence du mutant Rrp9p R289A puisque, d'une part, les clivages aux sites A1 et A2 étaient ralentis, et d'autre part, d'après nos analyses par centrifugation en gradient de saccharose, le snoARN U3, ainsi que la protéine Rrp9p, semblaient bloqués au sein particules de haut poids moléculaire (**Fig. 30**). Ainsi, on peut penser que la présence de la mutation Rrp9p R289A pourrait entraîner un défaut de recrutement de la protéine Dhr1p. Cependant, afin de confirmer cette hypothèse, les expériences de centrifugation en gradient de saccharose montrant une rétention du snoARN U3 au sein de complexes de haut poids moléculaires devront être répétées. Enfin, un autre ensemble de facteurs du processome, dont l'association au sein de celui-ci pourrait être altérée en présence de la mutation Rrp9p R289A, est le complexe Mpp10p, qui participe à la stabilisation des appariements établis entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 essentiels pour le déroulement des clivages précoces (Méreau *et al*, 1997 ; Gerczei *et al*, 2009 ; Wehner *et al*, 2002, Marmier-Gourrier *et al*, 2008 ; Perez-Fernandez *et al*, 2011). L'hypothèse est renforcée par le fait qu'une forme tronquée de la protéine Mpp10p entraine aussi un défaut de clivage aux sites A1 et A2 (Lee & Baserga, 1997). De plus, nous avons montré que le résidu

R289 a sans aucun doute aussi un rôle dans la stabilisation de certains des appariements intermoléculaires formés entre le snoARN U3 et le pré-ARNr, notamment les hélices II, III et VI (**Fig. 32 à 41**).

La protéine Rrp9p n'est peut-être pas directement impliquée dans l'association de l'ensemble des facteurs que nous venons de citer mais son interaction avec Rrp36p et les autres protéines du réseau que nous avons identifié pourraient être nécessaire à cette association. Ainsi, afin de tester cette hypothèse, il serait important d'analyser les interactions potentielles entre les protéines Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p et les protéines citées ci-dessus. Une définition de la connectivité existant entre les différents facteurs du processome devrait permettre de caractériser plus finement le mécanisme des étapes de clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 et également de mieux comprendre la cinétique d'assemblage du processome.

Il est en effet intéressant de noter que lors de l'assemblage du processome, les sous-complexes UTP-B/snoRNP U3 et UTP-C peuvent s'associer selon deux voies indépendantes (Perez-Fernandez et al, 2007, 2011). Or, Rrp36p a été retrouvée au sein du sous-complexe UTP-C (Gérus *et al*, 2010) et son recrutement lors de l'assemblage du processome a été montré dépendant du sous-complexe UTP-B/snoRNP U3 (Perez-Fernandez et al, 2007, 2011), suggérant que Rrp36p pourrait jouer un rôle de lien entre ces deux voies. Nous avons montré que la protéine Rrp36p interagit avec la protéine Rrp5p qui est un composant nécessaire au recrutement du sous-complexe UTP-C (Perez-Fernandez et al, 2007, 2011). Ainsi, si la protéine Rrp36p n'est plus associée correctement au sein du processome, du fait de la mutation Rrp9p R289A, il se pourrait que l'association du sous-complexe UTP-C soit ralentie ou altérée, entrainant la formation d'un processome incomplet, ou du moins mal assemblé, ne permettant plus la formation des clivages A1 et A2. Il faut aussi noté que l'association du sous-complexe UTP-C n'est pas dépendante du sous-complexe UTP-B/snoRNP U3 lors de l'assemblage du processome (Perez-Fernandez et al, 2007, 2011). Il est ainsi possible que la protéine Rrp36p interagisse avec les composants du sous-complexe UTP-C et Rrp5p seulement lorsque le processome est complètement formé et donc fonctionnel.

## V. L'accumulation de la mutation Rrp9p R289A et de la mutation affectant la région 5'-terminale du snoARN U3 conduit à un fort renforcement des défauts de croissance

Pour tester s'il peut exister un lien fonctionnel entre la formation des appariements entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 (hélices I, II, III, V et VI) et la mutation de Rrp9p R289A, nous avons employé la technique de synthétique létalité et analysé la croissance de levure présentant la mutation Rrp9 R289A et un ensemble de mutations dans le domaine 5' fonctionnel du snoARN U3 (**Fig. 32**). Pour certains des mutants du snoARN U3 testés, nous avons observé un très fort ralentissement de croissance en présence de Rrp9p R289A (**Fig. 32 à 41**). Ce ralentissement était particulièrement marqué pour certains des mutants affectant les hélices II, III et VI ou les segments inter-hélices 3 et 4, ce qui représente un grand nombre de segments. Néanmoins, il faut noter que la structure tridimensionnelle de l'ensemble, formé par les appariements entre le pré-ARNr 35S et le snoARN U3 n'est pas connue et que ces régions mutées conduisant au fort renforcement du phénotype de croissance pourraient être physiquement très proches dans l'espace. Ces résultats suggèrent aussi fortement que le ralentissement des clivages aux sites A1 et A2, induit par le mutant Rrp9p R289A, pourrait être lié à des défauts de formation et/ou stabilisation des différents appariements entre le snoARN U3 et le pré-ARNr. Ces observations peuvent également être mise en relation avec l'interaction affaiblie entre Rrp9p R289A et Rrp36p. En effet, le résidu R289 de la protéine Rrp9p pourrait être directement impliqué dans le recrutement de la protéine Rrp36p et de ses partenaires potentiels, comme les protéines Sgd1p ou Rrp5p, qui participeraient ainsi à la formation et la stabilisation des appariements. Le complexe Mpp10p, qui est impliqué dans la formation et la stabilisation des appariements, pourrait lui aussi être recruté par Rrp36p ou une autre protéine du réseau d'interaction que nous avons identifié (Sgd1p ou Rrp5p). Ces données suggèrent que la protéine Rrp9p, essentielle à la croissance cellulaire, puisse être une plateforme pour le recrutement des différents facteurs impliqués dans la formation et/ou la stabilisation des différents appariements intermoléculaires.

De manière intéressante, N. Marmier-Gourrier avait montré dans l'équipe que certains mutants de l'hélice III (**Fig. 32** : 1031 et 1192) ou des segments inter-hélices 3 (**Fig. 32 :** 1033 et 1193) et 4 (**Fig. 32 :** U3:4-2 (2788)) du snoARN U3 entrainaient

un défaut de clivage aux sites A1 et A2, qui est corrélé à l'accumulation d'un produit de maturation en A0, phénotype similaire à celui observé en présence du mutant Rrp9p R289A (**Fig. 3 publication**) (Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; thèse de N. Marmier-Gourrier). De plus, comme pour le mutant Rrp9p R289A, la croissance était seulement retardée à certaines températures en présence de ces mutants du snoARN U3 (Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; thèse de N. Marmier-Gourrier). Ces données sont donc en accord avec les résultats que nous avons obtenu par l'approche de synthétique létalité. De plus, il avait été montré au laboratoire que la longueur, plutôt que la séquence, des segments 3 et 4 semblait importante pour la fonction de la snoRNP U3 (Marmier-Gourrier *et al*, 2011 ; Thèse de N. Marmier-Gourrier). En accord avec ces données, nous avons observé que l'expression simultanée du mutant Rrp9p R289A et de mutants du snoARN U3 présentant une délétion dans une région des segments inter-hélices 3 ou 4 (**Fig. 34 et 36** : 1033, 1193 et U3:4-2 (2788)) conduit à une abolition de la croissance.

Pour compléter cette partie du travail, il sera important d'analyser les défauts de maturation du pré-ARNr en présence des mutations simultanées dans Rrp9p et dans le snoARN U3. Il sera aussi intéressant d'analyser la structure des appariements U3/pré-ARNr *in cellulo* par emploi du DMS, comme l'avait fait N. Marmier-Gourrier (Méreau et al, 1996 ; thèse de N. Marmier-Gourrier). Enfin, il sera intéressant de répéter les mêmes tests de synthétique létalité avec des mutants des partenaires de Rrp9p identifiés (Rrp36p, Rrp5p et Sgd1p), voir des autres partenaires potentiels des protéines de ce réseau, et les mutants du snoARN U3. Ce qui représente un vaste programme pour la suite de ce projet.

# Annexes

# Chapter 1

# Small Non-Coding RNAs: A Quick Look in the Rearview Mirror

**Guillaume Clerget, Yoann Abel, and Mathieu Rederstorff**

## Abstract

The revolution of miRNA discovery, in the early 2000s, shed a new light in the exciting field of small non-coding RNAs. Since then, and owing to outstanding breakthroughs in RNomic techniques, novel small non-coding RNA families have been regularly discovered, e.g., piRNAs, tiRNAs, and many others.

In this review, we provide a very succinct historical and functional overview on most prominent small non-coding RNA families.

**Key words** miRNA, snoRNA, piRNA, tRNA, rRNA, tiRNA, snRNA

## 1 Introduction

### *1.1 Dawn of Small Non-Coding RNAs*

It has been more than 60 years that the first soluble cytoplasmic small non-coding RNA (sncRNA), a yeast alanine transfer RNA (tRNA), was identified and its primary structure determined [1, 2]. Together with ribosomal RNAs (rRNA), the nucleic acid moieties of the ribosomes, tRNAs play a central role in protein synthesis, as the adaptor molecules providing the correct amino acid in response to a specific codon on the mRNA [3]. Only 20 years later were the first nuclear RNAs uncovered: uridine-rich RNAs, or U-RNAs, were observed to be very abundant, nucleus or sometimes even nucleolus specific, and highly conserved [4, 5]; small nuclear RNAs (snRNA) U1, U2, U4, U5, and U6 were later shown to be involved in splicing, in association with several proteins within a ribonucleoprotein particle (RNP) called spliceosome [6]. Base pairing among snRNAs and between snRNAs and pre-messenger RNA (pre-mRNA) regions account for the proper conformation of both spliceosome and pre-mRNA, eventually leading to release of the introns and mature mRNAs [7]. Interestingly, most small nucleolar RNAs (snoRNAs) are processed from the released introns [8]. Within snoRNPs,

Author contributed equally with all other contributors.

Mathieu Rederstorff (ed.), *Small Non-Coding RNAs: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1296, DOI 10.1007/978-1-4939-2547-6_1, © Springer Science+Business Media New York 2015

snoRNAs guide posttranscriptional RNA modifications of other ncRNAs, e.g., rRNAs and snRNAs: 2′-O-methylations for C/D box snoRNAs and pseudouridylation for H/ACA box snoRNAs. Some snoRNAs, such as U3 or U8, are instead involved in early cleavages of pre-rRNA during ribosome biogenesis in the nucleolus [9].

In the late 1990s, pioneering studies aimed at identifying novel non-coding RNAs using experimental approaches combining library generation and sequencing identified numerous novel snoRNAs in various models including human, using material that was usually discarded: small total RNA in the size range of 50–500 nucleotides [10]. At that time, why would one have looked for smaller functional RNAs? It would both have been nonsense and a waste of time. Nonsense? Actually no… antisense!

### 1.2 miRNAs: The Revolution!

In the early 1990s, the *lin-14* gene was shown to be involved in temporal development in the worm *C. elegans*. The *lin-4* gene product, most probably a polypeptide, was shown to negatively regulate *lin-14* expression by directly acting on the 3′ untranslated region of its pre-mRNA [11]. In 1993, both Ambros and Ruvkun labs discovered that the *lin-4* gene product actually was a small non-coding RNA, of 22 nucleotides in length in its mature form, targeting the 3′ UTR of the *lin-14* pre-mRNA several times, owing to imperfect antisense base pairing [12, 13]. Unfortunately enough, apparently, the *lin-4* small RNA neither had additional counterparts in worm nor was it found to be conserved in other species. However, in 2000, Pasquinelli and coworkers identified that *let-7*, another 22-nucleotide-long small temporal RNA (stRNA) involved in *C. elegans* developmental timing, was conserved in human and drosophila, anticipating the likely discovery of many other small regulatory RNAs [14]. Revolution came less than 1 year later, when Tuschl, Bartel, and Ambros labs reported, in the same issue of Science, the observation of an abundant class of novel small regulatory RNAs in worm, human, and drosophila, termed since microRNAs (miRNAs) [15–17]. Even certain viruses were next shown to encode their own miRNAs [18, 19].

It was rapidly observed that the miRNA maturation and assembly machinery were the same as the one implicated in the formation of short interfering RNAs (siRNAs), involved in the RNA interference (RNAi) pathway described in worm a couple of years earlier by the 2006 Nobel Prize awardees Andrew Fire and Craig Mello [20, 21] and even earlier in plants [22]. miRNA/siRNA maturation, from a double-stranded precursor, is now well understood [23] but still open to surprises; recently it was discovered that miRNAs could be processed from other types of ncRNAs, such as snoRNAs [24, 25].

In human, siRNAs, within the RNA-induced silencing complex (RISC), mediate perfectly complementary mRNA target cleavages

[26, 27]. On the other hand, miRNAs regulate gene expression by imperfectly base pairing to the 3′ UTR of the targeted mRNA, repressing its translation, which eventually leads to the mRNA decay by different possible mechanisms [28, 29]. miRNAs can act as regulators of epigenetic modifications as well, via DNA or histone modifications, therefore controlling gene expression at the transcriptional level [30].

### 1.3 Small Non-Coding RNAs Return!

Another sncRNA family, the Piwi-interacting RNAs (piRNA), discovered about half a decade after miRNAs, also regulates transcription [31]. piRNAs are 27–29-nucleotide-long RNAs. They prevent transposon dissemination in germinal cell lines, owing to an original "ping-pong" mechanism [32, 33]. The smallest eukaryotic ncRNAs known to date, the transcription initiation RNAs (tiRNAs), sized 17–18 nucleotides, are generated upon stalling or backtracking of RNA polymerase II (RNAPII) near the transcription start sites (TSSs) and might be involved in transcription initiation regulation as well [34, 35]. TSSs appear to be the source of bunches of small and long non-coding RNAs (lncRNAs) [36], such as transcription start site-associated RNAs (TSSa-RNAs) and promoter-associated RNAs (PASRs) in animals [37] or promoter upstream transcripts (PROMPTs) [38] and cryptic/Xrn1-sensitive unstable transcripts (CUTs/XUTs) in yeast [39–41]. While lncRNAs are generally involved in epigenetic and chromatin modifications [42–44], the functionality of short transcripts is debated. They might be involved in maintaining chromatin into a transcriptionally active state or in maintaining RNAPII available near TSSs [45].

### 1.4 Small Non-Coding RNA: Not the End

Most if not all the human genome appears to be actively transcribed [46–48]. Nevertheless, most transcripts rather belong to the TUF (transcripts of unknown function) rather than to the ncRNA family. Progresses in transcriptomics/RNomics enabled the identification of thousands of short and long transcripts [49–55]. Many of them were attributed a function but it is only the top of the iceberg. Whether every TUF is indeed functional is debated, and experimental efforts will be mandatory to answer this question.

There are no doubts that novel ncRNAs and novel ncRNA families will still be discovered in the (next) future.

## Acknowledgment

This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique, the Université de Lorraine, the Région Lorraine and La Ligue contre le Cancer.

## References


1. Holley RW, Apgar J, Doctor BP (1960) Separation of amino acid-specific "soluble"-fraction ribonucleic acids. Ann N Y Acad Sci 88:745–751
2. Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, Penswick JR, Zamir A (1965) Structure of a ribonucleic acid. Science 147(3664):1462–1465
3. Eddy SR (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. Nat Rev Genet 2(12):919–929. doi:10.1038/35103511, 35103511 [pii]
4. Busch H, Reddy R, Rothblum L, Choi YC (1982) SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing. Annu Rev Biochem 51:617–654. doi:10.1146/annurev.bi.51.070182.003153
5. Weinberg RA, Penman S (1968) Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. J Mol Biol 38(3):289–304, doi:0022-2836(68)90387-2 [pii]
6. Lerner MR, Steitz JA (1979) Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci U S A 76(11):5495–5499
7. Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, Wolin SL, Steitz JA (1980) Are snRNPs involved in splicing? Nature 283(5743):220–224
8. Matera AG, Terns RM, Terns MP (2007) Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. Nat Rev Mol Cell Biol 8(3):209–220. doi:10.1038/nrm2124, nrm2124 [pii]
9. Marmier-Gourrier N, Clery A, Schlotter F, Senty-Segault V, Branlant C (2011) A second base pair interaction between U3 small nucleolar RNA and the 5′-ETS region is required for early cleavage of the yeast pre-ribosomal RNA. Nucleic Acids Res 39(22):9731–9745. doi:10.1093/nar/gkr675, gkr675 [pii]
10. Huttenhofer A, Kiefmann M, Meier-Ewert S, O′Brien J, Lehrach H, Bachellerie JP, Brosius J (2001) RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse. EMBO J 20(11):2943–2953. doi:10.1093/emboj/20.11.2943
11. Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G (1991) Negative regulatory sequences in the lin-14 3′-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during Caenorhabditis elegans development. Genes Dev 5(10):1813–1824
12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75(5):843–854, doi: 0092-8674(93)90529-Y [pii]
13. Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 75(5):855–862, doi: 0092-8674(93)90530-4 [pii]
14. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature 408(6808):86–89. doi:10.1038/35040556
15. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 294(5543):853–858. doi:10.1126/science.1064921, 294/5543/853 [pii]
16. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science 294(5543):858–862. doi:10.1126/science.1065062, 294/5543/858 [pii]
17. Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science 294(5543):862–864. doi:10.1126/science.1065329, 294/5543/862 [pii]
18. Nathans R, Chu CY, Serquina AK, Lu CC, Cao H, Rana TM (2009) Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions. Mol Cell 34(6):696–709. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.003, S1097-2765(09)00394-3 [pii]
19. Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. Science 304(5671):734–736. doi:10.1126/science.1096781, 304/5671/734 [pii]
20. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391(6669):806–811. doi:10.1038/35888
21. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science 293(5531):834–838. doi:10.1126/science.1062961, 1062961 [pii]
22. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase

gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2(4):279–289. doi:10.1105/tpc.2.4.279, 2/4/279 [pii]

23. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116(2):281–297, doi: S0092867404000455 [pii]
24. Ender C, Krek A, Friedlander MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, Pfeffer S, Rajewsky N, Meister G (2008) A human snoRNA with microRNA-like functions. Mol Cell 32(4):519–528. doi:10.1016/j.molcel.2008.10.017, S1097-2765(08)00733-8 [pii]
25. Rother S, Meister G (2011) Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. Biochimie 93(11):1905–1915. doi:10.1016/j.biochi.2011.07.032,S0300-9084(11)00290-2 [pii]
26. Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes Dev 13(24):3191–3197
27. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101(1):25–33. doi:10.1016/S0092-8674(00)80620-0, S0092-8674(00)80620-0 [pii]
28. Braun JE, Huntzinger E, Izaurralde E (2013) The role of GW182 proteins in miRNA-mediated gene silencing. Adv Exp Med Biol 768:147–163. doi:10.1007/978-1-4614-5107-5_9
29. Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E (2009) The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. RNA 15(8):1433–1442. doi:10.1261/rna.1703809, rna.1703809 [pii]
30. Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. Science 303(5658):672–676. doi:10.1126/science.1093686, 1093686 [pii]
31. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. Nature 442(7099):203–207. doi:10.1038/nature04916, nature04916 [pii]
32. Chuma S, Pillai RS (2009) Retrotransposon silencing by piRNAs: ping-pong players mark their sub-cellular boundaries. PLoS Genet 5(12):e1000770. doi:10.1371/journal.pgen.1000770
33. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA (2011) PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. Nat Rev Mol Cell Biol 12(4):246–258. doi:10.1038/nrm3089, nrm3089 [pii]
34. Taft RJ, Glazov EA, Cloonan N, Simons C, Stephen S, Faulkner GJ, Lassmann T, Forrest AR, Grimmond SM, Schroder K, Irvine K, Arakawa T, Nakamura M, Kubosaki A, Hayashida K, Kawazu C, Murata M, Nishiyori H, Fukuda S, Kawai J, Daub CO, Hume DA, Suzuki H, Orlando V, Carninci P, Hayashizaki Y, Mattick JS (2009) Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. Nat Genet 41(5):572–578. doi:10.1038/ng.312, ng.312 [pii]
35. Valen E, Preker P, Andersen PR, Zhao X, Chen Y, Ender C, Dueck A, Meister G, Sandelin A, Jensen TH (2011) Biogenic mechanisms and utilization of small RNAs derived from human protein-coding genes. Nat Struct Mol Biol 18(9):1075–1082. doi:10.1038/nsmb.2091, nsmb.2091 [pii]
36. Jacquier A (2009) The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. Nat Rev Genet 10(12):833–844. doi:10.1038/nrg2683, nrg2683 [pii]
37. Seila AC, Calabrese JM, Levine SS, Yeo GW, Rahl PB, Flynn RA, Young RA, Sharp PA (2008) Divergent transcription from active promoters. Science 322(5909):1849–1851. doi:10.1126/science.1162253, 1162253 [pii]
38. Flynn RA, Almada AE, Zamudio JR, Sharp PA (2011) Antisense RNA polymerase II divergent transcripts are P-TEFb dependent and substrates for the RNA exosome. Proc Natl Acad Sci U S A 108(26):10460–10465. doi:10.1073/pnas.1106630108, 1106630108 [pii]
39. Neil H, Malabat C, d' Aubenton-Carafa Y, Xu Z, Steinmetz LM, Jacquier A (2009) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. Nature 457(7232):1038–1042. doi:10.1038/nature07747, nature07747 [pii]
40. van Dijk EL, Chen CL, d'Aubenton-Carafa Y, Gourvennec S, Kwapisz M, Roche V, Bertrand C, Silvain M, Legoix-Ne P, Loeillet S, Nicolas A, Thermes C, Morillon A (2011) XUTs are a class of Xrn1-sensitive antisense regulatory non-coding RNA in yeast. Nature 475(7354):114–117. doi:10.1038/nature10118, nature10118 [pii]
41. Xu Z, Wei W, Gagneur J, Perocchi F, Clauder-Munster S, Camblong J, Guffanti E, Stutz F, Huber W, Steinmetz LM (2009) Bidirectional promoters generate pervasive transcription in

yeast. Nature 457(7232):1033–1037. doi:10.1038/nature07728, nature07728 [pii]

42. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat Rev Genet 10(3):155–159. doi:10.1038/nrg2521, nrg2521 [pii]
43. Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009) Evolution and functions of long noncoding RNAs. Cell 136(4):629–641. doi:10.1016/j.cell.2009.02.006, S0092-8674(09)00142-1 [pii]
44. Yazgan O, Krebs JE (2007) Noncoding but nonexpendable: transcriptional regulation by large noncoding RNA in eukaryotes. Biochem Cell Biol 85(4):484–496. doi:10.1139/O07-061, o07-061 [pii]
45. Aalto AP, Pasquinelli AE (2012) Small non-coding RNAs mount a silent revolution in gene expression. Curr Opin Cell Biol 24(3):333–340. doi:10.1016/j.ceb.2012.03.006, S0955-0674(12)00037-3 [pii]
46. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetrie D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Reymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA, Lagarde J, Abril JF, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermuller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korbel J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB, Ganesh M, Patel S, Tammana H, Chrast J, Henrichsen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Carninci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaoz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Loytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Seringhaus M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameur A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley MJ, Inman D, Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Iyer VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyras E, Hallgrimsdottir IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B, De Jong PJ (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. Nature 447(7146):799–816. doi:10.1038/nature05874
47. Clark MB, Amaral PP, Schlesinger FJ, Dinger ME, Taft RJ, Rinn JL, Ponting CP, Stadler PF, Morris KV, Morillon A, Rozowsky JS, Gerstein MB, Wahlestedt C, Hayashizaki Y, Carninci P, Gingeras TR, Mattick JS (2011) The reality of pervasive transcription. PLoS Biol 9(7):e1000625. doi:10.1371/journal.pbio.1000625, discussion e1001102, 10-PLBI-PS-8040R3 [pii]
48. Clark MB, Choudhary A, Smith MA, Taft RJ, Mattick JS (2013) The dark matter rises: the expanding world of regulatory RNAs. Essays

Biochem 54:1–16. doi:10.1042/bse0540001, bse0540001 [pii]

49. Jochl C, Rederstorff M, Hertel J, Stadler PF, Hofacker IL, Schrettl M, Haas H, Huttenhofer A (2008) Small ncRNA transcriptome analysis from Aspergillus fumigatus suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. Nucleic Acids Res 36(8):2677–2689. doi:10.1093/nar/gkn123, gkn123 [pii]
50. Metzker ML (2010) Sequencing technologies – the next generation. Nat Rev Genet 11(1):31–46. doi:10.1038/nrg2626, nrg2626 [pii]
51. Rederstorff M (2012) Generation of cDNA libraries from RNP-derived regulatory non-coding RNAs. Methods Mol Biol 925:211–218. doi:10.1007/978-1-62703-011-3_14
52. Rederstorff M, Bernhart SH, Tanzer A, Zywicki M, Perfler K, Lukasser M, Hofacker IL, Huttenhofer A (2010) RNPomics: defining the ncRNA transcriptome by cDNA library generation from ribonucleo-protein particles. Nucleic Acids Res 38(10):e113. doi:10.1093/nar/gkq057, gkq057 [pii]
53. Rederstorff M, Huttenhofer A (2011) cDNA library generation from ribonucleoprotein particles. Nat Protoc 6(2):166–174. doi:10.1038/nprot.2010.186, nprot.2010.186 [pii]
54. Shen M, Eyras E, Wu J, Khanna A, Josiah S, Rederstorff M, Zhang MQ, Stamm S (2011) Direct cloning of double-stranded RNAs from RNase protection analysis reveals processing patterns of C/D box snoRNAs and provides evidence for widespread antisense transcript expression. Nucleic Acids Res 39(22):9720–9730. doi:10.1093/nar/gkr684, gkr684 [pii]
55. Skreka K, Schafferer S, Nat IR, Zywicki M, Salti A, Apostolova G, Griehl M, Rederstorff M, Dechant G, Huttenhofer A (2012) Identification of differentially expressed non-coding RNAs in embryonic stem cell neural differentiation. Nucleic Acids Res 40(13):6001–6015. doi:10.1093/nar/gks311, gks311 [pii]

# Chapter 2

# Alcoholic Precipitation of Small Non-Coding RNAs

**Guillaume Clerget, Valérie Bourguignon-Igel, and Mathieu Rederstorff**

## Abstract

Alcoholic precipitation is a critical step to recover RNA of high purity. This chapter describes the principles of alcoholic precipitation as well as a standard, basic protocol with key advices to observe, but numerous variations on the theme are discussed. Indeed, several important parameters, such as the choice of salt, alcohol, or carrier, have to be considered to improve the efficiency of precipitation and the yield of RNA recovery.

**Key words** RNA, Precipitation, Alcohol, Salt, Carrier

## 1 Introduction

Alcoholic precipitation is used to recover, purify, or concentrate nucleic acids from a total extract. It relies on nucleic acids' differential solubility in solution upon addition of alcohol and salts. Nucleic acids are soluble in water because both nucleic acids and water are polar molecules that can therefore interact together [1]. The negatively charged phosphate groups ($PO_3^-$) of nucleic acids electrostatically interact with water. Hence, water molecules form a solvation or hydration shell around each nucleic acid molecule, isolating them from each other and subsequently dissolving them in solution. Alcohol and salt enable to disrupt this hydration shell. In water, salts used for nucleic acid precipitation completely dissociate into their constituting anions and cations. Cations neutralize the negative charges of nucleic acids ($PO_3^-$ groups) while alcohol, which has a much lower dielectric constant than water, increases the electrostatic interaction force between the phosphate groups and the cations. Once neutralized, nucleic acids become less hydrophilic and thus precipitate out of solution. Additionally, alcohol decreases the repulsive forces between the inter-helical phosphates so that nucleic acid molecules aggregate.

Depending on the sample type or the subsequent experiments to be performed, several parameters such as the type of salt

Mathieu Rederstorff (ed.), *Small Non-Coding RNAs: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1296, DOI 10.1007/978-1-4939-2547-6_2, © Springer Science+Business Media New York 2015

or alcohol to be used, the addition of a carrier, the precipitation temperature, or the centrifugation speed have to be considered to improve RNA quality and recovery yield and are discussed (*see* **Notes 1–5**).

## 2 Materials

1. 100 % ethanol.
2. 70 % ethanol.
3. 100 % isopropanol.
4. 3 M sodium acetate, pH 5.2.
5. 5 M ammonium acetate.
6. 8 M lithium chloride.
7. 2 M sodium chloride.
8. Yeast tRNA (10–20 μg/ml).
9. Salmon sperm DNA (10–20 μg/ml).
10. Glycogen (50–150 μg/ml).
11. GlycoBlue (50–150 μg/ml) (Ambion).
12. Linear polyacrylamide (10–20 μg/ml).
13. 1 M $MgCl_2$.
14. RNase-free, DEPC-treated water.
15. 1× TE buffer, pH 8.0: 10 mM Tris–HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0.

## 3 Methods

To avoid RNase contaminations when preparing and handling RNAs, always use appropriate precautions such as RNase-free water (*see* **Note 6**), gloves, and RNase-free tubes and tips.

### 3.1 Ethanol Precipitation

1. Adjust sample volume to a minimum of 100 μl (*see* **Note 7**).
2. Add sodium acetate to the sample to a final concentration of 0.3 M (about 1/10 of volume) (*see* **Notes 1**, **3** and **8**).
3. Add 2.5–3 volumes of ice-cold 100 % ethanol (*see* **Note 2**).
4. Mix thoroughly by inverting the tube or pipetting up and down (*see* **Note 9**).
5. Incubate on ice for 15 min to 1 h (*see* **Note 4**).
6. Centrifuge at 12,000 × *g* for 30 min at 4 °C (*see* **Note 5**).
7. Carefully discard the supernatant without disturbing the pellet.

8. Wash the RNA pellet with 0.5 ml of 70 % ethanol and mix gently.
9. Centrifuge at 12,000 × *g* for 15 min at 4 °C.
10. Carefully discard the supernatant without disturbing the pellet (*see* **Note 10**).
11. Air-dry the RNA pellet for 5–10 min at room temperature (*see* **Note 11**).
12. Dissolve the pellet in RNase-free water (*see* **Note 12**).

## 4 Notes

1. Different salts can be used during alcoholic precipitation, the choice of which depending on the subsequent applications. Indeed, each salt features specific properties providing different advantages and/or drawbacks [1, 2]. Sodium acetate (0.3 M final concentration, pH 5.2) is the most widely used salt for alcoholic precipitation [1, 2]. However, if the sample contains SDS, sodium chloride (0.2 M final concentration) could be alternatively chosen. In this case, SDS would remain soluble in ethanol [1, 2], which would allow its separation and removal from the RNA. Ammonium acetate (2.5 M final concentration) is another possible choice. It allows to greatly reduce coprecipitation of both dNTPs and oligosaccharides. However, ammonium acetate should not be used if a phosphorylation reaction is planned after precipitation since ammonium ions inhibit T4 polynucleotide kinase [1, 2]. Finally, a last broadly used salt for RNA precipitation is lithium chloride (0.8 M final concentration). It is very soluble in alcohol and therefore coprecipitates with RNA to a smaller extent than others salts [1, 2]. Moreover, DNA, proteins, and carbohydrates do not efficiently precipitate with lithium chloride, which therefore leads to a greater purity of RNAs precipitated with this salt [3]. Unfortunately, possible loss of small RNAs has been reported (≈100 nt or less, e.g., miRNAs, tRNAs, sn- and snoRNAs, or 5S/5.8S rRNAs). Anyway, as small and large RNAs feature different solubility in high ionic strength solutions, small RNAs remaining soluble while larger ones do not, this property enables to selectively purify small RNAs with high concentrations of LiCl (up to 2.5 M) even without alcohol [1], as small RNAs will remain in solution. Finally, lithium chloride should not be employed if subsequent reverse transcription or in vitro translation reactions are planned, as the chloride ions at this concentration inhibit RNA-dependent DNA polymerase as well as initiation of protein synthesis in most cell-free systems [1].

2. Alternatively, isopropanol can replace ethanol as a precipitation alcohol. However, since isopropanol is less polar than ethanol, RNAs are even less soluble in isopropanol than they are in ethanol. Therefore, for a similar precipitation efficiency, a lower volume of isopropanol is necessary [1, 2]. Isopropanol can therefore replace ethanol in the case of large sample volume, using about one volume of isopropanol per volume of sample. However, as salts are also less soluble in isopropanol, they coprecipitate and contaminate RNA preparation to a higher extent [2]. Therefore, washing steps after precipitation with isopropanol are very important. Finally, isopropanol is less volatile than ethanol and will require more time for the RNA pellet to dry [2].
3. If you expect RNA quantity to be very low or if RNAs are very small in size (<100 nucleotides), you can add a carrier or coprecipitant to increase recovery yield before incubation on ice. Also, if you do not see any pellet after the centrifugation step, it is possible to proceed again to precipitation (starting from **step 5**, Subheading 3.1) after addition of a carrier. Carriers are molecules that trigger precipitation of RNA as they are insoluble in alcohol and thus precipitate. After centrifugation, the pellet will consequently be bigger and thus more visible, which will greatly facilitate removal of the supernatant without affecting the pellet. Moreover, colored dyes can be covalently linked to carriers, which additionally facilitates the observation of the pellet.

   The choice of the carrier in alcoholic precipitation is important. As for the choice of the salt to be used, carrier choice will depend on the subsequent reactions to be performed [2]. The most frequently used carrier molecules are yeast tRNAs (final concentration of 10–20 μg/ml), glycogen (final concentration of 50–150 μg/ml), or linear polyacrylamide (final concentration of 10–20 μg/ml). Yeast tRNAs are biologically active RNAs that might interfere with some subsequent current molecular biology reactions. For example, tailing reactions or reactions catalyzed by polynucleotide kinases or terminal transferases are inhibited by large amounts of yeast tRNAs [4]. In some cases, template-dependent cDNA synthesis is inhibited as well [5]. On the other hand, glycogen is an inert, DNA/RNA-free molecule. It neither interferes with subsequent enzymatic reactions (PCR, digestion, ligation, reverse transcription, labeling, transcription, hybridization, etc.) nor with electrophoresis or spectrophotometrical measurements [6]. Glycogen even allows improved precipitation of very small RNA (>8 nt). However, glycogen may prevent reverse transcription in the case of very large templates, as well as nucleic acid interactions with proteins [7] in a concentration-dependent manner [8]. Finally, linear polyacrylamide is another DNA/RNA-free inert molecule. As glycogen, it neither

interferes with enzymatic reactions such as phosphorylation by polynucleotide kinase, ligation, cDNA synthesis, in vitro transcription, and digestion by endonucleases nor with electrophoresis [9]. Linear polyacrylamide does not inhibit nucleic acid interactions with proteins [10]; however, it does not trigger coprecipitation of very small RNA (≤20 bases) [7].

4. The incubation step for the alcoholic precipitation of RNAs is generally performed at very low temperature (−20 °C or −80 °C) in most protocols. However, although possible RNases might be less active at lower temperatures, this appears to be rather counterproductive [1, 2]. Indeed, the lower the temperature, the higher the viscosity, which decreases RNA movements and thus aggregation and precipitation. Additionally, the dielectric constant increases when the temperature diminishes; therefore precipitation efficiency decreases with the temperature. Finally, salts' solubility decreases with the temperature as well, which leads to stronger coprecipitation of salts at lower temperatures [11]. Therefore, incubation at room temperature or on ice is sufficient and recommended, provided you work in RNase-free conditions. If you retrieve a low amount of RNA or if you do not see the pellet, you can increase the incubation time or add a carrier if not done already. An average time of about 15 min is generally sufficient.
5. If the amount of RNA is low, if you do not see the pellet, or if you work with very small RNAs (<100 nucleotides), you can both increase the speed and time of centrifugation in order to allow the pellet to more firmly stick to the tube wall [1, 2].
6. Water can be treated with DEPC (diethylpyrocarbonate) to avoid RNase contaminations.
7. Too small volumes of samples reduce the yield of RNA recovery.
8. $MgCl_2$ should be added to a final concentration of 10 mM for small RNAs (<100 nucleotides) [1].
9. Do not vortex. Too vigorous mixing could damage and slice the RNA.
10. Great care must be taken when discarding the supernatant in order not to lose the RNA pellet.
11. Do not dry the pellet too much, especially employing a speed vacuum, as too dry RNA pellets are more difficult to resolubilize.
12. You can dissolve the pellet in 1× TE buffer, pH 8, instead of water. Although EDTA chelates divalent cations, thus inhibiting metalloenzymes such as nucleases or proteases, it might also inhibit polymerases or other enzymes necessary for your subsequent experiences.

## References


1. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, pp E10–E15
2. Zumbo P (2012) Ethanol precipitation. Department of physiology and biophysics, Weill Cornell Medical College
3. Barlow J et al (2001) A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. Biochem Biophys Res Commun 13:61–66
4. Michelson AM, Orkin SH (1982) Characterization of the homopolymer tailing reaction catalyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase. J Biol Chem 257: 14773–14782
5. Wang QT et al (2002) Yeast tRNA as carrier in the isolation of microscale RNA for global amplification and expression profiling. Biotechniques 33:788–796
6. Tracy S (1981) Improved rapid methodology for the isolation oh nucleic acids from agarose gels. Prep Biochem 11:251–268
7. Gaillard C, Strauss F (1990) Ethanol precipitation of dna with linear polyacrylamide as carrier. Nucleic Acids Res 18:378
8. Baugh LR et al (2001) Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. Nucleic Acids Res 29:E29
9. Aruffo A, Seed B (1987) Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. Proc Natl Acad Sci U S A 84:8573–8577
10. Strauss F, Varshavsky A (1984) A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. Cell 37: 889–901
11. Zeugin J, Hartley JL (1985) Ethanol precipitation of DNA. Focus 7:1–2

médecine/sciences 2014 ; 30 : 297-302

# Les petits ARN nucléolaires nous surprennent encore !

**Yoann Abel, Guillaume Clerget, Valérie Bourguignon-Igel, Véronique Salone, Mathieu Rederstorff**

> Les petits ARN nucléolaires (snoARN), impliqués dans la modification post-transcriptionnelle d'ARN non codants, figurent, avec les ARN de transfert et les ARN ribosomiques, parmi les premiers ARN non codants identifiés. Pourtant, plusieurs nouvelles facettes de leur éventail d'activités biologiques possibles ont été mises en évidence ces dernières années, engendrant un regain d'intérêt important pour l'étude de cette famille d'ARN. Leur maturation en ARN fonctionnels plus petits, leur implication, ainsi que celle de leurs petits ARN dérivés, dans la régulation de l'épissage alternatif, ou encore leurs liens possibles avec plusieurs pathologies, y compris le cancer, sont évoqués dans cette revue. <

Université de Lorraine,
CNRS, UMR 7365 IMoPA, Biopôle,
9, avenue de la forêt de Haye,
54506 Vandœuvre-lès-Nancy,
France.
mathieu.rederstorff@univ-lorraine.fr

Les cellules de tous les organismes vivants contiennent deux catégories distinctes d'acides ribonucléiques (ARN) : les ARN messagers (ARNm), qui sont traduits en protéines après leur maturation, et les ARN non codants (ARNnc). Longtemps sous-estimés, les ARNnc ont connu un regain d'intérêt considérable au cours des dernières années, en raison de leur très grand nombre et des fonctions importantes qui leur sont associées. En effet, les ARNnc participent à la plupart des processus biologiques, depuis la réplication du matériel génétique et son expression dans la cellule, jusqu'au développement de l'organisme [1]. La taille des ARNnc est très variable. Certains peuvent être constitués de milliers de bases, comme l'ARN Xist (17 kb) qui participe à l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez les femelles des mammifères. D'autres ARNnc, dits microARN, sont d'extrême petite taille (21-23 bases) et interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes chez les vertébrés [2].

## Les snoARN : des molécules guides pour des enzymes de modification « aveugles »

Les petits ARN nucléolaires (snoARN) constituent une famille de plus de 300 ARN non codants, dont on pensait tout connaître ou presque. En effet, la première fonction décrite pour les snoARN consiste en la modification post-transcriptionnelle d'autres ARNnc, comme les ARN ribosomiques (ARNr) ou les petits ARN nucléaires (snARN). Ces modifications correspondent principalement à des clivages du pré-ARNr, des méthylations de nucléotides au niveau des riboses ou encore à l'isomérisation des uridines (pseudo-uridylations). La présence de motifs conservés ou boîtes, leur structure tridimensionnelle et la nature des modifications qu'ils guident, permettent de distinguer deux familles majeures de snoARN : les snoARN à boîtes C/D et les snoARN à boîtes H/ACA, guidant respectivement les réactions de méthylation ou de pseudo-uridylation *(Figure 1)*. Une autre famille, les petits ARN spécifiques des corps de Cajal (scaARN, pour *small* Cajal ARN), qui ne sont pas à proprement parler des snoARN puisqu'ils ne sont pas localisés dans le nucléole, présentent néanmoins des boîtes C/D et/ou H/ACA et peuvent donc guider l'une ou l'autre, ou les deux types de modifications correspondantes. Localisés dans les corps de Cajal, des compartiments nucléaires non délimités par une membrane, à l'instar des nucléoles, les scaARN interviennent dans la maturation de certains petits ARN nucléaires (snARN), tels que U1 ou U2, impliqués dans la machinerie d'épissage.

Les snoARN, comme la grande majorité des ARN non codants, ne portent pas d'activité catalytique intrinsèque et s'associent à des protéines catalytiques « aveugles », incapables de reconnaître leur cible, formant ainsi des particules ribonucléoprotéiques (RNP). Au sein de ces particules, les snoARN assurent une fonction de guide. En effet, la position à modifier dans l'ARN cible est spécifiée par la complémentarité des bases entre de courtes séquences antisens localisées dans les snoARN et les séquences de leurs ARN cibles *(Figure 1)*.




DOI : 10.1051/medsci/20143003018

***Figure 1. Représentation schématique des structures secondaires des snoARN.*** Les snoARN à boîtes C/D (à gauche) présentent, en amont de leurs boîtes D et D', une région antisens s'appariant à l'ARN cible (en rouge) et permettant de guider la 2'-O-méthylation du ribose du nucléotide situé cinq nucléotides en amont de la boîte (cette position est indiquée en orange) par la fibrillarine. Les snoARN à boîtes H/ACA (à droite) présentent deux régions antisens appelées poches de pseudo-uridylation, complémentaires de l'ARN cible (en rouge). Le premier résidu non apparié dans chaque boucle (représenté en orange), une uridine, est isomérisé en pseudo-uridine par la dyskérine [42].

Parmi les snoARN, plusieurs font toutefois exception à ces règles. En effet, l'ARN U3, le snoARN à boîtes C/D le plus abondant dans la cellule, présente une particularité fonctionnelle remarquable, puisqu'il ne guide pas la méthylation d'un ARN cible, mais les clivages nucléolytiques précoces au cours de la maturation du précurseur 35S de l'ARN ribosomique, toujours par le biais d'appariements spécifiques. D'autres snoARN ne présentent, quant à eux, aucune complémentarité de séquence avec des ARN cibles potentiels classiques (ARNr, snARN) et ont ainsi été désignés snoARN orphelins. L'identification de leur fonction reste un enjeu scientifique majeur.

## Les snoARN peuvent être les précurseurs d'autres ARN non codants plus petits

Les progrès en matière de séquençage à haut débit au cours de ces dernières années ont permis de lancer des analyses à grande échelle sur les petits ARNnc humains. En 2008, une étude a montré l'existence de petits ARNnc stables, produits de maturation de snoARN précurseurs [3]. La même année, deux autres groupes ont identifié des petits ARNnc dérivés de snoARN en association avec des protéines Argonautes (Ago1 et Ago2), protéines qui s'associent aux microARN au sein des particules RISC (*RNA induced silencing complex*) impliquées dans le *silencing* des gènes [4, 5, 45]. Ainsi, une nouvelle classe de petits ARN dérivés de snoARN a été mise en évidence : les sdARN (*snoRNA-derived small RNA*, petits ARN dérivés de snoARN). Ces nouveaux petits ARN (environ 20 nucléotides pour les plus petits) peuvent être générés à partir de snoARN précurseurs à boîtes C/D ou à boîtes H/ACA [6] *(Figure 2)*. La production et la fonction du sdARN ACA45, produit à partir du scaARN ACA45, un sous-type de snoARN à boîtes H/ACA, ont été les premières documentées dans la littérature scientifique. En effet, le scaARN ACA45, dont la structure en tige-boucle rappelle celle des précurseurs de microARN, subit une maturation en sdARN (sdARN ACA45) de 22-23 bases, comparable à celle d'un microARN. Certains auteurs emploient même le terme de sno-miR. Ender *et al.* [4] ont montré que cette maturation était, dans ce cas, indépendante de la RNase de type III Drosha, mais nécessitait l'action de la RNase de type III Dicer, toutes deux impliquées dans la maturation classique des microARN [45]. Enfin, les auteurs ont montré, par un test rapporteur, que le sdARN ACA45 pouvait cibler l'ARNm codant pour une sous-unité protéique du médiateur CDC2L6. Depuis, d'autres sdARN ont été identifiés par des immunoprécipitations de complexes argonaute-ARN, ou prédits à l'aide de modélisations bio-informatiques. Ainsi, les protéines Ago7 (chez *Arabidopsis*) et Ago1 (chez *S. pombe*) ont également été trouvées en complexe avec de petits ARN dérivés de snoARN [6]. Plus récemment, chez l'homme, plusieurs fragments dérivés de snoARN ont aussi été observés au sein de particules RISC [7]. Une autre étude montre que les sdARN semblent ne pas être incorporés dans les complexes Ago2 de manière très efficace [8]. Il n'en demeure pas moins que certaines espèces de snoARN présentent donc à la fois les caractéristiques et les fonctions des snoARN classiques, et peuvent générer des sno-miR fonctionnels [9]. Une hypothèse qui permet d'expliquer ces observations est que les précurseurs

***Figure 2. Caractéristiques des miARN issus de snoARN à boîtes C/D ou H/ACA chez l'homme.*** Les miARN dérivés de snoARN à boîtes C/D sont plus abondants que ceux dérivés de snoARN à boîtes H/ACA. Ces derniers ont toutefois une taille moyenne légèrement supérieure (21-24 contre 17-19 nucléotides, abscisse). En ordonnée : nombre de séquences correspondant à des sno-miR pour un million de séquences localisées sur le génome (d'après [6]).

de certains microARN dériveraient de snoARN ayant perdu leur fonction initiale de guide de modification post-transcriptionnelle d'ARN, et acquis une nouvelle fonctionnalité au cours de l'évolution. Cette hypothèse est étayée par le fait que de nombreux snoARN orphelins ont été décrits comme étant les précurseurs de sdARN [6].

Ce lien surprenant entre snoARN et microARN est conforté par l'existence de plusieurs similitudes entre les processus de maturation des microARN et des snoARN. En effet, ils nécessitent tous deux l'action de nucléases (endo- et exonucléases), notamment de type RNase III (Rnt1 chez la levure et les plantes pour la maturation des snoARN polycistroniques, Drosha et Dicer pour la maturation des microARN). De plus, il a été montré que Dicer pouvait accepter certains snoARN comme substrats [4]. En outre, des interactions ont été observées entre des protéines participant à l'une ou l'autre voie de maturation. Ainsi, la fibrillarine et la protéine NOP56 (*56-kDa nucleolar protein*) ont été retrouvées associées aux protéines Argonaute Ago2 et Ago1, respectivement. Enfin, chez les plantes, on a montré que la protéine chaperonne Hsp90 (*90-kDa heat shock protein*) intervenait à la fois dans la biogenèse des snoARN et celle des microARN [10].

## Les pré-ARN messagers : de nouvelles cibles pour les snoARN

Les snoARN à boîtes C/D SNORD115 et SNORD116 murins ont été identifiés en 2000 par le groupe d'Hüttenhofer [11]. Ils sont tous deux exprimés préférentiellement dans le cerveau et possèdent plusieurs caractéristiques originales. En effet, les gènes *SNORD115* et *SNORD116* sont localisés dans le locus 7C chez la souris, et 15q11-13 chez l'homme. Ces régions chromosomiques sont soumises à l'empreinte génomique parentale, et ces gènes ne sont exprimés qu'à partir de l'allèle paternel [12, 13]. De plus, de multiples copies de ces gènes sont présentes (respectivement 47 et 27 répétitions des gènes humains *SNORD115* et *SNORD116*). Chez l'homme, la délétion de l'allèle paternel de ce locus conduit au développement du syndrome de Prader-Willi (locus PW/AS), une maladie génétique rare (prévalence de 1 sur 25 000) entraînant des troubles du développement (taille réduite, hypogonadisme) et du comportement (hypotonie, retard mental, hyperphagie due à l'absence de sensation de la satiété conduisant à une obésité morbide) [14-16]. Des études génétiques ont montré que la seule délétion de la région correspondant aux copies de *SNORD116* était suffisante pour induire un phénotype pathologique ; toutefois, la sévérité des troubles augmente avec l'étendue de la région absente. Aucune cible canonique du snoARN SNORD116 n'a pu être identifiée à ce jour. On peut donc proposer que ce dernier, tout comme d'autres snoARN orphelins, participe à des processus biologiques encore non identifiés.

Par ailleurs, le snoARN SNORD115 ne semble pas jouer un rôle essentiel dans l'apparition du syndrome de Prader-Willi, puisque la seule délétion du *cluster* SNORD115 n'entraîne aucun symptôme chez les individus qui en sont porteurs. Il n'est cependant pas exclu que la perte de sa fonction, associée à celle de SNORD116, contribue à la variabilité du phénotype. Néanmoins, la compréhension de la responsabilité des snoARN dans l'apparition de la pathologie demeure partielle, et l'implication possible d'un nouveau gène, toujours au même locus, a été rapportée [17].

De manière remarquable, le snoARN orphelin SNORD115 possède une longue complémentarité de 18 nucléotides avec un pré-ARNm spécifique du cerveau codant pour le récepteur de la sérotonine 5-HT2c [11]. Ce récepteur transmembranaire couplé à la protéine G est impliqué dans le contrôle de l'appétit et de l'humeur. Le pré-ARNm codant pour ce récepteur peut subir, dans le cytoplasme, différents événements d'édition

***Figure 3.*** ***Les précurseurs des miARN 27b et 140 ressemblent à des snoARN.*** Les structures secondaires des précurseurs des miARN miR-27b et miR-140 sont représentées, avec les boîtes C/D ou H/ACA indiquées en vert et la région antisens complémentaire à une région cible dans un ARN ribosomique en rouge. Le miARN mature correspondant est représenté en bleu [22, 43, 44].

(conversion d'adénosine en inosine *via* les enzymes ADAR [*adenosine deaminase acting on RNA*] -1 et -2) au niveau de cinq sites spécifiques (A à E) de l'exon V [13]. Cet exon V correspond à la boucle II intracellulaire du récepteur à laquelle s'associe la protéine G indispensable à la transduction du signal par la sérotonine. Au cours de la traduction en protéines, les inosines de l'ARNm sont reconnues comme des guanosines. Aussi, en fonction du taux d'édition des différents sites, plusieurs isoformes du récepteur peuvent être produites, chacune présentant une affinité différente pour la protéine G. Le snoARN SNORD115 pourrait ainsi guider la méthylation d'un nucléotide correspondant au site d'édition C. Les expérimentations *in vitro* de Hüttenhofer et son équipe vont dans ce sens, qui montrent que l'expression du snoARN SNORD115 inhibait spécifiquement la déamination de l'adénosine au site C [13]. Ainsi, en réduisant l'efficacité de l'édition au site C, le snoARN SNORD115 pourrait moduler finement le couplage du récepteur 5-HT2c à la protéine G, et donc la transduction du signal par la sérotonine. Ainsi, une nouvelle classe de cibles possibles pour les snoARN, les pré-ARNm, a été mis en évidence et a engendré un regain d'intérêt important pour l'étude de cette famille de molécules. En outre, une autre étude [18] semble indiquer que le snoARN SNORD115 serait impliqué dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm codant le récepteur 5-HT2c, selon un mécanisme indépendant de l'édition. En effet, en présence du snoARN SNORD115, l'ARN mature produit contiendrait l'exon V en entier, conduisant à la forme fonctionnelle du récepteur à la sérotonine. En revanche, en son absence, un site proximal d'épissage au niveau de l'exon V serait utilisé, conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'exon VI. Le récepteur ainsi produit est amputé de sa partie carboxy-terminale, et son affinité pour la protéine G serait alors 10 à 100 fois moins importante. Il est intéressant de mentionner que des petits ARN dérivés du snoARN SNORD115 ont été observés [19-21]. Les détails concernant leur nombre, abondance et extrémités sont l'objet de débats [19-21] ; ils pourraient néanmoins être impliqués dans l'épissage du pré-ARNm du récepteur de la sérotonine, ainsi que dans celui d'autres pré-ARNm cibles potentiels [20]. Des observations similaires ont été faites pour d'autres snoARN et leurs petits fragments dérivés, comme SNORD88C, impliqué dans l'épissage du pré-ARNm de FGFR3 (*fibroblast growth factor receptor 3*) [22]. Ceci indique que le snoARN SNORD115, comme de nombreux snoARN, serait le précurseur de petits ARNnc fonctionnels, dont le nombre, la nature, les voies de biogenèse ainsi que la fonction exacte devront être caractérisés plus précisément [19]. Bien que l'implication éventuelle des snoARN ou de leurs petits ARN dérivés dans les phénomènes d'épissage ou d'édition de pré-ARNm soient encore mal comprise, l'élucidation des mécanismes biologiques et l'identification des partenaires mis en jeu lors de la maturation des sno-miR pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de pathologies complexes comme, par exemple, le syndrome de Prader-Willi.

## snoARN et cancer ?

Le rôle des microARN dans les processus de différenciation cellulaire, mais également dans le développement de pathologies, en particulier l'évolution tumorale, dont ils peuvent servir de marqueurs, est aujourd'hui largement documenté [23, 24]. À l'instar des microARN, des snoARN sont également retrouvés parmi les ARN circulants, représentant des biomarqueurs potentiels intéressants [25, 26], et de nouveaux résultats tendent

à indiquer que plusieurs snoARN sont également impliqués dans des processus tumoraux [27-31]. Par exemple, le snoARN à boîtes C/D U50 est sous-exprimé chez certains patients atteints de cancer de la prostate, et sa surexpression inhibe la prolifération cellulaire *in vitro* [32-34]. Un autre snoARN, à boîte H/ACA cette fois, est surexprimé dans certains types de cancers du poumon [25, 35]. Ainsi, des membres des deux familles de snoARN semblent impliqués dans la cancérogenèse, où ils peuvent se comporter comme oncogènes ou comme gènes suppresseurs de tumeurs. Bien que les mécanismes précis afférents à ces observations soient encore mal compris, une hypothèse attrayante est que l'existence de défauts de maturation des ARN ribosomiques, cibles canoniques des snoARN, et leur assemblage dans les ribosomes, puissent affecter la traduction protéique dans les cellules. Or, des défauts d'assemblage et de biogenèse des ribosomes ont été associés à l'évolution de processus tumoraux, en particulier chez des patients atteints de cancers du sein [36]. Une hypothèse alternative serait que les snoARN concernés, ou des sous-fragments de ces snoARN, puissent intervenir en dehors de la biogenèse des ribosomes, expliquant les effets observés au niveau tumoral. Les phénomènes de production de microARN à partir de snoARN précurseurs décrits plus haut pourraient en être une illustration. Les données de la littérature montrent que deux microARN issus de précurseurs ressemblant à des snoARN, les miR-27b et miR-140, ont une forte influence sur l'évolution de certaines tumeurs [37-39] *(Figure 3)*. Ainsi, une expression élevée de miR-140 dans les ostéosarcomes et dans les tumeurs du côlon ralentit la prolifération cellulaire, et entraîne la chimiorésistance de la tumeur [40]. La surexpression de miR-27b dans des neuroblastomes ralentit également la prolifération cellulaire par une répression de l'expression du gène codant pour les récepteurs PPARγ (*peroxisome proliferator-activated receptor* γ) [41].

## Conclusion

La famille des snoARN illustre parfaitement l'importance de la compréhension des mécanismes conduisant à la maturation ou l'assemblage des ARNnc au sein de particules ribonucléoprotéiques fonctionnelles. Elle constitue un domaine d'étude aussi fascinant que primordial. Ainsi, les snoARN, ces « anciens » ARN auxquels de nouveaux rôles sont attribués, ne cessent de nous surprendre. Leur maturation en ARN fonctionnels plus petits ou la démonstration de leur implication, ainsi que celle de leurs petits ARN dérivés récemment identifiés, dans la régulation de l'édition et l'épissage alternatif, ou le lien possible de certains d'entre eux avec le syndrome de Prader-Willi ou les processus tumoraux, en sont des exemples. L'élucidation des mécanismes de maturation des snoARN en microARN pourrait ainsi permettre d'envisager, à plus long terme, des approches thérapeutiques pour ces pathologies. ◊


## SUMMARY

### Beyond usual functions of snoRNAs

Small nucleolar RNAs or snoRNAs, principally implicated in post-transcriptional chemical modification of other RNAs, were among the first non-coding RNA identified, together with ribosomal and transfer RNA. Lately, snoRNA have been involved in various unexpected functions, which renewed researcher's interest for these molecules. SnoRNA processing into smaller functional RNA species (sdRNA for snoRNA-derived RNA) or into miRNA (sno-miR), snoRNA mediated regulation of messenger RNA alternative splicing or snoRNA links to human disorders, including cancers, are some of the topics developped in this review. ◊



### LIENS D'INTÉRÊT

*Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.*

### REMERCIEMENTS

*Nous tenons à remercier le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Université de Lorraine (UL) et la Ligue nationale contre le cancer (comités Meurthe-et-Moselle et Moselle) pour leur soutien financier. Nous tenons également à remercier Christiane Branlant et Bruno Charpentier pour leur relecture et commentaires sur le manuscrit ainsi que l'ensemble du laboratoire pour les discussions stimulantes.*


## RÉFÉRENCES


1. Rederstorff M. Une approche originale de sélection de nouveaux ARN non codants. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 343-5.
2. Cavaille J. Des microARN comme s'il en pleuvait... *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 399-401.
3. Kawaji H, Nakamura M, Takahashi Y, *et al.* Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics* 2008 ; 9 : 157.
4. Ender C, Krek A, Friedlander MR, *et al.* A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell* 2008 ; 32 : 519-28.
5. Saraiya AA, Wang CC. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* 2008 ; 4 : e1000224.
6. Taft RJ, Glazov EA, Lassmann T, *et al.* Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA* 2009 ; 15 : 1233-40.
7. Brameier M, Herwig A, Reinhardt R, *et al.* Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 675-86.
8. Kishore S, Gruber AR, Jedlinski DJ, *et al.* Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing. *Genome Biol* 2013 ; 14 : R45.
9. Scott MS, Ono M. From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie* 2011 ; 93 : 1987-92.
10. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, *et al.* Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 2010 ; 39 : 292-9.
11. Cavaille J, Buiting K, Kiefmann M, *et al.* Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 14311-6.
12. Rederstorff M, Huttenhofer A. Small non-coding RNAs in disease development and host-pathogen interactions. *Curr Opin Mol Ther* 2010 ; 12 : 684-94.
13. Vitali P, Cavaille J. Petits ARN C/D et syndrome de Prader-Willi. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 1017-9.
14. De Smith AJ, Purmann C, Walters RG, *et al.* A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum Mol Genet* 2009 ; 18 : 3257-65.
15. Duker AL, Ballif BC, Bawle EV, *et al.* Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 2010 ; 18 : 1196-201.
16. Sahoo T, del Gaudio D, German JR, *et al.* Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 719-21.

## RÉFÉRENCES


17. Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, *et al*. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet* 2013 ; 45 : 1405-8.
18. Kishore S, Stamm S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* 2006 ; 311 : 230-2.
19. Bortolin-Cavaille ML, Cavaille J. The SNORD115 (H/MBII-52) and SNORD116 (H/MBII-85) gene clusters at the imprinted Prader-Willi locus generate canonical box C/D snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 2012 ; 40 : 6800-7.
20. Kishore S, Khanna A, Zhang Z, *et al.* The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 : 1153-64.
21. Rederstorff M, Bernhart SH, Tanzer A, *et al.* RNPomics: defining the ncRNA transcriptome by cDNA library generation from ribonucleo-protein particles. *Nucleic Acids Res* 2010 ; 38 : e113.
22. Scott MS, Ono M, Yamada K, *et al.* Human box C/D snoRNA processing conservation across multiple cell types. *Nucleic Acids Res* 2012 ; 40 : 3676-88.
23. Kahn A. L'impérialisme des micro-ARN s'étend maintenant au cancer. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 687-9.
24. Ladeiro Y, Zucman-Rossi J. Micro-ARN (miARN) et cancer : le cas des tumeurs hépatocellulaires. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 467-72.
25. Liao J, Yu L, Mei Y, *et al.* Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Mol Cancer* 2010 ; 9 : 198.
26. Zhang L, Yang M, Marks P, *et al.* Serum non-coding RNAs as biomarkers for osteoarthritis progression after ACL injury. *Osteoarthritis Cartilage* 2012 ; 20 : 1631-7.
27. Martens-Uzunova ES, Olvedy M, Jenster G. Beyond microRNA - Novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer. *Cancer Lett* 2013 ; 340 : 201-11.
28. Su H, Xu T, Ganapathy S, *et al*. Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* 2013 ; doi : 10.1038/onc.2013.89.
29. Teittinen KJ, Laiho A, Uusimaki A, *et al*. Expression of small nucleolar RNAs in leukemic cells. *Cell Oncol (Dordr)* 2013 ; 36 : 55-63.
30. Valleron W, Ysebaert L, Berquet L, *et al.* Small nucleolar RNA expression profiling identifies potential prognostic markers in peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 2013 ; 120 : 3997-4005.
31. Williams GT, Farzaneh F. Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? *Nat Rev Cancer* 2012 ; 12 : 84-8.
32. Dong XY, Guo P, Boyd J, *et al.* Implication of snoRNA U50 in human breast cancer. *J Genet Genomics* 2009 ; 36 : 447-54.
33. Dong XY, Rodriguez C, Guo P, *et al*. SnoRNA U50 is a candidate tumor-suppressor gene at 6q14.3 with a mutation associated with clinically significant prostate cancer. *Hum Mol Genet* 2008 ; 17 : 1031-42.
34. Soeno Y, Fujita K, Kudo T, *et al*. Generation of a mouse model with down-regulated U50 snoRNA (SNORD50) expression and its organ-specific phenotypic modulation. *PLoS One* 2013 ; 8 : e72105.
35. Mei YP, Liao JP, Shen J, *et al*. Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. *Oncogene* 2011 ; 31 : 2794-804.
36. Belin S, Beghin A, Solano-Gonzalez E, *et al*. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One* 2009 ; 4 : e7147.
37. Buffa FM, Camps C, Winchester L, *et al.* microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer. *Cancer Res* 2011 ; 71 : 5635-45.
38. Husted S, Sokilde R, Rask L, *et al.* MicroRNA expression profiles associated with development of drug resistance in Ehrlich ascites tumor cells. *Mol Pharm* 2011 ; 8 : 2055-62.
39. Susuki D, Kimura S, Naganuma S, *et al.* Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2011 ; 102 : 2164-71.
40. Song B, Wang Y, Xi Y, *et al.* Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene* 2009 ; 28 : 4065-74.
41. Lee JJ, Drakaki A, Iliopoulos D, Struhl K. MiR-27b targets PPARgamma to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2011 ; 31 : 3818-25.
42. Eddy SR. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2001 ; 2 : 919-29.
43. Ono M, Scott MS, Yamada K, *et al*. Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 3879-91.
44. Scott MS, Avolio F, Ono M, *et al.* Human miRNA precursors with box H/ACA snoRNA features. *PLoS Comput Biol* 2009 ; 5 : e1000507.
45. Dunoyer P. La bataille du silence. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 505-12.



**TIRÉS À PART**

M. Rederstorff



# STRESS, TRAUMATISMES ET INSOMNIES

de Jean-Pierre FRESCO

**L'insomnie** c'est

**1** Français sur **5**

**1** personne âgée sur **3**

qui en **souffrent**

14 €

ISBN : 978-2-8425-4175-0

**Une étude**
sur les liens entre stress, traumatismes et insomnies.

**Une réflexion philosophique et sociétale**
sur les conditions de travail et de vie d'aujourd'hui.

**Une analyse**
d'un mal fréquent mais encore peu compris.

edp sciences

Ouvrage disponible sur :
**www.edition-sciences.com**

EDK

# Bibliographie

# A

Abdelhaleem, M., Maltais, L., and Wain, H. (2003). The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases. Genomics *81*, 618–622.

Abou Elela, S., and Ares, M. (1998). Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. EMBO J. *17*, 3738–3746.

Aittaleb, M., Rashid, R., Chen, Q., Palmer, J.R., Daniels, C.J., and Li, H. (2003). Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins. Nat. Struct. Biol. *10*, 256–263.

Akhtar, N., Påhlman, A.K., Larsson, K., Corbett, A.H., and Adler, L. (2000). SGD1 encodes an essential nuclear protein of Saccharomyces cerevisiae that affects expression of the GPD1 gene for glycerol 3-phosphate dehydrogenase. FEBS Lett. *483*, 87–92.

Allmang, C., Henry, Y., Morrissey, J.P., Wood, H., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1996a). Processing of the yeast pre-rRNA at sites A(2) and A(3) is linked. RNA *2*, 63–73.

Allmang, C., Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1996b). Recognition of cleavage site A(2) in the yeast pre-rRNA. RNA *2*, 51–62.

Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. EMBO J. *18*, 5399–5410.

Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' --> 5' exonucleases. Genes Dev. *13*, 2148–2158.

Angermayr, M., and Bandlow, W. (2002). RIO1, an extraordinary novel protein kinase. FEBS Lett. *524*, 31–36.

Angermayr, M., Roidl, A., and Bandlow, W. (2002). Yeast Rio1p is the founding member of a novel subfamily of protein serine kinases involved in the control of cell cycle progression. Mol. Microbiol. *44*, 309–324.

Antal, M., Mougin, A., Kis, M., Boros, E., Steger, G., Jakab, G., Solymosy, F., and Branlant, C. (2000). Molecular characterization at the RNA and gene levels of U3 snoRNA from a unicellular green alga, Chlamydomonas reinhardtii. Nucleic Acids Res. *28*, 2959–2968.

Arcus, V.L., Bäckbro, K., Roos, A., Daniel, E.L., and Baker, E.N. (2004). Distant

structural homology leads to the functional characterization of an archaeal PIN domain as an exonuclease. J. Biol. Chem. *279*, 16471–16478.

Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Becker, T., Bhushan, S., Jossinet, F., Habeck, M., Dindar, G., Franckenberg, S., et al. (2010a). Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-A resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 19748–19753.

Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Becker, T., Bhushan, S., Jossinet, F., Habeck, M., Dindar, G., Franckenberg, S., et al. (2010b). Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 19754–19759.

Atzorn, V., Fragapane, P., and Kiss, T. (2004). U17/snR30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production. Mol. Cell. Biol. *24*, 1769–1778.

# B

Babiano, R., and de la Cruz, J. (2010). Ribosomal protein L35 is required for 27SB pre-rRNA processing in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *38*, 5177–5192.

Babiano, R., Gamalinda, M., Woolford, J.L., and de la Cruz, J. (2012). Saccharomyces cerevisiae ribosomal protein L26 is not essential for ribosome assembly and function. Mol. Cell. Biol. *32*, 3228–3241.

Bachellerie, J.P., and Cavaillé, J. (1997). Guiding ribose methylation of rRNA. Trends Biochem. Sci. *22*, 257–261.

Bachellerie, J.P., Cavaillé, J., and Hüttenhofer, A. (2002). The expanding snoRNA world. Biochimie *84*, 775–790.

Bakin, A., and Ofengand, J. (1995). Mapping of the 13 pseudouridine residues in Saccharomyces cerevisiae small subunit ribosomal RNA to nucleotide resolution. Nucleic Acids Res. *23*, 3290–3294.

Bakin, A., Kowalak, J.A., McCloskey, J.A., and Ofengand, J. (1994a). The single pseudouridine residue in Escherichia coli 16S RNA is located at position 516. Nucleic Acids Res. *22*, 3681–3684.

Bakin, A., Lane, B.G., and Ofengand, J. (1994b). Clustering of pseudouridine residues around the peptidyltransferase center of yeast cytoplasmic and mitochondrial ribosomes. Biochemistry *33*, 13475–13483.

Balakin, A.G., Smith, L., and Fournier, M.J. (1996). The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. Cell *86*, 823–834.

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

Baronas-Lowell, D.M., and Warner, J.R. (1990). Ribosomal protein L30 is dispensable in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *10*, 5235–5243.

Baserga, S.J., Agentis, T.M., Wormsley, S., Dunbar, D.A., and Lee, S. (1997). Mpp10p, a new protein component of the U3 snoRNP required for processing of 18S rRNA precursors. Nucleic Acids Symp. Ser. 64–67.

Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. Mol. Cell *8*, 517–529.

Bassler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M., and Hurt, E. (2010). The AAA-ATPase Rea1 drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly. Mol. Cell *38*, 712–721.

Baudin-Baillieu, A., Fabret, C., Liang, X.-H., Piekna-Przybylska, D., Fournier, M.J., and Rousset, J.-P. (2009). Nucleotide modifications in three functionally important regions of the Saccharomyces cerevisiae ribosome affect translation accuracy. Nucleic Acids Res. *37*, 7665–7677.

Baughman, G., and Nomura, M. (1983). Localization of the target site for translational regulation of the L11 operon and direct evidence for translational coupling in Escherichia coli. Cell *34*, 979–988.

Bax, R., Vos, H.R., Raué, H.A., and Vos, J.C. (2006). Saccharomyces cerevisiae Sof1p associates with 35S Pre-rRNA independent from U3 snoRNA and Rrp5p. Eukaryotic Cell *5*, 427–434.

Baxter-Roshek, J.L., Petrov, A.N., and Dinman, J.D. (2007). Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification. PLoS ONE *2*, e174.

Van Beekvelt, C.A., Kooi, E.A., de Graaff-Vincent, M., Riet, J., Venema, J., and Raué, H.A. (2000). Domain III of Saccharomyces cerevisiae 25 S ribosomal RNA: its role in binding of ribosomal protein L25 and 60 S subunit formation. J. Mol. Biol. *296*, 7–17.

Van Beekvelt, C.A., de Graaff-Vincent, M., Faber, A.W., van't Riet, J., Venema, J., and Raué, H.A. (2001a). All three functional domains of the large ribosomal subunit protein L25 are required for both early and late pre-rRNA processing steps in Saccharomyces

cerevisiae. Nucleic Acids Res. *29*, 5001–5008.

Van Beekvelt, C.A., Jeeninga, R.E., van't Riet, J., Venema, J., and Raué, H.A. (2001b). Identification of cis-acting elements involved in 3'-end formation of Saccharomyces cerevisiae 18S rRNA. RNA *7*, 896–903.

Beltrame, M., and Tollervey, D. (1992). Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. EMBO J. *11*, 1531–1542.

Beltrame, M., and Tollervey, D. (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. EMBO J. *14*, 4350–4356.

Beltrame, M., Henry, Y., and Tollervey, D. (1994). Mutational analysis of an essential binding site for the U3 snoRNA in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-rRNA. Nucleic Acids Res. *22*, 4057–4065.

Bernstein, K.A., and Baserga, S.J. (2004). The small subunit processome is required for cell cycle progression at G1. Mol. Biol. Cell *15*, 5038–5046.

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

Bernstein, K.A., Bleichert, F., Bean, J.M., Cross, F.R., and Baserga, S.J. (2007). Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint. Mol. Biol. Cell *18*, 953–964.

Bernstein, L.B., Mount, S.M., and Weiner, A.M. (1983). Pseudogenes for human small nuclear RNA U3 appear to arise by integration of self-primed reverse transcripts of the RNA into new chromosomal sites. Cell *32*, 461–472.

Billy, E., Wegierski, T., Nasr, F., and Filipowicz, W. (2000). Rcl1p, the yeast protein similar to the RNA 3'-phosphate cyclase, associates with U3 snoRNP and is required for 18S rRNA biogenesis. EMBO J. *19*, 2115–2126.

Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Krogh, N., Sabarinathan, R., Gorodkin, J., and Nielsen, H. (2015). Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. *54*, 451–455.

Bizarro, J., Charron, C., Boulon, S., Westman, B., Pradet-Balade, B., Vandermoere, F., Chagot, M.-E., Hallais, M., Ahmad, Y., Leonhardt, H., et al. (2014). Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. J. Cell Biol. *207*, 463–480.

Bleichert, F., and Baserga, S.J. (2007). The long unwinding road of RNA helicases. Mol. Cell *27*, 339–352.

Bleichert, F., Granneman, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., and 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. U.S.A. *103*, 9464–9469.

De Boer, P., Vos, H.R., Faber, A.W., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2006). Rrp5p, a trans-acting factor in yeast ribosome biogenesis, is an RNA-binding protein with a pronounced preference for U-rich sequences. RNA *12*, 263–271.

Bohnsack, M.T., Kos, M., and Tollervey, D. (2008). Quantitative analysis of snoRNA association with pre-ribosomes and release of snR30 by Rok1 helicase. EMBO Rep. *9*, 1230–1236.

Bohnsack, M.T., Martin, R., Granneman, S., Ruprecht, M., Schleiff, E., and Tollervey, D. (2009). Prp43 bound at different sites on the pre-rRNA performs distinct functions in ribosome synthesis. Mol. Cell *36*, 583–592.

Borovjagin, A.V., and Gerbi, S.A. (2001). Xenopus U3 snoRNA GAC-Box A' and Box A sequences play distinct functional roles in rRNA processing. Mol. Cell. Biol. *21*, 6210–6221.

Bortolin, M.L., Ganot, P., and Kiss, T. (1999). Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs. EMBO J. *18*, 457–469.

Boulon, S., Basyuk, E., Blanchard, J.M., Bertrand, E., and Verheggen, C. (2002). Intra-nuclear RNA trafficking: insights from live cell imaging. Biochimie *84*, 805–813.

Boulon, S., Verheggen, C., Jady, B.E., Girard, C., Pescia, C., Paul, C., Ospina, J.K., Kiss, T., Matera, A.G., Bordonné, R., et al. (2004). PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. Mol. Cell *16*, 777–787.

Boulon, S., Marmier-Gourrier, N., Pradet-Balade, B., Wurth, L., Verheggen, C., Jády, B.E., Rothé, B., Pescia, C., Robert, M.-C., Kiss, T., et al. (2008). The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. J. Cell Biol. *180*, 579–595.

Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., G'elugne, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1997). A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs. EMBO J. *16*, 4770–4776.

Brand, R.C., Klootwijk, J., Van Steenbergen, T.J., De Kok, A.J., and Planta, R.J. (1977). Secondary methylation of yeast ribosomal precursor RNA. Eur. J. Biochem. *75*, 311–318.

Branlant, C., Widada, J.S., Krol, A., and Ebel, J.P. (1977). Studies on the primary structure of the ribosomal 23S RNA of Escherichia coli: II. A characterisation and an

alignment of 24 sections spanning the entire molecule and its application to the localisation of specific fragments. Nucleic Acids Res. *4*, 4323–4345.

Branlant, C., Krol, A., and Ebel, J.P. (1980). Characterization of the Escherichia coli 23S Ribosomal RNA region associated with ribosomal protein L1. Evidence for homologies with the 5'-end region of the L11 operon. Nucleic Acids Res. *8*, 5567–5577.

Briggs, M.W., Burkard, K.T., and Butler, J.S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. J. Biol. Chem. *273*, 13255–13263.

Briones, E., Briones, C., Remacha, M., and Ballesta, J.P. (1998). The GTPase center protein L12 is required for correct ribosomal stalk assembly but not for Saccharomyces cerevisiae viability. J. Biol. Chem. *273*, 31956–31961.

Brulé, F., Grégoire, A., Ségault, V., Mougin, A., and Branlant, C. (1995). Secondary structure conservation of the U3 small nucleolar RNA introns in Saccharomyces. C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie *318*, 1197–1206.

Brulé, F., Venema, J., Ségault, V., Tollervey, D., and Branlant, C. (1996). The yeast Hansenula wingei U3 snoRNA gene contains an intron and its coding sequence co-evolved with the 5' ETS region of the pre-ribosomal RNA. RNA *2*, 183–197.

Buchhaupt, M., Sharma, S., Kellner, S., Oswald, S., Paetzold, M., Peifer, C., Watzinger, P., Schrader, J., Helm, M., and Entian, K.-D. (2014). Partial methylation at Am100 in 18S rRNA of baker's yeast reveals ribosome heterogeneity on the level of eukaryotic rRNA modification. PLoS ONE *9*, e89640.

# C

Cahill, N.M., Friend, K., Speckmann, W., Li, Z.-H., Terns, R.M., Terns, M.P., and Steitz, J.A. (2002). Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP. EMBO J. *21*, 3816–3828.

Campbell, M.G., and Karbstein, K. (2011). Protein-protein interactions within late pre-40S ribosomes. PLoS ONE *6*, e16194.

Cavaillé, J., and Bachellerie, J.P. (1998). SnoRNA-guided ribose methylation of rRNA: structural features of the guide RNA duplex influencing the extent of the reaction. Nucleic Acids Res. *26*, 1576–1587.

Cavaillé, J., Nicoloso, M., and Bachellerie, J.P. (1996). Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. Nature *383*, 732–735.

Chagot, M.-E., Jacquemin, C., Branlant, C., Charpentier, B., Manival, X., and Quinternet, M. (2015). (1)H, (15)N and (13)C resonance assignments of the two TPR domains from the human RPAP3 protein. Biomol NMR Assign *9*, 99–102.

Chandramouli, P., Topf, M., Ménétret, J.-F., Eswar, N., Cannone, J.J., Gutell, R.R., Sali, A., and Akey, C.W. (2008). Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 A resolution. Structure *16*, 535–548.

Chanfreau, G., Elela, S.A., Ares, M., and Guthrie, C. (1997). Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. Genes Dev. *11*, 2741–2751.

Charette, M., and Gray, M.W. (2000). Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. IUBMB Life *49*, 341–351.

Charpentier, B., Fourmann, J.-B., and Branlant, C. (2007). Reconstitution of archaeal H/ACA sRNPs and test of their activity. Meth. Enzymol. *425*, 389–405.

Charron, C., Manival, X., Cléry, A., Senty-Ségault, V., Charpentier, B., Marmier-Gourrier, N., Branlant, C., and Aubry, A. (2004). The archaeal sRNA binding protein L7Ae has a 3D structure very similar to that of its eukaryal counterpart while having a broader RNA-binding specificity. J. Mol. Biol. *342*, 757–773.

Chook, Y.M., and Süel, K.E. (2011). Nuclear import by karyopherin-βs: recognition and inhibition. Biochim. Biophys. Acta *1813*, 1593–1606.

Chu, S., Archer, R.H., Zengel, J.M., and Lindahl, L. (1994). The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *91*, 659–663.

Ciganda, M., and Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. Wiley Interdiscip Rev RNA *2*, 523–533.

Cléry, A., Senty-Ségault, V., Leclerc, F., Raué, H.A., and Branlant, C. (2007). Analysis of sequence and structural features that identify the B/C motif of U3 small nucleolar RNA as the recognition site for the Snu13p-Rrp9p protein pair. Mol. Cell. Biol. *27*, 1191–1206.

Clissold, P.M., and Ponting, C.P. (2000). PIN domains in nonsense-mediated mRNA decay and RNAi. Curr. Biol. *10*, R888–R890.

Cole, J.R., Olsson, C.L., Hershey, J.W., Grunberg-Manago, M., and Nomura, M. (1987). Feedback regulation of rRNA synthesis in Escherichia coli. Requirement for initiation factor IF2. J. Mol. Biol. *198*, 383–392.

Colley, A., Beggs, J.D., Tollervey, D., and Lafontaine, D.L. (2000). Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. Mol. Cell. Biol. *20*, 7238–7246.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. Gene *367*, 17–37.

De la Cruz, J., Kressler, D., Rojo, M., Tollervey, D., and Linder, P. (1998a). Spb4p, an essential putative RNA helicase, is required for a late step in the assembly of 60S ribosomal subunits in Saccharomyces cerevisiae. RNA *4*, 1268–1281.

De la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., and Linder, P. (1998b). Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. *17*, 1128–1140.

De la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999). Unwinding RNA in Saccharomyces cerevisiae: DEAD-box proteins and related families. Trends Biochem. Sci. *24*, 192–198.

Culver, G.M. (2003). Assembly of the 30S ribosomal subunit. Biopolymers *68*, 234–249.

# D

Dahlberg, A.E. (1989). The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis. Cell *57*, 525–529.

Dai, M.-S., and Lu, H. (2008). Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. J. Cell. Biochem. *105*, 670–677.

Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J.M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *21*, 2331–2338.

Dammel, C.S., and Noller, H.F. (1993). A cold-sensitive mutation in 16S rRNA provides evidence for helical switching in ribosome assembly. Genes Dev. *7*, 660–670.

Darzacq, X., Jády, B.E., Verheggen, C., Kiss, A.M., Bertrand, E., and Kiss, T. (2002). Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. EMBO J. *21*, 2746–2756.

Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. Trends Biochem. Sci. *27*, 344–351.

Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2003). RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. J. Biol. Chem. *278*, 695–698.

Decatur, W.A., Liang, X., Piekna-Przybylska, D., and Fournier, M.J. (2007). Identifying effects of snoRNA-guided modifications on the synthesis and function of the yeast ribosome. Meth. Enzymol. *425*, 283–316.

Dechampesme, A.M., Koroleva, O., Leger-Silvestre, I., Gas, N., and Camier, S. (1999). Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway. J. Cell Biol. *145*, 1369–1380.

Deisenroth, C., and Zhang, Y. (2010). Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. Oncogene *29*, 4253–4260.

DeLabre, M.L., Kessl, J., Karamanou, S., and Trumpower, B.L. (2002). RPL29 codes for a non-essential protein of the 60S ribosomal subunit in Saccharomyces cerevisiae and exhibits synthetic lethality with mutations in genes for proteins required for subunit coupling. Biochim. Biophys. Acta *1574*, 255–261.

Dennis, P.P., Russell, A.G., and Moniz De Sá, M. (1997). Formation of the 5' end pseudoknot in small subunit ribosomal RNA: involvement of U3-like sequences. RNA *3*, 337–343.

Deshmukh, M., Tsay, Y.F., Paulovich, A.G., and Woolford, J.L. (1993). Yeast ribosomal protein L1 is required for the stability of newly synthesized 5S rRNA and the assembly of 60S ribosomal subunits. Mol. Cell. Biol. *13*, 2835–2845.

Dez, C., and Tollervey, D. (2004). Ribosome synthesis meets the cell cycle. Curr. Opin. Microbiol. *7*, 631–637.

Dez, C., Henras, A., Faucon, B., Lafontaine, D., Caizergues-Ferrer, M., and Henry, Y. (2001). Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. Nucleic Acids Res. *29*, 598–603.

Dez, C., Noaillac-Depeyre, J., Caizergues-Ferrer, M., and Henry, Y. (2002). Naf1p, an essential nucleoplasmic factor specifically required for accumulation of box H/ACA small nucleolar RNPs. Mol. Cell. Biol. *22*, 7053–7065.

Dichtl, B., and Tollervey, D. (1997). Pop3p is essential for the activity of the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins in vivo. EMBO J. *16*, 417–429.

Dichtl, B., Stevens, A., and Tollervey, D. (1997). Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. EMBO J. *16*, 7184–7195.

Dobbyn, H.C., and O'Keefe, R.T. (2004). Analysis of Snu13p mutations reveals differential interactions with the U4 snRNA and U3 snoRNA. RNA *10*, 308–320.

Dobbyn, H.C., McEwan, P.A., Krause, A., Novak-Frazer, L., Bella, J., and O'Keefe, R.T. (2007). Analysis of pre-mRNA and pre-rRNA processing factor Snu13p structure and mutants. Biochem. Biophys. Res. Commun. *360*, 857–862.

Dosil, M., and Bustelo, X.R. (2004). Functional characterization of Pwp2, a WD family protein essential for the assembly of the 90 S pre-ribosomal particle. J. Biol. Chem. *279*, 37385–37397.

Dosztányi, Z., Csizmók, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005a). The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. J. Mol. Biol. *347*, 827–839.

Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005b). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. Bioinformatics *21*, 3433–3434.

Dosztányi, Z., Mészáros, B., and Simon, I. (2009). ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. Bioinformatics *25*, 2745–2746.

Dosztányi, Z., Mészáros, B., and Simon, I. (2010). Bioinformatical approaches to characterize intrinsically disordered/unstructured proteins. Brief. Bioinformatics *11*, 225–243.

Douet, J., and Tourmente, S. (2007). Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in Arabidopsis thaliana and Xenopus laevis. Heredity (Edinb) *99*, 5–13.

Dragon, F., Pogačić, V., and Filipowicz, W. (2000). In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. Mol. Cell. Biol. *20*, 3037–3048.

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

Duan, J., Li, L., Lu, J., Wang, W., and Ye, K. (2009). Structural mechanism of substrate RNA recruitment in H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase. Mol. Cell *34*, 427–439.

Dunbar, D.A., and Baserga, S.J. (1998). The U14 snoRNA is required for 2'-O-methylation of the pre-18S rRNA in Xenopus oocytes. RNA *4*, 195–204.

Dunbar, D.A., Wormsley, S., Agentis, T.M., and Baserga, S.J. (1997). Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. Mol. Cell. Biol. *17*, 5803–5812.

Dutca, L.M., and Culver, G.M. (2005). Regulation of rRNA processing: a role for a unique GTPase. Mol. Cell *20*, 497–499.

Dutca, L.M., Gallagher, J.E.G., and Baserga, S.J. (2011). The initial U3 snoRNA:pre-rRNA base pairing interaction required for pre-18S rRNA folding revealed by in vivo chemical probing. Nucleic Acids Res. *39*, 5164–5180.

# E

Elela, S.A., Igel, H., and Ares, M. (1996). RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. Cell *85*, 115–124.

Emery, B., de la Cruz, J., Rocak, S., Deloche, O., and Linder, P. (2004). Has1p, a member of the DEAD-box family, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Microbiol. *52*, 141–158.

Enright, C.A., Maxwell, E.S., Eliceiri, G.L., and Sollner-Webb, B. (1996). 5'ETS rRNA processing facilitated by four small RNAs: U14, E3, U17, and U3. RNA *2*, 1094–1099.

Eppens, N.A., Rensen, S., Granneman, S., Raué, H.A., and Venema, J. (1999). The roles of Rrp5p in the synthesis of yeast 18S and 5.8S rRNA can be functionally and physically separated. RNA *5*, 779–793.

Epstein, P., Reddy, R., and Busch, H. (1984). Multiple states of U3 RNA in Novikoff hepatoma nucleoli. Biochemistry *23*, 5421–5425.

# F

Faber, A.W., Van Dijk, M., Raué, H.A., and Vos, J.C. (2002). Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. RNA *8*, 1095–1101.

Faber, A.W., Vos, J.C., Vos, H.R., Ghazal, G., Elela, S.A., and Raué, H.A. (2004). The RNA catabolic enzymes Rex4p, Rnt1p, and Dbr1p show genetic interaction with trans-acting factors involved in processing of ITS1 in Saccharomyces cerevisiae pre-rRNA. RNA *10*, 1946–1956.

Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. Curr. Opin. Cell Biol. *14*, 313–318.

Fatica, A., Galardi, S., Altieri, F., and Bozzoni, I. (2000a). Fibrillarin binds directly and specifically to U16 box C/D snoRNA. RNA *6*, 88–95.

Fatica, A., Morlando, M., and Bozzoni, I. (2000b). Yeast snoRNA accumulation relies on a cleavage-dependent/polyadenylation-independent 3'-processing apparatus. EMBO J. *19*, 6218–6229.

Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakić, M., and Tollervey, D. (2003). Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. Mol. Cell. Biol. *23*, 1798–1807.

Fayet-Lebaron, E., Atzorn, V., Henry, Y., and Kiss, T. (2009). 18S rRNA processing requires base pairings of snR30 H/ACA snoRNA to eukaryote-specific 18S sequences. EMBO J. *28*, 1260–1270.

Fernández, I.S., Bai, X.-C., Hussain, T., Kelley, A.C., Lorsch, J.R., Ramakrishnan, V., and Scheres, S.H.W. (2013). Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex. Science *342*, 1240585.

Fernández-Pevida, A., Rodríguez-Galán, O., Díaz-Quintana, A., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2012). Yeast ribosomal protein L40 assembles late into precursor 60 S ribosomes and is required for their cytoplasmic maturation. J. Biol. Chem. *287*, 38390–38407.

Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P.-E., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. Mol. Cell *20*, 263–275.

Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2007). Analysis of the in vivo assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. Mol. Cell *28*, 446–457.

Figaro, S., Wacheul, L., Schillewaert, S., Graille, M., Huvelle, E., Mongeard, R., Zorbas, C., Lafontaine, D.L.J., and Heurgué-Hamard, V. (2012). Trm112 is required for Bud23-mediated methylation of the 18S rRNA at position G1575. Mol. Cell. Biol. *32*, 2254–2267.

Fisk, D.G., Ball, C.A., Dolinski, K., Engel, S.R., Hong, E.L., Issel-Tarver, L., Schwartz, K., Sethuraman, A., Botstein, D., Cherry, J.M., et al. (2006). Saccharomyces cerevisiae S288C genome annotation: a working hypothesis. Yeast *23*, 857–865.

Ford, C.L., Randal-Whitis, L., and Ellis, S.R. (1999). Yeast proteins related to the p40/laminin receptor precursor are required for 20S ribosomal RNA processing and the maturation of 40S ribosomal subunits. Cancer Res. *59*, 704–710.

Fourmann, J.-B., Tillault, A.-S., Blaud, M., Leclerc, F., Branlant, C., and Charpentier, B. (2013). Comparative study of two box H/ACA ribonucleoprotein pseudouridine-synthases: relation between conformational dynamics of the guide RNA, enzyme assembly and activity. PLoS ONE *8*, e70313.

Fournier, R., Brulé, F., Ségault, V., Mougin, A., and Branlant, C. (1998). U3 snoRNA genes with and without intron in the Kluyveromyces genus: yeasts can accommodate great variations of the U3 snoRNA 3'-terminal domain. RNA *4*, 285–302.

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

Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. Gene *313*, 17–42.

# G

Gallagher, J.E.G., and Baserga, S.J. (2004). Two-hybrid Mpp10p interaction-defective Imp4 proteins are not interaction defective in vivo but do confer specific pre-rRNA processing defects in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *32*, 1404–1413.

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

Gamalinda, M., Jakovljevic, J., Babiano, R., Talkish, J., de la Cruz, J., and Woolford, J.L. (2013). Yeast polypeptide exit tunnel ribosomal proteins L17, L35 and L37 are necessary to recruit late-assembling factors required for 27SB pre-rRNA processing. Nucleic Acids Res. *41*, 1965–1983.

Ganot, P., Bortolin, M.L., and Kiss, T. (1997a). Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. Cell *89*, 799–809.

Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1997b). The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. Genes Dev. *11*, 941–956.

Ganot, P., Jády, B.E., Bortolin, M.L., Darzacq, X., and Kiss, T. (1999). Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. Mol. Cell. Biol. *19*, 6906–6917.

Garcia, I., and Uhlenbeck, O.C. (2008). Differential RNA-dependent ATPase activities of four rRNA processing yeast DEAD-box proteins. Biochemistry *47*, 12562–12573.

Gautier, T., Bergès, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (1997). Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. Mol. Cell. Biol. *17*, 7088–7098.

Gavin, A.-C., Bösche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature *415*, 141–147.

Geerlings, T.H., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2000). The final step in the formation of 25S rRNA in Saccharomyces cerevisiae is performed by 5'-->3' exonucleases. RNA *6*, 1698–1703.

Geerlings, T.H., Faber, A.W., Bister, M.D., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2003). Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. *278*, 22537–22545.

Gelperin, D., Horton, L., Beckman, J., Hensold, J., and Lemmon, S.K. (2001). Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. RNA *7*, 1268–1283.

Gerbi, S.A., Borovjagin, A.V., Ezrokhi, M., and Lange, T.S. (2001). Ribosome biogenesis: role of small nucleolar RNA in maturation of eukaryotic rRNA. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *66*, 575–590.

Gérczei, T., and Correll, C.C. (2004). Imp3p and Imp4p mediate formation of essential U3-precursor rRNA (pre-rRNA) duplexes, possibly to recruit the small subunit processome to the pre-rRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 15301–15306.

Gérczei, T., Shah, B.N., Manzo, A.J., Walter, N.G., and Correll, C.C. (2009). RNA chaperones stimulate formation and yield of the U3 snoRNA-Pre-rRNA duplexes needed for eukaryotic ribosome biogenesis. J. Mol. Biol. *390*, 991–1006.

Gérus, M., Bonnart, C., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y., and Henras, A.K. (2010). Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit. Mol. Cell. Biol. *30*, 1130–1144.

Gilbert, W.V. (2011). Functional specialization of ribosomes? Trends Biochem. Sci. *36*, 127–132.

Gilkes, D.M., and Chen, J. (2007). Distinct roles of MDMX in the regulation of p53 response to ribosomal stress. Cell Cycle *6*, 151–155.

Ginisty, H., Amalric, F., and Bouvet, P. (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. EMBO J. *17*, 1476–1486.

Ginisty, H., Serin, G., Ghisolfi-Nieto, L., Roger, B., Libante, V., Amalric, F., and Bouvet, P. (2000). Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex. J. Biol. Chem. *275*, 18845–18850.

Girard, J.P., Lehtonen, H., Caizergues-Ferrer, M., Amalric, F., Tollervey, D., and Lapeyre, B. (1992). GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. EMBO J. *11*, 673–682.

Goldfeder, M.B., and Oliveira, C.C. (2010). Utp25p, a nucleolar Saccharomyces cerevisiae protein, interacts with U3 snoRNP subunits and affects processing of the 35S pre-rRNA. FEBS J. *277*, 2838–2852.

Gomez-Lorenzo, M.G., Spahn, C.M., Agrawal, R.K., Grassucci, R.A., Penczek, P., Chakraburtty, K., Ballesta, J.P., Lavandera, J.L., Garcia-Bustos, J.F., and Frank, J. (2000). Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the Saccharomyces cerevisiae 80S ribosome at 17.5 A resolution. EMBO J. *19*, 2710–2718.

Gonzales, F.A., Zanchin, N.I.T., Luz, J.S., and Oliveira, C.C. (2005). Characterization of Saccharomyces cerevisiae Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in Pre-rRNA processing. J. Mol. Biol. *346*, 437–455.

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

Granneman, S., and Baserga, S.J. (2003). Probing the yeast proteome for RNA-processing factors. Genome Biol. *4*, 229.

Granneman, S., and Baserga, S.J. (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. Exp. Cell Res. *296*, 43–50.

Granneman, S., and Baserga, S.J. (2005). Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. Curr. Opin. Cell Biol. *17*, 281–286.

Granneman, S., Pruijn, G.J.M., Horstman, W., van Venrooij, W.J., Luhrmann, R., and Watkins, N.J. (2002). The hU3-55K protein requires 15.5K binding to the box B/C motif as well as flanking RNA elements for its association with the U3 small nucleolar RNA in Vitro. J. Biol. Chem. *277*, 48490–48500.

Granneman, S., Gallagher, J.E.G., Vogelzangs, J., Horstman, W., van Venrooij, W.J., Baserga, S.J., and Pruijn, G.J.M. (2003). The human Imp3 and Imp4 proteins form a ternary complex with hMpp10, which only interacts with the U3 snoRNA in 60-80S ribonucleoprotein complexes. Nucleic Acids Res. *31*, 1877–1887.

Granneman, S., Vogelzangs, J., Lührmann, R., van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J.M., and Watkins, N.J. (2004). Role of pre-rRNA base pairing and 80S complex formation in subnucleolar localization of the U3 snoRNP. Mol. Cell. Biol. *24*, 8600–8610.

Granneman, S., Nandineni, M.R., and Baserga, S.J. (2005). The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14. Mol. Cell. Biol. *25*, 10352–10364.

Granneman, S., Bernstein, K.A., Bleichert, F., and Baserga, S.J. (2006a). Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases required for small ribosomal subunit synthesis. Mol. Cell. Biol. *26*, 1183–1194.

Granneman, S., Lin, C., Champion, E.A., Nandineni, M.R., Zorca, C., and Baserga, S.J. (2006b). The nucleolar protein Esf2 interacts directly with the DExD/H box RNA helicase, Dbp8, to stimulate ATP hydrolysis. Nucleic Acids Res. *34*, 3189–3199.

Granneman, S., Kudla, G., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2009). Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 9613–9618.

Greber, B.J., Boehringer, D., Montellese, C., and Ban, N. (2012). Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jjj1 bound to the 60S ribosomal subunit. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 1228–1233.

Green, R., and Noller, H.F. (1996). In vitro complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for Escherichia coli 50S ribosomal subunit assembly and function. RNA *2*, 1011–1021.

Greenwood, S.J., Schnare, M.N., and Gray, M.W. (1996). Molecular characterization of U3 small nucleolar RNA from the early diverging protist, Euglena gracilis. Curr. Genet. *30*, 338–346.

Gutell, R.R. (1994). Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures: 1994. Nucleic Acids Res. *22*, 3502–3507.

Gutell, R.R., Larsen, N., and Woese, C.R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. Microbiol. Rev. *58*, 10–26.

# H

Hage, A.E., and Tollervey, D. (2004). A surfeit of factors: why is ribosome assembly so much more complicated in eukaryotes than bacteria? RNA Biol *1*, 10–15.

Hamma, T., and Ferré-D'Amaré, A.R. (2010). The box H/ACA ribonucleoprotein complex: interplay of RNA and protein structures in post-transcriptional RNA modification. J. Biol. Chem. *285*, 805–809.

Hanson, P.I., and Whiteheart, S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 519–529.

Hardin, J.W., Reyes, F.E., and Batey, R.T. (2009). Analysis of a critical interaction within the archaeal box C/D small ribonucleoprotein complex. J. Biol. Chem. *284*, 15317–15324.

Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., et al. (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. Mol. Cell *8*, 505–515.

Hartshorne, T. (1998). Distinct regions of U3 snoRNA interact at two sites within the 5' external transcribed spacer of pre-rRNAs in Trypanosoma brucei cells. Nucleic Acids Res. *26*, 2541–2553.

Hartshorne, T., and Agabian, N. (1994). A common core structure for U3 small nucleolar RNAs. Nucleic Acids Res. *22*, 3354–3364.

Hartshorne, T., and Toyofuku, W. (1999). Two 5'-ETS regions implicated in interactions with U3 snoRNA are required for small subunit rRNA maturation in Trypanosoma brucei. Nucleic Acids Res. *27*, 3300–3309.

He, F., and Jacobson, A. (1995). Identification of a novel component of the nonsense-mediated mRNA decay pathway by use of an interacting protein screen. Genes Dev. *9*, 437–454.

Held, W.A., and Nomura, M. (1973). Rate determining step in the reconstitution of Escherichia coli 30S ribosomal subunits. Biochemistry *12*, 3273–3281.

Held, W.A., Mizushima, S., and Nomura, M. (1973). Reconstitution of Escherichia coli 30 S ribosomal subunits from purified molecular components. J. Biol. Chem. *248*, 5720–5730.

Henras, A., Henry, Y., Bousquet-Antonelli, C., Noaillac-Depeyre, J., Gélugne, J.P., and Caizergues-Ferrer, M. (1998). Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. EMBO J. *17*, 7078–7090.

Henras, A., Dez, C., Noaillac-Depeyre, J., Henry, Y., and Caizergues-Ferrer, M. (2001). Accumulation of H/ACA snoRNPs depends on the integrity of the conserved central domain of the RNA-binding protein Nhp2p. Nucleic Acids Res. *29*, 2733–2746.

Henras, A.K., Bertrand, E., and Chanfreau, G. (2004a). A cotranscriptional model for 3'-end processing of the Saccharomyces cerevisiae pre-ribosomal RNA precursor. RNA *10*, 1572–1585.

Henras, A.K., Capeyrou, R., Henry, Y., and Caizergues-Ferrer, M. (2004b). Cbf5p, the putative pseudouridine synthase of H/ACA-type snoRNPs, can form a complex with

Gar1p and Nop10p in absence of Nhp2p and box H/ACA snoRNAs. RNA *10*, 1704–1712.

Henras, A.K., Dez, C., and Henry, Y. (2004c). RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. Curr. Opin. Struct. Biol. *14*, 335–343.

Henríquez, R., Blobel, G., and Aris, J.P. (1990). Isolation and sequencing of NOP1. A yeast gene encoding a nucleolar protein homologous to a human autoimmune antigen. J. Biol. Chem. *265*, 2209–2215.

Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., Kearsey, S., and Tollervey, D. (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. EMBO J. *13*, 2452–2463.

Hiley, S.L., Babak, T., and Hughes, T.R. (2005). Global analysis of yeast RNA processing identifies new targets of RNase III and uncovers a link between tRNA 5' end processing and tRNA splicing. Nucleic Acids Res. *33*, 3048–3056.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.-L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry. Nature *415*, 180–183.

Hoang, T., Peng, W.-T., Vanrobays, E., Krogan, N., Hiley, S., Beyer, A.L., Osheim, Y.N., Greenblatt, J., Hughes, T.R., and Lafontaine, D.L.J. (2005). Esf2p, a U3-associated factor required for small-subunit processome assembly and compaction. Mol. Cell. Biol. *25*, 5523–5534.

Hoareau-Aveilla, C., Fayet-Lebaron, E., Jády, B.E., Henras, A.K., and Kiss, T. (2012). Utp23p is required for dissociation of snR30 small nucleolar RNP from preribosomal particles. Nucleic Acids Res. *40*, 3641–3652.

Hodnett, J.L., and Busch, H. (1968). Isolation and characterization of uridylic acid-rich 7 S ribonucleic acid of rat liver nuclei. J. Biol. Chem. *243*, 6334–6342.

Van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000a). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. Mol. Cell. Biol. *20*, 441–452.

Van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000b). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. EMBO J. *19*, 1357–1365.

Horn, D.M., Mason, S.L., and Karbstein, K. (2011). Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production. J. Biol. Chem. *286*, 34082–34087.

Houseley, J., Kotovic, K., El Hage, A., and Tollervey, D. (2007). Trf4 targets ncRNAs from telomeric and rDNA spacer regions and functions in rDNA copy number control. EMBO J. *26*, 4996–5006.

Hughes, J.M. (1996). Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA. J. Mol. Biol. *259*, 645–654.

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

Hughes, J.M., Konings, D.A., and Cesareni, G. (1987). The yeast homologue of U3 snRNA. EMBO J. *6*, 2145–2155.

Hussain, T., Llácer, J.L., Fernández, I.S., Munoz, A., Martin-Marcos, P., Savva, C.G., Lorsch, J.R., Hinnebusch, A.G., and Ramakrishnan, V. (2014). Structural changes enable start codon recognition by the eukaryotic translation initiation complex. Cell *159*, 597–607.

# I

Isaac, C., Yang, Y., and Meier, U.T. (1998). Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. J. Cell Biol. *142*, 319–329.

Isaac, C., Pollard, J.W., and Meier, U.T. (2001). Intranuclear endoplasmic reticulum induced by Nopp140 mimics the nucleolar channel system of human endometrium. J. Cell. Sci. *114*, 4253–4264.

# J

Jack, K., Bellodi, C., Landry, D.M., Niederer, R.O., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Kopmar, N., Krasnykh, O., Dean, A.M., Thompson, S.R., et al. (2011). rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. Mol. Cell *44*, 660–666.

Jagannathan, I., and Culver, G.M. (2004). Ribosomal protein-dependent orientation of the 16 S rRNA environment of S15. J. Mol. Biol. *335*, 1173–1185.

Jakovljevic, J., de Mayolo, P.A., Miles, T.D., Nguyen, T.M.-L., Léger-Silvestre, I., Gas, N., and Woolford, J.L. (2004). The carboxy-terminal extension of yeast ribosomal protein S14 is necessary for maturation of 43S preribosomes. Mol. Cell *14*, 331–342.

Jakovljevic, J., Ohmayer, U., Gamalinda, M., Talkish, J., Alexander, L., Linnemann, J., Milkereit, P., and Woolford, J.L. (2012). Ribosomal proteins L7 and L8 function in concert with six $A_3$ assembly factors to propagate assembly of domains I and II of 25S rRNA in yeast 60S ribosomal subunits. RNA *18*, 1805–1822.

Jansen, R., Tollervey, D., and Hurt, E.C. (1993). A U3 snoRNP protein with homology to splicing factor PRP4 and G beta domains is required for ribosomal RNA processing. EMBO J. *12*, 2549–2558.

Jarmolowski, A., Zagorski, J., Li, H.V., and Fournier, M.J. (1990). Identification of essential elements in U14 RNA of Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. *9*, 4503–4509.

Jeeninga, R.E., Van Delft, Y., de Graaff-Vincent, M., Dirks-Mulder, A., Venema, J., and Raué, H.A. (1997). Variable regions V13 and V3 of Saccharomyces cerevisiae contain structural features essential for normal biogenesis and stability of 5.8S and 25S rRNA. RNA *3*, 476–488.

Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. Curr. Opin. Struct. Biol. *22*, 759–767.

Jeppesen, C., Stebbins-Boaz, B., and Gerbi, S.A. (1988). Nucleotide sequence determination and secondary structure of Xenopus U3 snRNA. Nucleic Acids Res. *16*, 2127–2148.

Johnson, A.W. (1997). Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. Mol. Cell. Biol. *17*, 6122–6130.

Jomaa, A., Stewart, G., Martín-Benito, J., Zielke, R., Campbell, T.L., Maddock, J.R., Brown, E.D., and Ortega, J. (2011a). Understanding ribosome assembly: the structure of in vivo assembled immature 30S subunits revealed by cryo-electron microscopy. RNA *17*, 697–709.

Jomaa, A., Stewart, G., Mears, J.A., Kireeva, I., Brown, E.D., and Ortega, J. (2011b). Cryo-electron microscopy structure of the 30S subunit in complex with the YjeQ biogenesis factor. RNA *17*, 2026–2038.

Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. Genes Dev. *18*, 2491–2505.

# K

Kaczanowska, M., and Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in Escherichia coli. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *71*, 477–494.

Karbstein, K. (2011). Inside the 40S ribosome assembly machinery. Curr Opin Chem Biol *15*, 657–663.

Karbstein, K., and Doudna, J.A. (2006). GTP-dependent formation of a ribonucleoprotein subcomplex required for ribosome biogenesis. J. Mol. Biol. *356*, 432–443.

Karbstein, K., Jonas, S., and Doudna, J.A. (2005). An essential GTPase promotes assembly of preribosomal RNA processing complexes. Mol. Cell *20*, 633–643.

Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.A., and Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. Cell *60*, 897–908.

Kast, J. (2008). Making connections for life: an in vivo map of the yeast interactome. HFSP J *2*, 244–250.

Kempers-Veenstra, A.E., Oliemans, J., Offenberg, H., Dekker, A.F., Piper, P.W., Planta, R.J., and Klootwijk, J. (1986). 3'-End formation of transcripts from the yeast rRNA operon. EMBO J. *5*, 2703–2710.

Kenna, M., Stevens, A., McCammon, M., and Douglas, M.G. (1993). An essential yeast gene with homology to the exonuclease-encoding XRN1/KEM1 gene also encodes a protein with exoribonuclease activity. Mol. Cell. Biol. *13*, 341–350.

Khaitovich, P., Mankin, A.S., Green, R., Lancaster, L., and Noller, H.F. (1999). Characterization of functionally active subribosomal particles from Thermus aquaticus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 85–90.

King, T.C., Sirdeshmukh, R., and Schlessinger, D. (1984). RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of Escherichia coli pre-23S rRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *81*, 185–188.

King, T.H., Decatur, W.A., Bertrand, E., Maxwell, E.S., and Fournier, M.J. (2001). A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. Mol. Cell. Biol. *21*, 7731–7746.

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

Kiparisov, S., Petrov, A., Meskauskas, A., Sergiev, P.V., Dontsova, O.A., and Dinman, J.D. (2005). Structural and functional analysis of 5S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Genet. Genomics *274*, 235–247.

Kiss, A.M., Jády, B.E., Darzacq, X., Verheggen, C., Bertrand, E., and Kiss, T. (2002). A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains. Nucleic Acids Res. *30*, 4643–4649.

Kiss, T., Fayet-Lebaron, E., and Jády, B.E. (2010). Box H/ACA small ribonucleoproteins. Mol. Cell *37*, 597–606.

Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. Cell *85*, 1077–1088.

Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. Science *334*, 941–948.

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

Klootwijk, J., van den Bos, R.C., and Planta, R.J. (1972). Secondary methylation of yeast ribosomal RNA. FEBS Lett. *27*, 102–106.

Knox, A.A., McKeegan, K.S., Debieux, C.M., Traynor, A., Richardson, H., and Watkins, N.J. (2011). A weak C' box renders U3 snoRNA levels dependent on hU3-55K binding. Mol. Cell. Biol. *31*, 2404–2412.

Komili, S., and Roth, F.P. (2007). Genetic interaction screens advance in reverse. Genes Dev. *21*, 137–142.

Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. Cell *131*, 557–571.

Korostelev, A., Ermolenko, D.N., and Noller, H.F. (2008). Structural dynamics of the ribosome. Curr Opin Chem Biol *12*, 674–683.

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

Kos, M., and Tollervey, D. (2010). Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. Mol. Cell *37*, 809–820.

Kowalak, J.A., Dalluge, J.J., McCloskey, J.A., and Stetter, K.O. (1994). The role of posttranscriptional modification in stabilization of transfer RNA from hyperthermophiles. Biochemistry *33*, 7869–7876.

Kressler, D., de la Cruz, J., Rojo, M., and Linder, P. (1997). Fal1p is an essential DEAD-box protein involved in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *17*, 7283–7294.

Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2010). Driving ribosome assembly. Biochim. Biophys. Acta *1803*, 673–683.

Kressler, D., Bange, G., Ogawa, Y., Stjepanovic, G., Bradatsch, B., Pratte, D., Amlacher, S., Strauß, D., Yoneda, Y., Katahira, J., et al. (2012a). Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. Science *338*, 666–671.

Kressler, D., Hurt, E., Bergler, H., and Bassler, J. (2012b). The power of AAA-ATPases on the road of pre-60S ribosome maturation--molecular machines that strip pre-ribosomal particles. Biochim. Biophys. Acta *1823*, 92–100.

Kristensen, A.R., and Foster, L.J. (2014). Protein correlation profiling-SILAC to study protein-protein interactions. Methods Mol. Biol. *1188*, 263–270.

Krogan, N.J., Peng, W.-T., Cagney, G., Robinson, M.D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D.P., et al. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. Mol. Cell *13*, 225–239.

Krol, A., Machatt, M.A., Branlant, C., and Ebel, J.P. (1978). RNA-RNA interactions in the binding site of protein L24 on 23S ribosomal RNA of E. coli. II. Sequence analysis of the interacting fragments. Nucleic Acids Res. *5*, 4933–4947.

Kudla, G., Granneman, S., Hahn, D., Beggs, J.D., and Tollervey, D. (2011). Cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids reveals RNA-RNA interactions in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 10010–10015.

Kufel, J., and Tollervey, D. (2003). 3'-processing of yeast tRNATrp precedes 5'-processing. RNA *9*, 202–208.

Kufel, J., Dichtl, B., and Tollervey, D. (1999). Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. RNA *5*, 909–917.

Kufel, J., Allmang, C., Chanfreau, G., Petfalski, E., Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (2000). Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. Mol. Cell. Biol. *20*, 5415–5424.

Kufel, J., Allmang, C., Petfalski, E., Beggs, J., and Tollervey, D. (2003a). Lsm Proteins are required for normal processing and stability of ribosomal RNAs. J. Biol. Chem. *278*, 2147–2156.

Kufel, J., Allmang, C., Verdone, L., Beggs, J., and Tollervey, D. (2003b). A complex pathway for 3' processing of the yeast U3 snoRNA. Nucleic Acids Res. *31*, 6788–6797.

# L

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

Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (1998). Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs. Trends Biochem. Sci. *23*, 383–388.

Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (1999). Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. RNA *5*, 455–467.

Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (2000). Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. Mol. Cell. Biol. *20*, 2650–2659.

Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 514–520.

Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A.L., Desgrès, J., and Vandenhaute, J. (1994). The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. J. Mol. Biol. *241*, 492–497.

Lafontaine, D.L., Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M., and Tollervey, D. (1998a). The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. Genes Dev. *12*, 527–537.

Lafontaine, D.L., Preiss, T., and Tollervey, D. (1998b). Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? Mol. Cell. Biol. *18*, 2360–2370.

Lamanna, A.C., and Karbstein, K. (2009). Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 14259–14264.

Lamanna, A.C., and Karbstein, K. (2011). An RNA conformational switch regulates pre-18S rRNA cleavage. J. Mol. Biol. *405*, 3–17.

Lamb, J.R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995). Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? Trends Biochem. Sci. *20*, 257–259.

Lane, B.G., Ofengand, J., and Gray, M.W. (1995). Pseudouridine and O2'-methylated nucleosides. Significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins. Biochimie *77*, 7–15.

Larimer, F.W., Hsu, C.L., Maupin, M.K., and Stevens, A. (1992). Characterization of the XRN1 gene encoding a 5'-->3' exoribonuclease: sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-disrupted yeast cells. Gene *120*, 51–57.

Leary, D.J., Terns, M.P., and Huang, S. (2004). Components of U3 snoRNA-containing complexes shuttle between nuclei and the cytoplasm and differentially localize in nucleoli: implications for assembly and function. Mol. Biol. Cell *15*, 281–293.

Lebaron, S., Froment, C., Fromont-Racine, M., Rain, J.-C., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M., and Henry, Y. (2005). The splicing ATPase prp43p is a component of multiple preribosomal particles. Mol. Cell. Biol. *25*, 9269–9282.

Lebaron, S., Papin, C., Capeyrou, R., Chen, Y.-L., Froment, C., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M., Grigoriev, M., and Henry, Y. (2009). The ATPase and helicase activities of Prp43p are stimulated by the G-patch protein Pfa1p during yeast ribosome biogenesis. EMBO J. *28*, 3808–3819.

Lee, S.J., and Baserga, S.J. (1999). Imp3p and Imp4p, two specific components of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein that are essential for pre-18S rRNA processing. Mol. Cell. Biol. *19*, 5441–5452.

Léger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J.-C., Choesmel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., and Gleizes, P.-E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. EMBO J. *23*, 2336–2347.

Léger-Silvestre, I., Caffrey, J.M., Dawaliby, R., Alvarez-Arias, D.A., Gas, N., Bertolone, S.J., Gleizes, P.-E., and Ellis, S.R. (2005). Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. J. Biol. Chem. *280*, 38177–38185.

Leidig, C., Thoms, M., Holdermann, I., Bradatsch, B., Berninghausen, O., Bange, G., Sinning, I., Hurt, E., and Beckmann, R. (2014). 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. Nat Commun *5*, 3491.

Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. J. Mol. Biol. *317*, 41–72.

Lemay, V., Hossain, A., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., and Dragon, F. (2011). Identification of novel proteins associated with yeast snR30 small nucleolar RNA. Nucleic Acids Res. *39*, 9659–9670.

Lempiäinen, H., and Shore, D. (2009). Growth control and ribosome biogenesis. Curr. Opin. Cell Biol. *21*, 855–863.

Lempicki, R.A., Jarmolowski, A., Huang, G.Y., Li, H.V., and Fournier, M.J. (1990). Mutations in conserved domains of U14 RNA impair 18S ribosomal RNA production in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biol. Rep. *14*, 119–120.

Létoquart, J., Huvelle, E., Wacheul, L., Bourgeois, G., Zorbas, C., Graille, M., Heurgué-Hamard, V., and Lafontaine, D.L.J. (2014). Structural and functional studies of Bud23-Trm112 reveal 18S rRNA N7-G1575 methylation occurs on late 40S precursor ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *111*, E5518–E5526.

Lewis, J.D., and Tollervey, D. (2000). Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. Science *288*, 1385–1389.

Li, D., and Fournier, M.J. (1992). U14 function in Saccharomyces cerevisiae can be provided by large deletion variants of yeast U14 and hybrid mouse-yeast U14 RNAs. EMBO J. *11*, 683–689.

Li, L., and Ye, K. (2006). Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle. Nature *443*, 302–307.

Liang, W.Q., and Fournier, M.J. (1997). Synthesis of functional eukaryotic ribosomal RNAs in trans: development of a novel in vivo rDNA system for dissecting ribosome biogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *94*, 2864–2868.

Liang, X.-H., and Fournier, M.J. (2006). The helicase Has1p is required for snoRNA release from pre-rRNA. Mol. Cell. Biol. *26*, 7437–7450.

Liang, B., Zhou, J., Kahen, E., Terns, R.M., Terns, M.P., and Li, H. (2009). Structure of a functional ribonucleoprotein pseudouridine synthase bound to a substrate RNA. Nat. Struct. Mol. Biol. *16*, 740–746.

Liang, X., Liu, Q., and Fournier, M.J. (2007). rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. Mol. Cell *28*, 965–977.

Liang, X., Liu, Q., Liu, Q., King, T.H., and Fournier, M.J. (2010). Strong dependence between functional domains in a dual-function snoRNA infers coupling of rRNA processing and modification events. Nucleic Acids Res. *38*, 3376–3387.

Lim, Y.H., Charette, J.M., and Baserga, S.J. (2011). Assembling a protein-protein interaction map of the SSU processome from existing datasets. PLoS ONE *6*, e17701.

Lin, H., Nguyen, P., and Vancura, A. (2002). Phospholipase C interacts with Sgd1p and is required for expression of GPD1 and osmoresistance in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Genet. Genomics *267*, 313–320.

Lin, J., Lai, S., Jia, R., Xu, A., Zhang, L., Lu, J., and Ye, K. (2011). Structural basis for site-specific ribose methylation by box C/D RNA protein complexes. Nature *469*, 559–563.

Lindahl, L., Archer, R.H., and Zengel, J.M. (1992). A new rRNA processing mutant of Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *20*, 295–301.

Linder, P. (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. Nucleic Acids Res. *34*, 4168–4180.

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

Liu, J., and Lilley, D.M.J. (2007). The role of specific 2'-hydroxyl groups in the stabilization of the folded conformation of kink-turn RNA. RNA *13*, 200–210.

Liu, P.C., and Thiele, D.J. (2001). Novel stress-responsive genes EMG1 and NOP14 encode conserved, interacting proteins required for 40S ribosome biogenesis. Mol. Biol. Cell *12*, 3644–3657.

Liu, N., Xiao, Z.-D., Yu, C.-H., Shao, P., Liang, Y.-T., Guan, D.-G., Yang, J.-H., Chen, C.-L., Qu, L.-H., and Zhou, H. (2009). SnoRNAs from the filamentous fungus Neurospora crassa: structural, functional and evolutionary insights. BMC Genomics *10*, 515.

Llácer, J.L., Hussain, T., Marler, L., Aitken, C.E., Thakur, A., Lorsch, J.R., Hinnebusch, A.G., and Ramakrishnan, V. (2015). Conformational Differences between Open and Closed States of the Eukaryotic Translation Initiation Complex. Mol. Cell *59*, 399–412.

Loar, J.W., Seiser, R.M., Sundberg, A.E., Sagerson, H.J., Ilias, N., Zobel-Thropp, P., Craig, E.A., and Lycan, D.E. (2004). Genetic and biochemical interactions among Yar1, Ltv1 and Rps3 define novel links between environmental stress and ribosome biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *168*, 1877–1889.

Lübben, B., Marshallsay, C., Rottmann, N., and Lührmann, R. (1993). Isolation of U3 snoRNP from CHO cells: a novel 55 kDa protein binds to the central part of U3 snoRNA. Nucleic Acids Res. *21*, 5377–5385.

Lukowiak, A.A., Granneman, S., Mattox, S.A., Speckmann, W.A., Jones, K., Pluk, H., Venrooij, W.J., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2000). Interaction of the U3-55k protein with U3 snoRNA is mediated by the box B/C motif of U3 and the WD repeats of U3-55k. Nucleic Acids Res. *28*, 3462–3471.

Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D., and Séraphin, B. (1996a). Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. Science *272*, 268–270.

Lygerou, Z., Pluk, H., van Venrooij, W.J., and Séraphin, B. (1996b). hPop1: an autoantigenic protein subunit shared by the human RNase P and RNase MRP ribonucleoproteins. EMBO J. *15*, 5936–5948.

# M

Machatt, M.A., Ebel, J.P., and Branlant, C. (1981). The 3'-terminal region of bacterial 23S ribosomal RNA: structure and homology with the 3'-terminal region of eukaryotic 28S rRNA and with chloroplast 4.5s rRNA. Nucleic Acids Res. *9*, 1533–1549.

Maden, B.E. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. *39*, 241–303.

Maden, T. (1996). Ribosomal RNA. Click here for methylation. Nature *383*, 675–676.

Mangiarotti, G., and Chiaberge, S. (1997). Reconstitution of functional eukaryotic ribosomes from Dictyostelium discoideum ribosomal proteins and RNA. J. Biol. Chem. *272*, 19682–19687.

Manival, X., Jacquemin, C., Charpentier, B., and Quinternet, M. (2015). (1)H, (15)N and (13)C resonance assignments of the yeast Pih1 and Tah1 C-terminal domains complex. Biomol NMR Assign *9*, 71–73.

Marmier-Gourrier, N., Cléry, A., Senty-Ségault, V., Charpentier, B., Schlotter, F., Leclerc, F., Fournier, R., and Branlant, C. (2003). A structural, phylogenetic, and functional study of 15.5-kD/Snu13 protein binding on U3 small nucleolar RNA. RNA *9*, 821–838.

Marmier-Gourrier, N., Cléry, A., Schlotter, F., Senty-Ségault, V., and Branlant, C. (2011). A second base pair interaction between U3 small nucleolar RNA and the 5'-ETS region is required for early cleavage of the yeast pre-ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. *39*, 9731–9745.

Marsden, S., Nardelli, M., Linder, P., and McCarthy, J.E.G. (2006). Unwinding single RNA molecules using helicases involved in eukaryotic translation initiation. J. Mol. Biol. *361*, 327–335.

Marshallsay, C., Connelly, S., and Filipowicz, W. (1992). Characterization of the U3 and U6 snRNA genes from wheat: U3 snRNA genes in monocot plants are transcribed by RNA polymerase III. Plant Mol. Biol. *19*, 973–983.

Martin, R., Straub, A.U., Doebele, C., and Bohnsack, M.T. (2013). DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. RNA Biol *10*, 4–18.

Martín-Marcos, P., Hinnebusch, A.G., and Tamame, M. (2007). Ribosomal protein L33 is required for ribosome biogenesis, subunit joining, and repression of GCN4 translation. Mol. Cell. Biol. *27*, 5968–5985.

Marz, M., and Stadler, P.F. (2009). Comparative analysis of eukaryotic U3 snoRNA. RNA Biol *6*, 503–507.

Mattaj, I.W., Tollervey, D., and Séraphin, B. (1993). Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA processing. FASEB J. *7*, 47–53.

Mayer, C., and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. Oncogene *25*, 6384–6391.

Mazan, S., and Bachellerie, J.P. (1988). Structure and organization of mouse U3B RNA functional genes. J. Biol. Chem. *263*, 19461–19467.

Mazan, S., and Bachellerie, J.P. (1990). Organization of the gene family encoding mouse U3B RNA: role of gene conversions in its concerted evolution. Gene *94*, 263–272.

McKeegan, K.S., Debieux, C.M., Boulon, S., Bertrand, E., and Watkins, N.J. (2007). A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly. Mol. Cell. Biol. *27*, 6782–6793.

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

Méreau, A., Fournier, R., Grégoire, A., Mougin, A., Fabrizio, P., Lührmann, R., and Branlant, C. (1997). An in vivo and in vitro structure-function analysis of the Saccharomyces cerevisiae U3A snoRNP: protein-RNA contacts and base-pair interaction with the pre-ribosomal RNA. J. Mol. Biol. *273*, 552–571.

Mészáros, B., Simon, I., and Dosztányi, Z. (2009). Prediction of protein binding regions in disordered proteins. PLoS Comput. Biol. *5*, e1000376.

Milkereit, P., Kühn, H., Gas, N., and Tschochner, H. (2003). The pre-ribosomal network. Nucleic Acids Res. *31*, 799–804.

Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969a). Extrachromosomal nucleolar genes in amphibian oocytes. Genetics *61*, Suppl:133–143.

Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969b). Visualization of nucleolar genes. Science *164*, 955–957.

Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969c). Portrait of a gene. J. Cell. Physiol. *74*, Suppl 1:225+.

Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1996). The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. Genes Dev. *10*, 502–513.

Miyoshi, K., Tsujii, R., Yoshida, H., Maki, Y., Wada, A., Matsui, Y., Toh-E, A., and Mizuta, K. (2002). Normal assembly of 60 S ribosomal subunits is required for the signaling in response to a secretory defect in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. *277*, 18334–18339.

Moore, T., Zhang, Y., Fenley, M.O., and Li, H. (2004). Molecular basis of box C/D RNA-protein interactions; cocrystal structure of archaeal L7Ae and a box C/D RNA. Structure *12*, 807–818.

Morita, D., Miyoshi, K., Matsui, Y., Toh-E, A., Shinkawa, H., Miyakawa, T., and Mizuta, K. (2002). Rpf2p, an evolutionarily conserved protein, interacts with ribosomal protein L11 and is essential for the processing of 27 SB Pre-rRNA to 25 S rRNA and the 60 S ribosomal subunit assembly in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. *277*, 28780–28786.

Moritz, M., Paulovich, A.G., Tsay, Y.F., and Woolford, J.L. (1990). Depletion of yeast ribosomal proteins L16 or rp59 disrupts ribosome assembly. J. Cell Biol. *111*, 2261–2274.

Morlando, M., Ballarino, M., Greco, P., Caffarelli, E., Dichtl, B., and Bozzoni, I. (2004). Coupling between snoRNP assembly and 3' processing controls box C/D snoRNA biosynthesis in yeast. EMBO J. *23*, 2392–2401.

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

Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J., and Bordonné, R. (2002). Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. Mol. Cell *9*, 891–901.

Mougey, E.B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O.L., Beyer, A., and Sollner-Webb, B. (1993a). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. Genes Dev. *7*, 1609–1619.

Mougey, E.B., Pape, L.K., and Sollner-Webb, B. (1993b). A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of Xenopus precursor rRNA. Mol. Cell. Biol. *13*, 5990–5998.

Mougin, A., Grégoire, A., Banroques, J., Ségault, V., Fournier, R., Brulé, F., Chevrier-Miller, M., and Branlant, C. (1996). Secondary structure of the yeast Saccharomyces cerevisiae pre-U3A snoRNA and its implication for splicing efficiency. RNA *2*, 1079–1093.

Mougin, A., Gottschalk, A., Fabrizio, P., Lührmann, R., and Branlant, C. (2002). Direct probing of RNA structure and RNA-protein interactions in purified HeLa cell's and yeast spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP particles. J. Mol. Biol. *317*, 631–649.

Muller, S., Charpentier, B., Branlant, C., and Leclerc, F. (2007a). A dedicated computational approach for the identification of archaeal H/ACA sRNAs. Meth. Enzymol. *425*, 355–387.

Muller, S., Fourmann, J.-B., Loegler, C., Charpentier, B., and Branlant, C. (2007b). Identification of determinants in the protein partners aCBF5 and aNOP10 necessary for the tRNA:Psi55-synthase and RNA-guided RNA:Psi-synthase activities. Nucleic Acids Res. *35*, 5610–5624.

Muller, S., Leclerc, F., Behm-Ansmant, I., Fourmann, J.-B., Charpentier, B., and Branlant, C. (2008). Combined in silico and experimental identification of the Pyrococcus abyssi H/ACA sRNAs and their target sites in ribosomal RNAs. Nucleic Acids Res. *36*, 2459–2475.

Mullineux, S.-T., and Lafontaine, D.L.J. (2012). Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? Biochimie *94*, 1521–1532.

Myslinski, E., Ségault, V., and Branlant, C. (1990). An intron in the genes for U3 small nucleolar RNAs of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Science *247*, 1213–1216.

# N

Narla, A., and Ebert, B.L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. Blood *115*, 3196–3205.

Neefs, J.M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., and De Wachter, R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. Nucleic Acids Res. *21*, 3025–3049.

Neueder, A., Jakob, S., Pöll, G., Linnemann, J., Deutzmann, R., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2010). A local role for the small ribosomal subunit primary binder rpS5 in final 18S rRNA processing in yeast. PLoS ONE *5*, e10194.

Ni, J., Tien, A.L., and Fournier, M.J. (1997). Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. Cell *89*, 565–573.

Nicoloso, M., Qu, L.H., Michot, B., and Bachellerie, J.P. (1996). Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs: the characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs. J. Mol. Biol. *260*, 178–195.

Nierhaus, K.H. (1991). The assembly of prokaryotic ribosomes. Biochimie *73*, 739–755.

Nierhaus, K.H., and Dohme, F. (1974). Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *71*, 4713–4717.

Niewmierzycka, A., and Clarke, S. (1999). S-Adenosylmethionine-dependent methylation in Saccharomyces cerevisiae. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. J. Biol. Chem. *274*, 814–824.

Nissan, T.A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. EMBO J. *21*, 5539–5547.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000a). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science *289*, 920–930.

Nissen, P., Kjeldgaard, M., and Nyborg, J. (2000b). Macromolecular mimicry. EMBO J. *19*, 489–495.

Niu, X.H., Hartshorne, T., He, X.Y., and Agabian, N. (1994). Characterization of putative small nuclear RNAs from Giardia lamblia. Mol. Biochem. Parasitol. *66*, 49–57.

Nogi, Y., Vu, L., and Nomura, M. (1991a). An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *88*, 7026–7030.

Nogi, Y., Yano, R., and Nomura, M. (1991b). Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of Saccharomyces cerevisiae defective in RNA polymerase I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *88*, 3962–3966.

Nomura, M. (1990). Early days of ribosome research. Trends Biochem. Sci. *15*, 244–247.

Nottrott, S., Hartmuth, K., Fabrizio, P., Urlaub, H., Vidovic, I., Ficner, R., and Lührmann, R. (1999). Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA. EMBO J. *18*, 6119–6133.

Nottrott, S., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2002). Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. EMBO J. *21*, 5527–5538.

Van Nues, R.W., Rientjes, J.M., Morré, S.A., Mollee, E., Planta, R.J., Venema, J., and Raué, H.A. (1995a). Evolutionarily conserved structural elements are critical for processing of Internal Transcribed Spacer 2 from Saccharomyces cerevisiae precursor ribosomal RNA. J. Mol. Biol. *250*, 24–36.

Van Nues, R.W., Venema, J., Rientjes, J.M., Dirks-Mulder, A., and Raué, H.A. (1995b). Processing of eukaryotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers. Biochem. Cell Biol. *73*, 789–801.

Van Nues, R.W., Venema, J., Planta, R.J., and Raué, H.A. (1997). Variable region V1 of Saccharomyces cerevisiae 18S rRNA participates in biogenesis and function of the small ribosomal subunit. Chromosoma *105*, 523–531.

Van Nues, R.W., Granneman, S., Kudla, G., Sloan, K.E., Chicken, M., Tollervey, D., and Watkins, N.J. (2011). Box C/D snoRNP catalysed methylation is aided by additional pre-rRNA base-pairing. EMBO J. *30*, 2420–2430.

# O

Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2004). A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. Genes Dev. *18*, 196–209.

Oeffinger, M., Zenklusen, D., Ferguson, A., Wei, K.E., El Hage, A., Tollervey, D., Chait, B.T., Singer, R.H., and Rout, M.P. (2009). Rrp17p is a eukaryotic exonuclease required for 5' end processing of Pre-60S ribosomal RNA. Mol. Cell *36*, 768–781.

Ofengand, J., and Del Campo, M. (2004). Modified Nucleosides of Escherichia coli Ribosomal RNA. Ecosal Plus *1*.

Ofengand, J., Malhotra, A., Remme, J., Gutgsell, N.S., Del Campo, M., Jean-Charles, S., Peil, L., and Kaya, Y. (2001). Pseudouridines and pseudouridine synthases of the ribosome. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *66*, 147–159.

Ohmayer, U., Gamalinda, M., Sauert, M., Ossowski, J., Pöll, G., Linnemann, J., Hierlmeier, T., Perez-Fernandez, J., Kumcuoglu, B., Leger-Silvestre, I., et al. (2013). Studies on the assembly characteristics of large subunit ribosomal proteins in S. cerevisae. PLoS ONE *8*, e68412.

Omer, A.D., Ziesche, S., Ebhardt, H., and Dennis, P.P. (2002). In vitro reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 5289–5294.

Oruganti, S. vdya, Zhang, Y., and Li, H. (2005). Structural comparison of yeast snoRNP and spliceosomal protein Snu13p with its homologs. Biochem. Biophys. Res. Commun. *333*, 550–554.

Osheim, Y.N., French, S.L., Keck, K.M., Champion, E.A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S.J., and 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*, 943–954.

# P

Parker, K.A., and Steitz, J.A. (1987). Structural analysis of the human U3 ribonucleoprotein particle reveal a conserved sequence available for base pairing with pre-rRNA. Mol. Cell. Biol. *7*, 2899–2913.

Peculis, B. (1997a). RNA processing: pocket guides to ribosomal RNA. Curr. Biol. *7*, R480–R482.

Peculis, B.A. (1997b). The sequence of the 5' end of the U8 small nucleolar RNA is critical for 5.8S and 28S rRNA maturation. Mol. Cell. Biol. *17*, 3702–3713.

Peculis, B.A., and Greer, C.L. (1998). The structure of the ITS2-proximal stem is required for pre-rRNA processing in yeast. RNA *4*, 1610–1622.

Peculis, B.A., and Steitz, J.A. (1993). Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the Xenopus oocyte. Cell *73*, 1233–1245.

Peisker, K., Braun, D., Wölfle, T., Hentschel, J., Fünfschilling, U., Fischer, G., Sickmann, A., and Rospert, S. (2008). Ribosome-associated complex binds to ribosomes in close proximity of Rpl31 at the exit of the polypeptide tunnel in yeast. Mol. Biol. Cell *19*, 5279–5288.

Peng, W.T., Robinson, M.D., Mnaimneh, S., Krogan, N.J., Cagney, G., Morris, Q., Davierwala, A.P., Grigull, J., Yang, X., Zhang, W., et al. (2003). A panoramic view of yeast noncoding RNA processing. Cell *113*, 919–933.

Peng, W.-T., Krogan, N.J., Richards, D.P., Greenblatt, J.F., and Hughes, T.R. (2004). ESF1 is required for 18S rRNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *32*, 1993–1999.

Pérez-Fernández, J., Román, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X.R., and Dosil, M. (2007). The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. Mol. Cell. Biol. *27*, 5414–5429.

Pérez-Fernández, J., Martín-Marcos, P., and 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*, 8105–8121.

Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., Schäfer, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. J. Biol. Chem. *284*, 35079–35091.

Petfalski, E., Dandekar, T., Henry, Y., and Tollervey, D. (1998). Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. Mol. Cell. Biol. *18*, 1181–1189.

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

Piper, P.W., Bellatin, J.A., and Lockheart, A. (1983). Altered maturation of sequences at the 3' terminus of 5S gene transcripts in a Saccharomyces cerevisiae mutant that lacks a RNA processing endonuclease. EMBO J. *2*, 353–359.

Piper, P.W., Patel, N., and Lockheart, A. (1984). Processing of the 3' sequence extensions upon the 5S rRNA of a mutant yeast in Xenopus laevis germinal vesicle extract. Eur. J. Biochem. *141*, 115–118.

Pluk, H., Soffner, J., Lührmann, R., and van Venrooij, W.J. (1998). cDNA cloning and characterization of the human U3 small nucleolar ribonucleoprotein complex-associated 55-kilodalton protein. Mol. Cell. Biol. *18*, 488–498.

Pogacić, V., Dragon, F., and Filipowicz, W. (2000). Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. Mol. Cell. Biol. *20*, 9028–9040.

Pöll, G., Braun, T., Jakovljevic, J., Neueder, A., Jakob, S., Woolford, J.L., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2009). rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins. PLoS ONE *4*, e8249.

Porter, G.L., Brennwald, P.J., Holm, K.A., and Wise, J.A. (1988). The sequence of U3 from Schizosaccharomyces pombe suggests structural divergence of this snRNA between metazoans and unicellular eukaryotes. Nucleic Acids Res. *16*, 10131–10152.

Pradet-Balade, B., Girard, C., Boulon, S., Paul, C., Azzag, K., Bordonné, R., Bertrand, E., and Verheggen, C. (2011). CRM1 controls the composition of nucleoplasmic pre-snoRNA complexes to licence them for nucleolar transport. EMBO J. *30*, 2205–2218.

Prestayko, A.W., Tonato, M., and Busch, H. (1970). Low molecular weight RNA associated with 28 s nucleolar RNA. J. Mol. Biol. *47*, 505–515.

Prieto, J.-L., and McStay, B. (2005). Nucleolar biogenesis: the first small steps. Biochem. Soc. Trans. *33*, 1441–1443.

# Q

Qiu, H., Eifert, J., Wacheul, L., Thiry, M., Berger, A.C., Jakovljevic, J., Woolford, J.L., Corbett, A.H., Lafontaine, D.L.J., Terns, R.M., et al. (2008). Identification of genes that function in the biogenesis and localization of small nucleolar RNAs in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *28*, 3686–3699.

Qu, F., Zhai, W., Chen, H., Zhu, L.H., and Morris, T.J. (1996). Cloning, characterization and transient expression of the gene encoding a rice U3 small nuclear RNA. Gene *172*, 217–220.

Qu, L.H., Henras, A., Lu, Y.J., Zhou, H., Zhou, W.X., Zhu, Y.Q., Zhao, J., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M., and Bachellerie, J.P. (1999). Seven novel methylation guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast. Mol. Cell. Biol. *19*, 1144–1158.

Quinternet, M., Rothé, B., Barbier, M., Bobo, C., Saliou, J.-M., Jacquemin, C., Back, R., Chagot, M.-E., Cianférani, S., Meyer, P., et al. (2015). Structure/Function Analysis of Protein-Protein Interactions Developed by the Yeast Pih1 Platform Protein and Its Partners in Box C/D snoRNP Assembly. J. Mol. Biol. *427*, 2816–2839.

# R

Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. Science *331*, 730–736.

Ramagopal, S. (1992). Are eukaryotic ribosomes heterogeneous? Affirmations on the horizon. Biochem. Cell Biol. *70*, 269–272.

Ramaswamy, P., and Woodson, S.A. (2009a). S16 throws a conformational switch during assembly of 30S 5’ domain. Nat. Struct. Mol. Biol. *16*, 438–445.

Ramaswamy, P., and Woodson, S.A. (2009b). Global stabilization of rRNA structure by ribosomal proteins S4, S17, and S20. J. Mol. Biol. *392*, 666–677.

Rashid, R., Aittaleb, M., Chen, Q., Spiegel, K., Demeler, B., and Li, H. (2003). Functional requirement for symmetric assembly of archaeal box C/D small ribonucleoprotein particles. J. Mol. Biol. *333*, 295–306.

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

Reddy, R., and Busch, H. (1983). Small nuclear RNAs and RNA processing. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. *30*, 127–162.

Reddy, R., Henning, D., Tan, E., and Busch, H. (1983). Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5 I RNA). J. Biol. Chem. *258*, 8352–8356.

Reddy, R., Henning, D., Chirala, S., Rothblum, L., Wright, D., and Busch, H. (1985). Isolation and characterization of three rat U3 RNA pseudogenes colinear with U3 RNA. J. Biol. Chem. *260*, 5715–5719.

Reichow, S.L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A.R., and Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. Nucleic Acids Res. *35*, 1452–1464.

Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Bermejo, B., Rodriguez-Gabriel, M.A., Guarinos, E., and Ballesta, J.P. (1995). Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *15*, 4754–4762.

Reuter, K., Nottrott, S., Fabrizio, P., Lührmann, R., and Ficner, R. (1999). Identification, characterization and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kD protein. J. Mol. Biol. *294*, 515–525.

Van Riggelen, J., and Felsher, D.W. (2010). Myc and a Cdk2 senescence switch. Nat. Cell Biol. *12*, 7–9.

Van Riggelen, J., Müller, J., Otto, T., Beuger, V., Yetil, A., Choi, P.S., Kosan, C., Möröy, T., Felsher, D.W., and Eilers, M. (2010a). The interaction between Myc and Miz1 is required to antagonize TGFbeta-dependent autocrine signaling during lymphoma formation and maintenance. Genes Dev. *24*, 1281–1294.

Van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsher, D.W. (2010b). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. Nat. Rev. Cancer *10*, 301–309.

Robledo, S., Idol, R.A., Crimmins, D.L., Ladenson, J.H., Mason, P.J., and Bessler, M. (2008). The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. RNA *14*, 1918–1929.

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

Rodríguez-Galán, O., García-Gómez, J.J., and de la Cruz, J. (2013). Yeast and human RNA helicases involved in ribosome biogenesis: current status and perspectives. Biochim. Biophys. Acta *1829*, 775–790.

Rosado, I.V., Dez, C., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y., and de la Cruz, J. (2007a). Characterization of Saccharomyces cerevisiae Npa2p (Urb2p) reveals a low-molecular-mass complex containing Dbp6p, Npa1p (Urb1p), Nop8p, and Rsa3p involved in early steps of 60S ribosomal subunit biogenesis. Mol. Cell. Biol. *27*, 1207–1221.

Rosado, I.V., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2007b). Functional analysis of Saccharomyces cerevisiae ribosomal protein Rpl3p in ribosome synthesis. Nucleic Acids Res. *35*, 4203–4213.

Rothé, B., Back, R., Quinternet, M., Bizarro, J., Robert, M.-C., Blaud, M., Romier, C., Manival, X., Charpentier, B., Bertrand, E., et al. (2014a). Characterization of the interaction between protein Snu13p/15.5K and the Rsa1p/NUFIP factor and demonstration of its functional importance for snoRNP assembly. Nucleic Acids Res. *42*, 2015–2036.

Rothé, B., Saliou, J.-M., Quinternet, M., Back, R., Tiotiu, D., Jacquemin, C., Loegler, C., Schlotter, F., Peña, V., Eckert, K., et al. (2014b). Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction. Nucleic Acids Res. *42*, 10731–10747.

Rozhdestvensky, T.S., Tang, T.H., Tchirkova, I.V., Brosius, J., Bachellerie, J.-P., and Hüttenhofer, A. (2003). Binding of L7Ae protein to the K-turn of archaeal snoRNAs: a shared RNA binding motif for C/D and H/ACA box snoRNAs in Archaea. Nucleic Acids Res. *31*, 869–877.

Rubin, G.M. (1974). Three forms of the 5.8-S ribosomal RNA species in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. *41*, 197–202.

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

# S

Sachs, A.B., and Davis, R.W. (1990). Translation initiation and ribosomal biogenesis: involvement of a putative rRNA helicase and RPL46. Science *247*, 1077–1079.

Samarsky, D.A., and Fournier, M.J. (1998). Functional mapping of the U3 small nucleolar RNA from the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *18*, 3431–3444.

Samarsky, D.A., and Fournier, M.J. (1999). A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *27*, 161–164.

Sandmeier, J.J., Celic, I., Boeke, J.D., and Smith, J.S. (2002a). Telomeric and rDNA silencing in Saccharomyces cerevisiae are dependent on a nuclear NAD(+) salvage pathway. Genetics *160*, 877–889.

Sandmeier, J.J., French, S., Osheim, Y., Cheung, W.L., Gallo, C.M., Beyer, A.L., and Smith, J.S. (2002b). RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. EMBO J. *21*, 4959–4968.

Sardana, R., Liu, X., Granneman, S., Zhu, J., Gill, M., Papoulas, O., Marcotte, E.M., Tollervey, D., Correll, C.C., and Johnson, A.W. (2015). The DEAH-box helicase Dhr1 dissociates U3 from the pre-rRNA to promote formation of the central pseudoknot. PLoS Biol. *13*, e1002083.

Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P.-E., Lebreton, A., Rousselle, J.-C., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2003). Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. Mol. Cell. Biol. *23*, 4449–4460.

Savino, R., Hitti, Y., and Gerbi, S.A. (1992). Genes for Xenopus laevis U3 small nuclear RNA. Nucleic Acids Res. *20*, 5435–5442.

Savkur, R.S., and Olson, M.O. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA byprotein B23 endoribonuclease. Nucleic Acids Res. *26*, 4508–4515.

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

Scheer, U., and Hock, R. (1999). Structure and function of the nucleolus. Curr. Opin. Cell Biol. *11*, 385–390.

Schillewaert, S., Wacheul, L., Lhomme, F., and Lafontaine, D.L.J. (2012). The evolutionarily conserved protein Las1 is required for pre-rRNA processing at both ends of ITS2. Mol. Cell. Biol. *32*, 430–444.

Schimmang, T., and Hurt, E.C. (1989). A 40 kDa nuclear membrane protein changes its concentration and localization within the nuclear envelope of the yeast Saccharomyces cerevisiae in a cell-cycle dependent manner. Eur. J. Cell Biol. *49*, 33–41.

Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R., and Hurt, E.C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. EMBO J. *8*, 4015–4024.

Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., et al. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. Cell *102*, 615–623.

Schmitt, M.E., and Clayton, D.A. (1993). Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *13*, 7935–7941.

Schmitt, M.E., Bennett, J.L., Dairaghi, D.J., and Clayton, D.A. (1993). Secondary structure of RNase MRP RNA as predicted by phylogenetic comparison. FASEB J. *7*, 208–213.

Schultz, A., Nottrott, S., Watkins, N.J., and Lührmann, R. (2006). Protein-protein and protein-RNA contacts both contribute to the 15.5K-mediated assembly of the U4/U6 snRNP and the box C/D snoRNPs. Mol. Cell. Biol. *26*, 5146–5154.

Ségault, V., Mougin, A., Grégoire, A., Banroques, J., and Branlant, C. (1992). An experimental study of Saccharomyces cerevisiae U3 snRNA conformation in solution. Nucleic Acids Res. *20*, 3443–3451.

Segerstolpe, A., Lundkvist, P., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., and Wieslander, L. (2008). Mrd1p binds to pre-rRNA early during transcription independent of U3 snoRNA and is required for compaction of the pre-rRNA into small subunit processomes. Nucleic Acids Res. *36*, 4364–4380.

Seipelt, R.L., Zheng, B., Asuru, A., and Rymond, B.C. (1999). U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. Nucleic Acids Res. *27*, 587–595.

Selinger, D.A., Porter, G.L., Brennwald, P.J., and Wise, J.A. (1992). The two similarly expressed genes encoding U3 snRNA in Schizosaccharomyces pombe lack introns. Mol. Biol. Evol. *9*, 297–308.

Selker, E.U., Stevens, J.N., and Metzenberg, R.L. (1985). Heterogeneity of 5S RNA in fungal ribosomes. Science *227*, 1340–1343.

Sharma, K., and Tollervey, D. (1999). Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 5' end of 18S rRNA is required for pre-rRNA processing. Mol. Cell. Biol. *19*, 6012–6019.

Sharma, K., Venema, J., and Tollervey, D. (1999). The 5' end of the 18S rRNA can be positioned from within the mature rRNA. RNA *5*, 678–686.

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

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

Shuai, K., and Warner, J.R. (1991). A temperature sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae defective in pre-rRNA processing. Nucleic Acids Res. *19*, 5059–5064.

Simmons, H.M., Ruis, B.L., Kapoor, M., Hudacek, A.W., and Conklin, K.F. (2005). Identification of NOM1, a nucleolar, eIF4A binding protein encoded within the chromosome 7q36 breakpoint region targeted in cases of pediatric acute myeloid leukemia. Gene *347*, 137–145.

Singh, S.K., Gurha, P., and Gupta, R. (2008). Dynamic guide-target interactions contribute to sequential 2'-O-methylation by a unique archaeal dual guide box C/D sRNP. RNA *14*, 1411–1423.

Sloof, P., Hunter, J.B., Garrett, R.A., and Branlant, C. (1978). RNA-RNA interactions in the binding site of protein L24 on 23S ribosomal RNA of Escherichia coli: 1. Evidence for their occurrence between widely separated sequence regions. Nucleic Acids Res. *5*, 3503–3513.

Smith, M.W., Meskauskas, A., Wang, P., Sergiev, P.V., and Dinman, J.D. (2001). Saturation mutagenesis of 5S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *21*, 8264–8275.

Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. Trends Biochem. Sci. *24*, 181–185.

Spahn, C.M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P.A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J. (2001). Structure of the 80S ribosome from Saccharomyces cerevisiae--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. Cell *107*, 373–386.

Spahn, C.M.T., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jørgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P.G., and Frank, J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. EMBO J. *23*, 1008–1019.

Sprang, S.R. (1997a). G protein mechanisms: insights from structural analysis. Annu. Rev. Biochem. *66*, 639–678.

Sprang, S.R. (1997b). G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. Curr. Opin. Struct. Biol. *7*, 849–856.

Srivastava, A.K., and Schlessinger, D. (1990a). Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. Annu. Rev. Microbiol. *44*, 105–129.

Srivastava, A.K., and Schlessinger, D. (1990b). Preparation of extracts and assay of ribosomal RNA maturation in Escherichia coli. Meth. Enzymol. *181*, 355–366.

Steffen, K.K., McCormick, M.A., Pham, K.M., MacKay, V.L., Delaney, J.R., Murakami, C.J., Kaeberlein, M., and Kennedy, B.K. (2012). Ribosome deficiency protects against ER stress in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *191*, 107–118.

Steitz, T.A. (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 242–253.

Steitz, J.A., Berg, C., Hendrick, J.P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J., and Yario, T. (1988). A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. J. Cell Biol. *106*, 545–556.

Steitz, J.A., Bruzik, J.P., Tyc, K., Kass, S., and Sollner-Webb, B. (1990). Molecular analyses of the functions of SL and U3 snRNPs. Mol. Biol. Rep. *14*, 123.

Stevens, A. (1978). An exoribonuclease from Saccharomyces cerevisiae: effect of modifications of 5’ end groups on the hydrolysis of substrates to 5’ mononucleotides. Biochem. Biophys. Res. Commun. *81*, 656–661.

Stevens, A. (1979). Evidence for a 5’ leads to 3’ direction of hydrolysis by a 5’ mononucleotide-producing exoribonuclease from Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun. *86*, 1126–1132.

Stevens, A. (1980). Purification and characterization of a Saccharomyces cerevisiae exoribonuclease which yields 5’-mononucleotides by a 5’ leads to 3’ mode of hydrolysis. J. Biol. Chem. *255*, 3080–3085.

Stevens, A. (2001). 5’-exoribonuclease 1: Xrn1. Meth. Enzymol. *342*, 251–259.

Stevens, A., and Maupin, M.K. (1987a). A 5’----3’ exoribonuclease of human placental nuclei: purification and substrate specificity. Nucleic Acids Res. *15*, 695–708.

Stevens, A., and Maupin, M.K. (1987b). A 5’----3’ exoribonuclease of Saccharomyces cerevisiae: size and novel substrate specificity. Arch. Biochem. Biophys. *252*, 339–347.

Stevens, A., and Poole, T.L. (1995). 5’-exonuclease-2 of Saccharomyces cerevisiae. Purification and features of ribonuclease activity with comparison to 5’-exonuclease-1. J. Biol. Chem. *270*, 16063–16069.

Stevens, A., Hsu, C.L., Isham, K.R., and Larimer, F.W. (1991). Fragments of the internal transcribed spacer 1 of pre-rRNA accumulate in Saccharomyces cerevisiae lacking 5’----3’ exoribonuclease 1. J. Bacteriol. *173*, 7024–7028.

Strunk, B.S., and Karbstein, K. (2009). Powering through ribosome assembly. RNA *15*, 2083–2104.

Strunk, B.S., Loucks, C.R., Su, M., Vashisth, H., Cheng, S., Schilling, J., Brooks, C.L., Karbstein, K., and Skiniotis, G. (2011). Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates. Science *333*, 1449–1453.

Subramanian, A.R. (1983). Structure and functions of ribosomal protein S1. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. *28*, 101–142.

Suh, D., Busch, H., and Reddy, R. (1986). Isolation and characterization of a human U3 small nucleolar RNA gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. *137*, 1133–1140.

Suh, D., Wright, D., and Reddy, R. (1991). Sequences more than 500 base pairs upstream of the human U3 small nuclear RNA gene stimulate the synthesis of U3 RNA in frog oocytes. Biochemistry *30*, 5438–5443.

Suryanarayana, T., and Subramanian, A.R. (1983). An essential function of ribosomal protein S1 in messenger ribonucleic acid translation. Biochemistry *22*, 2715–2719.

Svidritskiy, E., Brilot, A.F., Koh, C.S., Grigorieff, N., and Korostelev, A.A. (2014). Structures of yeast 80S ribosome-tRNA complexes in the rotated and nonrotated conformations. Structure *22*, 1210–1218.

Symmons, M.F., Williams, M.G., Luisi, B.F., Jones, G.H., and Carpousis, A.J. (2002). Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. Trends Biochem. Sci. *27*, 11–18.

# T

Tabb-Massey, A., Caffrey, J.M., Logsden, P., Taylor, S., Trent, J.O., and Ellis, S.R. (2003). Ribosomal proteins Rps0 and Rps21 of Saccharomyces cerevisiae have overlapping functions in the maturation of the 3’ end of 18S rRNA. Nucleic Acids Res. *31*, 6798–6805.

Tanaka, N., and Shuman, S. (2011). RtcB is the RNA ligase component of an Escherichia coli RNA repair operon. J. Biol. Chem. *286*, 7727–7731.

Tapia, H., and Morano, K.A. (2010). Hsp90 nuclear accumulation in quiescence is linked to chaperone function and spore development in yeast. Mol. Biol. Cell *21*, 63–72.

Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Serna Molina, M.M., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., and Michnick, S.W. (2008). An in vivo map of the yeast protein interactome. Science *320*, 1465–1470.

Taylor, D.J., Devkota, B., Huang, A.D., Topf, M., Narayanan, E., Sali, A., Harvey, S.C., and Frank, J. (2009). Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome. Structure *17*, 1591–1604.

Terns, M.P., and Dahlberg, J.E. (1994). Retention and 5' cap trimethylation of U3 snRNA in the nucleus. Science *264*, 959–961.

Thiry, M., and Lafontaine, D.L.J. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. Trends Cell Biol. *15*, 194–199.

Thompson, J.R., Zagorski, J., Woolford, J.L., and Fournier, M.J. (1988). Sequence and genetic analysis of a dispensible 189 nucleotide snRNA from Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *16*, 5587–5601.

Thomson, E., and Tollervey, D. (2005). Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. RNA *11*, 1215–1224.

Thomson, E., and Tollervey, D. (2010). The final step in 5.8S rRNA processing is cytoplasmic in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *30*, 976–984.

Tollervey, D. (1987a). High level of complexity of small nuclear RNAs in fungi and plants. J. Mol. Biol. *196*, 355–361.

Tollervey, D. (1987b). A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. EMBO J. *6*, 4169–4175.

Tollervey, D. (1996a). Small nucleolar RNAs guide ribosomal RNA methylation. Science *273*, 1056–1057.

Tollervey, D. (1996b). Trans-acting factors in ribosome synthesis. Exp. Cell Res. *229*, 226–232.

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

Tollervey, D., and Kiss, T. (1997). Function and synthesis of small nucleolar RNAs. Curr. Opin. Cell Biol. *9*, 337–342.

Tollervey, D., Wise, J.A., and Guthrie, C. (1983). A U4-like small nuclear RNA is dispensable in yeast. Cell *35*, 753–762.

Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., and Hurt, E.C. (1991). The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. EMBO J. *10*, 573–583.

Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E.C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. Cell *72*, 443–457.

Tomecki, R., Drazkowska, K., Krawczyk, A., Kowalska, K., and Dziembowski, A. (2015a). Purification of eukaryotic exoribonucleases following heterologous expression in bacteria and analysis of their biochemical properties by in vitro enzymatic assays. Methods Mol. Biol. *1259*, 417–452.

Tomecki, R., Labno, A., Drazkowska, K., Cysewski, D., and Dziembowski, A. (2015b). hUTP24 is essential for processing of the human rRNA precursor at site A1, but not at site A0. RNA Biol *12*, 1010–1029.

Torchet, C., and Hermann-Le Denmat, S. (2000). Bypassing the rRNA processing endonucleolytic cleavage at site A2 in Saccharomyces cerevisiae. RNA *6*, 1498–1508.

Torchet, C., and Hermann-Le Denmat, S. (2002). High dosage of the small nucleolar RNA snR10 specifically suppresses defects of a yeast rrp5 mutant. Mol. Genet. Genomics *268*, 70–80.

Torchet, C., Jacq, C., and Hermann-Le Denmat, S. (1998). Two mutant forms of the S1/TPR-containing protein Rrp5p affect the 18S rRNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae. RNA *4*, 1636–1652.

Toussaint, M., Levasseur, G., Tremblay, M., Paquette, M., and Conconi, A. (2005). Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I--transcribed ribosomal genes. Biochem. Cell Biol. *83*, 449–459.

Trapman, J., and Planta, R.J. (1975). Detailed analysis of the ribosomal RNA synthesis in yeast. Biochim. Biophys. Acta *414*, 115–125.

Trapman, J., De Jonge, P., and Planta, R.J. (1975a). On the biosynthesis of 5.8 S ribosomal RNA in yeast. FEBS Lett. *57*, 26–30.

Trapman, J., Retèl, J., and Planta, R.J. (1975b). Ribosomal precursor particles from yeast. Exp. Cell Res. *90*, 95–104.

Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y.W., Urcia, R., Boisvert, F.-M., Vandermoere, F., Morrice, N.A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H., et al. (2008). Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. J. Cell Biol. *183*, 223–239.

Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. Trends Cell Biol. *13*, 255–263.

Tyc, K., and Steitz, J.A. (1989). U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. EMBO J. *8*, 3113–3119.

Tycowski, K.T., Shu, M.D., and Steitz, J.A. (1993). A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3. Genes Dev. *7*, 1176–1190.

# U

Udem, S.A., and Warner, J.R. (1972). Ribosomal RNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. *65*, 227–242.

Ulbrich, C., Diepholz, M., Bassler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Böttcher, B., and Hurt, E. (2009). Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. Cell *138*, 911–922.

# V

Vanrobays, E., Gelugne, J.-P., Gleizes, P.-E., and Caizergues-Ferrer, M. (2003). Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *23*, 2083–2095.

Vanrobays, E., Gélugne, J.-P., Caizergues-Ferrer, M., and Lafontaine, D.L.J. (2004). Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis. RNA *10*, 645–656.

Veldman, G.M., Klootwijk, J., de Regt, V.C., Planta, R.J., Branlant, C., Krol, A., and Ebel, J.P. (1981a). The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. Nucleic Acids Res. *9*, 6935–6952.

Veldman, G.M., Klootwijk, J., van Heerikhuizen, H., and Planta, R.J. (1981b). The nucleotide sequence of the intergenic region between the 5.8S and 26S rRNA genes of the yeast ribosomal RNA operon. Possible implications for the interaction between 5.8S and 26S rRNA and the processing of the primary transcript. Nucleic Acids Res. *9*, 4847–4862.

Venema, J., and Tollervey, D. (1996). RRP5 is required for formation of both 18S and 5.8S rRNA in yeast. EMBO J. *15*, 5701–5714.

Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Annu. Rev. Genet. *33*, 261–311.

Venema, J., Dirks-Mulder, A., Faber, A.W., and Raué, H.A. (1995). Development and application of an in vivo system to study yeast ribosomal RNA biogenesis and function. Yeast *11*, 145–156.

Venema, J., Bousquet-Antonelli, C., Gelugne, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Tollervey, D. (1997). Rok1p is a putative RNA helicase required for rRNA processing. Mol. Cell. Biol. *17*, 3398–3407.

Venema, J., Planta, R.J., and Raué, H.A. (1998). In vivo mutational analysis of ribosomal RNA in Saccharomyces cerevisiae. Methods Mol. Biol. *77*, 257–270.

Venema, J., Vos, H.R., Faber, A.W., van Venrooij, W.J., and Raué, H.A. (2000). Yeast Rrp9p is an evolutionarily conserved U3 snoRNP protein essential for early pre-rRNA processing cleavages and requires box C for its association. RNA *6*, 1660–1671.

Verheggen, C., Mouaikel, J., Thiry, M., Blanchard, J.M., Tollervey, D., Bordonné, R., Lafontaine, D.L., and Bertrand, E. (2001). Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. EMBO J. *20*, 5480–5490.

Verheggen, C., Lafontaine, D.L.J., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J.-M., Bordonné, R., and Bertrand, E. (2002). Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. EMBO J. *21*, 2736–2745.

Vidovic, I., Nottrott, S., Hartmuth, K., Lührmann, R., and Ficner, R. (2000). Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. Mol. Cell *6*, 1331–1342.

Voorhees, R.M., and Ramakrishnan, V. (2013). Structural basis of the translational elongation cycle. Annu. Rev. Biochem. *82*, 203–236.

Vos, H.R., Bax, R., Faber, A.W., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2004a). U3 snoRNP and Rrp5p associate independently with Saccharomyces cerevisiae 35S pre-rRNA, but Rrp5p is essential for association of Rok1p. Nucleic Acids Res. *32*, 5827–5833.

Vos, H.R., Faber, A.W., de Gier, M.D., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2004b). Deletion of the three distal S1 motifs of Saccharomyces cerevisiae Rrp5p abolishes pre-rRNA processing at site A(2) without reducing the production of functional 40S subunits. Eukaryotic Cell *3*, 1504–1512.

# W

Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. Cell *83*, 1047–1058.

Wang, C., and Meier, U.T. (2004). Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. EMBO J. *23*, 1857–1867.

Wang, L., Zhao, C.-M., Wang, Y.-J., and Liu, J. (2005). Overexpression of chloroplast-localized small molecular heat-shock protein enhances chilling tolerance in tomato plant. Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao *31*, 167–174.

Wang, X., Khaleque, M.A., Zhao, M.J., Zhong, R., Gaestel, M., and Calderwood, S.K. (2006). Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. J. Biol. Chem. *281*, 782–791.

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

Warner, J.R., and Udem, S.A. (1972). Temperature sensitive mutations affecting ribosome synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. *65*, 243–257.

Warner, J.R., Kumar, A., Udem, S.A., and Wu, R.S. (1972). Ribosomal proteins and the assembly of ribosomes in eukaryotes. Biochem. J. *129*, 29P – 30P.

Watkins, N.J., and 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*, 397–414.

Watkins, N.J., Gottschalk, A., Neubauer, G., Kastner, B., Fabrizio, P., Mann, M., and Lührmann, R. (1998). Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. RNA *4*, 1549–1568.

Watkins, N.J., Ségault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C., and Lührmann, R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleoar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. Cell *103*, 457–466.

Watkins, N.J., Dickmanns, A., and Lührmann, R. (2002). Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. Mol. Cell. Biol. *22*, 8342–8352.

Watkins, N.J., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hossbach, M., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2004). Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. Mol. Cell *16*, 789–798.

Wegierski, T., Billy, E., Nasr, F., and Filipowicz, W. (2001). Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast. RNA *7*, 1254–1267.

Wehner, K.A., Gallagher, J.E.G., and Baserga, S.J. (2002). Components of an interdependent unit within the SSU processome regulate and mediate its activity. Mol. Cell. Biol. *22*, 7258–7267.

Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. Nature *407*, 327–339.

Wise, J.A., and Weiner, A.M. (1980). Dictyostelium small nuclear RNA D2 is homologous to rat nucleolar RNA U3 and is encoded by a dispersed multigene family. Cell *22*, 109–118.

Wise, J.A., Tollervey, D., Maloney, D., Swerdlow, H., Dunn, E.J., and Guthrie, C. (1983). Yeast contains small nuclear RNAs encoded by single copy genes. Cell *35*, 743–751.

Woolford, J.L., and Baserga, S.J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Genetics *195*, 643–681.

Wormsley, S., Samarsky, D.A., Fournier, M.J., and Baserga, S.J. (2001). An unexpected, conserved element of the U3 snoRNA is required for Mpp10p association. RNA *7*, 904–919.

Wu, H., and Feigon, J. (2007). H/ACA small nucleolar RNA pseudouridylation pockets bind substrate RNA to form three-way junctions that position the target U for modification. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 6655–6660.

Wu, H., Henras, A., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2004). Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 8307–8312.

# X

Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 355–369.

Xue, S., Wang, R., Yang, F., Terns, R.M., Terns, M.P., Zhang, X., Maxwell, E.S., and Li, H. (2010). Structural basis for substrate placement by an archaeal box C/D ribonucleoprotein particle. Mol. Cell *39*, 939–949.

# Y

Yang, Y., Isaac, C., Wang, C., Dragon, F., Pogacic, V., and Meier, U.T. (2000). Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140. Mol. Biol. Cell *11*, 567–577.

Ye, K., Jia, R., Lin, J., Ju, M., Peng, J., Xu, A., and Zhang, L. (2009). Structural organization of box C/D RNA-guided RNA methyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 13808–13813.

Yeh, L.C., and Lee, J.C. (1998). Yeast ribosomal proteins L4, L17, L20, and L25 exhibit different binding characteristics for the yeast 35S precursor rRNA. Biochim. Biophys. Acta *1443*, 139–148.

Young, C.L., and Karbstein, K. (2011). The roles of S1 RNA-binding domains in Rrp5's interactions with pre-rRNA. RNA *17*, 512–521.

Yu, X., and Warner, J.R. (2001). Expression of a micro-protein. J. Biol. Chem. *276*, 33821–33825.

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

# Z

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

Zanchin, N.I., and Goldfarb, D.S. (1999a). Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. Mol. Cell. Biol. *19*, 1518–1525.

Zanchin, N.I., and Goldfarb, D.S. (1999b). The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. Nucleic Acids Res. *27*, 1283–1288.

Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., Rout, M.P., Hiley, S.L., Hughes, T., and Woolford, J.L. (2007). Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. Genes Dev. *21*, 2580–2592.

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

Zhao, Z.-G., and Shen, W.-L. (2005). Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. World J. Gastroenterol. *11*, 73–78.

Zhao, Y., Lu, J., Sun, H., Chen, X., Huang, W., Tao, D., and Huang, B. (2005). Histone acetylation regulates both transcription initiation and elongation of hsp22 gene in Drosophila. Biochem. Biophys. Res. Commun. *326*, 811–816.

Zhou, J., Liang, B., and Li, H. (2011). Structural and functional evidence of high specificity of Cbf5 for ACA trinucleotide. RNA *17*, 244–250.

Zieve, G., and Penman, S. (1976). Small RNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular localization. Cell *8*, 19–31.

La biogenèse des ribosomes est un processus complexe et dynamique requérant l'intervention d'une multitude de facteurs d'assemblage et de maturation pour permettre la maturation du pré-ARNr et l'assemblage des protéines ribosomiques. Chez les eucaryotes, la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique 40S, débute dans le nucléole par la transcription d'un long précurseur contenant 3 des 4 futurs ARNr matures. Le pré-ARNr 18S est modifié par un ensemble de snoRNP à boîtes C/D et H/ACA et libéré par une série de clivages précoces au niveau des sites A0, A1 et A2. Ces clivages se déroulent au sein d'un macro-complexe, le SSU-processome. Celui-ci s'assemble de manière séquentielle à l'extrémité 5' du pré-ARNr et est composé d'une multitude de facteurs intervenant dans la maturation, notamment de la snoRNP U3, une snoRNP à boîtes C/D qui joue un rôle de chaperon du pré-ARNr. En effet, le snoARN U3 est impliqué dans la formation de 5 appariements avec le pré-ARNr permettant de positionner correctement les sites de clivages A0, A1 et A2. En plus des 4 protéines cœur retrouvées au sein des snoRNP à boîtes C/D, la snoRNP U3 possède une protéine supplémentaire essentielle à la viabilité cellulaire, Rrp9p. En C-terminal, Rrp9 présente un enchainement de 7 domaines WD40 s'organisant en une structure « hélix propeller ». Pour définir le rôle essentiel de cette protéine, nous avons généré des mutants et testé leur fonction. Nous avons ainsi pu montrer que le résidu R289 de Rrp9p est important pour les étapes de clivages précoces du pré-ARNr aux sites A1 et A2. De plus, nous avons identifié de nouveaux partenaires de la protéine Rrp9p au sein du processome et montré que le résidu R289 est impliqué dans une interaction directe avec le facteur Rrp36p. Lorsque ce résidu est muté, certains des défauts de croissance cellulaire liés à la stabilisation des appariements établis entre le pré-ARNr et le snoARN U3 par mutation du snoARN U3 sont fortement renforcés, montrant un lien fonctionnel entre Rrp9p et ces appariements. Nous avons mis en évidence un réseau d'interaction au sein du processome impliquant les protéines Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p : Rrp9p interagit avec Rrp36p et Sgd1p, et ces deux dernières interagissent ensemble, ainsi qu'avec Rrp5p. Les domaines responsables de ces interactions ont été étudiés.
**Mots clés :** Rrp9p, snoRNP U3, pré-ARNr 35S, processome, Rrp36p, *S. cerevisiae*

Ribosome biogenesis is a complex and dynamic process requiring several assembly and maturation factors needed for processing of the pre-rRNA and assembly of the ribosomal protein. In eukarya, biogenesis of the 40S small subunit starts in the nucleolus with the transcription of a long pre-rRNA, containing 3 out of the 4 future rRNAs. The 18S pre-rRNA is modified by several C/D or H/ACA box snoRNPs and processed by endonucleolytic cleavages at sites A0, A1 and A2 sites. These early cleavages occur within a huge complex termed the SSU-processome. The processome assembles at the 5' extremity of the pre-rRNA, and contains multiple factors, including the U3 snoRNP, a C/D box snoRNP chaperoning the pre-rRNA. Indeed, the U3 snoRNA is involved in formation of 5 intermolecular helix with the pre-rRNA, which defines the A0, A1 and A2 cleavage sites. In addition to the four C/D box snoRNP core proteins, the U3 snoRNP contains additional protein, Rrp9p, required for cell viability. The Rrp9p C-terminal extremity folds into a helix propeller structure. To try to decipher the Rrp9p role, we mutated several surface residues of the helix propeller protein and the effects of the mutations on cell growth were tested. Through this approach, we found that the R289 residue is important for the maturation events at A1 and A2 sites. Moreover, we identified new protein partners of Rrp9p within the processome and showed that R289 residue is involved in a direct interaction with Rrp36p. We identified a network of protein-protein interactions including Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p and Rrp5p : Rrp9p interacts with Rrp36p and Sgd1p, Rrp36p and Sgd1p interact together and with Rrp5p. Some of the protein domains involved in the interactions were identified. In addition, the R289A mutation in Rrp9p has a strong negative effect on growth with mutations in U3 snoRNA that destabilize the U3 snoRNA/pre-rRNA interaction.
**Keywords :** Rrp9p, U3 snoRNP, 35S pre-rRNA, processome, Rrp36p, *S. cerevisiae*

La biogenèse des ribosomes est un processus complexe et dynamique requérant l'intervention d'une multitude de facteurs d'assemblage et de maturation pour permettre la maturation du pré-ARNr et l'assemblage des protéines ribosomiques. Chez les eucaryotes, la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique 40S, débute dans le nucléole par la transcription d'un long précurseur contenant 3 des 4 futurs ARNr matures. Le pré-ARNr 18S est modifié par un ensemble de snoRNP à boîtes C/D et H/ACA et libéré par une série de clivages précoces au niveau des sites A0, A1 et A2. Ces clivages se déroulent au sein d'un macro-complexe, le SSU-processome. Celui-ci s'assemble de manière séquentielle à l'extrémité 5' du pré-ARNr et est composé d'une multitude de facteurs intervenant dans la maturation, notamment de la snoRNP U3, une snoRNP à boîtes C/D qui joue un rôle de chaperon du pré-ARNr. En effet, le snoARN U3 est impliqué dans la formation de 5 appariements avec le pré-ARNr permettant de positionner correctement les sites de clivages A0, A1 et A2. En plus des 4 protéines cœur retrouvées au sein des snoRNP à boîtes C/D, la snoRNP U3 possède une protéine supplémentaire essentielle à la viabilité cellulaire, Rrp9p. En C-terminal, Rrp9 présente un enchainement de 7 domaines WD40 s'organisant en une structure « hélix propeller ». Pour définir le rôle essentiel de cette protéine, nous avons généré des mutants et testé leur fonction. Nous avons ainsi pu montrer que le résidu R289 de Rrp9p est important pour les étapes de clivages précoces du pré-ARNr aux sites A1 et A2. De plus, nous avons identifié de nouveaux partenaires de la protéine Rrp9p au sein du processome et montré que le résidu R289 est impliqué dans une interaction directe avec le facteur Rrp36p. Lorsque ce résidu est muté, certains des défauts de croissance cellulaire liés à la stabilisation des appariements établis entre le pré-ARNr et le snoARN U3 par mutation du snoARN U3 sont fortement renforcés, montrant un lien fonctionnel entre Rrp9p et ces appariements. Nous avons mis en évidence un réseau d'interaction au sein du processome impliquant les protéines Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p et Rrp5p : Rrp9p interagit avec Rrp36p et Sgd1p, et ces deux dernières interagissent ensemble, ainsi qu'avec Rrp5p. Les domaines responsables de ces interactions ont été étudiés.
**Mots clés :** Rrp9p, snoRNP U3, pré-ARNr 35S, processome, Rrp36p, *S. cerevisiae*

Ribosome biogenesis is a complex and dynamic process requiring several assembly and maturation factors needed for processing of the pre-rRNA and assembly of the ribosomal protein. In eukarya, biogenesis of the 40S small subunit starts in the nucleolus with the transcription of a long pre-rRNA, containing 3 out of the 4 future rRNAs. The 18S pre-rRNA is modified by several C/D or H/ACA box snoRNPs and processed by endonucleolytic cleavages at sites A0, A1 and A2 sites. These early cleavages occur within a huge complex termed the SSU-processome. The processome assembles at the 5' extremity of the pre-rRNA, and contains multiple factors, including the U3 snoRNP, a C/D box snoRNP chaperoning the pre-rRNA. Indeed, the U3 snoRNA is involved in formation of 5 intermolecular helix with the pre-rRNA, which defines the A0, A1 and A2 cleavage sites. In addition to the four C/D box snoRNP core proteins, the U3 snoRNP contains additional protein, Rrp9p, required for cell viability. The Rrp9p C-terminal extremity folds into a helix propeller structure. To try to decipher the Rrp9p role, we mutated several surface residues of the helix propeller protein and the effects of the mutations on cell growth were tested. Through this approach, we found that the R289 residue is important for the maturation events at A1 and A2 sites. Moreover, we identified new protein partners of Rrp9p within the processome and showed that R289 residue is involved in a direct interaction with Rrp36p. We identified a network of protein-protein interactions including Rrp9p, Rrp36p, Sgd1p and Rrp5p : Rrp9p interacts with Rrp36p and Sgd1p, Rrp36p and Sgd1p interact together and with Rrp5p. Some of the protein domains involved in the interactions were identified. In addition, the R289A mutation in Rrp9p has a strong negative effect on growth with mutations in U3 snoRNA that destabilize the U3 snoRNA/pre-rRNA interaction.
**Keywords :** Rrp9p, U3 snoRNP, 35S pre-rRNA, processome, Rrp36p, *S. cerevisiae*