



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>

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 **Decebal TIOTIU**

Analyse fonctionnelle des protéines Hit1 et Bcd1 impliquées dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D eucaryotes

Le 10 octobre 2016

Membres du jury :

Rapporteurs :	M.	Cosmin	SAVEANU	Chef de Groupe, Institut Pasteur, Paris
	Mme	Christine	ALLMANG-CURA	Chargé de Recherche, IBMC, Strasbourg
Examineurs :	M.	Bruno	CHARPENTIER	Professeur, Université de Lorraine, Nancy Directeur de Thèse
	Mme.	Sandrine	BOSCHI-MULLER	Professeur, Université de Lorraine, Nancy

Laboratoire Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA),
Equipe ARN-RNP, structure-fonction-maturation
UMR 7365 CNRS-UL, Biopôle de l'Université de Lorraine, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, CS 50184,
54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy FRANCE

REMERCIEMENTS

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car, c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes, que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse, Bruno Charpentier, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail et, de m'avoir accompagné pendant ces années passées au laboratoire. Merci Bruno, je sais que cela n'a pas toujours été facile, mais tu m'as toujours soutenu et donne le temps dont j'avais besoin pour pouvoir avancer et pour cela je t'apprécie énormément.

Je suis très reconnaissant envers Benjamin Rothé, qui m'a encadré pendant la première partie de mon travail, et qui m'a initié dans ce sujet. Pendant le temps qu'on a travaillé ensemble, mais aussi après son départ, il a toujours été présent pour répondre à mes questions et ses conseils m'ont été très précieux. Merci Ben pour tout, je pense déjà avec plaisir aux moments où on se reverra. A très bientôt mon ami.

Je tiens aussi à remercier Madame Christiane Branlant pour m'avoir reçu au sein de son laboratoire, ce qui m'a permis de découvrir ce sujet.

Merci à Stéphane et Arnaud et à nos nombreuses discussions. Travailler avec vous a été un vrai plaisir. Bonne chance Arnaud pour finir ta thèse et aussi pour la suite.

Merci à Christine et Hélène pour leur aide précieuse. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous.

Merci Valérie, Séverine, Muriel pour votre aide et soutien, ainsi que pour vos conseils avisés.

Merci Xavier, Benoit, Marc, votre collaboration sur le sujet de ma thèse a été essentielle.

Merci à toutes les autres personnes avec lesquelles j'ai eu l'occasion de collaborer, en particulier Thomas, Yoan, Guillaume, Véro, Séverine, Isa, Mathieu, et aussi à toutes les personnes du laboratoire que je n'ai pas cités.

Je remercie Madame Christine Allmang-Cura et Mr Cosmin Saveanu d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci également à Madame Sandrine Boschi-Muller qui a accepté d'examiner ce travail.

Je remercie ma famille, ma mère et mon frère qui m'ont toujours aidé et encouragé. Merci Delia et Diana pour m'avoir compris et surtout supporté dans les moments où les manipulations ne marchaient pas.

Toutes les autres personnes du laboratoire que je remercie pour leur sympathie et leur gentillesse.

Merci à tous !

ABRÉVIATIONS

Liste des abréviations

3-AT :	3-aminotriazol	DMSO :	diméthylsulfoxyde
A :	Adénine	DNase :	Désoxyribonucléase
A600nm :	Absorbance à la longueur d'onde de 600 nm	dNTP :	Désoxyribonucléotide triphosphate
AAA+ :	ATPase associated with diverse cellular processes	DTT :	dithiothréitol
ADN :	Acide désoxyribonucléique	EDTA :	éthylène diamine tétraacétate
ADN db :	Acide désoxyribonucléique double brin	eRNA :	enhancer ARN
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire	FC :	Fibrillar Center
ARN :	Acide ribonucléique	G :	Guanine
ARNm :	Acide ribonucléique messenger	GST :	Glutathione S-transferase
ARNnc :	ARN non codant	HEPES :	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique	IPTG :	isopropyl β -D-thiogalactoside
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert	ITS :	Intenal Transcribed Spacer
ATP :	Adénosine 5' triphosphate	Kan :	Kanamycine
Bcd1 :	Box C/D snoRNA 1	Kb :	Kilobase
C :	Cytosine	lncRNA :	long ARN non codant
CAB :	Cajal bodies box	Lsm :	Sm Like
CB :	Cajal Bodies	mChIP :	modified Chromatin Immunoprecipitation
CBC :	Cap Binding Complex	miRNA :	micro RNA
Cbf5 :	Centromere binding factor 5	MOPS :	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
ChIP :	Chromatin Immunoprecipitation	Nat :	Nourseothricine
Ci :	Curie	NB :	Nucleolar bodies
cpm :	coups par minute	NES :	Nuclear Export Signal
CTD :	Carboxy Terminal Domain	Nhp2 :	Non-Histone Protein 2
Da, KDa :	Dalton, kilodalton	NLS :	Nuclear Localization signal
Damp :	Decreased abundance by mRNA perturbation	NMD :	Non sens Mediated Decay
		NoLS :	Nucleolar Localization Signal

Nop :	Nucleolar protein	SDS :	sodium dodecylsulfate
nt :	nucléotide	SELEX :	Systematic Evolution of Ligands
NUFIP :	Nuclear FMRP Interacting Protein		by Exponential enrichment
ORF :	Open Reading Frame	SMN :	Survival of MotoNeuron
PAGE :	polyacrylamide gel	siRNA :	small interfering RNA
	electrophoresis	snoRNA :	small nucleolar ARN
pb :	paire de base	snoRNP :	small nucleolar
PBS :	Phosphate Buffer Saline		Ribonucleoparticle
PCR :	Polymerase Chain Reaction	snRNA :	small nuclear ARN
PEG :	Polyéthylène glycol	snRNP :	small nuclear RNP
pGal :	promoteur galactose dépendant	Snu13 :	small Nuclear ribonucleoprotein
Pih1 :	Protein interacting with Hsp90-1		associated
pré-ARNm :	précurseur de l'ARN messager	sRNA :	small ARN
pré-ARNr :	précurseur de l'ARN ribosomique	sRNP :	small RNP
PUA :	PseudoUridine synthase and	SSC :	Saline-Sodium Citrate
	Archaeosine transglycosylase	SSPE :	Saline-Sodium Phosphate EDTA
R :	Purine (adénine ou guanine)	SSU :	Small Subunit
R2TP :	Rvb1p/Rvb2p/Tah1p/Pih1p	T :	Thymine
RBD :	RNA Binding Domain	Tah1 :	TPR containing protein asociated
Rex4 :	RNA exonuclease		with Hsp90
RMN :	Résonance Magnétique	TBE :	Tris-Borate-EDTA
	Nucléaire	TBP :	TATA box Binding Protein
RNAse :	Ribonucléase	TE :	Tris-EDTA
RNP :	Ribonucléoparticle	UAS :	Upstream activating sequences
Rrp9p :	Ribosomal RNA Processing 9	UsnRNP :	Uridine rich small nuclear
Rsa1 :	Ribosome assembly 1		ribonucleoprotein particle
RT :	Reverse Transcription	Y :	Pyrimidine (cytosine, uracile ou
Rtt106p :	Regulator of Ty1 Transposition		thymine)
	106	Y2H/Y3H :	Yeast two-hybrid/ Yeast three-
Rvb1/2 :	RuVB-like 1/2		hybrid
SAM :	S-Adenosyl-L-Methionine	YPD :	Yeast extract Peptone Dextrose
sb :	simple brin	YPG :	Yeast extract Peptone Galactose
scaRNA :	small Cajal Bodies RNA	Ψ :	Pseudouridine

Les abréviations internationales utilisées pour désigner les acides aminés (nomenclature à 3 lettres ou à une lettre) ne sont pas incluses dans cette liste.

LISTE DES PUBLICATIONS

Liste des publications en relation avec le sujet de thèse

Functional and Structural Insights of the Zinc-Finger HIT protein family members Involved in Box C/D snoRNP Biogenesis.

Bragantini B, **Tiotiu D**, Rothé B, Saliou JM, Marty H, Cianférani S, Charpentier B, Quinteret M, Manival X.

J Mol Biol. 2016 Apr 30. pii: S0022-2836(16)30109-7. doi: 10.1016/j.jmb.2016.04.028. PMID: 27139642

Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction.

Rothé B, Saliou JM, Quinteret M, Back R, **Tiotiu D**, Jacquemin C, Loegler C, Schlotter F, Peña V, Eckert K, Moréra S, Dorsselaer AV, Branlant C, Massenet S, Sanglier-Cianférani S, Manival X, Charpentier B.

Nucleic Acids Res. 2014;42(16):10731-47. doi: 10.1093/nar/gku612. Epub 2014 Aug 28. PMID: 25170085

Structural features of the box C/D snoRNP pre-assembly process are conserved through species.

Quinteret M, Chagot ME, Rothé B, **Tiotiu D**, Manival X

Soumis *Structure* (Cell press)

Présentation orales à des congrès (* orateur).

U3 snoRNP assembly and function. C. Branlant*, G. Clerget, B. Rothé, J. Bizarro, M. Quinternet, C. Charron, V. Igel-Bourguignon, R. Back, **D. Tiotiu**, J.-M. Saliou, N. Rolland, F. Allain, C. Dominguez, V. Senty-Séagault, S. Sanglier-Cianferani, D. Lafontaine, C. Verheggen, E. Bertrand, X. Manival, M. Rederstorff, and B. Charpentier. 10th Ribosome biogenesis. Bruxelles. Août 2015.

NMR and X-Ray structure-function analyses of box C/D ribonucleoprotein particles assembly complexes at atomic level. M. Quinternet, C. Charron, B. Rothé, R. Back, J. Bizarro, **D. Tiotiu**, J.-M. Saliou, S. Sanglier-Cianferani, C. Dominguez, F. Allain, S. Massenet, E. Bertand, X. Manival, B. Charpentier and C. Branlant*. Nineteenth Annual Meeting of the RNA Society in Quebec City, Canada, June, 2014.

Présentation par affiche à des congrès

Structure-function analysis of the box C/D snoRNP assembly factor Bcd1p.

B. Bragantini, **D. Tiotiu**, B. Rothé, H. Marty, M. Quinternet, B. Charpentier and X. Manival.
10th SifrARN 2016 – 8-10 March 2016 Toulouse.

Structure-function analysis of proteins Hit1p and Bcd1p involved in box C/D snoRNP biogenesis.

Decebal Tiotiu, Benoît Bragantini, Marc Quinternet, Benjamin Rothé, Jean-Michel Saliou, Stéphane Labialle, Alain Van Dorssealer, Christiane Branlant, Sarah Sanglier-Cianferani, Xavier Manival & Bruno Charpentier. 9th SifrARN 2013 – 18-20 Nov 2013 Strasbourg.

Etude fonctionnelle et structurale du processus d'assemblage des snoRNP à boîtes C/D chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Benjamin Rothé, Régis Back, Jean-Michel Saliou, **Decebal Tiotiu**, Cyril Dominguez, Marc Quinternet, Christophe Romier, Alain Van Dorsselaer, Sarah Sanglier-Cianferani, Frédéric Allain, Xavier Manival, Christiane Branlant et Bruno Charpentier. Poster LMO, 2012

Structural and functional analysis of the Hit1p and Bcd1p proteins involved in box C/D snoRNP biogenesis

Benoît Bragantini, **Decebal Tiotiu**, Marc Quinternet, Benjamin Rothé, Jean-Michel Saliou, Alain Van Dorsselaer, Christiane Branlant, Sarah Sanglier-Cianferani, Bruno Charpentier & Xavier Manival. Poster EMBO Practical Course 2013 – Novembre 2013 AFMB Marseille

TABLE DE MATIÈRES

INTRODUCTION.....	11
1 Les ARN non codants (ARNnc)	1-12
1.1 Les familles d'ARNnc	1-13
1.2 Nomenclature des gènes des ARNnc.....	1-14
1.3 Les petits ARNnc.....	1-15
1.3.1 Les ARNt	1-16
1.3.2 Les ARNr 5S et 5.8S.....	1-16
1.3.3 Les miRNA et les siRNA.....	1-17
1.3.4 Les piRNA.....	1-19
1.3.5 Les riboswitches	1-20
1.4 Les longs ARNnc (lncRNA)	1-21
1.5 Les particules ribonucléoprotéiques (RNP).....	1-21
2 Les snoRNA/snoRNP	2-23
2.1 Les petits ARN nucléolaires (snoRNA)	2-23
2.1.1 Organisation génomique des gènes des snoRNA	2-25
2.1.1.1 Diversité des gènes des snoRNA en fonction de leur localisation et de leur mode d'expression	2-26
2.1.1.2 Les gènes des snoRNA avec des promoteurs indépendants.....	2-28
2.1.1.3 Les gènes des snoRNA introniques	2-29
2.1.1.3.1 Caractéristiques fonctionnelles communes de gènes hôtes des snoRNA introniques	2-30
2.2 Les fonctions des snoRNA/snoRNP	2-34
2.2.1 Méthylation des cibles non-canoniques.....	2-35
2.2.2 Redondance des snoRNA	2-36
2.2.3 Les snoRNA dans les pathologies	2-38
2.2.3.1 Les snoRNA dans les maladies neurodégénératives.....	2-38
2.2.3.2 Implication des snoRNA dans le cancer	2-40
2.2.3.2.1 Rôle de pro-oncogène.....	2-40
2.2.3.2.2 Rôle anti-tumoral	2-41
2.2.3.2.3 Empreinte génomique parentale des locus snoRNA et cancer.....	2-43
2.2.3.2.4 Les snoRNA comme biomarqueurs	2-43
2.2.3.3 Les snoRNA orphelins	2-44
2.2.3.3.1 Implication des snoRNA dans le Syndrome Prader-Willi.....	2-45
2.2.3.3.2 Autres snoRNA orphelins	2-49
3 Les snoRNP à boîtes C/D	3-51
3.1 Transcription et maturation des snoRNA à boîtes C/D	3-51
3.1.1 Maturation des snoRNA à boîtes C/D.....	3-51
3.1.2 Maturation de l'extrémité 5' des snoRNA.....	3-53
3.1.2.1 La coiffe 7-méthylguanosine (m ⁷ G)	3-53
3.1.2.2 La coiffe triméthylée 2,2,7-méthylguanosine (m ^{2,2,7} G).....	3-54
3.1.3 Terminaison de la transcription et maturation de l'extrémité 3' des snoRNA.....	3-55

3.2	Structure des snoRNP à boîtes C/D	3-59
3.2.1	Les snoRNA à boîtes C/D	3-59
3.2.2	Les protéines des snoRNP à boîtes C/D.....	3-62
3.2.2.1	La protéine Snu13/SNU13(15.5K)	3-62
3.2.2.2	La 2'-O-méthylase Nop1p/Fibrillarine.....	3-65
3.2.2.3	Les protéines Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58	3-67
3.2.3	Structure des snoRNP à boîtes C/D chez les archées	3-72
3.2.4	Structure des snoRNP à boîtes C/D chez les eucaryotes	3-79
3.3	La biogenèse des snoRNP à boîtes C/D	3-80
3.3.1	Facteurs impliqués dans l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D.....	3-81
3.3.1.1	Les chaperonnes HSP90	3-81
3.3.1.2	Le complexe R2TP	3-87
3.3.1.2.1	Identification du complexe R2TP	3-88
3.3.1.2.2	Les protéines Rvb1/TIP49 (RuvBL1) et Rvb2/TIP48 (RuvBL2)	3-93
3.3.1.2.2.1	Structure	3-96
3.3.1.2.2.2	Organisation en structures hexamériques et dodécamériques.....	3-98
3.3.1.2.2.3	Fonctions.....	3-99
3.3.1.2.2.1	Les protéines Rvb1/2/RuvBL1/2 comme chaperonnes.....	3-100
3.3.1.2.3	La protéine Pih1 (Nop17p/NOP17)	3-102
3.3.1.2.4	La protéine Tah1/RPAP3	3-103
3.3.1.2.5	Fonctions du complexe R2TP	3-106
3.3.1.2.6	Rôle du complexe R2TP dans l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D	3-106
3.3.1.2.7	Rôle du complexe R2TP dans l'assemblage de l'ARN polymérase II	3-107
3.3.1.2.8	Le complexe R2TP et cancer	3-109
3.3.1.3	La protéine Rsa1/NUFIP1	3-110
3.3.1.4	Les protéines contenant un domaine ZF-HIT	3-114
3.3.1.4.1	La protéine Bcd1/ZNHIT6	3-117
3.3.1.4.2	La protéine Hit1/ZNHIT3	3-119
3.3.2	Modèle d'assemblage des snoRNP à boîtes C/D chez les eucaryotes.....	3-120
3.3.3	Transport et localisation des snoRNP à boîtes C/D	3-123
3.3.4	Importance des modifications post-traductionnelles (MPT) pour la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D	3-126
3.4	Les fonctions des snoRNP à boîtes C/D	3-129
3.4.1	La biogenèse des ribosomes.....	3-130
3.4.1.1	Transcription des pré-ARNr par l'ARN polymérase I.....	3-132
3.4.1.2	Les étapes de maturation des pré-ARNr.....	3-132
3.4.1.3	La maturation et la modification des ARNr s'effectue de manière co-transcriptionnelle	3-135
3.4.1.3.1	Le snoRNA U3.....	3-141
3.4.1.3.1.1	La snoRNP U3.....	3-143
3.4.1.3.2	Le snoRNA U14.....	3-147
3.4.1.3.3	Les snoRNA U8 et U13	3-147
3.4.1.4	Les snoRNA à boîtes C/D avec fonction de guide de méthylation	3-148
3.4.2	Autres fonctions des snoRNP à boîtes C/D.....	3-148
3.4.2.1	Fonctions métaboliques.....	3-148
3.4.2.2	Les snoRNA et l'épissage alternatif / l'édition des ARN.....	3-150
3.4.2.3	Les sdRNA	3-151
3.4.2.4	Les snoRNA-piRNA	3-152
3.4.2.5	La découverte de nouveaux membres de snoRNA	3-153
3.4.2.6	Médiateurs de stress et régulateurs du trafic lipidique.....	3-156
3.4.2.7	Facteurs associés à la chromatine	3-157

4	Les chaperonnes d'histones	4-159
4.1	<i>Chaperonnes d'histones et assemblage des nucléosomes.....</i>	<i>4-159</i>
4.1.1	Assemblage des nucléosomes couplé à la réplication de l'ADN (RCNA)	4-160
4.1.2	Assemblage des nucléosomes indépendant de la réplication de l'ADN (RINA)	4-166
4.1.3	L'assemblage des nucléosomes dans la réparation de l'ADN	4-168
4.2	<i>Les différents types de chaperonnes d'histones.....</i>	<i>4-169</i>
4.3	<i>Le complexe CAF-1 : activité chaperonne H3-H4</i>	<i>4-170</i>
4.3.1	La sous-unité CHAF1a	4-174
4.3.2	La sous-unité p48	4-175
4.3.3	La sous-unité CHAF1b.....	4-176
4.4	<i>Le complexe FACT : chaperonne des complexes histones H2A-H2B, H3-H4.....</i>	<i>4-178</i>
4.4.1	Les composants du complexe FACT	4-179
4.4.2	Les fonctions du complexe FACT	4-184
4.4.2.1	Réorganisation des nucléosomes	4-186
4.4.2.2	Lien avec l'ARN Pol II.....	4-186
4.4.2.3	Eviction des nucléosomes.....	4-187
4.4.2.4	Rôle dans la transcription	4-187
4.4.2.5	Echange des histones.....	4-188
4.4.2.6	Assemblage des nucléosomes pendant la réplication	4-189
4.5	<i>La protéine Rtt106 : chaperonne des histones H3 et H4.....</i>	<i>4-189</i>
4.5.1	Structure de la protéine Rtt106.....	4-190
4.5.2	Autres partenaires identifiés de Rtt106p	4-197
4.5.2.1	Les complexes de remodelage de la chromatine RSC et SWI/SNF	4-197
4.5.2.2	Le complexe HIR.....	4-199
4.5.2.3	Le complexe SIR	4-202
4.5.2.4	Le facteur PCNA	4-202
5	Objectifs des travaux.....	5-203
	Partie I – La protéine Hit1.....	5-223
1	Les éléments importants pour la fonction de Hit1p.....	5-223
1.1	<i>Recherche du domaine minimal fonctionnel de Hit1p</i>	<i>5-224</i>
1.1.1	Influence des domaines de Hit1p sur les taux de la protéine Rsa1	5-224
1.1.1.1	Construction de la souche Rsa1p-TAP x ΔHIT1	5-224
1.1.1.2	Etude fonctionnelle du domaine à doigt de zinc de Hit1p et Bcd1p.....	5-229
2	Identification les déterminants requis pour l'interaction entre Rsa1p et Hit1p	5-231
2.1	<i>Conséquences d'une perte de l'interaction Rsa1p-Hit1p in vivo : effet sur la croissance des cellules et sur le taux de Rsa1p</i>	<i>5-231</i>
2.1.1	Effet des mutations de Hit1p.....	5-231
2.1.2	Effet des mutations de Rsa1p.....	5-234
2.2	<i>Recherche de nouveaux partenaires d'interaction de Hit1p en relation avec la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D</i>	<i>5-236</i>
	Partie II – La protéine Bcd1.....	5-238
1	Les éléments importants pour la fonctionnalité de Bcd1p.....	5-238

1.1	Recherche du domaine minimal fonctionnel.....	5-240
1.2	Le fragment Bcd1p ₍₁₋₉₆₎	5-243
1.3	Le domaine Bcd1p ₍₁₋₄₅₎	5-247
1.4	L'influence des différents domaines de Bcd1p sur le taux de snoARN à boîtes C/D.....	5-250
1.5	Cartographie par test en double hybride des régions d'interaction de Bcd1p avec les protéines Pih1 et Rrp9	5-251
2	Etude fonctionnel du double doigt de zinc de Bcd1p.....	2-255
2.1	Mutations du double doigt de zinc de Bcd1p.....	2-255
2.1.1	Test de croissance	2-256
2.1.2	Taux de snoARN	2-256
2.2	Remplacement du ZnF de Bcd1p par d'autres doigts de zinc.....	2-259
2.2.1	Test de croissance	2-260
2.2.2	Les taux des snoARN	2-260
2.3	Complémentation dans une souche tetO ₇ ::BCD1 avec l'homologue humain de Bcd1p, la protéine ZNHIT6.....	2-262
3	Recherche des nouveaux partenaires d'interaction de Bcd1p par double hybride	3-264
3.1	Surexpression des divers fragments de Bcd1p dans des souches invalidées pour divers protéines connues ou candidates pour être impliquées dans la biogenèse des snoRNP (souches Δ RSA1, Δ PIH1, Δ RTT106, Δ YNL165W)	3-264
	Partie III – La protéine Rtt106.....	3-266
1	Analyse structurale de l'interaction Bcd1p - Rtt106p.....	3-266
1.1	Co-expression chez E.coli.....	3-266
1.2	Recherche des domaines spécifiques d'interaction entre Bcd1p et Rtt106p.....	3-266
1.2.1	Test de l'interaction entre Rtt106p et le domaine fonctionnel de Bcd1p1-168 et le domaine Bcd1p169-366.....	3-267
1.2.2	Test d'interaction entre Bcd1p et les domaines PH de Rtt106p, Pob3p et Spt16p.....	3-267
1.2.3	Le remplacement du doigt de zinc de Bcd1p par celui de Hit1p ne modifie pas l'interaction avec les domaines PH de Rtt106p.....	3-271
1.2.4	Recherche de régions spécifiques d'interaction présentes dans le double domaine PH de Rtt106p et potentiellement impliquées dans l'interaction avec Bcd1p	3-273
2	Recherche de l'interaction <i>in vivo</i> entre Bcd1p et Rtt106p par co-immunoprécipitation.....	2-278
3	Etude du rôle de Rtt106p dans la biogenèse des snoRNP	3-281
3.1	L'absence d'expression de Rtt106p n'a pas d'effet visible sur le taux des snoARN chez S.cerevisiae	3-281
3.2	La surexpression de Rtt106Mp, mais pas celle de Rtt106p apparaît avoir un impact sur le taux de certains snoARN	3-281
3.3	La double délétion des gènes codant Bcd1p et Rtt106p a un effet cumulatif sur la croissance cellulaire dans une souche Δ RTT106 x Gal-3HA-BCD1.....	3-284
3.4	Recherche d'une interaction entre Rtt106p et Pih1p ou Rrp9p par double hybride	3-284
3.5	Test de l'interaction entre Bcd1p, Rtt106p et Rrp9p dans une souche invalidée pour PIH1	3-286

3.6 Vérification d'un lien génétique entre RTT106 et les gènes codant d'autres facteurs impliqués dans la biogenèse de snoRNP	3-286

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	289

REFFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	299

ANNEXES.....	341

INTRODUCTION

1 Les ARN non codants (ARNnc)

Les cellules de tous les organismes vivants contiennent deux catégories distinctes d'acides ribonucléiques (ARN): les ARN messagers (ARNm) traduits en protéines, et les ARN dits non codants (ARNnc) qui ne sont pas traduits en protéines. Les exons des gènes codant des protéines représentent 1.2% de la totalité du génome humain, et environ 80% de celui-ci est soit activement transcrit, soit interagit avec des protéines régulatrices ou est associé à d'autres activités biochimiques (Consortium, 2012). L'obtention de ces résultats a été possible grâce au développement des nouvelles technique de séquençage à haut débit permettant l'analyse du génome et du transcriptome entier (projet ENCODE - Encyclopedia of DNA Elements) (Consortium, 2012; Consortium, 2007). Cette découverte, ainsi que d'autres, comme l'épigénétique ou l'identification de la transcriptase inverse chez les rétrovirus, a modifié notre vision du dogme central de la biologie moléculaire, basé sur l'hypothèse classique que les ARN constituent essentiellement des intermédiaires entre les séquences d'ADN et la machinerie de synthèse des protéines (Crick, 1958; Ricciuti et al., 2014). Bien que le nombre réel des ARNnc dans les génomes eucaryotes reste inconnu, les estimations varient d'un ordre de plusieurs milliers d'ARNnc (Consortium, 2012; Pignatelli et al., 2016; Washietl et al., 2007). Longtemps sous-estimés, les ARNnc ont connu un regain d'intérêt considérable au cours des dernières années, en raison de leur très grande variété 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 (Cavaille, 2004). La biologie des ARN a été révolutionnée par la découverte et la caractérisation des différents rôles que les ARNnc jouent dans les processus biologiques centraux tels que l'épissage (Kishore and Stamm, 2006), la défense du génome (Billi et al., 2012; Lee et al., 2012), la structure des chromosomes (Simon et al., 2011; Yang et al., 2011) et la régulation de la l'expression des gènes (Chen and Rajewsky, 2007). Les ARNnc ont également été associés à des maladies humaines, y compris le cancer (Croce, 2009; Nicoloso et al., 2009), des troubles neurologiques tels que la maladie de Parkinson (Gehrke et al., 2010) et la maladie d'Alzheimer (Faghihi et al., 2008; Gehrke *et al.*, 2010; Hebert et al., 2008), les troubles cardio-vasculaires (Yang et al., 2007; Zhao et al., 2007) et de nombreuses autres (Esteller, 2011).

1.1 Les familles d'ARNnc

La taille des ARNnc est très variable. Certains peuvent être constitués de milliers de nucléotides, comme l'ARNnc Xist (17 kb) qui participe à l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez les femelles des mammifères. D'autres ARNnc, comme les microARN, sont de très petite taille (21-23 bases) et interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes chez les animaux et les plantes (**Tableau 1**) (Abel et al., 2014).

1. Petits ARN non-codants (Small non-coding RNAs) (< 200 pb)	Fonctions
ARN de transfert (ARNt)	Transfert des acides aminés dans la synthèse protéique.
ARN ribosomiques 5S et 5.8S (ARNr)	Composants ARN des sous-unités ribosomiques, impliqués dans la traduction.
MicroARN (miARN)	Régulation des mARN au niveau post-transcriptionnel
Small interfering ARN (siARN)	Dégradation post-transcriptionnelle des ARNm de manière hautement séquence-spécifique.
PIWI-interacting ARN(piARN)	Petits ncARN qui forment le complexe avec le complexe RISC dans les cellules germinatives.
Petits ARN nucléolaires (snoARN) Petits ARN des Cajal bodies (scaARN)	Modification et traitement d'autres ARN en particulier les ARNr, ARNt et snARN, principalement par méthylation et pseudouridylation.
Petits ARN nucléaires (snARN)	Petits ARNnc impliqués dans l'épissage des pré-ARNm et la régulation des facteurs de transcription.
Riboswitches	Régulation de l'expression des ARNm par liaison spécifique et directe à de petites molécules.
2. Longs ARN non-codants (Long non-coding RNAs) (>200 pb)	Fonctions
ARN longs non-codants (Long non-coding ARN) (lncARN)	ARNnc de plus de 200 nucléotides qui régulent l'expression des gènes par mécanisme épigénétique, épissage, empreinte génomique, régulation de la transcription et transport intracellulaire.
ARN antisens	ARN simple brin complémentaire aux ARNm transcrits, impliqué dans l'inhibition de la traduction de l'ARNm cible.
ARN longs associés aux promoteurs Promoter associated longRNAs (PARs)	Transcrit de plus de 200 nt qui régule l'expression des gènes par interaction avec leurs promoteurs.
ARN non-codants associés aux télomères Telomere-associated ncRNAs (TERRAs)	Régulateurs négatifs de la longueur des télomères par inhibition de la télomérase.

Tableau 1 : Les différents types d'ARN non-codants bien caractérisés à ce jour. Adapté de (Dupuis-Sandoval et al., 2015).

1.2 Nomenclature des gènes des ARNnc

Les gènes codant des ARNnc de petite taille (<200nt) sont nommés après la classe spécifique de l'ARN identifié par similarité de séquence, par exemple SNORA1, "petit ARN nucléolaire à boîtes H/ACA 1". Les ARNnc humains sont répertoriés et leur nom est standardisé par HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (**Tableau 2**). Pour revue, voir (Wright and Bruford, 2011).

Les gènes codant des ARN longs non codants (> 200nt) (lncRNA) sont de préférence nommés en fonction de la fonction connue dans la transcription, par exemple XIST. Les transcrits antisens sont nommés en utilisant le symbole HGNC approuvé pour le gène codant la protéine avec le suffixe 'AS' pour 'antisens' (le symbole du gène ne doit pas être le symbole du gène codant la protéine codée sur l'autre brin), les transcriptions introniques sont marquées avec «IT» et les transcrits qui se chevauchent avec «OT». Les séquences intergéniques des lncRNA contiennent le préfixe LINC pour 'long intergenic non-protein coding RNA' par exemple LINC00028. Un guide de la nomenclature des gènes lncRNA a été publié en 2014, voir <http://www.humgenomics.com/content/8/1/7>)

Type d'ARN	Symbole HGNC	Nom entier
miRNA	<i>MIR</i>	microRNA
ARNt génomique	<i>TRNA</i>	ARN de transfert (code des acides aminés en une lettre)
ARNt mitochondrial	<i>MT-T</i>	ARNt mitochondrial (code des acides aminés en une lettre)
ARNr -- 5S	<i>RN5S</i>	ARN ribosomique 5S
-- 5.8S	<i>RN5-8S</i>	ARN ribosomique 5.8S
-- 18S	<i>RN18S</i>	ARN ribosomique 18S
-- 28S	<i>RN28S</i>	ARN ribosomique 28S
Spliceosomal -- U1	<i>RNU1</i>	snRNA U1
-- U2	<i>RNU2</i>	snRNA U2
-- U4	<i>RNU4</i>	snRNA U4
-- U5	<i>RNU5</i>	snRNA U5
-- U6	<i>RNU6</i>	snRNA U6
-- U4atac	<i>RNU4ATAC</i>	snRNA U4atac
-- U6atac	<i>RNU6ATAC</i>	snRNA, U6atac
-- U11	<i>RNU11</i>	snRNA U11
-- U12	<i>RNU12</i>	snRNA U12

Type d'ARN	Symbole HGNC	Nom entier
snoRNA à boîtes H/ACA	<i>SNORA</i>	petit ARN nucléolaire à boîtes H/ACA
snoRNA à boîtes C/D	<i>SNORD</i>	petit ARN nucléolaire à boîtes C/D
scaRNA	<i>SCARNA</i>	petit ARN spécifique aux corps de Cajal
piRNA -- cluster	<i>PIRC</i>	cluster RNA interagissant avec piwi
piRNA -- individual	<i>PIRNA</i>	RNA interagissant avec piwi
RNase MRP	<i>RMRP</i>	composant ARN de la RNase endoribonucléase mitochondriale MRP
RNase P	<i>RPPH1</i>	ARN de la ribonucléase P composant H1
U7	<i>RNU7</i>	snRNA U7
Télomérase	<i>TERC</i>	ARN de la télomérase
lncRNA -- Fonction connue	Nom basé sur la fonction (eg <i>XIST</i>)	Ex : X (inactive)- transcrit spécifique (non-codant des protéines)
lncRNA -- antisense	'-AS' suffixe* (eg <i>BOK-AS1</i>)	Ex : ARN antisense BOK 1 (non-codant des protéines)
lncRNA -- intronic	'- IT' suffixe* (eg <i>MAGI2-IT1</i>)	Ex : transcrit intronique MAGI2-IT1 1 (non-codant des protéines)
lncRNA -- host gene of small ncRNA	'HG' suffixe (eg <i>SNHG1</i>)	Ex : gène hôte du petit ARN nucléolaire 1 (non-codant des protéines)
lncRNA -- intergenic	<i>LINC</i>	ARN long intergénique non-codant des protéines

Tableau 2: Nomenclature courante utilisée pour les ARNnc humains. *gène codant. Après (Wright and Bruford, 2011).

1.3 Les petits ARNnc

La grande majorité des petits ARNnc contiennent moins de 200-300 nucléotides et ne portent pas les signatures des ARNm, incluant la coiffe 5' et la queue de polyA (Carninci et al., 2005). Les petits ARNnc les plus étudiés comprennent certains ARN ribosomiques (ARNr), les ARNt, les piRNA (Brennecke et al., 2007), les riboswitches (St Johnston, 2005), les snRNA (Matera et al., 2007) et les microARN (Bartel, 2004). Cette famille inclue également les snoRNA (Bachellerie et al., 2002), qui seront présentés dans le **Chapitre 2** et dont une classe sera décrite en détail dans le **Chapitre 3**.

1.3.1 Les ARNt

La fonction principale des ARN de transfert (ARNt) est de fournir aux machineries de synthèse des protéines des acides aminés, tel que dicté par les codons de l'ARN messager (ARNm) (Hopper, 2013; Phizicky and Hopper, 2010). Cependant, il est maintenant reconnu que les ARNt eucaryotes ont des fonctions supplémentaires dans des processus comme le ciblage des protéines pour la dégradation via la voie de la règle N-terminale (*N-end rule*), la signalisation dans la voie générale de régulation d'acides aminés, et la régulation de l'apoptose par liaison aux cytochromes c (Dever and Hinnebusch, 2005; Mei et al., 2010; Varshavsky, 1997). Les ARNt sont également utilisés comme amorces de transcription inverse et pour le transfert de brin pendant la réplication rétrovirale (Marquet et al., 1995; Piekna-Przybylska et al., 2010).

Des mécanismes récemment découverts montrent des rôles de fragments des ARNt dans la régulation de la traduction et dans les réponses cellulaires à différents stress (Hopper, 2013; Parker, 2012; Yamasaki et al., 2009). En raison de toutes ces fonctions, les modifications des taux de transcription d'ARNt ou des défauts dans plusieurs étapes de leur traitement post-transcriptionnel déterminent de nombreuses maladies humaines, par exemple des troubles neuronaux (Lemmens et al., 2010) et l'hypoplasie ponto-cérébelleuse (Budde et al., 2008).

Des petits ARNnc générés à partir d'ARNt représentent potentiellement une nouvelle classe d'ARN régulateurs. Alors que dans les voies de surveillance des ARNt leur dégradation est complète et aucun produit de dégradation ne devrait persister, des fragments relativement stables d'ARNt (tRF) de tailles différentes ont été trouvés chez de nombreux organismes (Megel et al., 2015). Des demi-ARNt sont créés principalement suite à différents stress, mais des fragments plus courts d'ARNt d'environ 15 à 25 nucléotides sont également abondants. Ces fragments ont des fonctions potentiellement importantes, y compris dans l'inhibition de la traduction ou l'induction de l'interférence ARN ou l'apoptose (Megel et al., 2015).

1.3.2 Les ARNr 5S et 5.8S

Les acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr) sont les composants ARN des ribosomes, et sont essentiels pour la synthèse des protéines dans tous les organismes vivants (archées, bactéries et eucaryotes). Ce sont les constituants prédominants du ribosome, qui contient environ 60% d'ARNr et 40% de protéines. Les ribosomes contiennent deux ARNr majeurs et plusieurs dizaines de protéines associées. Les ribosomes fonctionnels sont constitués par l'association de deux sous-unités, une grande sous-unité (LSU) et une

petite sous-unité (SSU). L'ARNr de la LSU agit comme un ribozyme, catalysant la formation de la liaison peptidique.

L'ARNr 5S d'environ 120 nucléotides et d'une masse de 40 kDa, est un composant structural et fonctionnel de la grande sous-unité du ribosome à l'exception des ribosomes mitochondriaux chez les champignons et les animaux. Les ribosomes sans l'ARNr 5S sont fonctionnellement inactifs. L'ARNr 5S est transcrit sous la forme d'un précurseur portant une extension de 10 nucléotides en 3' qui est éliminée par l'exonucléase 3'-5' Rex1p.

L'ARN ribosomique 5.8S (ARNr 5,8S) est un composant de la grande sous-unité du ribosome eucaryote et joue un rôle important dans la traduction des protéines. Sa séquence est présente au sein du précurseur 45S qui est transcrit par l'ARN polymérase I et qui porte également les séquences des ARNr 18S et 28S. Il contribue au mécanisme de translocation du ribosome lors de l'élongation de la traduction. Chez les eucaryotes il est présent sous deux formes: une forme majoritaire courte 5.8SS et une forme longue minoritaire 5.8SL, qui contient 6 nucléotides additionnels à son extrémité 5' par rapport à la forme courte.

1.3.3 Les miRNA et les siRNA

Les microARN (miRNA) sont des petits ARNnc contenant environ 22 nucléotides, présents chez les plantes, les animaux et certains virus, et qui fonctionnent dans le mécanisme de *silencing* par régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique (Ambros, 2004). Leur fonction repose sur la mise en place d'un appariement de bases avec des séquences complémentaires présentes au sein des régions 3' UTR des ARNm (Bartel, 2009). L'association conduit à une altération de la fonction des ARNm, par plusieurs mécanismes possibles (Bartel, 2009; Fabian et al., 2010). L'ARNm est clivé en deux fragments si l'appariement miRNA-ARNm est parfait. Dans la majorité des cas, l'appariement est non parfait ce qui conduit à une répression de l'initiation de la traduction qui peut être suivie par une déstabilisation de l'ARNm par un raccourcissement de la queue poly(A), l'élimination de la coiffe, puis sa dégradation.

Les petits ARN interférents (siRNA) constituent une classe de molécules d'ARN double brin, avec une longueur de 20-25 paires de bases générées par le clivage de longs duplex d'ARN par l'enzyme Dicer. Les siRNA produits interfèrent avec l'expression de gènes à un niveau post-transcriptionnel. Ils présentent une complémentarité parfaite de séquence avec l'ARNm. Un brin du duplex de siRNA, dans la plupart des cas le brin antisens, est chargé dans un complexe protéique appelé RNA-Induced Silencing Complex (RISC). Le brin lié par RISC permet, par appariement de bases, l'association du complexe à l'ARNm cible.

L'ARNm est alors clivé par l'activité endonucléolytique de la protéine de la famille Argonaute qui est présente au sein du complexe RISC, puis dégradé.

Les miRNA ressemblent aux siRNA, mais ils proviennent de régions de transcrits d'ARN qui se replient sur eux-mêmes pour former des motifs en tige-boucle courts, alors que les siRNA proviennent de régions plus longues d'ARN double brin (Bartel, 2004). Le génome humain peut coder plus de 1000 miRNA (Bentwich et al., 2005) qui sont abondants dans de nombreux types de cellules de mammifères (Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2003) et semblent cibler environ 60% des gènes humains et d'autres mammifères (Friedman and Burge, 2014; Friedman et al., 2009; Lewis et al., 2005). Les miRNA sont bien conservés chez les plantes et les animaux, et sont considérés comme un élément essentiel et d'évolution ancienne de la régulation des gènes. Alors que les composantes de base de la voie microARN sont conservées entre les plantes et les animaux, les répertoires miRNA dans les deux royaumes semblent avoir émergé de façon indépendante avec différents modes primaires d'action (Shabalina and Koonin, 2008).

Les miRNA de plantes réalisent habituellement un appariement quasi-parfait avec leurs cibles d'ARNm, ce qui induit la répression génique par clivage des transcrits cibles (Jones-Rhoades et al., 2006). En revanche, les miRNA animaux sont capables de reconnaître leurs ARNm cibles en utilisant un appariement de seulement 6-8 nucléotides (région « *seed* ») à l'extrémité 5' du miRNA (Ellwanger et al., 2011; Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2003), qui ne suffit pas pour induire le clivage des ARNm cibles. (Bartel, 2009). La régulation combinatoire est une caractéristique de la régulation des miRNA chez les animaux (Bartel, 2009; Rajewsky, 2006). Un miRNA donné peut avoir des centaines de cibles d'ARNm différentes, et une cible donnée peut être régulée par plusieurs miRNA (Friedman et al., 2009; Krek et al., 2005).

Des expériences de séquençage à haut débit et des expériences de protection à la RNase ont montré l'expression généralisée de fragments de snoRNA, appelés ARN dérivés de snoRNA (snoRNA-derived RNAs, ou sdRNAs) (Brameier et al., 2011). Ces données ont fourni des pistes sur de nouvelles fonctions des snoRNA (Falaleeva and Stamm, 2013). Ces fragments ont été retrouvés dans toutes les espèces testées, allant des espèces de mammifères à *Giardia lamblia* (Saraiya and Wang, 2008) et le virus d'Epstein-Barr (Hutzinger et al., 2009). Les snoRNA à boîtes H/ACA donnent lieu à des ARN d'une longueur de 17-19 nucléotides, alors que les snoRNA à boîtes C/D génèrent des fragments de plus de 27 nt. La longueur des fragments ARN issus des snoRNA à boîtes C/D suggère qu'ils sont différents des miRNA qui ont une longueur moyenne de 21-22 nucléotides (Kawaji et al., 2008; Ono et al., 2011; Taft et al., 2009b). Certains sdRNA ressemblent aux miRNA, peuvent s'associer

avec des protéines Argonaute et ainsi influencer la traduction des ARNm. Une autre catégorie de sdRNA sont plus longs, forment des complexes avec les hnRNP et influencent l'expression des gènes. Ces modèles de fragmentation des snoRNA sont conservés dans plusieurs types de cellules, ce qui suggère l'existence d'un processus de maturation spécifique, plutôt que ces formes raccourcies soient des intermédiaires d'un processus de dégradation (Falaleeva and Stamm, 2013).

Une analyse par immunoprécipitation et séquençage à haut débit des petits ARN associés aux protéines humaines Ago1 et Ago2 a révélé la présence de petits ARN provenant du snoRNA ACA45 (Ender et al., 2008). Ce snoRNA semble être mûré en petits ARN de 20 à 25 nucléotides, et l'un de ceux-ci s'associe de manière stable avec les protéines Ago en régulant l'ARNm de CDC2L6 par association avec son extrémité 3' UTR (Ender et al., 2008). De même, 11 sno-miRNA provenant des snoRNA à boîtes C/D ont été trouvés avoir une fonction de répression génique efficace (Brameier et al., 2011). Une analyse bioinformatique approfondie récente et soutenue par la validation expérimentale, a suggéré que près de la moitié de tous les snoRNA boîtes C/D génèrerait des fragments plus courts (Scott et al., 2012).

Une autre analyse bioinformatique a identifié 84 miRNA introniques qui sont codés dans les snoRNA à boîtes C/D, ou dans des précurseurs montrant des similarités avec les snoRNA à boîtes C/D (Ono et al., 2011). Les prédictions des structures de ces précurseurs de miRNA snoRNA-like ressemblent aux structures des snoRNA à boîtes C/D. Ces fragments contiennent principalement les séquences des boîtes C et D, souvent retrouvées à proximité dans les molécules repliées, et sont conservées dans plusieurs lignées cellulaires, ce qui indique qu'ils ne sont pas le résultat de la dégradation aléatoire (Ono et al., 2011). Cinq précurseurs de miRNA snoRNA à boîtes C/D - like ont été testés (miR-27b, miR-16-1, mir-28, miR-31 and let-7g) et ils ont tous été retrouvés associés à la Fibrillarine (Ono et al., 2011). Ces données suggèrent qu'une sous-catégorie de petits ARN régulateurs a pu évoluer à partir des snoRNA à boîtes C/D ou H/ACA.

1.3.4 Les piRNA

Contrairement aux miRNA, qui ont été étudiés pendant une vingtaine d'années, les piRNA ont été découverts plus récemment. Leur biogenèse et leurs fonctions restent encore mal connues. Néanmoins les piRNA sont beaucoup plus spécifiques pour les cellules germinales, où ils sont plus nombreux que les miRNA. Cela suggère qu'ils peuvent potentiellement jouer des rôles fondamentaux dans le développement des cellules germinales. En 2006, au moins quatre groupes de recherche ont identifié ce nouveau

membre de la famille de petits ARNnc dans des testicules de mammifères (Aravin et al., 2006; Girard et al., 2006; Grivna et al., 2006; Luo et al., 2015; Watanabe et al., 2006). Les piRNA ont généralement une taille de 24 à 31 nt, qui est donc plus longue que celle d'autres types de petits ARNnc connus (Grivna *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006; Zhong et al., 2015). Ces ARN sont appelés piwRNA en raison de leur association avec les membres de la sous-famille PIWI de la famille des protéines Argonaute. Chez les animaux, les protéines Argonaute sont divisées en deux sous-familles. La sous-famille Argonaute est impliquée dans l'interférence ARN et dans la régulation génique médiée par les microARN. La sous-famille PIWI est impliquée dans des événements spécifiques à la lignée germinale, comme la maintenance de cellules souches de la lignée germinale et la méiose (Girard *et al.*, 2006). Leur activité protège la lignée germinale des phénomènes de transposition (Luo *et al.*, 2015). De plus, récemment il a été montré que des piRNA et des molécules piRNA-like sont exprimées également dans des cellules somatiques (Cichocki et al., 2010; Lee et al., 2011a; Malone et al., 2009; Yan et al., 2011), dans des lignées de cellules cancéreuses et dans des tumeurs (Cheng et al., 2012; He et al., 2015; Huang et al., 2013).

1.3.5 Les riboswitches

Le terme riboswitch a été établi pour définir les ARN qui contrôlent l'expression des gènes par la liaison de métabolites sans nécessiter des facteurs protéiques. Plus récemment, le nom a commencé à être utilisé pour des ARN « *riboswitch-like* », qui répondent aux changements de température (Johansson, 2009; Klinkert and Narberhaus, 2009), l'interaction avec des ARNt (Gutierrez-Preciado et al., 2009), ou la liaison des ions métalliques (Cromie et al., 2006; Dann et al., 2007).

Contrairement aux ARN décrits ci-dessus agissant en *trans* sous la forme d'entités libres, les riboswitches ou ribocommutateurs sont des éléments agissant en *cis* et retrouvés au sein d'une région non codante d'un ARNm. Ces structures font néanmoins partie des ARNnc de petite taille. Les bactéries utilisent couramment ces éléments d'ARN en tant que régulateurs des voies métaboliques et comme médiateurs des changements dans la physiologie cellulaire. Certains riboswitches sont étonnamment complexes (Breaker, 2011). Un riboswitch typique consiste en deux domaines fonctionnels: un récepteur pour les petites molécules (appelé le domaine aptamère) et un domaine régulateur (nommé plate-forme d'expression) (Garst and Batey, 2009; Winkler and Breaker, 2003). Le récepteur est une structure fortement repliée qui lie spécifiquement une molécule effectrice, typiquement un métabolite directement lié aux gènes codés par l'ARNm contenant le riboswitch. Par exemple les riboswitches fixant spécifiquement des purines régulent principalement, mais pas

exclusivement, les gènes impliqués dans la biosynthèse ou le transport des purines (Mandal et al., 2003; Mandal and Breaker, 2004). Actuellement, plus de 20 classes de riboswitches ont été validées, contenant des aptamères s'associant spécifiquement à des acides nucléiques et des nucléosides, à des acides aminés, des cofacteurs, des aminoglycosides, et aux ions métalliques (Breaker, 2011). En outre, il y a beaucoup de motifs «*orphelins*» qui sont soupçonnés être des riboswitches, mais n'ont pas d'effecteur connu (Barrick et al., 2004; Batey, 2012; Weinberg et al., 2007; Weinberg et al., 2010).

1.4 Les longs ARNnc (lncRNA)

Des études de séquençage à haut débit ont révélé au cours de la dernière décennie l'existence de milliers d'ARN non codants chez la souris et l'humain (Carninci *et al.*, 2005; Derrien et al., 2012), qui sont maintenant classés principalement en fonction de leur longueur et de l'origine de leur transcription. Les lncRNA constituent la classe la plus large de ces molécules décrites, contenant au moins 200 nucléotides et avec peu ou pas de potentiel codant pour une protéine (Cabili et al., 2011; Ng et al., 2013). Ceux-ci ne seront pas décrits en détail dans ce manuscrit. Le lecteur pourra se reporter à de nombreuses revues qui leur sont consacrées (Dube et al., 2016; Liu et al., 2015; Ma et al., 2013; (Cabili *et al.*, 2011; Derrien *et al.*, 2012; Kim and Sung, 2012; Nakagawa and Kageyama, 2014; Wilusz, 2016).

1.5 Les particules ribonucléoprotéiques (RNP)

Chez les eucaryotes, la plupart des ARN sont transcrits sous la forme de précurseurs qui sont maturés. Dès leur synthèse, ils entrent en association avec des protéines (Sloan et al., 2015), et les particules ribonucléoprotéiques formées (RNP) peuvent avoir une composition protéique qui évolue durant le processus de leur biogenèse, jusqu'à ce que les RNP matures atteignent leurs sites fonctionnels. Les RNP jouent des rôles centraux dans une multitude de processus cellulaires dans les cellules eucaryotes, comme par exemple le clivage des ARN, l'épissage, le transport, la traduction, ou l'export des protéines à travers les membranes.

Le mécanisme de maturation des ARN repose sur des interactions transitoires avec des protéines de liaison à l'ARN (RNA binding proteins - RBP), qui facilitent les différentes étapes de la biogenèse des RNP et qui sont uniques à chaque type d'ARN (Fernandez-Pevida et al., 2015; Muller-McNicoll and Neugebauer, 2013). La biogenèse des RNP est généralement réalisée de façon hiérarchique et séquentielle, où chaque étape de la voie d'assemblage dépend de l'achèvement de la précédente, ce qui garantit que des pré-complexes intermédiaires correctement assemblés poursuivent leur assemblage. Ceci

constitue un mécanisme de contrôle qualité des pré-particules intermédiaires, nécessaire pour garantir la production d'un produit final fonctionnel. Les étapes intermédiaires de la biogenèse sont souvent réalisées dans des compartiments cellulaires différents, ce qui confère au processus d'assemblage la possibilité de l'utilisation de machineries spécialisées pour chaque étape. Le passage d'une étape à l'autre nécessite fréquemment le transport des pré-particules intermédiaires d'un site de traitement au suivant. Pendant le processus, de nombreux facteurs intermédiaires, qui ne sont pas retrouvés dans la particule mature, interviennent de façon transitoire afin d'assurer la stabilité ou la maturation des ARN, de protéger les particules immatures contre une activation prématurée, de prévenir les interactions non-spécifiques, de réaliser le transport des particules entre les différents sites de traitement, de favoriser l'échange entre des divers composants intermédiaires. Ces facteurs correspondent à des chaperonnes, des hélicases d'ARN, d'autres RNP, des enzymes de modification, des nucléases; les facteurs impliqués dans la production des RNP sont généralement largement plus nombreux que les composants présents dans la particule mature.

2 Les snoRNA/snoRNP

L'activité des ribosomes nécessite la présence de nucléotides modifiés à des positions précises dans la séquence de leurs ARNr. Ces modifications sont générées par des enzymes catalysant des réactions de modifications chimiques sur les transcrits. Parmi les modifications post-transcriptionnelles les plus abondantes figurent la méthylation de l'hydroxyle en position 2' du ribose (2'-O-méthylation) et la conversion d'uridines en pseudouridines (pseudouridylation). Ces modifications sont présentes dans des régions phylogénétiquement conservées et fonctionnellement importantes du ribosome. Chez les eucaryotes et les archées, ces réactions de modification des ARNr sont majoritairement catalysées par des RNP à activité catalytique méthylase et pseudouridine synthase, appelées snoRNP chez les eucaryotes et sRNP chez les archées (Bleichert and Baserga, 2010). La spécificité des snoRNP repose sur leur composant ARN snoRNA, dont une région s'apparie avec une séquence d'un ARN cible afin de diriger les sous-unités catalytiques de ces RNP sur le site de modification dans les ARN cibles. Ces enzymes comptent également parmi leurs substrats les ARNt chez les archées (Renalier et al., 2005), les ARNm et les snRNA chez les eucaryotes (Cavaille et al., 2000; Ganot et al., 1999; Jady and Kiss, 2001; Massenet S, 1998; Motorin and Helm, 2011; Uliel et al., 2004).

2.1 Les petits ARN nucléolaires (snoRNA)

Les petits ARN nucléolaires (snoRNA) représentent une classe d'ARN régulateurs dont une fonction bien documentée est de participer à la biogenèse des ribosomes. Les snoRNA se répartissent en deux classes en fonction de la conservation de séquences, de leur structure et leur fonction principale: les snoRNA à boîtes C/D et les snoRNA à boîtes H/ACA. Les snoRNA à boîtes C/D participent à la 2'-O-méthylation des nucléotides, et les snoRNA à boîtes H/ACA à la pseudouridylation (Cavaille et al., 1996b; Ganot et al., 1997a).

Une autre catégorie proche des snoARN est représentée par les petits ARN qui s'accumulent spécifiquement dans les corps de Cajal (scaRNA) et qui sont impliqués dans les modifications nucléotidiques des UsnRNA transcrits par l'ARN polymérase II (Darzacq et al., 2002 ; Richard et al., 2003 ; Henras et al., 2004; Meier, 2005). On distingue des scaRNA à boîtes C/D et à boîtes H/ACA mais aussi quelques membres de cette famille contiennent à la fois des boîtes C/D et des boîtes H/ACA (Williams and Farzaneh, 2012).

La désignation de « snoRNA » a été introduite en 1981, mais l'identification initiale du premier petit ARN nucléolaire (le snoRNA U3) a été faite plus de dix ans plus tôt (Pene et al., 1968). Après fractionnement des ARN à partir de noyaux de cellules de rat par électrophorèse sur gel, des bandes d'ARN de petite taille ont été observées, et les ARN correspondants ont été baptisés petits ARN nucléaires (snRNA) (Weinberg, 1973). Comme ceux-ci ont été trouvés être riches en uridine, ils ont reçu la désignation « U » utilisée aujourd'hui. Parmi ceux-ci figurait en abondance un petit ARN nucléolaire, le snoRNA U3 (Busch et al., 1982; Prestayko et al., 1970). L'identification et la caractérisation des snoRNA peuvent être divisées en deux périodes. La période initiale est caractérisée par la découverte des snoRNA et leur lien fonctionnel avec les ARNr, notamment le snoRNA U3 (Hughes and Ares, 1991; Kass et al., 1990), ce qui a permis la prédiction de leur implication dans la synthèse des ribosomes; cette hypothèse a été renforcée après la démonstration du lien fonctionnel entre U3 et les ARNr par la formation de pontages covalents (Beltrame and Tollervey, 1992). Les recherches dans ce domaine ont permis l'identification d'autres snoRNA ou des formes variantes du snoRNA U3, ainsi que la caractérisation structurale et de l'expression du snoRNA U3 et des complexes snoRNP (Maxwell and Fournier, 1995). Après le séquençage de plusieurs snoRNA, les motifs conservés C/D et leur structure secondaire ont été identifiés. À la suite, les boîtes C/D ont été retrouvées dans d'autres snoRNA, et la présence d'autres motifs distincts (les boîtes H/ACA), a conduit à la désignation des deux classes actuelles de snoRNA (Olson 2004).

La deuxième période a commencé à la fin des années 1980, facilitée par les progrès simultanés des nouvelles stratégies et technologies pour l'analyse de la synthèse des ribosomes, des snoRNA et des nouvelles fonctions des ARN. Des anticorps spécifiques pour la triméthylguanosine qui est présente à l'extrémité 5' de snoRNA, ainsi que pour la protéine nucléolaire Fibrillarine a facilité la détection des snoRNA et a permis leur sélection parmi les autres ARN nucléoplasmiques. Depuis, la compréhension de la structure et des fonctions des snoRNA s'est considérablement élargie.

De nouveaux snoRNA ont été identifiés par des approches bio-informatiques basées sur la recherche d'une complémentarité de séquence entre les snoRNA et les ARNr ou d'autres séquences d'ARN. Ces nouvelles techniques de détection plus larges ont non seulement conduit à l'identification d'un grand nombre de snoRNA dans divers organismes, mais ont également permis de retrouver un certain nombre de snoRNA «orphelins», pour lesquels aucunes des cibles ARN connues ne peuvent être identifiés. Ces snoRNA ont finalement conduit à la découverte de nouvelles fonctions cellulaires de ces ARN (Kawaji and Hayashizaki, 2008).

Les dernières années ont connu un développement remarquable des technologies de séquençage à haut débit, ce qui a permis de réaliser des analyses systématiques en transcriptomique (RNA-seq), protéomique (ChIP-seq), génomique (DNA-seq), épigénomique et métabolomique, à travers toutes les facettes de la biologie. Parmi ces techniques, le séquençage du transcriptome est capable d'identifier les taux d'expression de tous les transcrits dans une cellule particulière, à un moment donné, et dans un état particulier, et permet l'identification et la quantification de leurs isoformes, l'expression spécifique des exons, l'expression spécifique des allèles et l'expression haplotype spécifique - pour revue - (Suravajhala et al., 2016).

Les études initiales du transcriptome se basaient sur les technologies d'hybridation sur des puces ADN et offraient une capacité limitée pour cataloguer et quantifier tous les ARN qui sont exprimés dans une cellule. Le séquençage à haut débit de nouvelle génération (NGS, Next Generation Sequencing) (Metzker, 2010) a révolutionné la transcriptomique en permettant l'analyse de l'ARN par séquençage d'ADNc à grande échelle (ARN-seq).

Dans le cas du séquençage des ARN autre que les ARNm, l'ARN cellulaire est choisi en fonction de la gamme de taille souhaitée. Pour les ARN tels que les snoRNA, l'isolement est réalisé par sélection de taille, soit par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, où le fragment d'ARN est découpé du gel et récupéré par diffusion, soit en utilisant des billes magnétiques, qui portent des charges positives dans des environnements acides ($\text{pH} < 6.0$) et des charges négatives lorsque le pH est > 8.0 . L'ARN naturellement chargé peut être lié ou libéré de la surface des billes en fonction du pH de l'environnement (Shi et al., 2015). Des séquences « adaptatrices » sont ajoutées aux extrémités 3' et 5', puis les ARN sont purifiés. La dernière étape est la production d'ADNc par transcription inverse, suivie du séquençage par l'une des technologies disponibles.

2.1.1 Organisation génomique des gènes des snoRNA

L'explosion récente d'études génomiques dans les systèmes eucaryotes (Amaral et al., 2008; Huttenhofer et al., 2002) est révélateur d'une adaptation évolutive remarquable de l'organisation génique des snoRNA. Des nombreuses études réalisées ces dernières années, explorant les snoRNA dans les génomes eucaryotes se concentrent soit sur la structure, la fonction et les cibles des snoRNA (Bachellerie et al., 2002; Filipowicz and Pogacic, 2002; Kiss, 2002; Reichow et al., 2007) ou sur l'expression des snoRNA et leur fonction dans des lignées eucaryotes individuelles: plantes (Brown et al., 2003; Tycowski and Steitz, 2001), drosophile (Tycowski and Steitz, 2001), trypanosomatidés (Uliel et al., 2004),

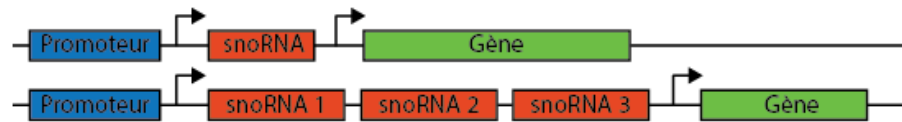
ou humains (Kiss et al., 2006; Lestrade and Weber, 2006). Ainsi, il y a plusieurs types d'organisation génomique des snoRNA qui ont déjà été identifiés chez les cellules eucaryotes, chacune correspondant à un mode de transcription distinct.

2.1.1.1 Diversité des gènes des snoRNA en fonction de leur localisation et de leur mode d'expression

Les séquences de snoRNA peuvent être trouvées au sein d'unités transcriptionnelles qui leur sont propres, ou au sein d'un gène hôte et le plus souvent dans ses régions introniques. Dans ce cas, le snoRNA n'est pas transcrit de façon indépendante mais à partir du promoteur du gène hôte (**Figure 1**). Chez la levure et les animaux, la production des snoRNA à partir des introns est largement dépendante du processus d'épissage. Par contre, chez les plantes, la transcription des snoRNA introniques semble être un phénomène indépendant de l'épissage (Brown et al., 2008).

Dans les deux contextes (intragénique et intergénique), les gènes des snoRNA peuvent être seuls ou organisés en groupes ou clusters. Dans le dernier cas, les snoRNA individuels sont générés à partir d'un précurseur ARN polycistronique qui subit des étapes de clivages enzymatiques. Ce processus chez la levure semble utiliser les mêmes endo et exoribonucléases requises pour la maturation des pré-snoRNA monocistroniques (Chanfreau et al., 1998a; Petfalski et al., 1998; Qu et al., 1999).

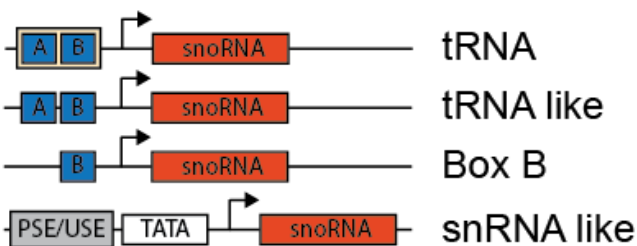
A snoRNA indépendants



B snoRNA introniques



C snoRNA Pol III dépendants



Legende

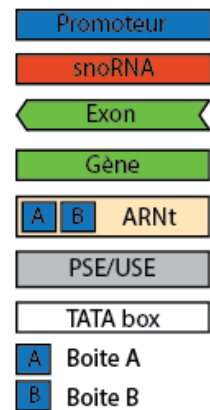


Figure 1 : Organisation génomique des unités transcriptionnelles codant des snoRNA. Représentation schématique des différents types de localisation génomique des gènes des snoRNA. Les unités codant des snoRNA avec des promoteurs indépendants (**A**) et ceux qui sont situés dans les introns (**B**) sont transcrits par l'ARN polymérase II. Fréquemment, les introns du même gène hôte voisin contiennent des snoRNA avec une distribution de type "un gène par intron". Dans ces cas, les séquences codant des snoRNA ont été considérées comme «individuelles introniques», même si plusieurs snoRNA différents peuvent provenir du même transcrit précurseur. Adapté de Dieci et al., 2009.

2.1.1.2 Les gènes des snoRNA avec des promoteurs indépendants

Tous les génomes eucaryotes contiennent des gènes de snoRNA dotés de promoteurs indépendants. Chez la levure et les plantes, de tels promoteurs dirigent la synthèse des transcrits snoRNA monocistroniques et celle des précurseurs polycistroniques. La plupart des promoteurs de gènes de snoRNA sont reconnus par l'ARN polymérase II (Pol II), mais quelques-uns possèdent des éléments de contrôle reconnus par la machinerie de transcription de l'ARN polymérase III (Pol III). Le caractère interchangeable entre Pol II et Pol III dans la transcription des gènes des snoRNA chez les eucaryotes est connu depuis longtemps et se base sur des études des gènes codant le snoRNA U3. Chez les vertébrés et invertébrés, ce gène est transcrit par la Pol II à partir d'un promoteur contenant l'élément de séquence proximal (PSE) caractéristique pour les gènes des snRNA (Jawdekar and Henry, 2008). Chez la levure, les deux gènes de U3 sont transcrits par la Pol II, à partir d'un promoteur TATA, potentialisé par des éléments facilitateurs situés à distance (Nabavi and Nazar, 2008), alors que chez les plantes, et même chez les algues unicellulaires (*Chlamydomonas reinhardtii*), le gène est transcrit par la Pol III à partir d'une séquence située en amont (USE, fonctionnellement analogue à la PSE des métazoaires), suivie d'un élément TATA-like (Antal et al., 2000; Kiss et al., 1991). De plus, chez la levure les deux gènes du snoRNA U3 contiennent un intron avec des séquences conservées (Brule et al., 1995; Myslinski et al., 1990). L'ARN MRP est un autre snoRNA abondant et qui n'a pas de fonction de guide de modification. Son promoteur indépendant a été caractérisé chez plusieurs espèces eucaryotes et est utilisé par la Pol III (à partir des promoteurs PSE/USE-TATA) à la fois chez les métazoaires et chez les plantes, mais pas chez la levure (Briand et al., 2001; Dieci et al., 2007). Une analyse complète des gènes codant le snoRNA U3 et leurs contextes génomiques chez *E. gracilis*, a identifié que, contrairement à la plupart des autres organismes, où le snoRNA U3 est un gène à copie unique, chez l'*Euglena* il est codé par une famille multigénique comprenant au moins 14 membres (Charette and Gray, 2009). Il existe moins de données concernant l'organisation des promoteurs des gènes transcrits de manière autonome codant les snoRNA guides. Néanmoins, ils apparaissent généralement être transcrits par la Pol II à partir de promoteurs en amont (Deng et al., 2006; Leader et al., 1997; Tycowski et al., 2004), mais la nature de ces promoteurs est en grande partie non caractérisée. Certaines informations sont disponibles dans le cas de la levure, où les promoteurs des gènes de snoRNA ont tendance à contenir des boîtes TATA et des éléments riches en A/T, ainsi que des sites de liaison pour les facteurs régulateurs généraux, comme Rap1p et Abf1p (Qu et al., 1999). Le snoRNA snR52 de levure est une exception, car il est transcrit par la Pol III à partir des régions de contrôle (boîtes A et B, typiques des gènes d'ARNt) qui sont situées dans une séquence transcrite primaire (Guffanti et al., 2006).

L'utilisation des boîtes A et B spécifiques à la Pol III pour la transcription des gènes de snoRNA a également été décrite chez les plantes *A. thaliana* et *O. sativa*, où quelques snoRNA guides sont synthétisés comme précurseurs bicistroniques ARNt-snoRNA (Kruszka et al., 2003), et chez le nématode *C. elegans* (Deng et al., 2006). Au moins deux gènes de snoRNA guides chez la drosophile sont également transcrits indépendamment par la Pol III, possiblement grâce à l'utilisation des éléments promoteurs contenant la boîte B (Isogai et al., 2007). En conclusion, il semble que la transcription des gènes autonomes des snoRNA a évolué plutôt de manière opportuniste, grâce à l'exploitation flexible des différents types de promoteurs spécialisés.

2.1.1.3 Les gènes des snoRNA introniques

Les snoRNA introniques ont été identifiés dans tous les génomes eucaryotes. Ils peuvent être trouvés soit dans une organisation "un gène par intron", ou en groupes de deux ou plusieurs unités codantes situés dans le même intron. Ces groupes, à leur tour, peuvent être soit constitués de gènes de snoRNA homologues (groupe d'homoclusters), provenant probablement des duplications locales en tandem, ou consistent en gènes de snoRNA hétérologues (groupes d'hétéroclusters) qui peuvent même contenir à la fois des snoRNA à boîtes C/D et des snoRNA à boîtes H/ACA (Chen et al., 2008b). Aussi, des grands groupes d'hétéroclusters introniques peuvent être composés de plusieurs petits hétéroclusters (Brown et al., 2003). Souvent, les différentes unités contenant des séquences de snoRNA se trouvent dans des introns de gènes d'ARN non-codants. Une telle situation a été initialement identifiée chez les mammifères et plus tard chez la drosophile (Tycowski and Steitz, 2001), et se caractérise par la présence de plusieurs gènes de snoRNA différents au sein des introns consécutifs de la même unité de transcription non-codante, avec une distribution "un gène par intron" (Huang et al., 2005b). Apparemment, ces unités de transcription, également appelés UHG (à partir du gène hôte U22 identifié à l'origine (Tycowski et al., 1996)), sont consacrées à la production des snoRNA. Ils pourraient donc, en principe, être classés parmi les gènes des snoRNA exprimés par des promoteurs indépendants. Cependant, en raison de leur emplacement particulier, elles sont comptées parmi les unités de codage des snoRNA introniques (**Tableau 3**). Enfin, un intérêt particulier est l'identification, dans le génome de *C. elegans*, de loci de snoRNA introniques montrant des signes de transcription indépendante (par exemple la présence de séquences conservées en amont, qui dans certains cas ressemblent à des régions de contrôle spécifiques pour la Pol III (Deng et al., 2006). Une observation similaire a été faite dans une recherche génomique à haut débit des signatures des promoteurs des gènes de miRNA chez l'homme, montrant qu'un tiers des miRNA introniques humains contiennent des régions d'initiation de la transcription indépendantes,

qui, pour la plupart, sont spécifiques à la Pol II (même si certains d'entre eux sont occupés par la Pol III *in vivo* et présentent des éléments spécifiques au promoteurs de type Pol III) (Ozsolak et al., 2008).

Organisme	snoRNA	Gènes	Indépendants		Introniques		Polymérase III
			Individuel	Clusters	Individuel	Clusters	
<i>S. cerevisiae</i>	75	76 (47 C/D; 29 H/ACA)	50 (23 C/D; 27 H/ACA)	17 (C/D)	8 (6 C/D; 2 H/ACA)	0	1
<i>S. pombe</i>	55	55 (32 C/D; 24 H/ACA)	43 (20 C/D; 24 H/ACA)	8 (C/D)	4 (C/D)	0	0
<i>C. elegans</i>	161	161 (96 C/D; 65 H/ACA)	42 (33 C/D; 9 H/ACA)	0	119 (63 C/D; 56 H/ACA)	0	71
<i>D. melanogaster</i>	131	227 (111 C/D; 116 H/ACA)	8 (5 C/D; 3 H/ACA)	0	135 (101 C/D; 34 H/ACA)	82 (5 C/D; 77 H/ACA)	2 (H/ACA)
<i>H. sapiens</i>	216	456 (257 C/D; 181 H/ACA)	42 (15 C/D; 27 H/ACA)	2 (1 C/D; 1 H/ACA)	412 (259 C/D; 153 H/ACA)	0	0
<i>O. sativa</i>	140	357 (345 C/D; 12 H/ACA)	76 (C/D)	174 (169 C/D; 5 H/ACA)	0	104 (97 C/D; 7 H/ACA)	3 (C/D)
<i>A. thaliana</i>	155	246 (199 C/D; 47 H/ACA)	57 (42 C/D; 15 H/ACA)	146 (131 C/D; 15 H/ACA)	23 (6 C/D; 17 H/ACA)	6 (C/D)	14 (C/D)

Tableau 3: Organisation des gènes des snoRNA dans des génomes eucaryotes de référence.

Adapté de (Dieci et al., 2009).

2.1.1.3.1 Caractéristiques fonctionnelles communes de gènes hôtes des snoRNA introniques

Lorsque les snoRNA introniques ont été découverts, ils se sont avérés être associés à des gènes codant des protéines impliquées dans la fonction du nucléole, la structure du ribosome ou la synthèse des protéines (Maxwell and Fournier, 1995). Des données génomiques confirment le fait que la tendance des unités de snoRNA à coloniser des gènes liés à la fonction ribosomique représente une caractéristique universelle de l'organisation des gènes des snoRNA chez les eucaryotes. Fait important, la plupart des gènes hébergeant des snoRNA guides chez les vertébrés appartiennent à la famille de gènes TOP (terminal oligopyrimidique), qui comprennent des gènes codant des protéines liées à la traduction,

mais aussi d'autres gènes caractérisés par une transcription massive et une régulation dépendante de la croissance (Yamashita et al., 2008). Ce biais de localisation universelle de gènes des snoRNA introniques suggère la possibilité d'une expression régulée de manière coordonnée entre les snoRNA et d'autres composants impliqués dans le même processus (c. à. d. la biogenèse du ribosome) (Bachellerie *et al.*, 2002; Maxwell and Fournier, 1995).

Cas des snoRNP à boîtes C/D. Chez l'homme, les snoRNA à boîtes C/D sont préférentiellement situés à une distance conservée, environ 70 nt en amont du site d'épissage 3' de l'intron et au moins 41 nt en aval du point de branchement (Hirose and Steitz, 2001). Des expériences réalisées sur le gène de la protéine GAS5, qui contient les snoRNA à boîtes C/D U75 et U76 introniques, ont montré que leur synthèse est optimale lorsque la distance entre le site d'épissage en 3' et le gène des snoRNA est située entre 65 et 85 nt, indépendamment de la séquence nucléotidique (Hirose and Steitz, 2001). Cette longueur minimale est particulièrement rigide: si elle est de moins de 65 nt, l'expression du snoRNA est abolie. La seule exception connue à cette règle concerne le snoRNA U16, codé dans le premier intron du gène de la protéine ribosomique L1. Cet intron hôte est un intron de classe mineure (intron AC-AT) excisé par le spliceosome dépendant de U12 (Burge et al., 1998). La conservation de cette distance a également été observée dans le gène *UHG* de la drosophile (Tycowski and Steitz, 2001), ce qui suggère que cette contrainte de longueur est générale pour les organismes métazoaires (Hirose and Steitz, 2001). Par contraste avec l'effet de la distance entre le point de branchement en 3' et le corps du gène des snoRNA à boîtes C/D, de manière surprenante le déplacement de la région codante du snoRNA plus proche de l'extrémité 3' du site d'épissage n'a pas d'incidence sur l'épissage de l'intron hôte. Ces données suggèrent l'existence d'un couplage fonctionnel avec la machinerie d'épissage. L'assemblage du spliceosome soit précède ou soit est capable de déplacer les protéines du complexe snoRNP (Hirose and Steitz, 2001). Ainsi, des interactions sont probablement mises en place entre des facteurs d'épissage et les protéines cœur ou les facteurs d'assemblage des snoRNP pendant leur biogenèse (Hirose and Steitz, 2001). Les premières observations indiquent que le recrutement des protéines SNU13 et Fibrillarine s'effectue après la formation du complexe spliceosomal C1 sur les intermédiaires en lasso de la réaction d'épissage (Hirose et al., 2003). Des expériences *in vitro* ont démontré que le recrutement de la protéine cœur SNU13 sur le motif en K-turn de snoRNA à boîtes C/D introniques dépend de facteurs d'épissage spécifiques du complexe spliceosomique C1, ce qui explique le besoin d'un emplacement approprié par rapport au point de branchement pour une maturation efficace (Hirose *et al.*, 2003; Richard et al., 2006). La protéine IBP160 (Intron Binding Protein 160), appartenant à ce complexe, interagit avec la région située 33 à 40 nt en amont du point de branchement et ce, de manière distance-spécifique plutôt que

séquence-spécifique (Hirose et al., 2006). Vu que cette protéine est requise pour la production de snoRNP, celle-ci correspond probablement à un facteur de couplage entre l'épissage et la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D. Cependant, aucune interaction n'a été observée entre IBP160 et SNU13 ou la Fibrillarine. Cela suggère l'existence d'autres partenaires associés aux snoRNA à boîtes C/D qui interviendraient dans ce processus. Les données actuelles suggèrent que l'IBP160 assisterait par son activité hélicase le repliement correct de l'ARN plutôt que de recruter directement des partenaires protéiques (Hirose *et al.*, 2006).

Chez la levure, si cette distance est inférieure à 44 nt, ni l'ARNm, ni le(s) snoRNA hébergé(s) dans son intron ne sont produits (Vincenti et al., 2007). Chez la levure il y a peu de snoRNA introniques (Maxwell and Fournier, 1995). Leur libération dépend en partie de l'épissage du pré-ARNm et de leur excision de l'intron en forme de lasso qui doit être ouvert par l'enzyme de débranchement Dbr1p. Pourtant, les snoRNA introniques peuvent être produits chez des levures déficientes en Dbr1p (Ooi et al., 1998), ce qui suggère l'implication d'une autre endonucléase qui linéarise le lasso intronique (Ooi *et al.*, 1998). Néanmoins, le taux de snoRNA introniques matures est réduit dans des mutants de Dbr1p. Fait intéressant dans ces expériences, l'accumulation des snoRNA introniques au sein des précurseurs en forme de lasso variaient en fonction de la taille de l'intron hôte. Les snoRNA introniques portés par les introns courts, tels que U24 et snR38, s'accumulent plus sous forme de précurseurs en lasso que ceux codés dans les introns plus longs, par exemple, les snoARN U18 et snR39 (Ooi *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent l'existence d'une voie de biosynthèse impliquant une maturation exonucléolytique dépendante de l'épissage pour les snoRNA introniques. Curieusement, le snoRNA U24 présent dans une structure en lasso peut être fonctionnel pour réaliser la méthylation de l'ARN ribosomique (Ooi *et al.*, 1998).

Des exonucléases produisent les extrémités finales 5' et 3' des snoRNA: les exonucléases 5' → 3' de levure Rat1p et Xrn1p jouent un rôle essentiel dans la formation de l'extrémité 5' des snoRNA introniques et polycistroniques (Petfalski *et al.*, 1998). La maturation de certains snoRNA de levure à leur extrémité 3' exige spécifiquement l'exonucléase 3' → 5' Rrp6p, qui est une sous-unité des complexes exosomes nucléaires de levure (Allmang et al., 1999).

Cas des snoRNA H/ACA. Contrairement aux snoRNA à boîtes C/D introniques, les gènes des snoRNA à boîtes H/ACA humains ne montrent pas une localisation préférentielle à proximité de l'extrémité 3' de leurs introns hôtes (Schattner et al., 2006). Alors que la longueur moyenne d'un intron humain est d'environ 3400 nt (Lander et al., 2001), la longueur moyenne des introns contenant des snoRNA à boîtes H/ACA est d'environ 7400 nt. La

signification fonctionnelle de cette observation, reste incertaine, d'autant plus que certains snoRNA à boîtes H/ACA sont situés dans des introns très courts (Richard *et al.*, 2006). De plus, il a été constaté qu'ils se localisent de façon aléatoire par rapport aux extrémités des introns hôtes. Des expériences *in vivo* ont montré que l'expression du snoRNA à boîtes H/ACA humain U64 n'est pas affectée par un changement de sa position intronique par rapport au point de branchement et que les snoRNA H/ACA U17, U19 et U64 flanqués par des séquences courtes naturelles sont également traités de manière efficace à partir de l'extrémité 5', du milieu ou de la région 3' terminale du deuxième intron du pré-ARNm du gène de la β -globine humaine (Richard *et al.*, 2006). Pris ensemble, ces résultats plaident fortement contre une synergie entre le traitement des snoARN à boîtes H/ACA humains et l'épissage des pré-ARNm (Richard *et al.*, 2006).

Chez la levure, les protéines Nhp2 et Cbf5 du cœur des snoRNP à boîtes H/ACA, ainsi que le facteur d'assemblage Naf1p (Dez *et al.*, 2002; Fatica *et al.*, 2002) sont présents au niveau des snoRNA à boîtes H/ACA activement transcrits (Ballarino *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Etant donné que Naf1p peut interagir avec Cbf5p et Nhp2p ainsi qu'avec le domaine carboxy-terminal phosphorylé (CTD) de l'ARN polymérase II (Ho *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2001) et qu'il est associé aux facteurs Pol II Spt16p, Sub1p et Tfg1p (Yang *et al.*, 2005), il est proposé qu'il joue un rôle central dans le recrutement des protéines cœur sur le snoRNA en cours de synthèse (Richard *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2005).

Vu que les introns de mammifères sont très instables après leur débranchement, il semble raisonnable de supposer que, dans le but de maximiser l'efficacité de l'expression des ARN introniques, les protéines cœur des RNP H/ACA et les facteurs d'assemblage sont activement recrutés sur le pré-ARNm naissant (Richard *et al.*, 2006). L'association des protéines H/ACA peut efficacement concurrencer le recrutement des facteurs d'épissage qui sont chargés activement sur le pré-ARNm naissant au cours de la transcription. L'existence d'un mécanisme stimulant l'assemblage des précurseurs snoRNP à boîtes H/ACA sur le pré-ARNm naissant est en outre soutenu par le fait que l'expression correcte et efficace des RNP à boîtes H/ACA humaines est dépendante de la transcription par la Pol II (Richard *et al.*, 2006).

2.2 Les fonctions des snoRNA/snoRNP

Les premiers membres de la famille des snoRNA à boîtes C/D qui ont été caractérisés fonctionnellement, les snoRNA U3 et U8, qui sont essentiels et hautement conservés, sont codés dans leurs propres unités de transcription et jouent un rôle dans le clivage endonucléolytique et dans le repliement des pré-ARNr (Kass *et al.*, 1990; Peculis and Steitz, 1993; Tyc and Steitz, 1989). Deux snoRNA supplémentaires (snR10/ACA21 et snR30/U17) sont également requis pour des clivages précoces du pré-ARNr, mais un très grand nombre de snoRNA servent de guides pour spécifier les positions à modifier, principalement dans les ARNr et aussi dans le petit ARN nucléaire U6 transcrit par l'ARN polymérase III (Ganot *et al.*, 1999; Watkins and Bohnsack, 2012). Des molécules apparentées au snoRNA à boîtes C/D, les petits ARN spécifiques des corps de Cajal (scaARN), guident la modification des autres UsnRNA, qui sont transcrits par l'ARN polymérase II (Darzacq *et al.*, 2002). Chez les vertébrés, des dizaines à des centaines de nucléotides de l'ARNr sont modifiés par les snoRNP, soit par une 2'-O-ribose méthylation guidée par des snoRNA à boîtes C/D, soit par une pseudouridylation guidée par les snoRNA à boîtes H/ACA (Bachellerie *et al.*, 2002; Filipowicz and Pogacic, 2002; Tyc and Steitz, 1989; Watkins and Bohnsack, 2012) (tel que décrit dans le tableau **Tableau 4** pour l'homme).

Cependant, dans plusieurs organismes, un nombre important de snoRNA n'ont pas de cibles identifiées (Hertel *et al.*, 2008; Vitali *et al.*, 2003) (**Tableau 4** pour l'homme). En plus de ces snoRNA orphelins, plusieurs études récentes ont décrit des snoRNA présentant des caractéristiques et des modèles d'expression non canoniques, ainsi que des interactions avec des partenaires protéiques inattendus et assurant des fonctions diverses et non canoniques, ce qui suggère l'existence de fonctions portées par les snoRNP plus complexes que celles connues actuellement (Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015). Par exemple, plusieurs analyses par ARN-seq ont révélé l'association étroite des snoRNA et d'autres espèces d'ARN au niveau de la chromatine (Caudron-Herger *et al.*, 2011; Mondal *et al.*, 2010).

Fonctions canoniques	snoRNA à boîtes C/D	snoRNA à boîtes H/ACA
Clivage endonucléolytique et repliement du pré-ARN	6 snoRNA	0
Modifications des ARNr	118 snoRNA (110 positions 2' O-méthylées)	86 snoRNA (100 positions pseudouridylées)
Modifications du snRNA U6	6 snoRNA (5 positions 2' O-méthylées)	1 snoRNA (2 positions pseudouridylées)
snoRNA orphelins	137 snoRNA	21 snoRNA
Total	267 snoRNA	108 snoRNA

Fonctions non-canoniques	snoRNA à boîtes C/D	snoRNA à boîtes H/ACA
Régulation de la chromatine	7 snoRNA	14 snoRNA
Epissage	3 snoRNA	0
Modification de cibles non-canoniques	0	2 snoRNA
Médiateurs du stress oxydatif	5 snoRNA	1 snoRNA
sdRNA avec des propriétés miRNA-like	10 snoRNA	1 snoRNA
snoRNA chevauchant des loci codant des miRNA	2 snoRNA	2 snoRNA
Total	27 snoRNA	20 snoRNA

Tableau 4: Fonctions des snoRNA et nombre de membres identifiés à ce jour chez l'humain. Adapté de (Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015).

2.2.1 Méthylation des cibles non-canoniques

Les cibles canoniques de snoRNA C/D et H/ACA ont été largement caractérisées et des centaines de nucléotides 2'-O-méthylés ou de pseudouridines ont été identifiées dans les ARNr chez l'humain (Bachellerie *et al.*, 2002; Filipowicz and Pogacic, 2002; Lestrade and Weber, 2006). Chez les archées, en plus de modifier les ARNr, les ARN équivalents aux snoRNA sont également connus pour modifier les ARNt (Bachellerie *et al.*, 2002). Il a été montré par ingénierie des ARN que les éléments guide des snoRNA peuvent être modifiés pour cibler la modification de sites non-ARNr, quoique ces modifications se réalisent moins

efficacement que pour les ARNr, probablement parce que le substrat modifié n'est pas localisé au niveau du nucléole (Cavaille et al., 1996b). Des expériences récentes de PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation) réalisées avec des cellules humaines HEK293 ont conduit à l'identification de nouvelles cibles potentielles. Parmi les ARN identifiés à plusieurs reprises comme liés aux snoRNP à boîtes C/D, d'autres ARN ont été détectés, comme les ARN 7SK et 7SL, qui ont été validés comme portant des sites 2'-O-méthylés, bien que les snoRNA guidant ces modifications ne sont pas encore connus (Kishore et al., 2013). En outre, les snoRNA à boîtes C/D ont été identifiés associés aux snoRNP à boîtes H/ACA et vice-versa, ce qui suggère qu'une classe de snoRNA peut guider les modifications sur les ARN de l'autre famille. En effet, le snoRNA H/ACA SNORA61 est 2'-O-méthylé et les snoRNA à boîtes C/D SNORD16 et SNORD35A sont pseudouridylés, mais les snoRNA guides de ces modifications ne sont pas identifiés (Kishore *et al.*, 2013). Enfin, de nombreux ARNm ont également été détectés associés aux snoRNP dans ces expériences. Un nombre statistiquement significatif de séquences de snoRNA guide ont été identifiées comme complémentaires pour un grand nombre de ces ARNm, ce qui suggère que les snoRNA pourraient jouer un rôle dans la modification des ARNm (Kishore *et al.*, 2013).

2.2.2 Redondance des snoRNA

Les régions guide des snoRNA canoniques interagissent par complémentarité des bases avec leurs séquences d'ARN cibles, en formant un duplex d'ARN de 6 à 20 paires de bases, sans former de boucles et avec peu de mésappariements (Chen et al., 2007; Ganot et al., 1997b).

L'identification des éléments canoniques des snoRNA a été réexaminée au cours des dernières années, offrant une vue nuancée vis-à-vis de l'identification de leurs cibles, des modifications apportées et de leurs régulations. En 2011, un sous-ensemble de snoRNA à boîtes C/D de *Saccharomyces cerevisiae* et humains a été dégagé pour lequel les snoRNA possèdent des séquences complémentaires étendues qui ne sont pas contigües à la séquence guide et dans certains cas, se situent à l'autre extrémité du snoRNA (van Nues et al., 2011). Les nouvelles interactions impliquent entre 4 et 10 résidus supplémentaires qui s'apparient avec l'ARN cible. Les appariements de bases supplémentaires favorisent probablement l'interaction snoRNA-ARN cible ou augmente sa stabilité, possiblement en facilitant l'accès à des régions fortement structurées des ARNr (van Nues *et al.*, 2011). Les appariements de bases supplémentaires stimulent jusqu'à un facteur cinq le taux de méthylation (van Nues *et al.*, 2011).

Dans une étude ultérieure, des analyses génomiques comparatives ont conduit à la prédiction de cibles pour les snoRNA orphelins. Les fonctions de snoRNA homologues se sont révélées être évolutivement stables, permettant d'attribuer à quatre snoRNA orphelins humains des cibles dans l'ARNr et de proposer des snoRNA guides pour huit positions modifiées déjà connues dans l'ARNr, ainsi que deux positions modifiées connues dans les snRNA, pour lesquelles aucun guide n'avait été précédemment retrouvé (Kehr *et al.*, 2014). De plus, des complémentarités ont été prédites entre de nombreux snoRNA et des régions orphelines dans les ARNr pas connues pour être modifiées, ce qui soulève la possibilité que ces modifications pourraient être apportées spécifiquement dans certaines conditions ou dans certains tissus et pourraient contribuer à la spécialisation des ribosomes (Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015; Kehr *et al.*, 2014; Xue and Barna, 2012).

La redondance ajoute également un niveau de complexité dans l'étude de la régulation des cibles des snoRNA. La redondance apparente entre des snoRNA et des cibles a été remarquée dans de nombreux organismes, avec de nombreux snoRNA présents sous forme de petites familles de deux ou trois membres presque identiques. Certains présentent des dizaines de copies de gènes, un exemple étant les 42 copies du snoRNA HBII-52 chez l'homme (Nahkuri *et al.*, 2008), et un exemple encore plus marquant dans le génome de l'ornithorynque qui porte jusqu'à des dizaines de milliers de copies d'un snoRNA H/ACA issues d'un rétrotransposon (Schmitz *et al.*, 2008). Quand ils ne sont pas orphelins, ces paralogues guident généralement la modification des mêmes cibles et sont codés dans des introns différents du même gène hôte, bien que ce ne soit pas toujours le cas (Hoeppner and Poole, 2012; Hoeppner *et al.*, 2009). Chez l'humain, selon la banque de données *snoRNA database*, (Lestrade and Weber, 2006), 22 des 120 (18%) positions modifiées par les snoRNA dans la grande sous-unité ribosomique sont guidées par plus d'un snoRNA, tandis que pour la petite sous-unité ribosomique, la proportion des résidus modifiés par des snoRNA redondants atteint 29% (22 sur 76).

Les snoRNA ont été décrits comme des éléments génétiques mobiles intragénomiques pouvant migrer à des endroits différents mais aussi pouvant se copier à l'aide de mécanismes de rétrotransposition comme en témoignent leurs nombreuses copies dans les génomes de mammifères (Schmitz *et al.*, 2008; Weber, 2006). De nombreuses familles de snoRNA sont anciennes et remontent au dernier ancêtre commun eucaryote (LECA), mais alors que beaucoup de leurs gènes hôte sont soupçonnés avoir existé dans le LECA, des études génomiques comparatives menées par Hoeppner et Poole suggèrent que l'emplacement intronique des snoRNA n'est pas ancestral (Hoeppner and Poole, 2012). Il a été récemment proposé que l'évolution des snoRNA suit un modèle de dérive par lequel les

snoRNA migrent de façon intragénomique dans différents gènes hôtes, principalement sur la base de leur profils d'expression (Hoeppner and Poole, 2012). Il est proposé que la grande mobilité et la redondance des snoRNA a probablement favorisé l'acquisition de nouvelles cibles et de nouvelles fonctions (Weber, 2006).

2.2.3 Les snoRNA dans les pathologies

Des variations de taux d'expression de snoRNA dans différents tissus ont été observées chez différents organismes et l'hypothèse d'une possible régulation tissu-spécifique en lien avec les transcrits de leurs gènes hôtes a été proposée (Chang et al., 1998). Des profilages d'ARNnc, comme les microARN et les snoRNA, dans différents échantillons sanguins ou de biopsies de patients atteints de pathologies ont également montré des variations de taux d'expression de ces ARNnc, suggérant une utilisation possible de ces ARN comme biomarqueurs de pathologies. Ces observations suggèrent également la possibilité des liens directs entre dérégulation de l'expression des ARNnc et développement pathologique.

2.2.3.1 *Les snoRNA dans les maladies neurodégénératives*

Le système nerveux central contient un grand nombre de types cellulaires, qui expriment environ 80% des protéines du génome humain, excédant ainsi l'expression génique de tous les autres organismes (Gstir et al., 2014; Lein et al., 2007). Ainsi, l'expression génique, contrôlée par des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles, est d'une grande diversité dans les différents types cellulaires. Elle suit des changements continus pendant le développement et présente des adaptations en réponse à des stimuli environnementaux. En général, les ARNnc augmentent la complexité de la régulation génique dans tous les tissus humains. La complexité d'un organisme n'est pas en relation avec la taille de son génome, ni avec le nombre de gènes codant des protéines (**Figure 2**) (Lein et al., 2007; Taft et al., 2007). Alors que le nombre de gènes codant des protéines reste relativement constant, les séquences non-codantes introniques et intergéniques augmente en fonction de la complexité des organismes (Mattick, 2011).

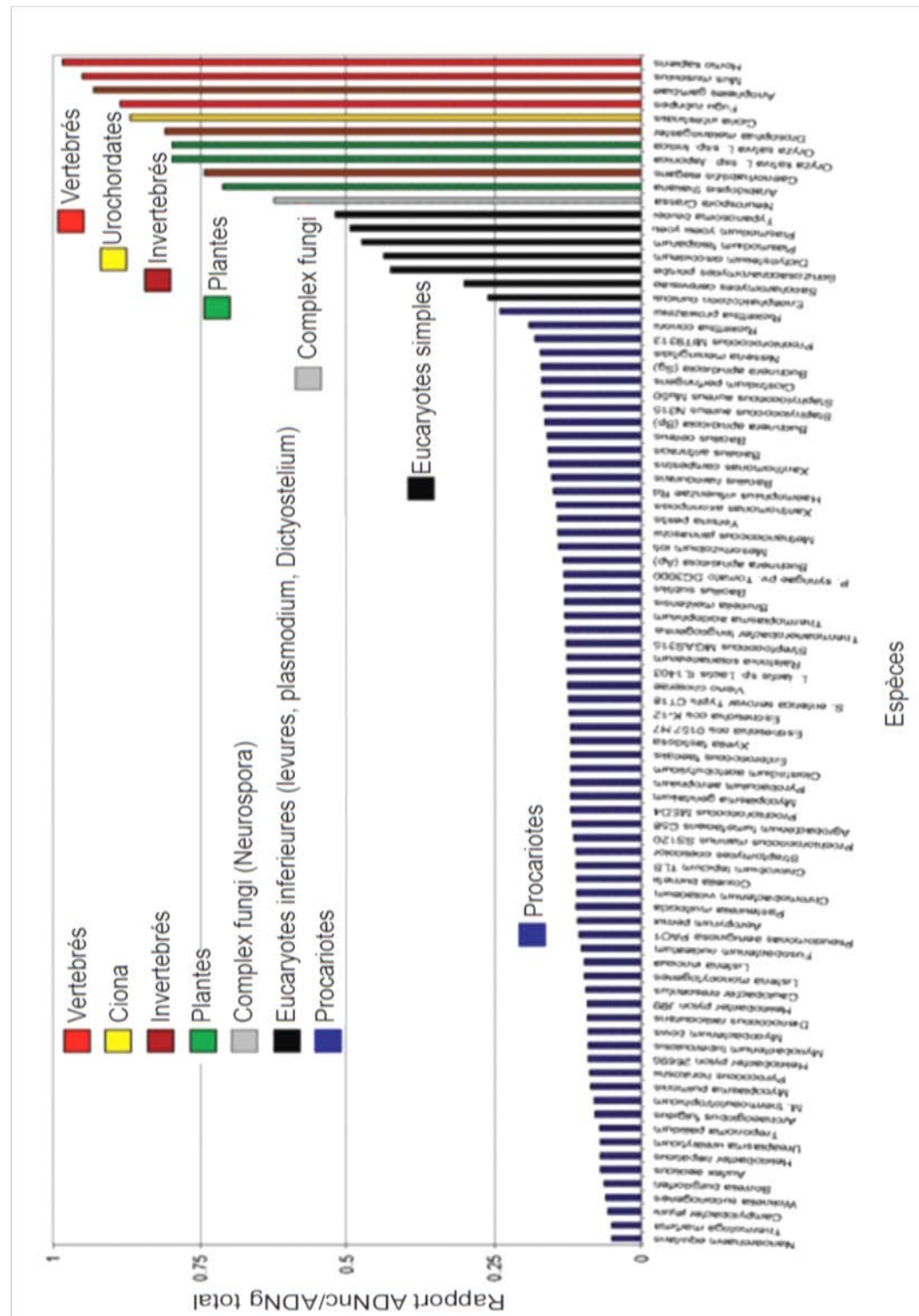


Figure 2 : La proportion des séquences ne codant pas de protéines augmente avec la complexité du processus de développement des organismes. Adapté de (Mattick, 2011; Taft *et al.*, 2007).

Les ARNnc ont été trouvés être impliqués dans des nombreuses maladies neurologiques (Cavaille *et al.*, 2000; Haramati *et al.*, 2010; Hebert *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007; Stark *et al.*, 2008; Taft *et al.*, 2009a). Le snoRNA orphelin HBII-52, qui est localisé dans un locus soumis à l’empreinte génétique parentale et est exprimé dans le cerveau, participe à l’épissage alternatif du récepteur de sérotonine 2C par complémentarité des séquences ARNm-snoRNA (Nicholls and Knepper, 2001). L’inactivation de ce snoRNA conduit à une production de différentes formes d’ARNm (Kishore and Stamm, 2006). Ce snoRNA est situé au locus humain 15q11q13, qui est associé avec deux maladies neurologiques: le syndrome Prader-Willi et le Syndrome Angelman. Ces maladies apparaissent après une perte d’expression génique dans cette région sur l’une des deux allèles (paternel ou maternel). La perte de snoRNA dans cette région peut être impliquée dans la progression de ces maladies possiblement par un épissage inapproprié de l’ARNm du récepteur de la sérotonine (Nicholls and Knepper, 2001).

Plus récemment, des études visant à déterminer les variations dans les taux des ARN non codants dans différents modèles murins de maladies neurologiques comme la maladie d’Alzheimer, ont trouvé une dérégulation de deux nouveaux snoRNA (e307 et e470), dérégulation détectable avant la formation des plaques amyloïdes (Gstir *et al.*, 2014).

2.2.3.2 Implication des snoRNA dans le cancer

2.2.3.2.1 Rôle de pro-oncogène

Les premières indications que les snoRNA pouvaient être impliqués dans l’apparition des cancers datent depuis plus d’une dizaine d’années. Ainsi, il a été observé que les snoRNA H/ACA h5sn1, h5sn2, h5sn3 et h5sn4, qui ont un niveau d’expression variable dans les divers tissus humains, ont une expression dérégulée dans les méningiomes par rapport aux tissus de cerveau normal (Chang *et al.*, 2002). Cette observation a suggéré la possibilité d’un lien possible entre le processus de biogenèse des snoRNA et la cancérogenèse. Des études ultérieures menées dans cette direction ont confirmé ce lien (Dong *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2008; Gee *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2010; Martens-Uzunova *et al.*, 2012; Mourtada-Maarabouni *et al.*, 2008; Mourtada-Maarabouni *et al.*, 2009; Siprashvili *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016c).

Le SNORA42 a été récemment trouvé surexprimé dans certains cancers du poumon (cancers non à petites cellules, NSLC) (Mei *et al.*, 2012). La réduction du taux de SNORA42 par siARN a comme résultat une diminution de la croissance cellulaire et un effet inhibiteur sur les capacités oncogénique des lignées cellulaires de NSLC. Ces cellules sont aussi

moins susceptibles à former des tumeurs dans des modèles de souris *nude* (athymiques). Au contraire, une surexpression de ce snoRNA conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire *in vitro*. Il a été aussi montré que son expression est inversement corrélée à celle de la protéine p53 (Tumor protein p53), le suppresseur de tumeurs retrouvé le plus inhibé dans tous les types de cancers. Ces résultats suggèrent que le rôle oncogène du SNORA42 serait lié à une inhibition de l'apoptose dépendante de la protéine p53, mais le mécanisme exact de ce lien n'a pas encore été précisé. Le SNORA42 est surexprimé dans des cancers de poumon (Liao *et al.*, 2010) et les patients chez lesquels il est surexprimé présentent un temps de survie réduit par rapport aux autres patients (Mei *et al.*, 2012).

Un travail visant à trouver une corrélation entre le profil d'expression des snoRNA avec des anomalies chromosomiques fréquents dans les leucémies aiguës a mis en évidence une sous-expression globale des snoRNA dans des leucémies par rapport à des cellules saines (Valleron *et al.*, 2012). Cette même étude a aussi conduit à identifier les SNORD112 et SNORD114 (exprimés normalement dans le cerveau) spécifiquement exprimés dans les leucémies aiguës promyélocyaires (LAP). La surexpression du variant SNORD114-1 active la croissance cellulaire, a priori en modulant le cycle cellulaire via une inhibition du suppresseur tumoral Rb (*Retinoblastoma protein*) (Valleron *et al.*, 2012).

Une analyse globale des snoRNA présents dans les cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou a identifié une dérégulation globale des 33 snoRNA par rapport à des cellules normales (Zou *et al.*, 2015). Notamment la réduction très importante d'un de ces snoRNA, le *SNORD35B* (snoRNA à boîtes C/D) a été trouvée être corrélée avec la survie globale des patients, suggérant une importance fonctionnelle dans la pathogénie de ce type de cancer et dans l'évolution clinique des patients.

2.2.3.2.2 Rôle anti-tumoral

Les snoRNA SNORD50A et SNORD50B ne sont exprimés dans 10-40% des cancers humains les plus fréquents. Ces deux ARN sont connus pour guider la modification de l'ARNr 28s (Rebane *et al.*, 2002). Les premières pistes indiquant un rôle possible dans les cancers reposent sur la découverte que le gène hôte de SNORD50 est localisé au niveau du point de cassure de la translocation t(3;6)(q27;215), présente dans des nombreux cancers (Tanaka *et al.*, 2000). Ultérieurement, il a été retrouvé comme étant le seul gène du locus 6q14-q15 à être muté et sous-exprimé dans le cancer de la prostate (Dong *et al.*, 2008) et la présence des variants mutés homozygotes est associée à des cancers de grade élevé. Le rôle de suppresseur de tumeurs a été aussi identifié par la suite dans des cancers du sein (Dong *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été trouvé que l'absence d'expression de ces

snoRNA a comme conséquence une quantité augmentée de K-Ras active et une hyper activation de la voie de signalisation Ras-ERK1/ERK2, ainsi qu'une affinité accrue d'une farnésyltransférase pour K-Ras et une phosphorylation anormale de cette protéine. Ces observations suggèrent que les modifications de K-Ras sont synergiques avec la perte d'expression de SNORD50A et SNORD50B dans les cancers. Une invalidation des gènes de ces deux snoRNA par le système CRISPR/Cas9 favorise la tumorigénèse, et une délétion des deux snoRNA apparue de manière concomitante avec des mutations dans la protéine K-Ras a été identifiée dans de multiples tumeurs humaines (Siprashvili et al., 2015).

Une approche de séquençage à haut débit des ARNnc dans des cellules de cancer de poumon de type NSCLC (non-small cell lung carcinoma) (Gao et al., 2015) a identifié une série de 29 snoARN qui sont surexprimés à un niveau au moins trois fois supérieur par rapport à des tissus de poumon normal. La vérification de ces résultats par qRT-PCR a confirmé cette surexpression pour 16 snoRNA; 6 gènes (snoRA47, snoRA68, snoRA78, snoRA21, snoRD28 et snoRD66) ont été identifiés associés à la survie globale des patients atteints de NSCLC quand ils sont surexprimés, avec une sensibilité et une spécificité de 70% à 95,0%. Un modèle de prédiction composé de trois gènes (snoRA47, snoRA68 et snoRA78) a été développé, pouvant potentiellement prédire de façon significative la survie globale des patients.

snoRNA	Type	Expression	Implication	Type cancer	de
U50	à boîtes C/D	Réduite	Suppresseur tumoral	Sein et prostate	
h5sn2	à boîtes H/ACA	Réduite	Suppresseur tumoral	Méningiome	
RNU43	à boîtes C/D	Réduite	Suppresseur tumoral	Sein et poumon	
RNU44	à boîtes C/D	Réduite	Suppresseur tumoral	Sein et poumon	
snoRD33	à boîtes C/D	Augmentée	Oncogène	NSCLC	
snoRD66	à boîtes C/D	Augmentée	Oncogène	NSCLC	
snoRD76	à boîtes C/D	Augmentée	Oncogène	NSCLC	
snoRA42	à boîtes H/ACA	Augmentée	Oncogène	NSCLC	
snoRD44	à boîtes C/D	Augmentée	Oncogène	Sein	

Tableau 5 : snoRNA représentatifs pour une implication dans le cancer et leur rôle proposé. NSCLC : Cancer de poumon non à petites cellules. Adapté de (Mannoor et al., 2012).

2.2.3.2.3 Empreinte génomique parentale des locus snoRNA et cancer

La perte de l'empreinte génomique parentale au locus hébergeant des snoARN est aussi impliquée dans le développement des cancers, par l'expression altérée des gènes présents à ces locus (Benetatos et al., 2011; Jelinic and Shaw, 2007). L'empreinte génomique parentale des snoRNA a été signalée être associée à certains cancers (Benetatos et al., 2011; Donsante et al., 2007). Par exemple, l'intégration d'un vecteur viral AAV (Adeno-associated virus) contenant un activateur du cytomégalo virus et le gène de β -glucuronidase humaine dans le génome de souris néonatales normales pourrait produire un carcinome hépatocellulaire. Le locus AAV-HCC sur le chromosome 12 porte de multiples gènes soumis à l'empreinte parentale, y compris le gène *Rian*, qui code au moins 9 snoRNA et des miRNA (Seitz et al., 2004; Shimoda et al., 2002). Fait intéressant, les snoRNA soumis à l'empreinte et codés dans *Rian* ont été retrouvés surexprimés de ~10 à ~500 fois dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux. Par conséquent, l'effet oncogénique de l'intégration du vecteur pourrait être due à la surexpression des snoRNA (Benetatos et al., 2011). Un autre exemple est *MEG3*, un gène exprimé à partir du chromosome maternel. Il possède des activités de suppression tumorale et sa sous-régulation inhibe la prolifération des cellules cancéreuses par des voies dépendantes ou indépendante de p53 (Benetatos et al., 2011). *MEG3* héberge les snoRNA SNORD112, SNORD113 et SNORD114 et des miARN suppresseurs de tumeur (Benetatos et al., 2011; da Rocha et al., 2008; Kagami et al., 2008). En outre, *MEG8* localisé sur le chromosome 14q32 est un autre gène codant un lncRNA dont l'expression est soumise à l'empreinte parentale. Le dysfonctionnement de *MEG8* est impliqué dans plusieurs maladies, dont les syndromes Prader-Willi et Angelman (Cavaille et al., 2002; da Rocha et al., 2008). Le locus 14q32 peut avoir aussi une fonction de suppression de tumeurs (Ko et al., 2005). Comme pour *MEG3*, l'ARN produit par *MEG8* porte des répétitions de deux snoRNA introniques: SNORD113 (9 copies) et SNORD114 (31 copies) (Cavaille et al., 2002). Au total, les snoRNA soumis à l'empreinte parentale pourraient avoir des fonctions importantes dans la carcinogenèse. Néanmoins, la recherche vers une meilleure compréhension du rôle biologique précis de ces snoRNA et s'ils ont une fonction indépendante de leurs gènes hôtes dans l'initiation et de la progression du cancer est nécessaire (Williams and Farzaneh, 2012).

2.2.3.2.4 Les snoRNA comme biomarqueurs

Le développement des biomarqueurs permettant la détection des tumeurs dans des stades précoces présente un grand intérêt, car la mise en place d'un traitement le plus rapidement possible a des conséquences majeures sur l'évolution de la maladie. Il y a de

plus en plus de preuves montrant que les cellules tumorales libèrent des quantités substantielles d'ARN résistants à la dégradation par les RNases dans le flux sanguin, et qu'ils sont présents en quantité suffisante pour être détectés de manière quantitative. Les taux sanguins de ces ARN sont modifiés chez des patients présentant des cancers par rapport à des sujets sains. La première étude visant à identifier des acides nucléiques circulants dans le sérum des patients atteints d'un cancer a été réalisée en 1977 (Leon et al., 1977). Des travaux ultérieurs ont permis de détecter des séquences mutées provenant des gènes de Kras et Nras (Sorenson et al., 1994; Vasioukhin et al., 1994). Plus récemment, des analyses génomiques à haut débit des ADN circulants ont démontré le potentiel de cette technique comme méthode de détection précoce, ainsi que la prédiction de la chemosensibilité des tumeurs (Chan et al., 2013; Kishikawa et al., 2015; Murtaza et al., 2013). Même s'il reste encore beaucoup de questions concernant leur mécanisme de libération dans le flux sanguin, leur origine, la spécificité des complexes de transport, les ARNnc circulants représentent une piste prometteuse dans le dépistage précoce des états cancéreux et dans le suivi des stades de cette maladie. Des données dans ce sens concernent les miRNA (Lu et al., 2005; Rosenfeld et al., 2008), les snoRNA (Dong *et al.*, 2009; Gee *et al.*, 2011; Mei *et al.*, 2012; Valleron *et al.*, 2012), les snRNA (Baraniskin et al., 2013; Kuhlmann et al., 2014; Matera *et al.*, 2007; Mazieres et al., 2013), les piRNA (Cheng et al., 2011; Qiao et al., 2002), les lncRNA (Arita et al., 2013; Isin et al., 2014; Xie et al., 2013).

2.2.3.3 Les snoRNA orphelins

Un certain nombre de snoRNA ne montrent aucune complémentarité apparente à des positions modifiées connues dans l'ARNr ou les snRNA et ont été supposés guider des modifications dans d'autres espèces d'ARN. Les snoRNA impliquées dans les fonctions non canoniques les plus étudiés sont les membres de la famille des snoRNA orphelins à boîtes C/D SNORD115 (M/HBII-52) et SNORD116 (M/HBII-85) codés par le locus SNURF-SNRPN soumis à l'empreinte génomique sur le chromosome humain 15 (Kishore et al., 2010; Runte et al., 2001). Des preuves convaincantes ont été recueillies pour la famille de snoRNA de SNORD115, qui chez l'homme et la souris sont exprimés exclusivement dans le cerveau, et réalisent la modification directe du pré-ARNm du sérotonine-type de récepteur 2c (5 HT2cR) (Kishore *et al.*, 2010; Kishore and Stamm, 2006; Vitali et al., 2005). Le SNORD115 est intégré dans les introns d'un grand transcrit polycistronique SNURF/SNRPN, exprimé uniquement à partir du locus paternel; les régions génomiques correspondant aux SNORD115-SNORD116 portent de grandes délétions chez les individus atteints du syndrome de Prader-Willi (PWS).

2.2.3.3.1 Implication des snoRNA dans le Syndrome Prader-Willi

Le syndrome Prader-Willi (PWS) est un trouble cognitif et du développement, qui représente la cause la plus fréquente de l'obésité génétique morbide chez l'homme (Bittel and Butler, 2005). Il est caractérisé par un faible tonus musculaire, une maturité sexuelle incomplète ou retardée, un léger retard mental, des problèmes de comportement et de compulsion alimentaire, conduisant à une obésité morbide si elle est non contrôlée (pour revue (Butler, 2011; Cassidy et al., 2012)).

L'empreinte génomique est un phénomène épigénétique dans lequel le phénotype est modifié en fonction du sexe du parent contribuant à l'allèle du gène (Hanel and Wevrick, 2001) et provient de changements épigénétiques lorsque l'expression des gènes est contrôlée sans modifier la séquence d'ADN. Il est réversible durant la gamétogenèse. La régulation de l'expression génique est habituellement réalisée par la méthylation de l'ADN. Le contrôle de l'expression des gènes imprimés dépend du parent d'origine avec l'expression de l'allèle soit maternel soit paternel pour un locus ou un gène imprimé(e) (Butler, 2011).

Le PWS résulte d'un manque d'expression des gènes paternels situés dans la région 15q11-q13. Environ 70% des patients PWS portent des délétions complètes du domaine soumis à l'empreinte génomique hérité paternellement, et environ 25% de tous les cas sont dus à une disomie uniparentale maternelle (deux copies de chromosomes maternels) (Buiting, 2010; Cassidy *et al.*, 2012). Le syndrome opposé au PWS, le syndrome d'Angelman, est dû à la perte d'expression maternelle de gènes dans la même région, qui sont normalement inactivés sur le chromosome paternel 15. Un idéogramme du chromosome 15 et l'ordre des gènes dans la région 15q11-q13 est montré dans la **Figure 3**.

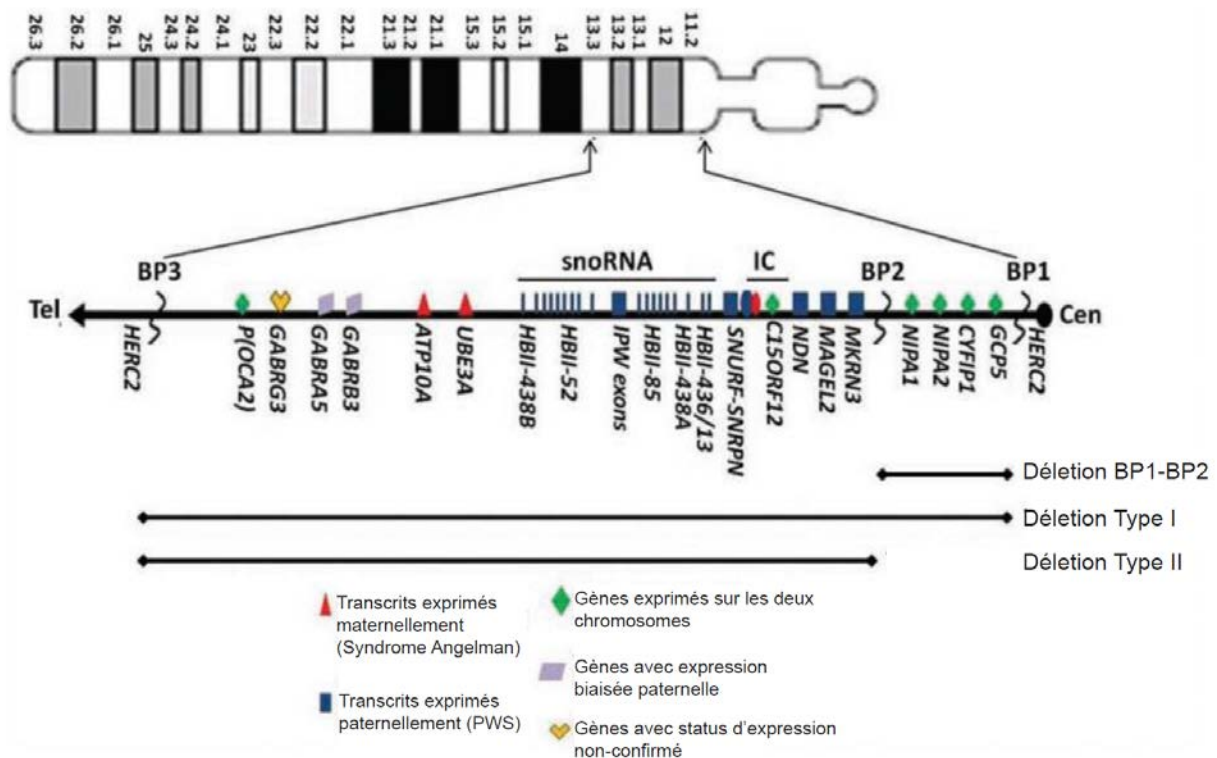


Figure 3 : Représentation du chromosome 15 montrant l'ordre des gènes codants et non-codants transcrits dans la région 15q11-q13 et l'emplacement des points de coupure pour les délétions typiques de type I et II. La région chromosomique 15q11-q13 contient environ 8 millions de paires de bases d'ADN, comprenant un grand groupe de gènes soumis à l'empreinte génomique et aussi un domaine non imprimé dans lequel les gènes sont aussi exprimés soit sur le chromosome maternel soit sur celui paternel 15, mais avec quelques gènes montrant un biais d'expression paternel (Bittel and Butler, 2005; Bittel et al., 2003; Butler et al., 2008). Les séquences d'ADN répétées en faible nombre de copies sont regroupées au niveau ou à proximité des deux points de rupture principaux du chromosome proximal («break point 1», BP1 et «break point 2», BP2) et le point de rupture distal (BP3) dans la région 15q11-q13 (Chai et al., 2003; Nicholls and Knepper, 2001). La délétion typique PWS peut appartenir à deux classes, de Type I et de Type II. La suppression la plus grande, de Type I (TI) implique BP1, qui est le plus proche du centromère tandis que BP2, est impliqué dans la délétion de type2 (TII), plus petite. BP3 est situé dans la région 15q11-q13 et est commun dans les deux sous-groupes de suppression typiques. Abréviations: Cen, centromère; Tel, télomères; BP, breakpoint; IC, centre d'impression; snoRNAs, petits ARN nucléolaires. Adapté de (Butler, 2011).

Il y a environ 100 gènes ou transcrits identifiés dans la région 15q11-q13 entre BP1 et BP3 et environ 10 de ces gènes sont imprimés et paternellement exprimés (Cassidy and Driscoll, 2009). Plusieurs gènes codant des protéines exprimées paternellement sont situés à ce locus, y compris *NECDIN* (*NDN*), *MAGEL2*, *MKRN3*, *NPAP1*, et le *SNURF-SNRPN* bi-cistronique (**Figure 3**). En dehors des gènes codants, ce locus contient également des gènes d'ARNnc, comme par exemple, les longs transcrits non-codants *PWRN1/PWRN2* localisées entre les gènes *NDN* et *SNURF-SNRPN*. Le locus PWS code également de nombreux snoRNA à boîtes C/D exprimées paternellement. La plupart d'entre eux, sinon tous, sont portés par les introns du transcrit U-BE3A-ATS (Runte *et al.*, 2001), qui contient deux clusters de répétitions des gènes de SNORD116 (snoRNA HBII-85) et SNORD115 (snoRNA HBII-52) contenant 29 et respectivement 47 copies (Cavaille *et al.*, 2000). D'autres snoRNA, comme le SNORD107 (HBII-436), le SNORD64 (HBII-13), et le SNORD108 (HBII-437), sont codés par une seule copie, et le SNORD109A/B (HBII-438a/438b) par deux copies (Cavaille *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001) (**Figure 3**). L'analyse des différentes délétions du locus PWS dans des modèles de souris, ainsi que l'analyse de l'expression des gènes chez les patients présentant des translocations chromosomiques ont prédit le locus SNORD116 comme étant une région critique du PWS (PWScr) (Ding *et al.*, 2005; Gallagher *et al.*, 2002; Rozhdestvensky *et al.*, 2016; Runte *et al.*, 2005; Schule *et al.*, 2005).

Le SNORD115 contient un élément antisens conservé de 18 nucléotides, complémentaire avec un segment d'un exon de pré-ARNm de 5-HT2cR épissé alternativement (Cavaille *et al.*, 2000). Par ailleurs, le deuxième intron du pré-ARNm de 5-HT2cR abrite un snoRNA H/ACA (Cavaille *et al.*, 2000). En 1997, Burns *et al.* (Burns *et al.*, 1997) ont découvert que les transcrits de 5-HT2cR subissent une édition adénosine-à-inosine (A-to-I) site spécifique, conduisant à des produits de traduction alternatifs. Plus précisément, la variation de séquence d'acides aminés est limitée à la deuxième boucle intracellulaire en contact avec des protéines G. Les variantes générées des récepteurs présentent des différences significatives dans l'efficacité de la transduction du signal. En conséquence, les souris mutantes exprimant uniquement une isoforme entièrement éditée du récepteur présentent beaucoup de traits phénotypiques caractéristiques de PWS (Morabito *et al.*, 2010). Curieusement, en 2005 l'équipe de J. Cavallé (Vitali *et al.*, 2005) a montré que la modification exercée par SNORD115 sur le même segment de pré-ARNm de 5-HT2cR a un effet antagoniste sur l'édition réalisée par l'enzyme nucléaire ADAR2 (adénosine désaminase agissant sur l'ARN 2). Plus précisément, la snoRNP SNORD115 est censée empêcher l'édition A-I à travers une méthylation du ribose, inactivant ainsi l'inhibiteur exonique de l'épissage. L'exon épissé alternativement Vb est ainsi incorporé dans l'ARNm mature, donnant lieu à un récepteur totalement fonctionnel. Peu de temps après, le

laboratoire de S. Stamm (Kishore and Stamm, 2006) a présenté des preuves que l'inclusion de l'exon Vb pourrait être indépendante de la méthylation et a proposé que la snoRNP SNORD115 s'associe de manière transitoire avec le pré-ARNm du récepteur, masquant directement l'inhibiteur de l'épissage. Une autre étude a révélé que le même snoRNA est effectivement mûré en ARN de taille plus courte (appelés snoRNA transformés (psnoARN)) qui, au lieu de former des snoRNP canoniques, s'associent avec des protéines hnRNP pour réguler l'épissage d'autres pré-ARNm (Kishore *et al.*, 2010). Dans un modèle murin de PWS où l'expression du SNORD115 fait défaut, seule une augmentation de l'édition, mais pas un changement dans le taux d'épissage du 5-HT_{2c}R, a pu être confirmée (Doe *et al.*, 2009). D'ailleurs, le rôle de l'édition augmentée du pré-ARNm dans le PWS est fortement débattu dans la communauté, car ce phénomène ne peut pas toujours être lié au phénotype de la maladie (Glatt-Deeley *et al.*, 2010).

Tous les snoRNA provenant du locus PWS sont d'origine intronique, ce qui est le cas avec la plupart des snoRNA de vertébrés. À l'exception de SNORD9, prédit pour guider la 2'-O méthylation à la position A53 du snRNA U6 (Ganot *et al.*, 1999), les autres snoRNA provenant du locus PWS n'ont pas de cibles connues. Récemment, des microdélétions sur le chromosome paternel du groupe de gènes SNORD116 ont été identifiés comme la principale cause génétique de PWS (Anderlid *et al.*, 2014; de Smith *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2005; Duker *et al.*, 2010; Sahoo *et al.*, 2008), bien que le manque d'expression de SNORD115 contribue probablement au phénotype de la maladie. Des indications existent également qu'un défaut d'expression des gènes hôtes des snoRNA SNORD115/116 pourrait être la principale cause de PWS. Notamment, le locus PWS présente des propriétés inhabituelles: une organisation chromatinienne allèle-spécifique existe au niveau du cluster des gènes des snoRNA et les gènes hôtes épissés des snoRNA SNORD115/116 s'accumulent à proximité du site de transcription (Powell *et al.*, 2013a; Powell *et al.*, 2013b; Vitali *et al.*, 2010). Le gène hôte de SNORD116 a été impliqué dans le contrôle de la dépense d'énergie diurne du cerveau en réprimant indirectement un groupe de gènes régulés de manière diurne bien connus, qui pourraient expliquer les traits phénotypiques de PWS (Powell *et al.*, 2013a). De plus, une classe de longs ARN non codants (lncRNA), exprimée à partir du locus PWS et contenant un motif SNORD à leurs extrémités 5' et 3' a été identifiée dans des cellules souches embryonnaires humaines (Yin *et al.*, 2012). Ces transcrits s'associent fortement avec les régulateurs d'épissage de la famille Fox dans le noyau, et pourraient donc agir comme des éponges pour ces protéines régulatrices en titrant leur activité. Ainsi, la baisse du taux d'expression de sno-lncARN dans PWS pourrait entraîner une augmentation des niveaux de Fox et des anomalies dans l'épissage du pré-ARNm, ce qui entraîne un développement anormal (Bratkovic and Rogelj, 2014).

En ce qui concerne le snoRNA SNORD116 mature, l'équipe de S. Stamm a identifié par expériences de protection à la RNase que les transcrits introniques de SNORD116 donnent également lieu à des snoRNA de tailles plus courtes, les deux snoRNA pourraient partager les mêmes voies de maturation (Shen et al., 2011). Ces expériences apportent des indications sur l'existence d'événements spécifiques de maturation et confirment que tous les snoRNA à boîtes C/D ne sont pas clivés. Cependant, la pertinence physiologique des deux ensembles de psnoARN doit encore être clarifiée. Des données de l'équipe de J. Cavaillé remettent en question l'existence des psnoARN SNORD115/116 fonctionnels (Bortolin-Cavaillé and Cavaillé, 2012). La plupart ne seraient que de simples produits de dégradation des ARN endogènes et/ou des fragments clivés dérivés du couplage imparfait des ribosonmes et de nombreuses variantes de SNORD116/SNORD115. Néanmoins, il est tentant de spéculer que SNORD116 ou des psnoARN apparentés modifient l'épissage, vu que des membres de la famille de SNORD116 ont été prédits de cibler préférentiellement les séquences d'exons de transcrits primaires régulés par épissage alternatif (Bazeley et al., 2008).

2.2.3.3.2 Autres snoRNA orphelins

Les snoRNA du locus 15q11-q13 ne sont pas les seuls exemples de snoRNA orphelins regroupés dans des locus soumis à l'empreinte parentale. Chez l'homme, le locus exprimé maternellement 14q32 porte les snoRNA à boîtes C/D (SNORD112-114) et partage des similitudes notables avec le locus des snoRNA PWS en termes d'organisation génomique (Cavaillé *et al.*, 2002). En outre, l'expression des deux groupes de snoRNA est différente selon le tissu, avec un taux plus abondant dans la muqueuse utérine et dans le cerveau. Chez les rongeurs, le locus orthologue humain 14q32 donne lieu à des snoRNA exprimés strictement dans le cerveau, avec aucune homologie significative avec leurs homologues humains, contrairement à la situation du locus PWS. Pourtant, chez l'homme et chez la souris, les deux loci sont régulés en fonction du développement des neurones et affichent des décondensations significatives de la chromatine spécifique de l'origine parentale (Leung et al., 2009). De manière intéressante, dans les régions génétiques hautement transcrites dans les neurones de souris, seuls les loci de PWS et 12qF1 (orthologue à 14q32 chez l'homme) sont complètement décondensés aux allèles paternels et maternels. Le contexte génomique du cluster des snoRNA apparaît être vital pour le remodelage de la chromatine. En outre, la décondensation de la chromatine au niveau des loci de ces snoRNA est nécessaire pour leur localisation nucléolaire correcte. Lors de la maturation neuronale des cellules de Purkinje, des souris dépourvues de l'expression des

SNORD115/SNORD116 présentent des nucléoles significativement plus petits par rapport au type sauvage (Leung *et al.*, 2009).

Plusieurs snoRNA orphelins spécifiques du cerveau (SNORD115, SNORD116, SNORA35, et le snoRNA à boîtes C/D spécifique aux rongeurs MBII-48) ne sont pas uniformément exprimés dans le cerveau de souris, avec des niveaux plus élevés dans l'hippocampe et l'amygdale, dans des régions impliquées dans l'apprentissage et dans la mémoire. Cette observation a conduit Rogelj *et al.* à étudier les changements d'expression dans l'hippocampe lors de la consolidation contextuelle de la mémoire (Rogelj *et al.*, 2003). Grâce à l'utilisation de la peur conditionnée contextuellement (une méthode d'apprentissage pavlovien qui établit une association entre les stimuli et leurs conséquences aversives), les SNORD115 et PMBI-48 ont été retrouvés respectivement sur- et sous-exprimés. Les changements dans les niveaux d'expression ont été de courte durée (détectés à 90 min, mais pas à 25 heures après le traitement). Les résultats suggèrent un rôle pour SNORD115 et PMBI-48 dans les fonctions supérieures du cerveau, mais l'analyse fonctionnelle reste entravée par l'absence d'identification d'ARN cible; des différences potentielles dans le motif d'épissage de l'ARNm de 5 HT2cR ont été examinées, cependant, aucun changement accompagnant la surexpression de SNORD115 n'a pu être détecté.

Une autre snoRNA orphelin (SNORD3A) semble être impliqué dans la modulation de la réponse à l'accumulation de protéines non repliées dans le réticulum endoplasmique (RE) dans les maladies à prions (Cohen *et al.*, 2013). Son expression est augmentée dans le sang des patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). En outre, une surexpression dans le cerveau a été confirmée dans deux modèles murins de MCJ. Dans le même temps, ATF6, un facteur de transcription nécessaire à une expression élevée des chaperonnes, s'accumule dans le cerveau touché, mais ses protéines clientes gardent le même taux cellulaire. Aucune autre étude mécanistique détaillée n'a été rapportée et il est donc difficile de savoir si SNORD3A est impliqué dans la réponse au stress, dans le blocage de la production de chaperonnes pour prévenir la récupération de la fonction du RE, ou si sa surexpression est un épiphénomène de stress du RE résultant de l'agrégation de la protéine prion. Néanmoins, SNORD3A revêt un grand potentiel en tant que marqueur de la maladie, d'autant plus que la MCJ ne peut être confirmée que post-mortem par des analyses en Western blot ou des analyses immunohistochimiques (Falaleeva and Stamm, 2013).

3 Les snoRNP à boîtes C/D

Les complexes snoRNP à boîtes C/D catalysent la méthylation des riboses dans l'ARNr des eucaryotes et des archées. Chez les eucaryotes, ces RNP comprennent le jeu invariable de quatre protéines coeur: la Fibrillarine/Nop1p, Nop58p, Nop56p et Snu13p, qui s'associent spécifiquement avec un snoRNA à boîtes C/D (Lapinaite et al., 2013). Bien que le rôle précis des méthylations des riboses dans les ARNr soit resté élué dans les organismes unicellulaires comme les levures, les organismes multicellulaires affichent des phénotypes spécifiques suite à la perte de certaines méthylations spécifiques (Higa-Nakamine et al., 2012). Des études récentes ont également mis l'accent sur leur rôle dans le développement des cancers humains et murins, en particulier dans les cancers du sein et de la prostate (Su et al., 2014). Nop1p et les snoRNA sont surexprimés dans plusieurs tissus cancéreux et cette surexpression a été démontrée comme cruciale pour la tumorigénèse. La suppression de la surexpression des snoRNA réduit considérablement la tumorigénicité, via l'activation de la voie p53 (Su et al., 2014). Dans ce chapitre seront discutés les aspects structuraux et fonctionnels des snoRNP à boîtes C/D.

3.1 Transcription et maturation des snoRNA à boîtes C/D

Les cellules eucaryotes utilisent des stratégies très différentes pour synthétiser les snoRNA, qu'ils soient de type C/D ou H/ACA. Bien que majoritairement introniques chez les vertébrés, certains snoRNA, tels que les snoRNA U3, U8 et MRP, et la plupart des snoRNA chez la levure sont monocistroniques et transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) à partir de gènes indépendants. Une organisation polycistronique plus complexe, particulièrement fréquente chez les plantes, et également utilisée par la levure et les trypanosomes, repose sur un regroupement dans une même unité transcriptionnelle de plusieurs snoRNA différents (Terns and Terns, 2002; Weinstein and Steitz, 1999). Chez le trypanosomatide *Leptomonas colossoma*, une unité poly-snoRNA contenant à la fois des snoRNA à boîtes C/D et à boîtes H/ACA est répétée en tandem (Liang et al., 2001).

3.1.1 Maturation des snoRNA à boîtes C/D

Les snoRNA présents dans des unités polycistroniques ou dans des introns, et les transcrits monocistroniques portant des extensions longues à leur extrémités 3', tels que U3, nécessitent des étapes de maturation des formes précurseurs de l'ARN pour produire des

molécules matures. Chez la levure, l'excision des snoRNA à partir de transcrits polycistroniques s'effectue par des coupures endonucléolytiques initiales catalysées par l'endoribonucléase Rnt1p, l'orthologue de la RNase III bactérienne (Chanfreau et al., 1998b). Les extrémités libérées fournissent des points d'entrée pour les exonucléases 5'→3' (Rat1p et Xrn1p chez la levure) et 3'→5' (l'exosome et sa composante Rrp6p étant fréquemment utilisé pour le clivage final), qui éliminent les nucléotides excédentaires (Allmang *et al.*, 1999; van Hoof et al., 2000b). La maturation de l'extrémité 3' du snoRNA U3 nécessite également le facteur Rnt1p, qui clive le pré-ARN U3 au niveau d'une tige-boucle distale (Kufel et al., 2000). Dans le cas de U3, le traitement exonucléolytique se poursuit par deux étapes et nécessite une interaction de l'ARN U3 partiellement mûr avec la protéine Lhp1, l'homologue de levure pour la protéine La chez les vertébrés. Ce traitement par étapes est présent pour d'autres petits ARN. Il pourrait agir comme un système de contrôle de qualité en retardant l'action de l'exosome, Lhp1p/La pouvant offrir le temps nécessaire pour l'assemblage approprié des RNP et/ou pour des étapes de maturation supplémentaires de l'ARN (Kufel *et al.*, 2000). Certains pré-snoRNA ne contiennent pas le motif en tige-boucle reconnu par Rnt1p. Pour ces pré-snoRNA, le point d'entrée 3'→5' pour les exonucléases est généré par le clivage réalisé par le système de clivage/polyadénylation de l'ARNm utilisé dans la maturation des extrémités 3' des ARNm (Fatica et al., 2000).

Les snoRNA introniques peuvent suivre deux voies alternatives de maturation. Ils sont généralement mûrs après la réaction d'épissage libérant l'intron sous la forme d'un lasso. Après débranchement, des exonucléases éliminent les séquences ne faisant pas partie des snoRNA. Dans une deuxième voie (mineure), ne dépendant pas de l'épissage, les snoRNA sont excisés des introns par des endonucléases et des extrémités matures sont ensuite générées de manière exonucléolytique. La présence de protéines associées à la pré-snoRNP est nécessaire pour protéger le snoRNA de la dégradation et ainsi ces protéines contribuent à définir précisément les extrémités des snoRNA matures (Terns and Terns, 2002; Weinstein and Steitz, 1999). De façon intéressante, le traitement endonucléolytique des snoRNA à boîtes C/D introniques implique la protéine Rnt1, qui clive l'ARN au niveau de la tige formée par les séquences introniques flanquantes. Chez la levure, dans un système *in vitro* reproduisant la maturation des snoRNA introniques, le clivage au niveau de cette tige (qui représente un substrat non-canonique de la protéine Rnp1) dépend de l'interaction entre Rnt1p avec la protéine Nop1, déjà associée avec l'ARN (Giorgi et al., 2001). D'autres expériences indiquent que les protéines des snoRNP jouent un rôle actif dans la maturation des pré-snoRNA (Lafontaine and Tollervy, 2000). Chez les mammifères, les snoRNA à boîtes C/D introniques sont préférentiellement situés ~ 70 nt en amont du site 3' d'épissage. Comme nous l'avons déjà évoqué, des expériences *in vitro* et *in vivo* ont révélé qu'un

espacement adéquat entre les snoRNA et les points de branchement des introns est essentiel pour l'efficacité de la formation du snoRNA, suggérant des interactions fonctionnelles entre la machinerie d'épissage et celle de la biogenèse des snoRNP (Hirose and Steitz, 2001; Vincenti *et al.*, 2007) (cf. **Chapitre 2.1.1.3.1**).

3.1.2 Maturation de l'extrémité 5' des snoRNA

Les transcrits de l'ARN polymérase II se caractérisent par l'ajout d'une coiffe m⁷G au niveau de leur extrémité 5', qui leur confère de nouvelles propriétés. Cette coiffe est impliquée dans de nombreux processus et contribue aux événements de maturation. Les snARN U1, U2, U4 et U5, l'ARN de la télomérase, ainsi que plusieurs snoRNA portent une coiffe hyperméthylée obtenue après l'ajout d'une double méthylation en position 2 de la guanine (m^{2,2,7}G) par une méthyltransférase nucléolaire (triméthyl guanosine synthase 1 – Tgs1p), qui leur confère des propriétés distinctes de celles des ARNm. Cependant, certains snoRNA perdent leur coiffe m⁷G car ils sont maturés par une activité exonucléolytique à leur extrémité 5'.

3.1.2.1 *La coiffe 7-méthylguanosine (m⁷G)*

Dès que les ARN naissants qui émergent au cours de la transcription par l'ARN polymérase II atteignent 22-25 nucléotides, la 7-méthylguanosine (m⁷GpppG) est ajoutée à leur extrémité 5' triphosphate par trois étapes enzymatiques séquentielles, qui sont catalysées chez *S. cerevisiae* par les facteurs Cet1p, Ceg1p et Abd1p. La coiffe est immédiatement reconnue et liée par le *cap-binding complexe* nucléaire (nCBC), un complexe qui contient une sous-unité de liaison à la coiffe, la *cap-binding protein* 20 (CBP 20) et une protéine auxiliaire, la *cap-binding protein* 80 (CBP 80), (Cbc2p et Cbc1p/Sto1p, chez la levure, qui forment le complexe de la coiffe) (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014; Izaurralde *et al.*, 1995; Izaurralde *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2016b; Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Topisirovic *et al.*, 2011).

Peu après l'initiation de la transcription, l'ARN polymérase II entre en « pause » et la transcription s'arrête. La reprise de la synthèse des transcrits est un point majeur dans le contrôle de la transcription (Guenther *et al.*, 2007). Des guanylyltransférase et méthyltransférases sont recrutées par l'ARN polymérase II pendant cette étape, et la reprise de l'élongation de la transcription dépend en partie de ces enzymes (Cowling, 2010).

Les implications du complexe nucléaire de la coiffe est multiple: le couplage entre les différentes étapes de la transcription par l'ARN polymérase II, le processus d'épissage (Izaurralde *et al.*, 1995), les étapes de maturation de l'extrémité 3' des ARNm, l'export des

UsnARN vers le cytoplasme (Behm-Ansmant et al., 2007), le contrôle qualité des ARNm par le système NMD (Non-sens Mediated Decay) (Lee et al., 2015), la traduction des ARNm (le facteur eIF4G interagit avec la protéine PAB1 (PolyA-Binding protein 1) et facilite la circularisation de l'ARNm en favorisant la ré-initiation du processus de traduction) (Kressler et al., 2010).

3.1.2.2 La coiffe triméthylée 2,2,7-méthylguanosine ($m^{2,2,7}G$)

La coiffe m^7G de petits ARN nucléaires (snARN), petits ARN nucléolaires (snoARN) ainsi que l'ARN de la télomérase et les ARNm des sélénoprotéines (Boon et al., 2015) est connue pour être hyperméthylée par la Triméthylguanosine synthase 1 (Tgs1p) au cours de la maturation des particules ribonucléoprotéiques. L'enzyme responsable de l'hyperméthylation de la coiffe m^7G des UsnARN chez la levure a été identifié par Mouaikel et ses collègues en 2002 et il a été nommé Tgs1p conformément à sa fonction (Mouaikel et al., 2002). Elle catalyse deux transferts successifs des groupes méthyles, chacun à partir d'une S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet) vers l'azote N2 de la guanine, générant deux molécules de S-adénosyl-L-homocystéine (AdoHcy) au niveau de la coiffe $m^{2,2,7}G$ modifié (m^3G ou TMG pour triméthyl G) (Hausmann and Shuman, 2005).

La coiffe hyperméthylée est importante pour le transport nucléolaire des snoRNA à boîtes C/D (Boulon et al., 2004). Le facteur de transport PHAX lie les snoRNA coiffés m^7G et les orientent vers les corps de Cajal (CB), où ils subissent la triméthylation de la coiffe. Suite à cette modification, PHAX se dissocie des ARN portant la coiffe hyperméthylée et ils sont pris en charge par la protéine CRM1 et ensuite dirigées vers le nucléole.

Chez *S. cerevisiae*, les UsnRNA sont triméthylés dans le noyau au niveau du nucléole (Mouaikel et al., 2002). Pour les snoRNA et l'ARN de la télomérase, ce processus a lieu dans les CB (Jady et al., 2004; Zhu et al., 2004). En absence de corps de Cajal, ces modifications s'effectuent dans le nucléole (dans les NB pour les snoRNA à boîtes C/D) (Franke et al., 2008; Verheggen et al., 2002). Bien que chez la levure la protéine Tgs1 ne soit pas essentielle pour la viabilité cellulaire, sa suppression conduit à un phénotype cryosensible, car les mutants montrent une croissance réduite à des températures plus basses ainsi que l'absence de coiffe $m^{2,2,7}G$ pour certains UsnRNA et snoRNA (Mouaikel et al., 2002).

Chez *S. cerevisiae*, le snoRNA U3 mature porte aussi une coiffe $m^{2,2,7}G$, mais il subit plusieurs étapes intermédiaires de maturation avant l'acquisition de cette modification. Le transcrit naissant subit, dans un premier temps, un clivage précoce par l'endonucléase Rnt1p

jusqu'au site +58, puis +21 (Kufel *et al.*, 2000; Kufel *et al.*, 2003). Ce clivage est suivi par des étapes de dégradation exonucléolytique 5'-3' par l'exosome ou par des endonucléases de la famille Rex (Rex1-3p) jusqu'aux sites +12 ou +18. Les produits intermédiaires issus de cette dégradation sont stabilisés par les protéines Lsm et la protéine Lhp1, facteurs qui sont recrutés sur les séquences riches en U présentes en amont des sites de clivage. Ces facteurs sont ensuite chassés du complexe par les protéines constitutives des snoRNP à boîtes C/D (Nop1, Nop56p et Nop58p), ce qui permet la dernière étape de formation de l'extrémité mature, catalysée par l'exosome. Comme la coiffe m^{2,2,7}G est présente seulement dans les formes matures de U3, l'étape d'hyperméthylation catalysée par le facteur Tgs1p est ultérieure aux étapes de maturation nucléolytique décrites (Kufel *et al.*, 2000; Kufel *et al.*, 2003).

3.1.3 Terminaison de la transcription et maturation de l'extrémité 3' des snoRNA

Comme déjà présenté au début du **Chapitre 3.1.1**, la maturation des snoRNA (ainsi que celle des ARNr et des snARN) exige le clivage endonucléolytique de la longue extrémité 3' de leurs transcrits naissants et l'élimination des fragments d'ARN excisés par une dégradation exonucléolytique réalisée par l'exosome jusqu'à l'extrémité 3' mature (Allmang *et al.*, 1999; Bernstein and Toth, 2012; Chanfreau *et al.*, 1998a; Perumal and Reddy, 2002). Ces processus impliquent un complexe de ribonucléases connu sous le nom d'exosome (Allmang *et al.*, 1999). En plus de sa participation dans le traitement de l'extrémité 3', l'exosome intervient dans les voies de surveillance et de turnover des ARN (Chlebowski *et al.*, 2013; Schaeffer *et al.*, 2011; Schmid and Jensen, 2008). Dans le noyau, il médie le turnover des précurseurs des ARNt (pré-ARNt) et des pré-ARNm (Gudipati *et al.*, 2012). Les exosomes nucléaires éliminent également rapidement les pré-ARNt et les pré-ARNm issus d'une maturation aberrante (Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000; Hilleren *et al.*, 2001; Kadaba *et al.*, 2004) ainsi que les transcrits cryptiques instables (CUTs – Criptic Unstable Transcripts) générés par la transcription antisens et intergénique (Davis and Ares, 2006; Neil *et al.*, 2009; Wyers *et al.*, 2005).

Chez *S. cerevisiae*, le traitement des transcrits à leur extrémité 3' est catalysé pour la plupart des snoRNA par la protéine Rnt1 (RNase three protéine 1) (Filipowicz *et al.*, 1999) qui génère les sites d'entrée pour l'exosome (Liang *et al.*, 2014). Etant la seule ARNase III de *S. cerevisiae*, la protéine Rnt1 est impliquée dans la production des snARN (Abou Elela and Ares, 1998; Liang *et al.*, 2014), celle des pré-ARNr (Elela *et al.*, 1996), et celle des snoRNA (Chanfreau *et al.*, 1998; Chanfreau *et al.*, 1998a). Elle est également impliquée

dans la dégradation de plusieurs ARNm (Danin-Kreiselman et al., 2003; Meaux et al., 2011). Rnt1p ne clive pas l'ARN double brin dans des conditions physiologiques, mais reconnaît spécifiquement des hélices surmontées d'une boucle à 4 résidus conservées de type "AGNN", situés 13 à 16 paires de bases des sites de coupure (Lebars et al., 2001). L'absence de Rnt1p perturbe le cycle cellulaire et la croissance (Ochs et al., 1985), inhibe la production du ribosome, affecte la réponse au stress de la paroi cellulaire et induit une sensibilité à la température (Catala et al., 2008). Bien que Rnt1p clive normalement des structures en tige-boucle, elle peut diriger le clivage en *trans* par liaison à un petit ARN guide par analogie avec le mécanisme de l'interférence ARN (RNAi), qui est absent chez *S. cerevisiae* (Lamontagne and Abou Elela, 2007).

L'activité des exosomes nucléaires dépend de protéines ou de complexes supplémentaires. Des études sur le rôle de l'exosome dans la maturation des ARN ont montré que le complexe de polyadénylation TRAMP (Trfp/Airp/Mtr4p), le complexe Nrd1p/Nab3p/Sen1p, ainsi que la sous-unité exosomique Rrp47p (alias Lrp1p) et la protéine Mpp6 (Chlebowski *et al.*, 2013) participent à la maturation de l'extrémité 3' des snoRNA à boîtes C/D (Costello et al., 2011; Feigenbutz et al., 2013; Garland et al., 2013).

Le complexe NNS (Nrd1p/Nab3p/Sen1p) est un cofacteur de l'exosome nucléaire, composé de deux protéines de liaison à l'ARN de manière séquence spécifique, appartenant à la famille des protéines hnRNP (Nrd1p et Nab3p), et une hélicase ARN/ADN ATP-dépendante, Sen1p, qui interagit avec l'ARN polymérase II et l'exosome pour stimuler la terminaison de la transcription des transcrits courts de l'ARN polymérase II, dont les snoRNA et le snARN U4. Il favorise la dégradation médiée par les exosomes des transcrits contenant des sites de liaison au complexe Nrd1p/Nab3p (Vasiljeva and Buratowski, 2006). Le dysfonctionnement de ces trois facteurs essentiels à la viabilité cellulaire affecte la biogenèse de nombreux transcrits en provoquant l'accumulation de précurseurs non maturés en 3' (Steinmetz et al., 2001) et le traitement/dégradation des ARNnc (Carroll et al., 2004; Steinmetz *et al.*, 2001; Vasiljeva and Buratowski, 2006). Les sous-unités du NNS lient les différentes classes d'ARNnc, y compris des snoRNA, des CUT, des ARNt et des ARNm, par l'intermédiaire des terminateurs NNS-dépendants (Jamonnak et al., 2011; Wlotzka et al., 2011). Nrd1p et Nab3p reconnaissent spécifiquement les terminateurs de la transcription spécifiques pour le complexe NNS, contenant les motifs ARN « GUAG/A » et « UCUU » (Steinmetz et al., 2006).

Nrd1p et Nab3p interagissent également de manière directe l'un avec l'autre par l'intermédiaire de domaines de liaison (Carroll et al., 2007; Vasiljeva et al., 2008). En outre, Nrd1p peut être co-immunoprécipitée avec l'exosome et interagit directement avec Rrp6p et

Trf4p (Tudek et al., 2014), et TRAMP et Nab3p interagissent avec Sen1p (Vasiljeva and Buratowski, 2006). Nrd1p interagit avec le domaine C-terminal de l'ARN Pol II et l'exosome, reliant ainsi la terminaison de la transcription avec la maturation des snoRNP (Grzechnik and Kufel, 2008).

Dans les modèles qui ont été proposés récemment, Nrd1p se lie au domaine C-terminal de l'ARN Pol II lors de la transcription précoce d'un ARNnc et l'hétérodimère Nrd1p-Nab3p reconnaît le terminateur de l'ARNnc, recrute l'hélicase Sen1p pour dissocier le complexe d'élongation et pour terminer la transcription par un mécanisme impliquant la liaison Sen1p-ARN et l'hydrolyse de l'ATP, et recrute l'exosome pour traiter/dégrader l'ARNnc. Notamment, l'orthologue humain de Sen1p, la protéine Senataxin, qui est associée à des troubles neurodégénératifs, participe à la terminaison de la transcription dans les cellules humaines, ce qui suggère la présence des homologues humains de Nrd1p et Nab3p (Chen et al., 2004). La protéine Nrd1 interagit avec le domaine CTD de l'ARN polymérase II (Carroll *et al.*, 2004; Steinmetz and Brow, 1998). La phosphorylation de la Sérine 2 du domaine CTD inhibe le recrutement de Nrd1p, tandis que la phosphorylation de la Sérine 5 est essentielle pour l'interaction avec la Pol II (Kubicek et al., 2012; Yogesha et al., 2014).

Le complexe TRAMP favorise la terminaison de la transcription des snoRNA dépendante de Nrd1p/Nab3p (Grzechnik and Kufel, 2008) et ajoute des extensions poly(A) sur les substrats d'ARN, ce qui favorisent leur dégradation subséquente (LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005; Wyers *et al.*, 2005). Rrp47p interagit directement avec Rrp6p et fonctionne spécifiquement pour promouvoir les processus médiés par Rrp6p (Mitchell et al., 2003; Peng et al., 2003). Il a été montré que la région C-terminale de Rrp47p interagit avec les protéines Nop56 et Nop58 ainsi qu'avec les snoRNA à boîtes C/D (Costello et al., 2011).

Rrp6p est une sous-unité catalytique conservée de l'exosome eucaryote. L'expression de Rrp6p dans des mutants *rrp47Δ* est sensiblement réduite pendant la croissance dans un milieu minimal, par des effets sur le niveau de transcription et la stabilité des protéines. L'expression exogène de Rrp6p restore un phénotype normal dans des mutants *rrp47Δ*, ce qui suggère que la fonction principale de Rrp47p est de faciliter l'expression des niveaux appropriés de Rrp6p. Le complexe Rrp6p/Rrp47p et la protéine Rex1 (une autre exoribonucléase à activité RNase D 3'→5') portent des activités exonucléases redondantes pour la maturation de l'extrémité 3' des snoRNA à boîtes C/D, car la surexpression de Rrp6p dans un mutant *rrp47Δrex1Δ* (les doubles mutants *rrp6Δ* et *rrp47Δ* présentent un phénotype synthétique létal avec les mutants *Rex1Δ*)(van Hoof et al., 2000a), restore le défaut de maturation des snoRNA en 3' (Feigenbutz *et al.*, 2013).

Les snoRNA provenant des transcrits polycistroniques chez *S. cerevisiae* sont libérés suite à des étapes de maturation nucléolytique supplémentaires, au niveau de régions internes séparant les différents ARN. Ces étapes sont réalisées par l'enzyme Rnt1p, qui génère des sites d'entrée pour l'activité exonucléase 5'→3' des protéines Rat1p et Xrn1p, et pour l'activité exonucléase 3'→5' de l'exosome (Allmang *et al.*, 1999; Chanfreau *et al.*, 1998b; Petfalski *et al.*, 1998; van Hoof *et al.*, 2000b).

Chez la levure, le complexe PAF1 (Paf1p, Ctr9p, Cdc73p, Rtf1p et Leo1p) a été retrouvé impliqué dans les mécanismes de terminaison de la transcription des snoRNA (Sheldon *et al.*, 2005). Ce complexe, conservé chez l'homme, participe à l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II. Le complexe PAF1 s'associe physiquement à l'ARN Pol II et aux régions codantes de gènes activement transcrits (Simic *et al.*, 2003; Squazzo *et al.*, 2002), où les membres du complexe réalisent des interactions physiques et génétiques avec des facteurs impliqués dans l'élongation de la transcription, y compris le complexe Spt4p-Spt5p et FACT, et des protéines qui contrôlent la phosphorylation de l'ARN Pol II (Mueller and Jaehning, 2002).

Plusieurs membres du complexe PAF1 (les facteurs Rtf1p, Paf1p et Ctr9p), sont essentiels pour certaines modifications des histones qui se produisent lors de la transcription. Le complexe PAF1 est nécessaire pour le recrutement et l'activation de l'ubiquitine conjugase Rad6p et l'ubiquitine ligase Bre1p, qui ubiquitinylent la lysine 123 de l'histone H2B chez la levure (Ng *et al.*, 2003a; Xiao *et al.*, 2005). L'ubiquitinylation de l'histone H2B dépendante de Paf1p et le recrutement du complexe histone méthyltransférase Set1p sont nécessaires pour la méthylation subséquente de la lysine 4 de l'histone H3 (Krogan *et al.*, 2003a; Ng *et al.*, 2003b). Le complexe PAF1 est également nécessaire pour la méthylation de l'histone H3K79 par la méthyltransférase Dot1p, une modification importante pour la répression transcriptionnelle (Krogan *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2003a) et la méthylation K36 de l'histone H3 par la méthyltransférase Set2p au cours de l'élongation de la transcription (Krogan *et al.*, 2003b).

3.2 Structure des snoRNP à boîtes C/D

3.2.1 Les snoRNA à boîtes C/D

Chez les eucaryotes, les snoRNA à boîtes C/D ont une taille typiquement comprise entre 70 et 300 nucléotides (Lestrade and Weber, 2006; Weinberg and Penman, 1968) et contiennent deux éléments conservés appelées boîtes C (5'-RUGAUGA-3') et D (5'-CUGA-3'), situés à l'extrémité 5' et respectivement 3'-terminale de la molécule d'ARN (**Figure 4**). Ces éléments s'associent pour former un motif C/D qui forme une structure dite en « *kink-turn* » ou « *K-turn* », caractérisée par la présence de deux hélices, I et II, séparées par une boucle interne de 3 nt (**Figure 5**) (Vidovic et al., 2000; Watkins et al., 2000). Cette structure contient dans la boucle centrale asymétrique, deux paires de bases conservées non canoniques G:A dites paires de bases *sheared*. Cette structure représente le motif pour le recrutement spécifique de la protéine Snu13 et SNU13(15.5K) (Watkins et al., 2002) chez les eucaryotes et de la protéine L7Ae chez les archées (Kuhn et al., 2002).

Dans la plupart des snoRNA on retrouve deux motifs supplémentaires, les boîtes C' et D', dont les séquences sont moins conservées que celles des boîtes C et D (Baserga et al., 1991; Watkins *et al.*, 2002). Ces deux boîtes sont situées en position interne: la boîte D' dans la moitié 5' de l'ARN, et la boîte C' dans la partie 3' (Kiss-Laszlo et al., 1998). Les boîtes C' et D' sont séparées par 3 à 12 nucléotides non appariés ou par des séquences plus longues qui s'associent pour former soit l'hélice I d'un motif en K-turn ou soit un motif en K-loop lorsque la distance entre les deux boîtes C' et D' est courte (3-4 nt) (Kiss-Laszlo *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 2002; Nolivos et al., 2005). Alors que chez les archées la protéine L7Ae peut lier le motif en K-loop formé par le motif C'/D', ses homologues eucaryotes (Snu13 et SNU13(15.5K)) n'ont pas d'affinité suffisante.

L'appariement entre le snoRNA et son ARN cible forme un duplexe parfait, de 10 à 20 paires de bases (Cavaille *et al.*, 1996b; Kiss-Laszlo et al., 1996). Ces duplexes ARN substrat/ARN guide se forment entre les nucléotides situés directement en amont des boîtes D et D', et contiennent une information structurale essentielle pour la 2'-O-méthylase (Nop1p/Fibrillarine) pour cibler de façon invariable le 5^{ème} nucléotide du substrat, apparié en amont des boîtes D et D', (règle « N + 5 ») (Filipowicz *et al.*, 1999; Kiss-Laszlo *et al.*, 1996).

Chez les archées, les sARN à boîtes C/D sont plus courts, d'une taille généralement comprise entre 50 et 70 nt et leurs boîtes C'/D' sont mieux conservées (Gaspin et al., 2000; Omer et al., 2000). Les boîtes C' et D' sont séparées par une séquence généralement courte de 3 ou 4 nt, et forment un motif en K-loop, que l'on peut aussi retrouver dans les sARN à boîtes H/ACA (Nolivos *et al.*, 2005).

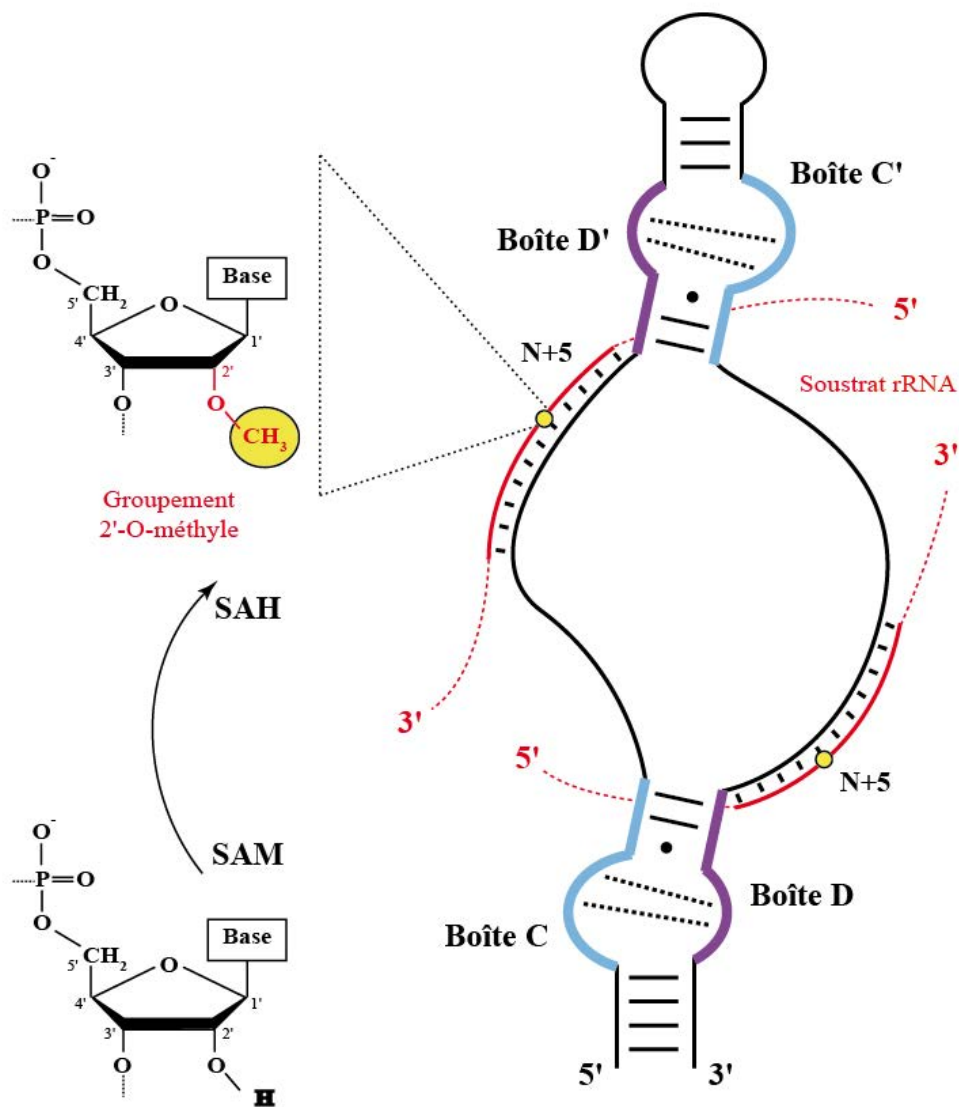


Figure 4: Représentation schématique des snoRNA à boîtes C/D. Les snoRNA à boîtes C/D partagent deux éléments conservés: les boîtes C (PuUGAUGA) et D (CUGA) situés, respectivement, aux extrémités 5' et 3' terminales de la molécule d'ARN. Souvent, les snoRNA à boîtes C/D ont également une copie supplémentaire de boîtes C' et D' situées dans la partie interne du snoRNA. Les boîtes C, D et C', D' s'assemblent pour former des motifs structurés en K-turn. Le complexe composé d'un ARN à boîtes C/D associé aux protéines nucléolaires Nop1p (fibrillarine), Nop56p, Nop58p et Snu13p (SNU13(15.5K)) catalyse spécifiquement la 2'-O-méthylation du nucléotide visé dans la séquence nucléotidique de l'ARN cible, apparié avec le 5ⁱème résidu en amont des boîtes D et D'. La S-adenosylméthionine (SAM) sert de donneur de groupe méthyle et est convertie en S-adenosylhomocystéine (SAH). Adapté de Stepanov et al., 2015.

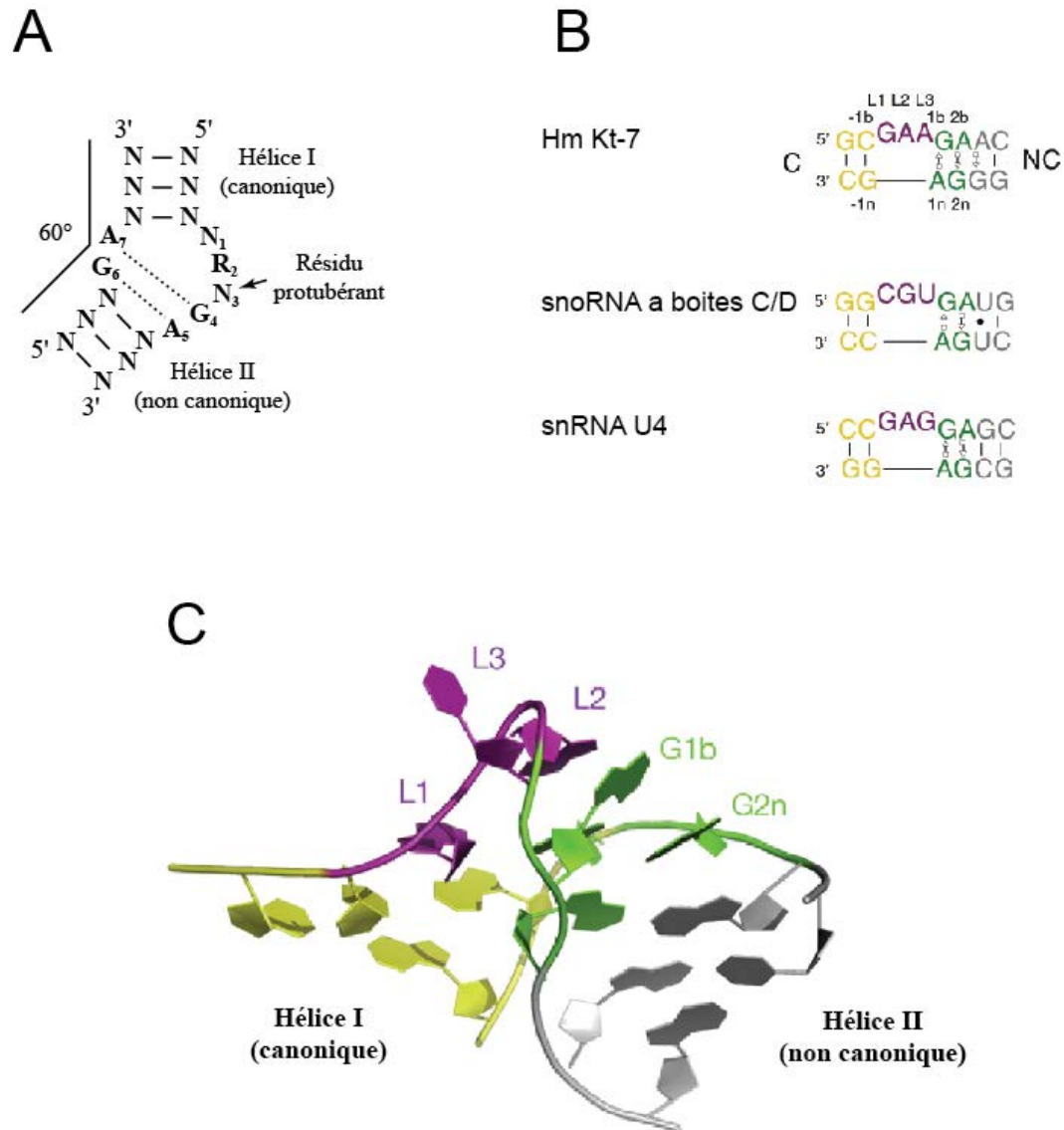


Figure 5: Motifs en K-turn classique. (A) Motif K-turn consensus. (B) Trois exemples de motifs en K-turn. La première séquence représente le K-turn de *Haloarcula marismortui* (HmKt-7), avec indication des positions des nucléotides. (C) Structure 3D du HmKt-7 (Huang et al., 2016; PDB: 4BW0). Le même code couleur a été utilisé. Adapté de (Huang and Lilley, 2016).

3.2.2 Les protéines des snoRNP à boîtes C/D

3.2.2.1 La protéine Snu13/SNU13(15.5K)

La protéine Snu13 de *S. cerevisiae* et son homologue humain, la protéine SNU13 (15.5K), font partie de la famille L7Ae. Elles ont été identifiées initialement comme composants de la tri-snRNP spliceosomale U4/U6-U5 (Gottschalk et al., 1999; Nottrott et al., 1999; Vidovic et al., 2000). Ces protéines interagissent spécifiquement avec les ARN formant un motif en K-turn (uniquement avec le motif en K-turn formé dans l'extrémité 5' du snARN U4, les motifs présents dans les snoRNA à boîtes C/D et le motif B/C spécifique du snoRNA U3), mais pas avec les motifs en K-loop (Charron et al., 2004; Nottrott et al., 1999; Watkins et al., 2000). Les structures 3D des protéines Snu13 de levure et son homologue chez l'humain, la protéine SNU13 (anciennement nommée 15.5K) sont très similaires (Oruganti et al., 2005; Vidovic et al., 2000), témoignant d'une forte conservation au cours de l'évolution.

L'une des premières structures d'un complexe formé entre la protéine SNU13 humaine et le motif en K-turn du snARN U4 a été obtenue par radiocristallographie (Vidovic et al., 2000) et a permis de montrer la forte conservation de structure avec la protéine L7Ae d'archée. Ces protéines partagent la même organisation en sandwich hélice α - brin β - hélices α . Les deux protéines reconnaissent des motifs en K-turn très similaires. Une caractéristique principale de la structure 3D du K-turn est l'angle aigu formé par le squelette ribose-phosphate de la boucle interne (Ban et al., 2000; Vidovic et al., 2000) et qui est stabilisé par l'empilement des résidus aux positions 1 et 2 sur les hélices I et II, respectivement (**Figure 5**). En conséquence, le résidu U présent en position 3 dans la boucle, qui est hautement conservé dans les motifs en K-turn et est reconnu par les protéines de la famille L7Ae, sort à l'extérieur du motif et joue un rôle essentiel dans l'interaction ARN-protéine (Vidovic et al., 2000). La liaison de SNU13/Snu13p permet en outre le recrutement des autres protéines cœur spécifiques des RNP: PRP31 pour la snRNP U4 (Nottrott et al., 2002), U3-55K (Rrp9p chez la levure) sur le motif B/C du snoRNA U3 (Clery et al., 2007; Granneman et al., 2002), et NOP56, NOP58 et Fibrillarine (Nop1p chez la levure) sur les snoRNA et les scaRNA à boîtes C/D (Schultz et al., 2006b; Watkins et al., 2002). Les facteurs déterminants pour la reconnaissance sélective de ces protéines spécifiques sont représentés par les éléments variables des motifs K-turn, (la longueur de l'hélice I et la séquence de l'hélice II) (Clery et al., 2007; Schultz et al., 2006a; Watkins et al., 2002).

La structure de la protéine Snu13 de *S. cerevisiae* sous forme libre a été obtenue plus tard (Oruganti et al., 2005) (**Figure 6**), en confirmant la forte conservation structurale avec la

protéine humaine SNU13. Les deux protéines eucaryotes présentent des différences structurales notables dans les feuillets β centraux de leur structure 3D par rapport à leur homologue chez les archées, la protéine L7Ae. Les différences structurales observées offrent une explication possible de la différence observée dans spécificité pour l'ARN entre Snu13p/SNU13 et L7Ae.

Au Laboratoire, des études approfondies ont été menées sur l'interaction de la protéine Snu13 de *S. cerevisiae* et les motifs en K-turn atypiques C'/D et B/C présents dans le snoRNA U3 (Clery *et al.*, 2007; Marmier-Gourrier *et al.*, 2003). Les protéines Snu13 et SNU13 interagissent avec les motifs C'/D et B/C du snoRNA U3 (Marmier-Gourrier *et al.*, 2003; Watkins *et al.*, 2000), la pré-structuration du motif en K-turn n'étant pas essentielle pour le recrutement de ces deux protéines, car sa formation est induite par la formation du complexe (Marmier-Gourrier *et al.*, 2003; Mougin *et al.*, 2002). De plus, *in vitro*, la protéine Snu13 a une affinité très faible pour le motif C'/D (K_d apparent $> 1,5 \mu\text{M}$), tandis qu'elle interagit avec une forte affinité avec le motif B/C (K_d apparent $< 250 \text{ nM}$) (Marmier-Gourrier *et al.*, 2003). La faible affinité naturelle de Snu13p pour le motif C'/D est due à la présence d'un résidu U non canonique situé en position 2 du motif en K-turn (Marmier-Gourrier *et al.*, 2003).

En raison d'une hélice I très réduite (un seul appariement G-C), le motif B/C ne se structure pas en K-turn. Cependant, des expériences de retard de migration sur gel ont révélé une affinité plus élevée de Snu13p pour le motif B/C, par rapport au motif C'/D. Une analyse phylogénétique du snoRNA U3, couplée à une analyse d'affinité de Snu13p pour les motifs C'/D et B/C du snoRNA U3 de levure, et une étude fonctionnelle d'un snoRNA U3 tronqué portant des substitutions de bases dans les motifs C'/D et B/C, ont révélé que la conservation des résidus 2 et 3 dans le K-turn B/C est plus important pour la fixation de Snu13p et la fonction du snoRNA U3, que la conservation des résidus correspondants dans le K-turn C'/D. Cela suggère que l'interaction de Snu13p avec un K-turn contenant une hélice I très courte impose des contraintes de séquence dans la boucle interne (Marmier-Gourrier *et al.*, 2003). Par la suite, A. Clery a identifié au laboratoire les déterminants ARN majeurs pour l'interaction avec Snu13p. Une paire G-C dans la tige II, un résidu G en position 1 dans la boucle, et une tige I courte ont été identifiés comme étant essentiels pour l'interaction avec la protéine Rrp9p (Clery *et al.*, 2007).

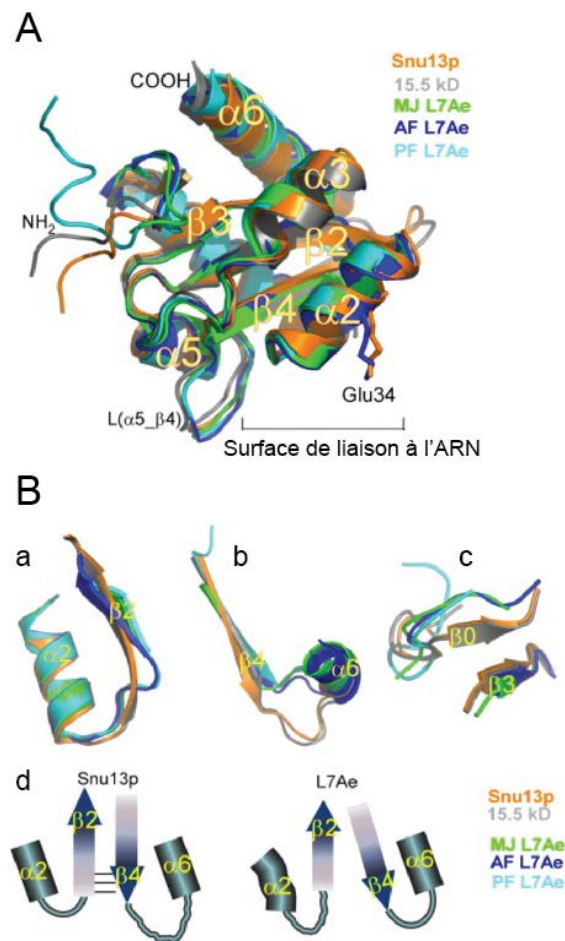


Figure 6: Comparaison de la structure 3D de la protéine Snu13 avec ses homologues. (A) Superposition de la structure de Snu13p avec ses homologues. Snu13p non liée à l'ARN en orange (PDB: 1ZWZ), L7Ae non liée à l'ARN en cyan (PDB: 1PXW), L7Ae de PF liée à un snoARN à boîtes C/D en bleu (PDB: 1RLG), L7Ae de *M. jannashi* liée à une boucle interne d'un motif en K-turn en vert (PDB: 1RA4) et SNU13 liée à une tige 5' du snRNA U4 en gris (PDBid: 1E7K). Snu13p a une structure qui ressemble à celle de ses orthologues, en particulier au niveau de la surface d'interaction à l'ARN. L(α5_β4): boucle qui connecte l'hélice α5 et le feuillet β4. La hélice α2 contient le plus grand nombre de résidus interagissant avec l'ARN. **(B)** Vue détaillée des régions montrant des différences entre la structure de Snu13p et L7Ae. **(a)** région L(α2_β2); **(b)** région L(β4_α6); **(c)** région du feuillet β de Snu13p et SNU13; **(d)** Représentation schématique montrant comment les différences observées dans la structure de Snu13p et L7Ae pourraient expliquer leur spécificité du substrat. Adapté de Oruganti et al., 2005.

3.2.2.2 La 2'-O-méthylase Nop1p/Fibrillarine

La protéine Fibrillarine, appelée Nop1p chez la levure, a été identifiée pour la première fois dans les cellules eucaryotes (Ochs *et al.*, 1985) et a été retrouvée associée aux snoRNA chez la levure (Schimmang *et al.*, 1989). C'est une méthyltransférase SAM-dépendante de classe I (Schubert *et al.*, 2003). Elle est principalement située dans les régions FC (centres fibrillaires) et DFC (centres fibrillaires denses) des nucléoles (Ochs *et al.*, 1985) où elle est directement impliquée en tant que composant protéique des snoRNP à boîtes C/D dans plusieurs étapes de la biogenèse des ribosomes. Elle est aussi retrouvée dans les corps de Cajal (Ochs *et al.*, 1985). Essentielle à la viabilité cellulaire et à la production des ARNr, la fibrillarine est conservée chez les eucaryotes et chez les archées (Tollervey *et al.*, 1991; Tollervey *et al.*, 1993).

Nop1p/Fib est nécessaire pour la synthèse et l'accumulation des snoRNP à boîtes C/D introniques des pré-ARNm et des transcrits polycistroniques (Lafontaine and Tollervey, 2000). Chez *S. cerevisiae*, son absence affecte principalement la production de l'ARNr 18S en inhibant les clivages précoces aux sites A0, A1 et A2 (Tollervey *et al.*, 1991), mais détermine aussi une réduction du taux des snoRNA, à l'exception du snoRNA U3 (Tollervey *et al.*, 1991).

Chez les eucaryotes la fibrillarine forme un complexe avec les protéines NOP56/Nop56p, NOP58/Nop58p, Snu13/SNU13 et les différents ARN guides comme U3. La Fibrillarine est également impliquée dans les premières étapes d'initiation de la transcription des ARNr où elle interagit avec les facteurs PI4 et 5P2 (Sobol *et al.*, 2013; Yildirim *et al.*, 2013), reliant la modification des ARNr avec l'initiation de la transcription des ARNr.

En fonction de l'organisme, la masse moléculaire de la Fibrillarine varie entre 34 et 38 kDa et a été initialement décrite dans le nucléole de *Physarum polycephalum* (Christensen *et al.*, 1977). Elle fait partie de la superfamille de Rossmann-fold S-adénosylméthionine (SAM) méthyltransférases (MTases) (Wang *et al.*, 2000). Les caractéristiques de cette superfamille comprennent un motif de liaison conservé SAM, la triade/tétrade catalytique [KDK-(H)] conservée et localisée dans la poche de fixation du substrat (Feder *et al.*, 2003) et sept brins β flanqués par 6 hélices α pour former une structure α - β - α qui porte l'activité catalytique (Rakitina *et al.*, 2011). L'aspartate de ce motif a un rôle essentiel dans la catalyse, car il pourrait être responsable de la déprotonation du groupement 2'-OH du ribose et/ou de la stabilisation du co-substrat SAM (Aittaleb *et al.*, 2003). Les structures primaires et secondaires de membres de cette famille sont conservées et l'une de leurs principales caractéristiques est un site riche en résidus arginine et glycine (domaine GAR) et un motif

spécifique pour la liaison à l'ARN. La Fibrillarine réalise le transfert d'un groupe méthyle depuis un donneur S-Adénosine-(L)-Méthionine (SAM) vers un ribose cible (Aittaleb *et al.*, 2003; Omer *et al.*, 2002). L'activité MTase a été confirmée par la reconstitution *in vitro* de RNP à partir des composants protéiques et ARN purifiés de l'archée *Sulfolobus solfataricus* (Omer *et al.*, 2002). Chez les archées le domaine C-terminal est responsable de l'interaction avec la protéine NOP5 (Aittaleb *et al.*, 2003). *In vitro*, la protéine seule interagit très peu avec les snoRNA (Omer *et al.*, 2002), même si des expériences de pontages aux UV ont montré des contacts directs avec l'ARN au sein des RNP (Bohnsack *et al.*, 2009; Cahill *et al.*, 2002). Chez les eucaryotes, la Fibrillarine contient un domaine N-terminal GAR (Glycine and Arginine Rich) qui n'est pas présent chez les archées.

La surproduction de Fibrillarine dans les cellules de mammifères peut conduire à une altération de la méthylation ribosomique pouvant influencer le processus de traduction. Les ribosomes hautement méthylés sont très efficaces pour les initiations de la traduction dépendantes des éléments IRES (Internal Ribosomal Entry Site) conduisant à une lecture erronée lors de la traduction qui se traduit par l'apparition de certains types de cancers tels que le cancer du sein et le cancer de la prostate (Koh *et al.*, 2011; Marcel *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2012). Des niveaux élevés d'expression de la Fibrillarine ont été observés dans plusieurs types de cellules cancéreuses, en particulier lorsque les niveaux de p53 sont réduits. En effet p53 est un régulateur négatif direct de la transcription de la Fibrillarine (Rodriguez-Corona *et al.*, 2015). Elle a été aussi montrée interagir avec les protéines virales du virus de la grippe A, ainsi qu'avec la protéine Tat (trans-activator of transcription) du HIV (Melen *et al.*, 2012; Yoo *et al.*, 2003).

Chez les plantes, la Fibrillarine a été montrée être un co-facteur du complexe médiateur de l'ARN polymérase II (la sous-unité 36a) (Backstrom *et al.*, 2007). Récemment, la Fibrillarine a été montrée être impliquée dans des mécanismes épigénétiques nucléolaires (Loza-Muller *et al.*, 2015), où elle réalise la méthylation de l'histone H2A chez la levure (position Q105) et dans des cellules humaines (position Q104); cette méthylation est spécifiquement réalisée dans le nucléole (Tessarz *et al.*, 2014). Cette modification est exclusivement réalisée au niveau des promoteurs actifs de l'unité transcriptionnelle du pré-ARNr 35S, (Loza-Muller *et al.*, 2015). La glutamine méthylée fait partie d'un motif de reconnaissance par le complexe chaperonne d'histones FACT. Lors de la transcription par l'ARN Pol I, FACT interagit préférentiellement avec l'histone H2A méthylée dans des nucléosomes réorganisés et présents dans les promoteurs actifs des ARNr (Tessarz *et al.*, 2014). Cette modification représente le premier marqueur épigénétique des histones dédié

spécifiquement à l'ARN polymérase I et représente une voie de régulation des interactions entre le complexe FACT et les nucléosomes (Tessarz *et al.*, 2014).

Les promoteurs de ARNr des cellules eucaryotes et de plantes présentent des différences significatives (Knight *et al.*, 2014; Perry, 2005). Chez les plantes, la Fibrillarine est également capable de méthyliser l'histone H2A liée à l'ADNr, dans les régions des promoteurs. Chez le chou *Brassica oleracea*, des histones H2A méthylées *in vivo* peuvent être trouvées en dehors des régions du génome présentes dans le nucléole, ce qui montre que chez les plantes, cette modification peut avoir des rôles épigénétiques supplémentaires qui ne se retrouvent pas dans les cellules animales (Loza-Muller *et al.*, 2015).

Récemment, il a été démontré que la Fibrillarine joue un rôle dans les infections virales et est associée à des RNP virales. La fibrillarine 2 recombinante d'*Arabidopsis thaliana* (AtFib2) a été montrée interagir *in vitro* avec différents types d'ARN incluant les ARNr, des snoRNA, des snRNA, des siRNA et des ARN viraux. Il semble que AtFib2 possède deux sites de liaison à l'ARN dans son domaine central (acides aminés 138-179) et respectivement dans le domaine C-terminal (acides aminés 225-281). L'octamère conservé GCVYAVEF présent dans AtFib2 ne lie pas directement l'ARN mais il a éventuellement un rôle facilitateur pour le repliement correct du site central de liaison à l'ARN (Rakitina *et al.*, 2011).

3.2.2.3 Les protéines Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58

Les protéines Nop56 (nucleolar protein of 56 kDa) et Nop58p (nucleolar protein of 58 kDa) ont été identifiées chez la levure *S. cerevisiae* lors d'un crible synthétique létal réalisé avec des mutants de la protéine Nop1 (Gautier *et al.*, 1997). Nop56 et Nop58 sont deux protéines nucléolaires essentielles à la viabilité cellulaire qui présentent une forte homologie de séquence (21% d'identité et 45% similarité), ce qui pourrait montrer leur origine dans un événement de duplication génique qui aurait eu lieu seulement chez les eucaryotes (Gautier *et al.*, 1997). En effet une seule protéine (NOP5) est présente chez les archées. Elles portent des fonctions distinctes, car chez la levure elles ne sont pas capables de se substituer l'une à l'autre (Gautier *et al.*, 1997). La protéine humaine NOP56 de 611 acides aminés présente une identité de 52% et une similarité de 68% avec son homologue de levure Nop56p, alors que l'homologie de NOP58 avec la protéine de levure Nop58 est plus faible (41% d'identité et 57% de similarité). Curieusement, la protéine NOP56 humaine ne présente pas les motifs KKE/D dans sa partie C-terminale et ne peut pas compléter une souche de levure n'exprimant plus Nop56p (Gautier *et al.*, 1997).

Une caractéristique commune de Nop56p et Nop58p est la présence de répétitions du motif KKE/D présent à leur extrémité C-terminale. Des répétitions de séquences similaires sont présentes dans les protéines humaines associées aux microtubules MAP1A et MAP1B (Langkopf et al., 1992; Noble et al., 1989), et les répétitions KKE/D ont été rapportées être impliquées dans la liaison aux microtubules (Pedrotti and Islam, 1994). Des répétitions fortement homologues sont présentes dans deux autres protéines nucléolaires de levures: Cbf5p, la pseudouridine synthase des ARNr (Jiang et al., 1993; Lafontaine et al., 1998), et Dbp3p qui est une hélicase ARN nécessaire pour le clivage au niveau du site A3 du pré-ARNr (Weaver et al., 1997). Le domaine C-terminal contenant des répétitions du motif KKE/D qui est présent dans les protéines Nop56p/NOP56 et Nop58p/NOP58 n'est pas requis pour leur localisation et fonction chez la levure (Gautier *et al.*, 1997) mais il est possiblement impliqué dans l'interaction avec l'hyperméthylase Tgs1p (l'isoforme longue) (Mouaikel *et al.*, 2002). Ces répétitions KKE/D ont un rôle de signal de localisation nucléaire (NLS) et nucléolaire (NoLS) pour les protéines humaines (Pradet-Balade et al., 2011). L'isoforme longue de l'hyperméthylase de la coiffe Tgs1p (Tgs1 LF), contient un signal d'exportation nucléaire riche en leucine et se lie au signal de localisation nucléolaire (NoLS) de la protéine Nop58. Des données *in vitro* indiquent que CRM1 interagit avec Tgs1 LF et favorise sa dissociation du NoLS de Nop58p, CRM1 semblant promouvoir le transport nucléolaire de snoRNP par la dissociation de Tgs1 LF des NoLS de Nop58p (Pradet-Balade *et al.*, 2011).

Le domaine NOP présent dans ces deux protéines est retrouvé dans la protéine Prp31/PRP31. Il correspond à un domaine de liaison à l'ARN comme cela a été montré pour la protéine Prp31/PRP31 qui s'associe de manière stable avec le snRNA U4 (Liu et al., 2007).

Même si les deux protéines partagent une forte homologie de séquences et font partie des protéines cœur des snoRNP à boîtes C/D, leurs absence d'expression mène à des phénotypes différents (Lafontaine and Tollervey, 1999, 2000). L'épuisement en Nop58p conduit à forte diminution des snoRNA à boîtes C/D chez la levure, les taux de snoRNP à boîtes H/ACA n'étant pas affectés. Les snoRNA C/D U3 et U14 sont requis pour les premières étapes de clivage des pré-ARNr et l'absence de Nop58p entraîne une forte inhibition de la synthèse de l'ARNr 18S. De plus, l'épuisement en Nop58p conduit à l'accumulation de formes étendues en 3' des snoRNA U3 et U24 (Lafontaine and Tollervey, 1999).

L'analyse *in vivo* des complexes snoRNP a montré que la protéine Nop56 est associée de façon stable avec les snoRNA et ce uniquement en présence de Nop1p. Par contre,

Nop58p et Nop1p peuvent s'associer avec les snoRNA de manière indépendante (Lafontaine and Tollervey, 2000). L'épuisement en Nop56p entraîne un défaut dans les événements précoces de maturation des pré-ARNr aux sites A0, A1 et A2 et conduit à un épuisement de l'ARNr 18S, mais en moindre mesure que celui induit par la réduction du taux de Nop58p. En revanche, l'épuisement en Nop56p ne conduit pas à une diminution du taux des snoRNA à boîtes C/D (Lafontaine and Tollervey, 2000). Chez l'homme aussi, l'absence de NOP58 et NOP56 conduit à une réduction du taux de snoRNA à boîtes C/D, et cet effet est plus fort dans le cas de NOP58 (Watkins et al., 2004).

Chez l'humain la conservation de la séquence de l'hélice II du motif en K-turn est essentielle pour le recrutement des protéines NOP56 et NOP58 sur l'ARN (Watkins *et al.*, 2002). Le motif NOP de la protéine NOP5 d'archée est précédé par un domaine « coiled-coil » contenant au milieu un domaine Tip, qui participe à la dimérisation de la protéine (Ye et al., 2009), et la partie N-terminale représente un domaine contenant 3 hélices α et deux brins β , qui est impliqué dans l'interaction avec la Fibrillarine (Aittaleb *et al.*, 2003). Le domaine « coiled-coil » de Nop56p et Nop58p leur permet aussi de former un hétérodimère. Cette propriété permet de connecter les motifs C/D et C'/D' au sein d'une snoRNP C/D et contribuent à former la structure pseudo-dimérique proposée pour les snoRNP (Aittaleb *et al.*, 2003; Bizarro et al., 2014; Lin et al., 2011).

L'activité du complexe R2TP (**Chapitre 3.3.1.2**) contribue à la stabilité de la protéine Nop58 *in vivo*. De plus, cette stabilité est contrôlée par la redistribution subcellulaire du complexe R2TP en réponse aux conditions de croissance et la disponibilité des nutriments (Kakihara et al., 2014). Les travaux de l'équipe de W. Houry indiquent qu'en conditions optimales de croissance, le complexe R2TP se localise dans le noyau et interagit avec les snoRNA à boîtes C/D. Cette interaction est significativement réduite dans les cellules en conditions défavorables de croissance quand le complexe R2TP se relocalise principalement dans le cytoplasme (Kakihara *et al.*, 2014). L'interaction entre le complexe R2TP et Nop58p (acides aminés 285-447) non présente au sein des RNP est médiée par la partie N-terminale de Pih1p (acides aminés 1-230) (Kakihara *et al.*, 2014).

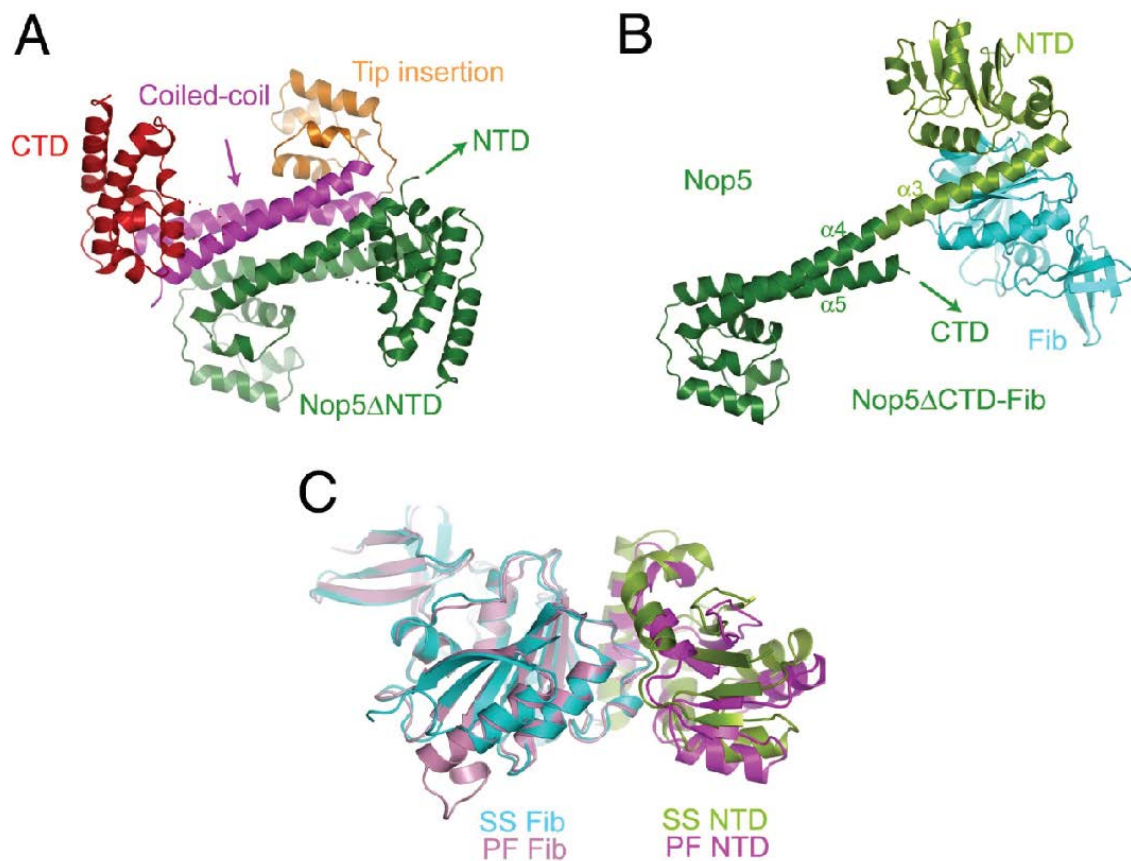


Figure 7 : Structures cristallines des protéines d'archée Nop5 et Fibrillarine. (A) Structure d'un dimère Nop5 tronqué de sa région N-terminale (Nop5ΔNTD). NTD: domaine N-terminal, CTD: domaine C-terminal. Une sous-unité est colorée en vert et l'autre en fonction des domaines: CTD en rouge, le domaine « coiled-coil » en magenta et le domaine « Tip » en orange. **(B)** Structure du complexe Nop5ΔCTD-Fibrillarine. Une seule copie de chaque protéine est montrée. Les domaines CTD et NTD de Nop5 sont colorés en vert foncé, respectivement en vert clair, et la Fibrillarine (Fib) en cyan. **(C)** Alignement des structures des complexes Nop5 NTD-Fib. SS: *Sulfolobus solfataricus*; PF: *Pyrococcus furiosus*. L'alignement est réalisé par rapport à la structure de la Fibrillarine. Adapté de Ye et al., 2009

Deux études récentes de séquençage à haut débit de petits ARN ont montré que les snoRNA à boîtes C/D humains ont des extrémités qui sont déterminées de manière très précise par la position des boîtes C et D. Avec quelques exceptions, les snoRNA à boîtes C/D commencent exactement quatre à six nucléotides en amont de la boîte C et se terminent deux à cinq nucléotides en aval de la boîte D (Deschamps-Francoeur *et al.*, 2014; Kishore *et al.*, 2013), soutenant l'idée d'une protection contre le clivage exonucléolytique par la présence de protéines liées au motif en K-turn (Darzacq and Kiss, 2000; Deschamps-Francoeur *et al.*, 2014; Kishore *et al.*, 2013). Fait intéressant, les snoRNA à boîtes C/D peuvent être classés en fonction des caractéristiques de leurs extrémités en considérant la contribution de la protéine NOP58 pour leur stabilité (Deschamps-Francoeur *et al.*, 2014). Bien que NOP58 soit considérée comme une composante essentielle de toutes les snoRNA à boîtes C/D, une population nombreuse de ces particules n'est pas affectée par une diminution de la quantité de cette protéine chez l'homme. Les snoRNA significativement affectés par l'épuisement de NOP58 ont généralement des extrémités « longues », situées à cinq nucléotides en amont de la boîte C et se terminant quatre ou cinq nucléotides en aval de la boîte D (Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015). Les résidus terminaux supplémentaires sont complémentaires, et peuvent former, en s'appariant, une tige terminale qui augmente la stabilité du motif en K-turn (Deschamps-Francoeur *et al.*, 2014). En revanche, les snoRNA à boîtes C/D qui ne sont pas touchés par l'épuisement de NOP58 ont généralement des extrémités « courtes », dont beaucoup comptent seulement deux nucléotides après la boîte D, ce qui rend la formation d'un K-turn peu probable. Ces données suggèrent qu'un sous-ensemble de protéines différentes peut se lier aux extrémités de ces snoRNA, ce qui entraîne un traitement différent de leurs extrémités. À l'appui de cette hypothèse, un sous-ensemble de snoRNA humains à extrémités courtes a été montré être fortement affecté par l'appauvrissement de la protéine RBFOX2 (Deschamps-Francoeur *et al.*, 2014), un facteur d'épissage pour lequel les sites consensus de liaison ont déjà été déterminés par CLIP-seq chez l'homme dans des cellules souches embryonnaires et comprennent un motif C partiel (GUGAUG) (Yeo *et al.*, 2009). Les données issues des expériences de CLIP-seq incluent des nombreux loci codant des snoRNA (Yeo *et al.*, 2009), suggérant que RBFOX2 pourrait être un composant d'un sous-ensemble des snoRNP à boîtes C/D non canoniques, ou pourrait contribuer à l'épissage au cours de la biogenèse des snoRNA introniques (Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015).

3.2.3 Structure des snoRNP à boîtes C/D chez les archées

Chez les archées, les sRNP catalytiquement actives se composent des trois composants protéiques L7Ae, NOP5 et Fibrillarine, qui s'associent à un des sARN C/D produits dans la cellule (**Figure 8**) (Omer et al., 2006). La reconstitution d'une particule sRNP C/D *in vitro* a été réalisée pour la première fois en utilisant des protéines recombinantes de *S. solfataricus* et un sARN produit par transcription *in vitro*. La sRNP obtenue était active *in vitro* et pouvait 2' O-méthyliser un fragment d'ARNr à la position prédite (Omer et al., 2006). Il n'est pas clair si d'autres facteurs s'associent avec ce complexe minimal pour un assemblage optimal ou une activité catalytique *in vivo* (Omer et al., 2006; Yip et al., 2013). Cette étude a également permis d'étudier les étapes d'assemblage de la sRNP. Dans une première étape de l'assemblage, deux copies de la protéine L7Ae lient respectivement les motifs des boîtes C et D, et D' et C' et stabilisent le motif structural en K-turn. Cette étape est suivie par l'addition supplémentaire des protéines NOP5 et de la Fibrillarine pour achever l'assemblage du complexe actif. NOP5 et Fibrillarine s'associent à la particule seulement en présence de la protéine L7Ae (Omer et al., 2006; Omer et al., 2002). Il est généralement admis qu'un seul exemplaire de la protéine L7Ae se lie à chacun des deux motifs en K-turn et cette nucléation sur chaque site permet l'ajout d'un hétérodimère contenant les protéines NOP5 et Fibrillarine (Fib) (Rashid et al., 2003; Tran et al., 2003).

Des études de microscopie électronique et de cristallisation des complexes sRNP à boîtes C/D chez les archées ont révélé des structures qui contiennent soit deux, soit quatre copies des protéines L7Ae, NOP5 et Fibrillarine (Bleichert et al., 2009; Lin et al., 2011). Des expériences récentes en spectroscopie RMN et SAXS montrent la présence de dimères de sRNP, chacun contenant deux sARN à boîtes C/D et quatre copies de chaque protéine (Lapinaite et al., 2013). Ces études ont révélé le potentiel de méthylation séquentielle des ARN cibles par le même complexe dimérique sRNP à boîtes C/D (Dennis et al., 2015).

La structure obtenue par cristallographie de L7Ae associée à un fragment de sARN à boîtes C/D a confirmé la formation d'un motif en K-turn et l'importance de ce motif dans la liaison de la protéine L7Ae (Moore et al., 2004). Les protéines Fibrillarine et NOP5 peuvent interagir en formant des hétérodimères qui favorisent leur association aux sRNA à boîtes C/D (Aittaleb et al., 2003). De plus, l'association de la Fibrillarine avec le sARN *in vitro* est dépendante de la protéine NOP5 (Omer et al., 2002). Les structures cristallines et des études biochimiques des complexes Fibrillarine/NOP5 ainsi que d'un complexe sRNP à boîtes C/D partiellement assemblé avec L7Ae, NOP5, Fibrillarine ont révélé l'importance de la protéine NOP5 pour l'association des autres protéines (Xue et al., 2010; Ye et al., 2009).

Le domaine C-terminal (CTD) de NOP5 se lie à la surface composite formée par L7Ae et le sARN, alors que le domaine N-terminal (NTD) de NOP5 interagit avec la Fibrillarine (Xue *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2009). Par ailleurs, le domaine en superhélice de NOP5 procure une surface d'interaction avec une deuxième protéine NOP5. Cette interaction permet de créer une liaison entre les protéines assemblées sur chacun des deux motifs à boîtes C/D. Les structures des complexes NOP5/Fibrillarine provenant d'espèces différentes, ainsi qu'un complexe partiel sRNP à boîtes C/D ont suggéré qu'il existe une région charnière flexible dans la protéine NOP5, autour de laquelle le NTD se déplace (Oruganti *et al.*, 2007). Cette région charnière peut également permettre un mouvement de l'enzyme Fibrillarine associée, ce qui permet une catalyse efficace après la liaison au substrat.

La structure tridimensionnelle d'une sRNP à boîtes C/D complète, catalytiquement active, a été obtenue par analyse par microscopie électronique à coloration négative (EM) après reconstitution de la sRNP à partir des composants protéiques purifiés de l'archée *M. jannaschii* (Bleichert and Baserga, 2010; Bleichert *et al.*, 2009). De manière inattendue, cette structure a montré des dimères de sRNP (di-sRNP), résultats qui sont d'ailleurs soutenus par de nombreuses données biochimiques (Bleichert *et al.*, 2009; Ghalei *et al.*, 2010). Dans le modèle de di-sRNP, plutôt que d'avoir deux ensembles de trois protéines cœur associées à un seul sARN, la structure complète est composée de quatre ensembles de protéines cœur associées à deux sARN. Curieusement, l'ancrage des protéines cœur dans la di-sRNP a également suggéré que les dimères de NOP5 agissent comme un pont entre les protéines L7Ae et Fibrillarine assemblées sur le motif à boîtes C/D d'un sARN avec ceux qui sont assemblés sur les boîtes C'/D' d'un deuxième sARN. Ainsi, l'orientation du sARN n'est pas parallèle au dimère de NOP5 (**Figure 8**). Alors que la résolution relativement faible de la reconstruction en EM ne fournit pas de détails atomiques, il est présenté un nouveau modèle de la façon dont les sRNP à boîtes C/D peuvent effectuer la réaction de catalyse. Dans une autre étude plus récente, la même équipe a montré que la tige formée par les extrémités N et C-terminales du sRNA de *M. jannaschii* est importante pour la formation des di-sRNP (Yip *et al.*, 2016). Ce motif participe à des interactions entre les deux sRNA au sein de la particule et son mauvais repliement mène à une efficacité réduite des di-sRNP (Yip *et al.*, 2016). Les sRNA fournissent une interface qui relie la moitié gauche de la di-sRNP avec la moitié droite, tandis que les domaines coiled-coil des Nop5 fournissent une interface qui relie la moitié supérieure de la moitié inférieure (Bleichert and Baserga, 2010). Par conséquent, les deux interfaces formées par les sARN et les deux protéines NOP5 sont importantes pour l'assemblage correct des di-sRNP (Yip *et al.*, 2016).

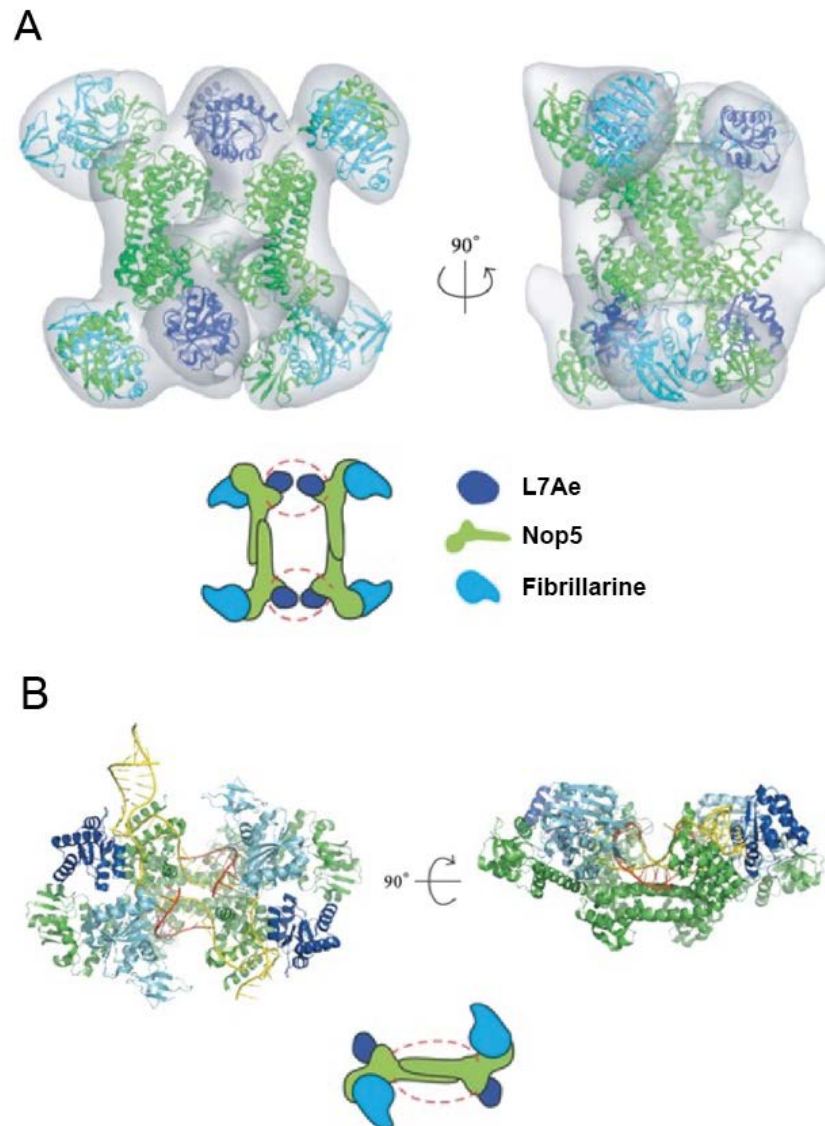


Figure 8 : Structure des sRNP à boîtes C/D des archées. (A) Vues en ME colorée négativement de sRNP de *S. solfataricus* reconstituée avec un sARN naturel. Les structures des protéines L7Ae (bleu), NOP5 (vert), et Fibrillarin (cyan), sont ancrées dans la reconstitution. Panneau inférieur - schéma du modèle de di-sRNP. **(B)** Panneau supérieur - deux vues de la structure cristalline résolue par diffraction aux rayons X d'une sRNP à boîtes C/D de *S. solfataricus* reconstituée avec un sARN non-naturel, rendues en PyMol (PDB ID: 3PLA). Les protéines cœur sont codées par les mêmes couleurs comme en (A). Le sARN est en jaune et l'ARN substrat est en rouge. Panneau inférieur - schéma du modèle de mono-sRNP. Tiré de Yip *et al.*, 2013.

Des arguments en faveur de ce modèle ont été apportés par une étude cristallographique de la structure d'une demi-sRNP couplée avec son substrat (Xue *et al.*, 2010). Les auteurs ont réussi à modéliser une di-sRNP et de prédire son fonctionnement. Dans ce modèle, l'ARN substrat ne peut pas interagir avec la Fibrillarine située sur le même motif en K-turn en raison de contraintes stériques, mais en revanche il peut interagir avec la Fibrillarine présente sur le motif en K-turn opposé du même sARN. Ce modèle implique un mouvement de la protéine L7Ae, pour faciliter la fixation du substrat et le positionnement de la sous-unité catalytique (**Figure 9**) (Xue *et al.*, 2010).

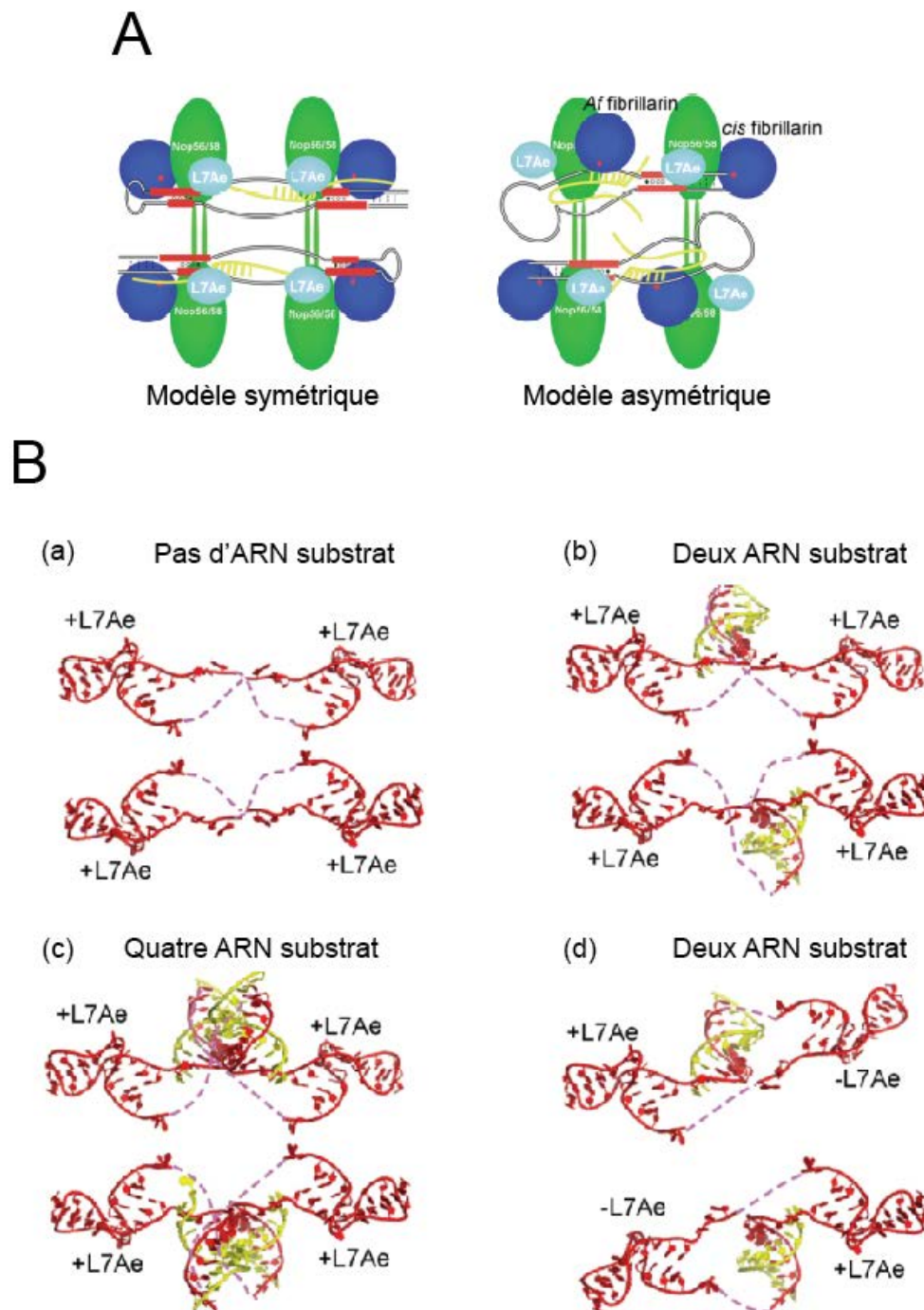


Figure 9 : Modèle structural des snoRNP à boîtes C/D. (A) Représentation des modèles symétrique et asymétrique des snoRNP à boîtes C/D. L'interaction possible avec l'ARN substrat (en jaune) est montrée. (B) Illustration de quatre modèles possibles de structuration de l'ARN guide (rouge) dans le modèle diRNP. Le symbole $\pm$ L7Ae indique la présence ou l'absence de la protéine L7Ae au niveau du chaque motif en K-turn. (a) ARN guide sans substrat; (b et c) le substrat ARN simple ou double interrompt la connexion entre les deux motifs en K-turn interagissant avec la protéine L7Ae; (d) un seul substrat lié au chaque ARN guide. Adapté de Xue et al., 2010.

Le modèle de di-sRNP a été remis en question suite à la détermination de la structure cristalline d'une sRNP à boîtes C/D totalement assemblée à partir de composants de *S. solfataricus*. Dans cette structure, les deux couples de boîtes sont appariés simultanément à deux substrats (Lin *et al.*, 2011). En contraste avec la structure de di-sRNP, la structure cristalline indique qu'un complexe sRNP complet se compose de deux lots de protéines cœur L7Ae-NOP5-Fibrillarine assemblés sur un seul sARN à boîtes C/D et qui interagissent par la dimérisation des domaines Coiled-coil des deux protéines NOP5 (**Figure 9**), chaque couple de boîtes étant associé et assurant la 2'-O-méthylation de son propre substrat. Ce modèle de mono-sRNP contredit non seulement le modèle de di-sRNP en terme d'état oligomérique du complexe mais suggère également une orientation différente des protéines et du sARN dans le complexe. Tandis que le dimère NOP5 relie les motifs C/D et C'/D' provenant de deux sARN dans la structure di-sRNP, dans le modèle mono sRNP il relie les boîtes C/D et C'/D' situées sur le même sARN (**Figure 9**). Dans le modèle de mono-sRNP, l'orientation du sARN est parallèle au dimère NOP5 (Yip *et al.*, 2013). D'autre part, ce modèle est en accord avec la conservation de la taille d'une douzaine de nucléotides de la région entre les deux motifs C/D et C'/D' (Tran *et al.*, 2005).

L'ensemble des résultats de ces études structurales suggère que les sRNP à boîtes C/D de différentes espèces d'archées contenant des protéines très conservées pourraient adopter de structures différentes. Une explication possible réside dans les différents sARN utilisés pour chacune de ces études. Dans la structure di-sRNP, un sARN naturel constitué d'un seul brin continu contenant à la fois des motifs en K-turn et K-loop a été utilisé (Bleichert and Baserga, 2010; Bleichert *et al.*, 2009). En revanche, dans la structure mono-sRNP, un sARN non-naturel composé de deux brins d'ARN, contenant deux motifs en K-turn et l'absence de la boucle interne, a été utilisé (Lin *et al.*, 2011) (**Figure 10**). En fonction de la présence ou de l'absence de la boucle du sARN les sRNP seraient structurées différemment comme démontré par des expériences d'électrophorèse en gel natif (Bower-Phipps *et al.*, 2012). Tandis que le sARN naturel, avec la boucle interne, ne forme que les espèces de di-sRNP, l'utilisation d'un sARN non naturel, dépourvu de la boucle interne, conduit à la formation d'une population mixte de mono- et de di-sRNP (Bower-Phipps *et al.*, 2012). Des protéines provenant de quatre espèces différentes d'archées se rassemblent pour former à la fois des mono- et des di-sRNP, selon le sARN (Bower-Phipps *et al.*, 2012; Yip *et al.*, 2013).

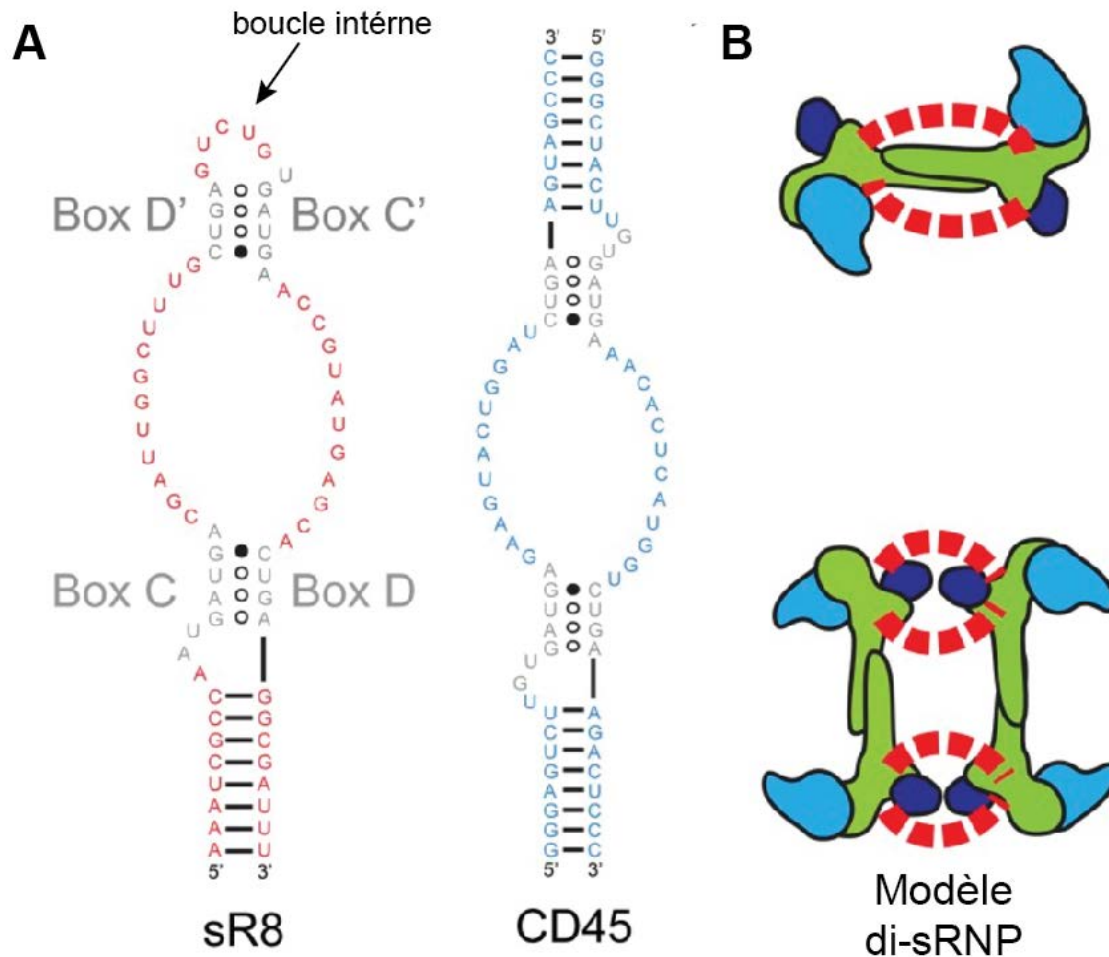


Figure 10 : Les sRNP à boîtes C/D d'archées peuvent adopter de structures différentes en fonction des caractéristiques des sARN guide. **(A) Gauche**: représentation du sARN U8, contenant les motifs connus des snoRNP à boîtes C/D. La boucle formée entre les boîtes C' et D' est présente et est structurée en motif en K-loop (Bleichert et al., 2009). **Droite**: une structure artificielle en double brin, mimant un snoRNA; l'ARN CD45 résulte de l'hybridation entre deux brins d'ARN, et il manque par conséquent la boucle interne. Il contient deux motifs en K-turn (Lin et al., 2011). **(B)** Deux modèles d'assemblage des snoRNA à boîtes C/D. **Haut**: modèle mono sRNP; **Bas**: modèle di-sRNP. Fibrillarine (cyan), Nop5 (vert), L7Ae (bleu foncé), sRNA à boîtes C/D (pointillés rouges). Extrait de (Bower-Phipps et al., 2012).

Des expériences récentes de spectroscopie RMN ont confirmé la présence des di-sRNP, chacun contenant deux sARN à boîtes C/D et quatre copies de chaque protéine (Lapinaite *et al.*, 2013). Ces études ont révélé le potentiel de méthylation séquentielle des cibles d'ARNr par le même complexe di-sRNP. Ainsi, la présence de deux séquences guide dans chaque complexe sRNP à boîtes C/D pourrait avoir évolué pour fournir un mécanisme régulateur pour le repliement des ARNr, qui est facilité par les interactions entre les complexes sRNP et l'ARNr naissant.

3.2.4 Structure des snoRNP à boîtes C/D chez les eucaryotes

Dans une première étude réalisée chez la levure *S. cerevisiae* par l'équipe de S. Maxwell, il a été montré que le motif C/D est suffisant pour la fonctionnalité des snoRNP à boîtes C/D. (Qu *et al.*, 2011). De plus, la fonctionnalité du motif C'/D' structuré en K-loop nécessite la présence d'un motif C/D. Par rapport aux archées, les distances plus grandes présentes sur les snoRNA des eucaryotes entre les motifs C/D et C'/D', ainsi que la distribution apparente asymétrique des protéines, a longtemps suggéré un fonctionnement indépendant des deux motifs (Qu *et al.*, 2011). Antérieurement, dans ces expériences menées sur le snoRNA U24, il a été montré que le motif C/D peut être stabilisé par la présence d'un motif H/ACA (Kiss-Laszlo *et al.*, 1998). La méthylation *in vivo* des deux nucléotides cibles dans l'ARNr - A534 (guide D) et U547 (guide D') des nucléotides cibles a été possible en utilisant une construction chimérique U24-snR5 possédant à la fois un motif C/D terminal et un motif C'/D' interne (Qu *et al.*, 2011). Ces expériences ont aussi révélé qu'une distance de 12 à 36 nucléotides entre les deux motifs est requise pour obtenir un motif C'/D' fonctionnel. Quand la longueur entre les 2 motifs est plus grande, les snoRNA chez la levure forment des structures en tige-boucle afin d'ajuster la distance entre les deux motifs. Il a aussi été montré qu'un snoRNA chimérique ne possédant que la boîte C/D est également capable de méthyle la séquence nucléotidique s'appariant en amont de la boîte D.

Comme nous l'avons vu, les sRNP d'archées forment un complexe symétrique avec deux jeux de protéines cœur L7Ae, NOP5 et Fibrillarine présents sur chaque motif C/D et C'/D' (Rashid *et al.*, 2003; Reichow *et al.*, 2007). En revanche, le complexe snoRNP eucaryote avait été décrit comme étant asymétrique, avec la protéine cœur Snu13/SNU13 retrouvée uniquement sur le motif terminal C/D (Szewczak *et al.*, 2002). Ce modèle était basé sur les observations que la protéine SNU13 est incapable de se lier au motif en K-loop C'/D' *in vitro* (Watkins *et al.*, 2002; Watkins *et al.*, 2000) et qu'il n'est pas ponté au motif C'/D'

suite à un traitement aux UV *in vivo* (Szewczak *et al.*, 2002). Les résultats obtenus par l'équipe de S. Maxwell ont montré que la protéine Snu13 est en effet recrutée sur le motif C'/D', en dépit de son incapacité à reconnaître le motif en K-loop, ce qui suggère que la présence de Snu13p dans ce complexe se produit probablement par des interactions protéine-protéine entre les deux motifs (Qu *et al.*, 2011). Ces données suggèrent un modèle d'assemblage symétrique chez la levure, avec un lot de trois protéines Snu13-Nop1-Nop56/Nop58 associées par couple de boîtes. De plus, la distance entre les deux motifs serait ajustée par les dimères des protéines Nop56 et Nop58 (Qu *et al.*, 2011). Chez *S. cerevisiae*, les protéines Nop1 et Nop58 peuvent s'assembler de façon indépendante dans les particules snoRNP mais le recrutement de la protéine Nop56 nécessite la présence de Nop1p (Lafontaine and Tollervey, 2000). Cependant, chez la levure la formation d'un pré-complexe Nop1p-Nop56p n'a pas été observée (Lafontaine and Tollervey, 2000).

3.3 La biogenèse des snoRNP à boîtes C/D

Chez les archées, la biogenèse des RNP à boîtes C/D est un processus simple, vu que chacune des familles de RNP, C/D et H/ACA, peuvent être reconstituées *in vitro* en utilisant des protéines recombinantes et un ARN transcrit *in vitro* (Baker *et al.*, 2005; Charpentier *et al.*, 2005; Galardi *et al.*, 2002; Omer *et al.*, 2002). Ce type d'expériences n'a pu être réalisé avec les composants protéiques de pleine taille des eucaryotes. Ceci suggère l'existence d'un processus d'assemblage beaucoup plus complexe. Ainsi, les RNP nécessitent chez les eucaryotes des mécanismes cellulaires spécialisés pour leur assemblage, même lorsqu'il est possible de les reconstituer *in vitro* à partir de composants purifiés (Meister *et al.*, 2001). La biogenèse des UsnRNP est étudiée depuis plus longtemps que celle des snoRNP. Le processus est complexe avec des phases dans le nucléoplasme, le cytoplasme, les corps de Cajal, le nucléole. Elle requiert l'intervention du complexe SMN (survival of motor neurons) pour charger dans le cytoplasme l'anneau de 7 protéines Sm sur les UsnRNA transcrits par l'ARN polymérase II (Fischer *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 1997; Neuenkirchen *et al.*, 2015). Des études exhaustives sur ce système modèle et les connaissances de la biogenèse des snoRNP H/ACA ont montré que les facteurs d'assemblage remplissent des rôles multiples (Grimm *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016a; Zhang *et al.*, 2011). Tout d'abord, ils facilitent la formation d'une pré-RNP formée par les protéines cœur assemblées en l'absence de l'ARN, stabilisant ainsi les intermédiaires d'assemblage labiles. Deuxièmement, ils fournissent un échafaudage structurel et organisent les protéines d'une manière qui favorise l'assemblage spécifique avec certains ARN. Troisièmement, ils empêchent la liaison des ARN non spécifiques comme SHQ1 et NAF1 lors de l'assemblage des snoRNP H/ACA. Par

conséquent, en interagissant à la fois avec les protéines cœur des RNP et avec les composants ARN des RNP, les facteurs d'assemblage assurent l'efficacité, la spécificité et le contrôle de la qualité de la production des RNP.

Plusieurs facteurs intervenant transitoirement sont requis pour la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D et H/ACA ont été identifiés ces dernières années (**Tableau 6**). C'est notamment le cas des protéines ATPases AAA+ RVB1 et RVB2, de Tah1p et Pih1p qui forment le complexe R2TP (qui est un cochaperon de la protéine de choc thermique HSP90/Hsp82). L'assemblage repose également sur la protéine NUFIP1/Rsa1 et son co-facteur TRIP3(ZNHIT3)/Hit1p, ainsi que sur la protéine ZNHIT6/Bcd1 (pour revue (Bizarro *et al.*, 2014; Kiss *et al.*, 2006; von Morgen *et al.*, 2015)).

<i>S.cerevisiae/ H.sapiens</i>	MW (KDa)	Nombre aa	IP	ADNc (nt)	Chr.
Rvb1p/RUVBL1	50,4 / 50,2	463 / 456	5,62 / 6,36	1392 / 1761	IV / 3
Rvb2p/RUVBL2	51,6 / 51,2	471 / 463	4,96 / 5,32	1416 / 2009	XVI / 19
Pih1p/PIH1D1	39,5 / 32,4	344 / 290	5,71 / 4,79	1035 / 1192	VIII / 19
Tah1p/RPAP3	12,5 / 75,7	111 / 665	6,51 / 6,77	336 / 4370	III / 12
Rsa1p/NUFIP1	44 / 56,3	381 / 495	6,03 / 9,64	1146 / 3492	XVI / 13
Hit1p/TRIP3	18,4 / 17,6	164 / 155	9 / 5,35	495 / 951	X / 17
Bcd1p/ZNHIT6	42,3 / 53,9	366 / 470	6 / 5,52	1101 / 2797	VIII / 1

Tableau 6: Caractéristiques des facteurs d'assemblage intervenant dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D chez *S. cerevisiae* et chez l'humain. MW : poids moléculaire ; IP : point isoélectrique

3.3.1 Facteurs impliqués dans l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D

3.3.1.1 Les chaperonnes HSP90

Les chaperonnes sont des protéines impliquées dans le repliement des protéines et dans l'assemblage/désassemblage des complexes protéiques. (Macario and Conway de Macario, 2005). La chaperonne Hsp90 (protéine de choc thermique 90) est abondamment exprimée et, conjointement avec Hsp70 et des co-chaperonnes, constitue le complexe chaperonne Hsp90, qui stabilise et active plus de 200 protéines dans des cellules de mammifères (Makhnevych and Houry, 2012; Neckers, 2007; Trepel *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2005). Elle est impliquée dans une large gamme de processus cellulaires, y compris la

signalisation cellulaire, l'homéostasie cellulaire, le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN, la dégradation des protéines, la maintenance du génome et l'assemblage de machineries de transcription et de traduction (Prodromou et al., 1997; Saibil, 2013). Deux principales isoenzymes cytoplasmiques de Hsp90 sont connues, la forme inductible/majeure Hsp90 α et la forme constitutive/mineure Hsp90 β (Csermely et al., 1998). L'une des principales différences structurales est que la forme α dimérise facilement, alors que cela est beaucoup moins efficace pour la forme de β (Pennisi et al., 2015).

La spécificité de substrat et l'activité du dimère Hsp90 dépendent de partenaires protéiques d'interaction appelés co-chaperonnes (Ali et al., 2006; Li et al., 2012). Bien que la plupart des co-chaperonnes de Hsp90 bien connues sont de petites protéines (Cdc37, p23, SGT1, Aha1), des travaux récents ont montré que ces co-chaperonnes peuvent être des complexes multi-protéiques, comme par exemple le complexe R2TP (Li *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2005). La participation du complexe chaperon Hsp90 à l'assemblage protéique et à la dégradation protéique représente un mécanisme de contrôle qualité et fournit de la plasticité aux complexes protéiques dynamiques (Echtenkamp and Freeman, 2012; Quadroni et al., 2015).

Contrairement aux autres chaperones, Hsp90 n'est pas nécessaire pour le repliement *de novo* des protéines, mais facilite plutôt la maturation finale des protéines clientes spécifiques, qui sont déjà dans un état de repliement avancé. En effet, la plupart des protéines clientes de Hsp90 doivent être correctement repliées afin d'interagir avec succès avec leurs partenaires de liaison. Par conséquent, le complexe chaperon Hsp90 joue un rôle clé dans la coordination spatiale et temporelle des interactions des protéines (Taipale et al., 2010; Tiwari et al., 2015). Pour assurer l'assemblage correct des protéines, Hsp90 remplit trois fonctions principales dans des conditions normales: (i) il interagit spécifiquement avec une vaste gamme de protéines clientes grâce à ses co-chaperonnes (par exemple, p23 et Cdc37); (ii) il stabilise les intermédiaires de repliement, ce qui permet aux protéines clientes d'interagir avec leurs partenaires de liaison spécifiques; et (iii) il régule la dégradation médiée par l'ubiquitine et le protéasome (Echtenkamp and Freeman, 2012; Quadroni *et al.*, 2015; Taipale *et al.*, 2010).

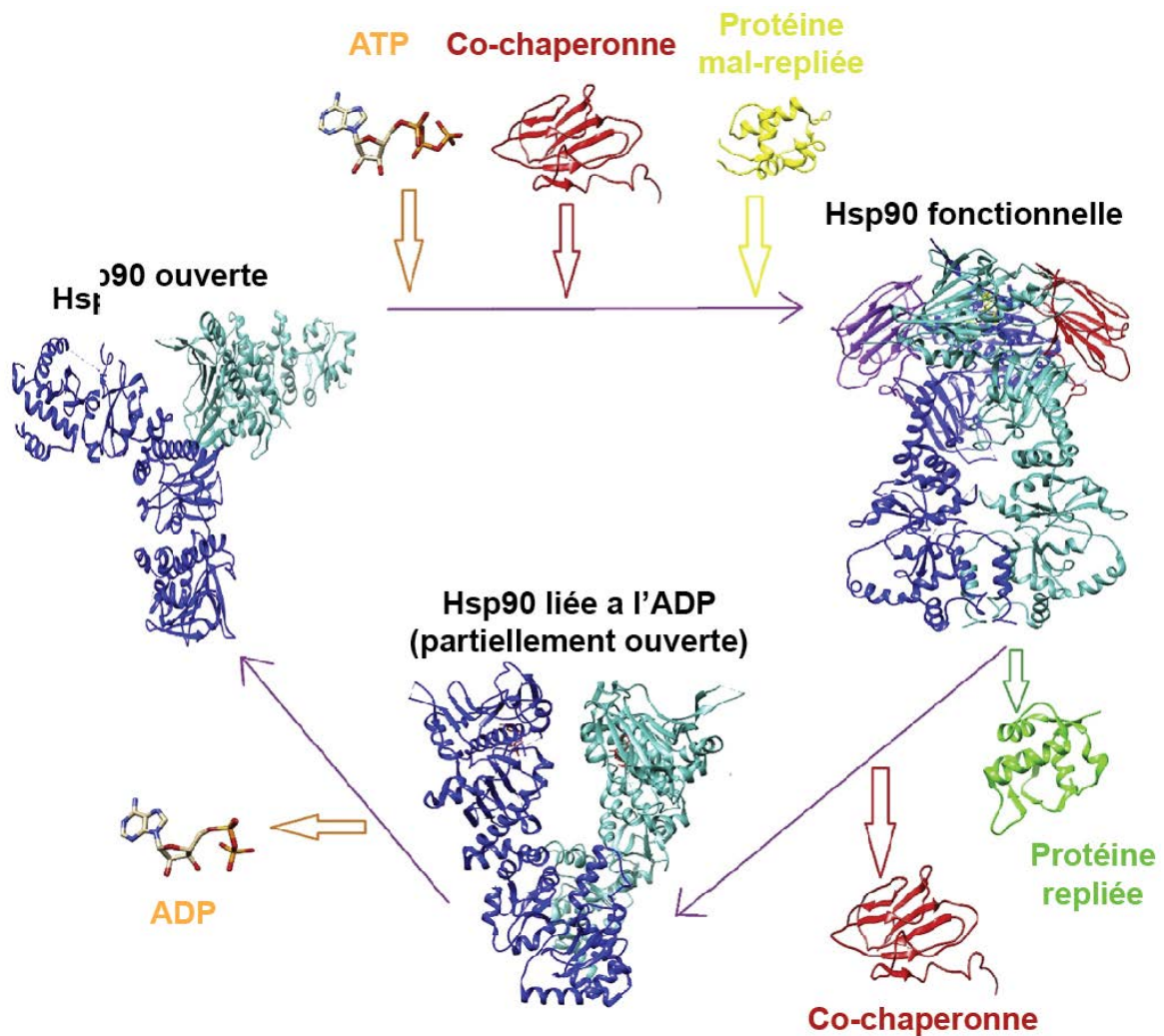


Figure 11 : Représentation schématique du cycle ATP-ase des protéines Hsp90, et les changements conformationnels qui se produisent à chaque étape. Le recrutement de l'ATP et des co-chaperonnes, suivi du recrutement de la protéine client déterminent la formation de la chaperonne fonctionnelle. Une fois les protéines client repliées correctement, celles-ci quittent le complexe, et les co-chaperonnes libèrent Hsp90 dans une conformation partiellement ouverte, liée à l'ADP. Enfin, l'ADP est libéré du complexe et Hsp90 revient à sa conformation initiale ouverte, qui lui permet de commencer un nouveau cycle. Dans le complexe fonctionnel Hsp90, la protéine Hsp90 est colorée en bleu et cyan (les deux monomères) et la protéine client est colorée en rouge. Adapté de Verma et. al., 2016.

Près de 100 protéines sont connues pour être régulées par Hsp90. La plupart de ces substrats sont impliqués dans la transduction du signal, et ils interagissent avec Hsp90 au sein d'un complexe multi-protéique Hsp90/Hsp70. De nombreuses études indiquent que les complexes chaperonnes-protéines clientes ont tendance à suivre une progression temporelle - des complexes protéines clientes-Hsp40 à un stade précoce après la synthèse des protéines, puis à des complexes protéines clientes-Hsp70 à des stades intermédiaires et finalement à des complexes protéines clientes-Hsp90 à des stades tardifs (Young et al., 2004). La co-chaperonne Hop peut s'associer à la fois à Hsp70 et à Hsp90 et facilite le transfert des protéines d'une protéine chaperonne à l'autre (Johnson et al., 1998). L'hydrolyse de l'ATP par l'activité ATPase intrinsèque de Hsp90 conduit à un changement conformationnel dans Hsp90 qui est nécessaire pour induire un changement conformationnel dans les protéines clientes (Fan et al., 2003).

L'activité du complexe Hsp90 est régulée à plusieurs niveaux, comprenant le cycle ATPase, l'association avec les co-chaperonnes reconnaissant spécifiquement la conformation et les modifications post-traductionnelles (Echtenkamp et al., 2011; Soroka et al., 2012). Les co-chaperonnes modulent la reconnaissance des protéines clientes par le complexe Hsp90, régulent son activité ATPase, et modulent les activités biochimiques de ses protéines clientes. Dans les conditions physiologiques, Hsp90 représente environ 1-2% des protéines cellulaires totale. Dans des conditions environnementales extrêmes, le réservoir de chaperonnes peut être rapidement activé afin de maintenir la protéostasie cellulaire (Welch, 1991; Welch and Feramisco, 1982).

Chez *S. cerevisiae* il existe deux isoformes de Hsp90: la protéine Hsc82, qui est exprimée de façon constitutive, et la protéine Hsp82, qui est surexprimée en condition de stress thermique ou en phase stationnaire de croissance (Borkovich et al., 1989; Donalies and Stahl, 2001). Ces isoformes, principalement cytoplasmiques, semblent faire l'objet de passages transitoires dans le noyau durant la phase exponentielle de croissance (Dezwaan and Freeman, 2008; Shibata and Morimoto, 2014; Tapia and Morano, 2010). L'isoforme Hsp82p s'accumule dans le noyau des cellules en phase stationnaire (Tapia and Morano, 2010).

Chaque monomère de Hsp90 se compose de trois domaines stables à la protéolyse limitée: un domaine N-terminal (N) impliqué dans la fixation et dans l'hydrolyse de l'ATP, un domaine central (M), qui facilite l'hydrolyse de l'ATP et est partiellement impliqué dans la liaison au substrat, et un domaine C-terminal (C), qui permet la dimérisation et est impliqué dans le recrutement des co-chaperonnes contenant des domaines TPR (Tetratricopeptid Repeat). Les domaines TPR contiennent plusieurs motifs hélice-boucle-hélice de 34 acides

aminés (motifs TPR), et sont souvent présents dans la structure des cofacteurs des protéines HSP (Roberts et al., 2015). La protéine Sti1/HOP, une co-chaperonne majeure de Hsp90, contient plusieurs domaines TPR, qui lui permet d'interagir avec les motifs C-terminaux EEVD des chaperonnes Hsp90 et Hsp70 (Scheufler et al., 2000). Ces trois domaines sont séparés par des domaines charnières flexibles qui permettent à la chaperonne d'adopter différentes conformations.

Tandis que chaque sous-unité contient un domaine ATPase, la dimérisation est critique pour la fonction *in vivo* (Wayne and Bolon, 2007). L'activité ATPase et les changements de la conformation de Hsp90 sont grandement influencés par les protéines clientes et de nombreuses co-chaperonnes dont Aha1p, p23, Cdc37, PPlases et Pih1p (Bose et al., 1996; Cox and Johnson, 2011; Zhao *et al.*, 2005). Les protéines clientes de Hsp90 peuvent également être dirigées vers les voies de dégradation (McClellan et al., 2005), et des co-chaperonnes comme l'ubiquitine ligase E3 CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*) aide à la médiation de ce processus (Xu et al., 2002). Par quel mécanisme chaque sous-unité dans le dimère Hsp90 assure la liaison à ses co-chaperonnes et conduit finalement à la maturation de la protéine cliente est une question qui est en cours d'étude, mais il est clair que l'asymétrie du dimère Hsp90 joue un rôle important dans ce processus (Alvira et al., 2014; Flynn et al., 2015; Karagoz et al., 2014; Kirschke et al., 2014; Lavery et al., 2014; Lorenz et al., 2014).

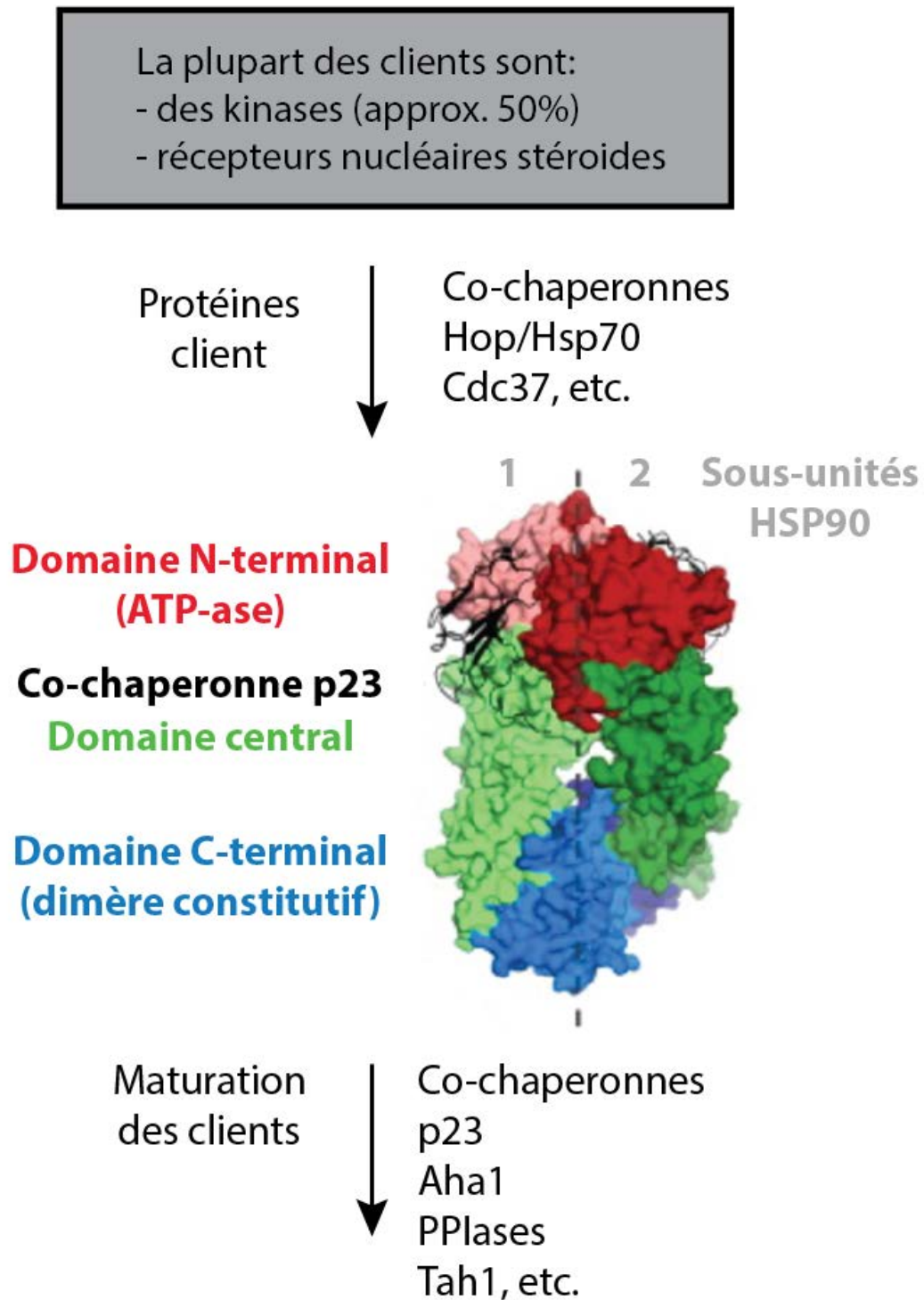


Figure 12 : Hsp90 fonctionne avec des multiples co-chaperonnes pour réaliser la maturation des nombreux facteurs protéiques. L'image du milieu représente une modélisation moléculaire (structure cristalline PDB: 2GC9) d'un homo-dimère Hsp90 associé à deux monomères de co-chaperonne p23. Chaque sous-unité Hsp90 semble interagir de manière asymétrique avec les clients au cours du processus de maturation. Adapté de Flynn et al., 2015.

3.3.1.2 Le complexe R2TP

Le complexe R2TP chez *S. cerevisiae* est formé par les protéines Rvb1p, Rvb2p, Tah1p et Pih1p. Bien que le complexe R2TP ait été d'abord découvert chez la levure en tant que complexe associé à Hsp90 (Zhao *et al.*, 2005), ses sous-unités sont hautement conservées de la levure aux mammifères. Ce complexe a été identifié et purifié chez l'homme (Te *et al.*, 2007), où il se compose des quatre sous-unités : PIH1D1, RPAP3, RuvBL1 et RuvBL2, connus sous divers noms (**Tableau 7**). Le complexe s'associe également avec les protéines préfoldine et préfoldine-like PFDN2, PFDN6, UXT, WDR92, URI et PDRG1, qui forment un complexe impliqué dans l'assemblage des complexes protéiques (Cloutier and Coulombe, 2010)(von Morgen *et al.*, 2015).

	Mammifères	Levure
PIH1D1	NOP17	Nop17, Pih1
RPAP3	hSPAGH	Tah1
RuvBL1	Pontin, RVB1, TIP49A, TAP54 α , ECP-54, TIH1, p50	Rvb1
RuvBL2	Reptin, RVB2, TIP49B, TAP54 β , ECP-51, TIH2, p47	Rvb2

Tableau 7: Noms alternatifs pour les protéines du complexe R2TP

	Mammifères	Levure
ZNHIT6	NY-BR-75	Bcd1
ZNHIT3	TRIP3	Hit1
NUFIP1	NUFIP	Rsa1

Tableau 8: Noms alternatifs pour les facteurs d'assemblage impliqués dans la biogénèse des snoRNP à boîtes C/D

3.3.1.2.1 Identification du complexe R2TP

Le complexe R2TP a été découvert chez *S. cerevisiae* comme une entité interagissant avec Hsp90. Afin de comprendre par quel mécanisme Hsp90 réalise son effet protecteur cellulaire, l'équipe de W. A. Houry a entrepris une série d'études protéomiques et génomiques à grande échelle visant à identifier l'ensemble des partenaires protéiques et des substrats interagissant avec la chaperonne Hsp90 de levure (isoformes Hsp82p et Hsc82p). Une combinaison de quatre stratégies expérimentales complémentaires a été employée. Dans un premier temps, une recherche des interactions protéine-protéine médiées par Hsp90 a été réalisée par un crible par double hybride (Y2H) systématique à l'échelle génomique. Une autre approche a été d'identifier les protéines qui co-immunoprécipitent avec Hsp90. Une troisième approche a été d'identifier des interactions synthétiques létales entre un allèle mutant spécifique de Hsp90 et un nombre d'environ 4700 souches de levure invalidées (KO) pour des gènes uniques par la technique de « *synthetic genetic array* » (SGA). En quatrième lieu, un crible des souches KO afin d'identifier une hypersensibilité différentielle à la geldanamycine, un inhibiteur de Hsp90, en utilisant aussi des techniques à haut débit. Collectivement, ces expériences ont identifié 627 substrats et cofacteurs potentiels de Hsp90, ce qui représente environ 10% du protéome de levure. L'identification de ces partenaires potentiels de Hsp90 suggère des liens possibles de Hsp90 avec la régulation transcriptionnelle, le cycle cellulaire, le traitement de l'ADN, ou le transport cellulaire. Parmi ces candidats potentiels, deux nouveaux cofacteurs non définis auparavant ont été caractérisés, les protéines codées par les gènes YCR060W et YHR034C, qui interagissent physiquement et fonctionnellement avec Hsp90 et entre eux, et qui se sont avérés interagir avec deux ATPase AAA+ essentielles et liées au remodelage de la chromatine (Zhao *et al.*, 2005).

YCR060Wp est une petite protéine de 111 acides aminés (12,5 kDa) qui contient un motif TPR bien défini chez la levure. Cette protéine a été nommée Tah1 (TPR-containing protein associated with Hsp90). Tah1p interagit avec l'extrémité C-terminale de Hsp90 (résidus 599-709) dans un test d'interaction Y2H. Le domaine TPR de Tah1p est similaire au domaine TPR2B du cofacteur Sti1p/HOP de Hsp90 (une protéine de 589 acides aminés) (Scheufler *et al.*, 2000) et aux motifs TPR de Sgt2, une protéine de 346 acides aminés riche en glutamine et contenant le motif TPR, et de fonction inconnue, tandis que l'homologue humain le plus proche est la protéine SGT2 (également appelée SGTB, de 304 acides aminés). Comme plusieurs autres cofacteurs de Hsp90, la suppression de Tah1p dans la souche S288C ou W303 ne confère aucun défaut de croissance évidente (Zhao *et al.*, 2005).

YHR034Cp est une protéine de 344 acides aminés (39,5 kDa) qui ne contient pas de motifs connus. Elle a été baptisée Pih1 (protéine interagissant avec Hsp90) car elle interagit fortement avec l'extrémité C-terminale de Hsp90 dans des tests de Y2H. Bien qu'il n'y ait pas de paralogue de levure de Pih1p retrouvé, un orthologue humain proche et de taille similaire (290 acides aminés), mais dont la fonction était inconnue, a été détecté (nommée PIH1D1, aussi appelé NOP17). Une souche de levure S288C invalidée pour le gène *PIH1* présente une croissance ralentie et les cellules sont de taille réduite, ce qui suggère un rôle important pour cette protéine dans la croissance et/ou la division cellulaire.

Tah1p avait déjà été rapportée interagir avec Pih1p dans des tests Y2H (Ito *et al.*, 2001). Suite à des expériences *in vitro* de pull-down avec les protéines recombinantes Hsc82, Pih1 et Tah1, l'équipe de W. A. Houry a démontré qu'il existe une interaction entre Hsc82p et Pih1p qui est médiée par Tah1p. En absence de Tah1p l'interaction de Pih1p avec Hsc82p n'est plus détectable. Ces données suggèrent que les trois protéines pouvaient former un complexe ternaire (Zhao *et al.*, 2005).

Les données obtenues *in vitro* et la présence des motifs TPR de Tah1p suggèrent fortement que Tah1p et Pih1p correspondent à de nouveaux cofacteurs de la chaperonne Hsp90. Afin de tester cette hypothèse, les auteurs ont utilisé un essai *in vivo* afin de déterminer si l'inactivation des gènes *TAH1* ou *PIH1*, dans les souches de levure Δ *TAH1* et Δ *PIH1*, respectivement, affectait la capacité de Hsp90 à replier correctement deux de ses protéines clientes bien caractérisées, le récepteur glucocorticoïde (GR, un facteur de transcription) et vSrc (une protéine tyrosine kinase). Des souches de *S. cerevisiae* W303 de type sauvage et invalidées présentent des taux de croissance similaires. Dans les souches Δ *TAH1* ou Δ *PIH1*, la maturation du GR est compromise de manière significative, (60% par rapport à la souche sauvage), alors que les niveaux d'expression de GR n'étaient pas perturbés. Des effets similaires ont été observés pour la maturation du vSrc (Nathan *et al.*, 1997). L'absence de production de Tah1p ou de Pih1p n'affecte pas de façon significative les niveaux d'expression de vSrc, mais conduit à un niveau réduit de phosphorylation de tyrosines par rapport aux cellules de type sauvage, ce qui indique un rôle pour Tah1p et Pih1p dans la maturation Hsp90-dépendante de vSrc. L'effet perturbateur de Tah1p et Pih1p sur la fonction et l'activité de Hsp90 *in vivo* est similaire à celui observé pour les autres cofacteurs établis de Hsp90, telles que Aha1p, Cns1, Hch1p.

Il était donc établi à ce stade que Tah1p et Pih1p sont de nouveaux cofacteurs de Hsp90 formant probablement un complexe ternaire avec la chaperonne Hsp90. Vu que les différents cofacteurs de Hsp90 ciblent des protéines clientes différentes, les auteurs ont ensuite tenté d'identifier les substrats de Tah1p et Pih1p, par des purifications d'affinité TAP

en utilisant des souches de levure exprimant les protéines Tah1 ou Pih1 fusionnées à leur extrémité C-terminale avec l'étiquette CBP-ProtA (dite étiquette TAP). Les résultats montrent que Tah1p et Pih1p non seulement sont purifiées ensemble, mais aussi en des quantités stœchiométriques avec Rvb1p et Rvb2p. Hsp90 n'a pas été observée dans ces expériences probablement parce qu'elle est impliquée dans beaucoup d'autres interactions simultanément et ses niveaux dans ce complexe sont en dessous des limites de détection (Zhao *et al.*, 2005).

Comme nous le détaillerons plus loin, Rvb1/2 sont des composants essentiels du complexe de remodelage de la chromatine Ino80 qui est lié à la régulation de la transcription de 5% des gènes de levure. Ces protéines sont également des sous-unités essentielles d'un complexe de remodelage de la chromatine de 13 protéines, le complexe SWR-C, qui régule la transcription des gènes présents au niveau de la hétérochromatine en facilitant l'incorporation de Htz1p, une forme variante de l'histone H2A (Mattioli *et al.*, 2015). Hsp90 interagit physiquement avec Rvb1p, Htz1p, ainsi qu'avec les1p, un autre composant du complexe Ino80. De plus, Hsp90 interagit avec Vps1p, Swr1p et Aor1p, qui sont des composantes essentielles du complexe SWR-C. Les auteurs ont appelé le complexe Rvb1p-Rvb2p-Tah1p-Pih1p le complexe R2TP, en reprenant les initiales de chacune des protéines (Zhao *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que Tah1p et Pih1p, et par extension Hsp90 peuvent participer au repliement et/ou à l'assemblage de Rvb1/2 dans les complexes de régulation de la transcription Ino80 et/ou SWR-C (Zhao *et al.*, 2005).

Dans les souches $\Delta TAH1$ et $\Delta PIH1$, les niveaux apparents des protéines Rvb1/2 en association avec le complexe Ino80 augmentent de manière significative. Étant donné que Tah1p et Pih1p sont détectées dans le noyau et dans le cytoplasme tandis que la localisation de Hsp90 est exclusivement cytoplasmique chez la levure, il est possible que Hsp90 et R2TP agissent de manière transitoire dans le cytoplasme par le maintien de Rvb1/2 dans un état en équilibre jusqu'à ce que par la suite, celles-ci correctement agencées sont transportées par le complexe R2TP dans le noyau où elles sont incorporées dans les complexes Ino80 et SWR-C.

Depuis cette découverte, le complexe R2TP a été impliqué dans divers processus cellulaires tels que l'assemblage des snoRNP (Boulon *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008), des ARN polymérases (Boulon *et al.*, 2010), l'apoptose (Inoue *et al.*, 2010) et la signalisation PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases) (Horejsi *et al.*, 2010). Les PIKK et leurs complexes (Horejsi *et al.*, 2010) sont impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN (ATM, ATR, DNA-PKcs), la régulation de la transcription (TRRAP), la voie NMD

(nonsense mediated mRNA decay) (SMG1), et la voie mTOR (la signalisation par des éléments nutritifs) (Izumi et al., 2012).

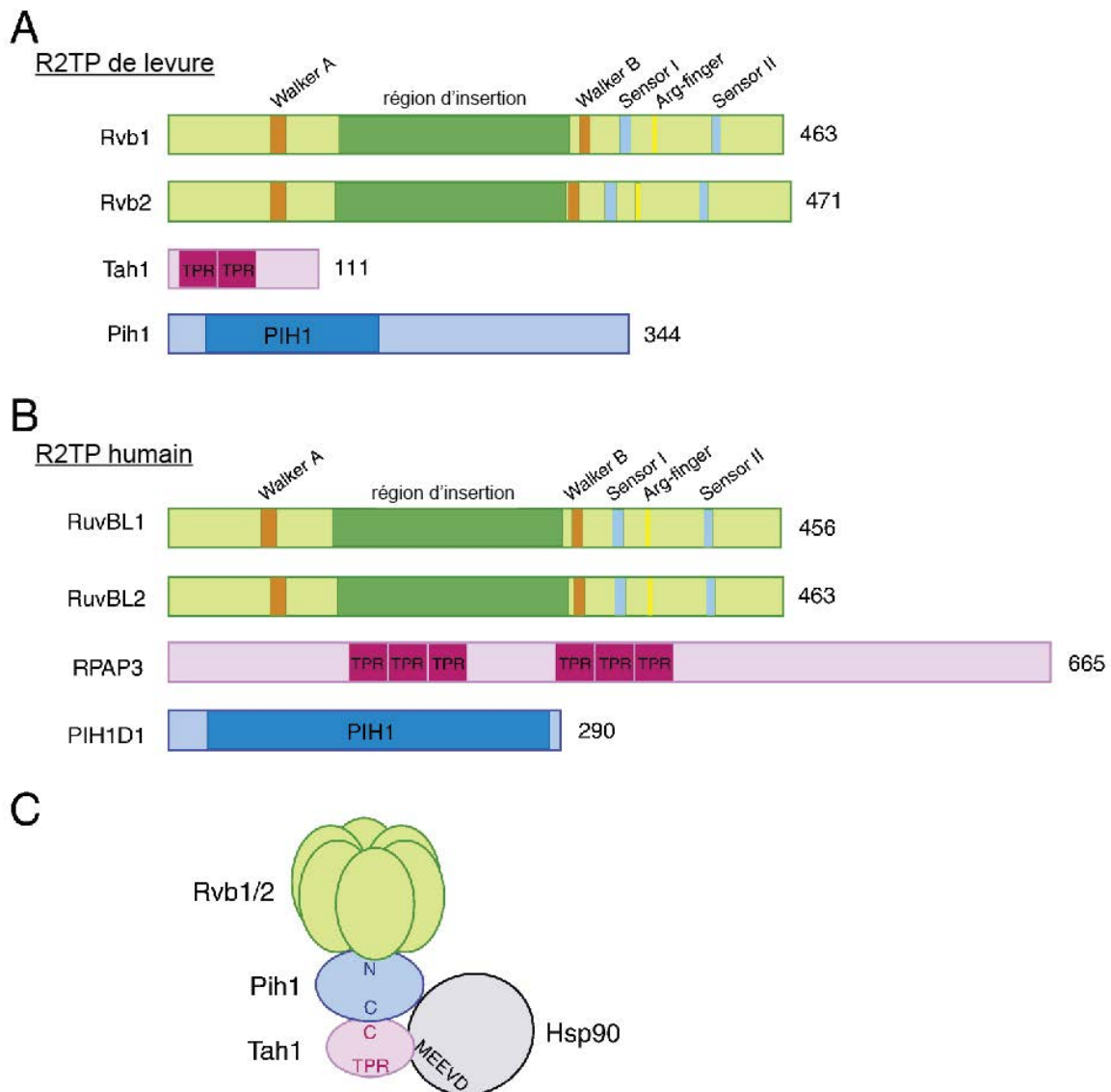


Figure 13 : Représentation schématique du complexe R2TP. (A) Protéines du R2TP chez la levure: Rvb1, Rvb2, Tah1, et Pih1. **(B)** Protéines du R2TP humain: RuvBL1, RuvBL2, RPAP3, et PIH1D1. Les protéines de levure Rvb1/Rvb2 et humaines RuvBL1/RuvBL2 contiennent les motifs conservés: Walker A, le domaine d'insertion, de liaison à l'ADN/ARN, les motifs Walker B, sensor 1, le doigt d'arginine, et sensor 2. Tah1 de levure et RPAP3 humaine contiennent les motifs TPR. Pih1 de levure et PIH1D1 humain contiennent le domaine PIH1. L'arrangement des domaines des protéines Rvb1, Rvb2, RuvBL1, et RuvBL2 est basé sur les structures cristallographiques de RuvBL1 (Matias et al., 2006). L'arrangement des domaines de Tah1 et RPAP3 est basé sur les données SMART - Simple modular architecture research tool (Letunic et al., 2009). L'arrangement des domaines de Pih1 et PIH1D1 est réalisé d'après les données CDD (Conserved Domain Database de NCBI, (Marchler-Bauer et al., 2011)). **(C)** Modèle du complexe R2TP de levure. Adapté de Kakiyama et al., 2011.

L'implication du R2TP dans l'assemblage de divers complexes semble être due en partie à Pih1p et Tah1p, qui servent de protéines adaptateurs/recruteurs. Par exemple, l'assemblage cytoplasmique du complexe ARN Pol II humain implique une co-chaperonne, le complexe Préfoldine-like. Le complexe Préfoldine et le complexe ARN Pol II sont recrutés par le complexe R2TP (Cloutier et al., 2009) par le biais de Tah1p qui interagit directement avec Rpb1p (la plus grande sous-unité de l'ARN Pol II). Ainsi, les complexes R2TP et préfoldine-like sont recrutés ensemble pour faciliter l'assemblage du complexe ARN Pol II (Boulon *et al.*, 2010). Des exemples similaires illustrent une fonction adaptateur/recruteur de Pih1p pour recruter la chaperonne Hsp90 au niveau d'autres macrocomplexes. Par exemple les snoRNP à boîtes C/D de levure par l'intermédiaire d'une interaction entre Pih1p et Nop58p, et l'activation de la voie de signalisation PIKK par le recrutement de Hsp90 à PIKK via une interaction entre Pih1p et la sous-unité de PIKK, la protéine Tel2 (Lakshminarasimhan et al., 2016; Pal et al., 2014; von Morgen *et al.*, 2015).

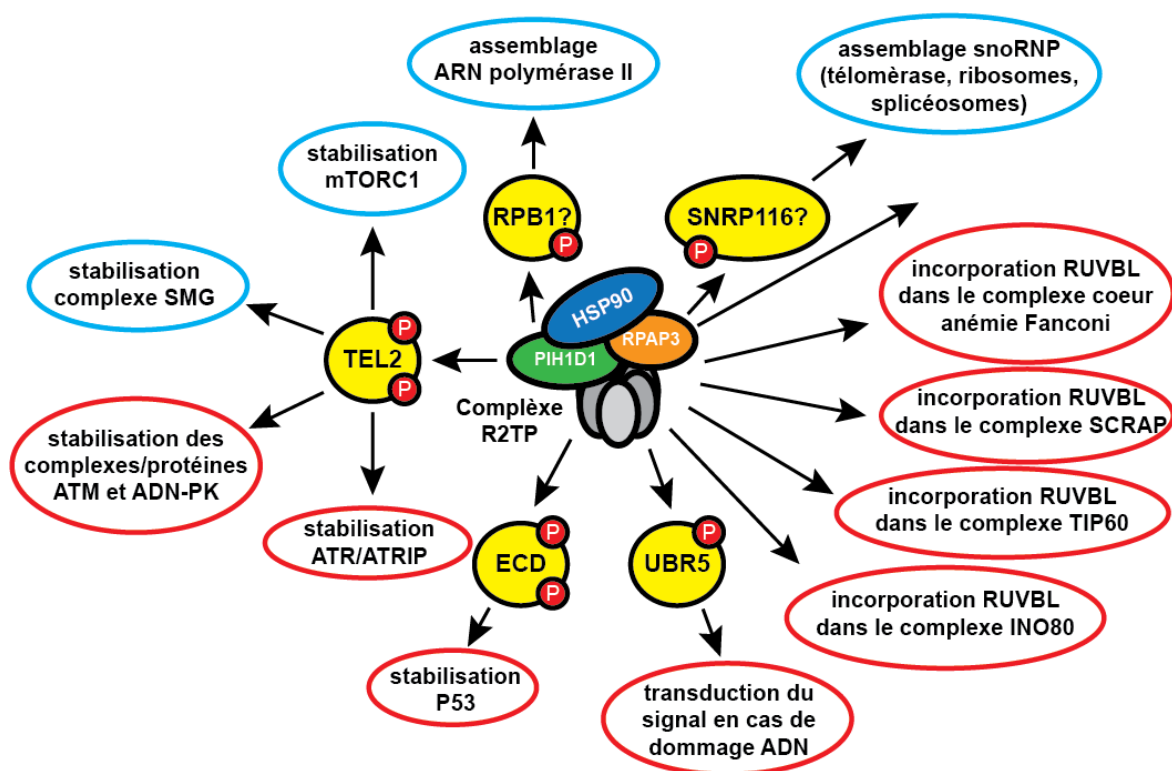


Figure 14 : Fonctions potentielles du complexe R2TP humain. Les fonctions connues sont indiquées en bleu et celles inconnues en rouge. La stabilisation du complexe SMG1 et mTOR par le complexe R2TP nécessite l'interaction du domaine PIH1-N à TEL2. D'autres protéines potentielles de liaison au domaine PIH1-N sont indiquées, mais leur rôle dans le fonctionnement du complexe R2TP reste à être élucidé. Adapté de von Morgen et al., 2015.

3.3.1.2.2 Les protéines Rvb1/TIP49 (RuvBL1) et Rvb2/TIP48 (RuvBL2)

Les gènes codant Rvb1p et Rvb2p (dénomination chez la levure; TIP49/TIP48 ou RuvBL1/ RuvBL2 ou Pontin/Reptin chez les métazoaires) sont essentiels pour la viabilité dans tous les organismes modèles examinés jusqu'à présent, y compris *S. cerevisiae* (Qiu et al., 1998), *Drosophila melanogaster* (Bauer et al., 2000) et *Caenorhabditis elegans* (Matias et al., 2006). Dans la suite du manuscrit, Rvb1/2 feront référence aux protéines de levure et RuvBL1/2 aux protéines humaines.

Depuis leur découverte, les Rvb1/2/RuvBL1/2 ont été trouvées associées à de nombreuses voies cellulaires (Jha and Dutta, 2009), y compris le remodelage de la chromatine (Choi et al., 2009; Jonsson et al., 2001; Shen et al., 2000), la régulation de la transcription (Jonsson et al., 2001; Ohdate et al., 2003), la biogenèse des complexes ribonucléoprotéiques (Izumi et al., 2010; McKeegan et al., 2007), l'assemblage mitotique (Ducat et al., 2008; Gartner et al., 2003), l'assemblage du complexe télomérase (Venteicher et al., 2008), l'assemblage des ARN polymérases nucléaires (Boulon et al., 2008; Forget et al., 2010), la réponse aux dommages de l'ADN et l'apoptose (via les complexes de remodelage de la chromatine SWR1, INO80 et TIP60), le développement cellulaire, l'apparition des métastases dans le cancer et la voie de signalisation PIKK (Izumi et al., 2010) (**Figure 15**).

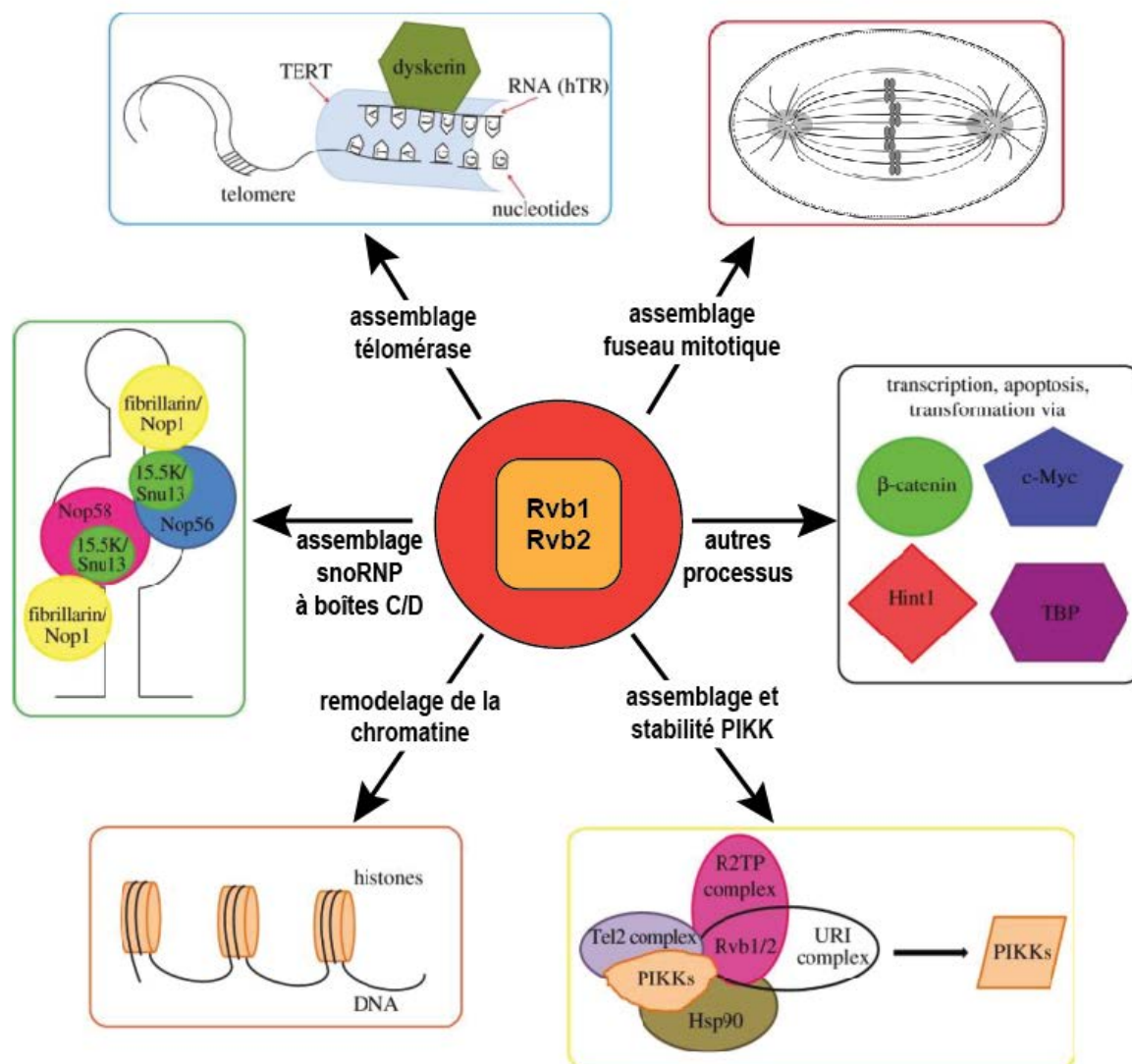


Figure 15 : Fonctions des Rvb1/2. Rvb1 et Rvb2 fonctionnent dans l'assemblage des complexes/processus cellulaires multiples. Elles sont impliquées dans l'assemblage du fuseau mitotique, du complexe télomérage, des snoRNP à boîtes C/D, des complexes de remodelage de la chromatine et des PIKK. Elles réalisent aussi d'autres fonctions dans divers processus, comme la transcription ou l'apoptose, par interaction avec des facteurs comme la β -caténine, c-Myc, Hint1 ou TBP. TERT, télomérage reverse transcriptase. Adapté de Nano et al., 2013.

Rvb1p/RuvBL1 et Rvb2p/RuvBL2 sont membres de la superfamille des AAA+ (adénosine triphosphatase associée à des activités cellulaires diverses) possédant à la fois des activités ATPase et potentiellement hélicase (Gribun et al., 2008). Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence d'un domaine AAA+ contenant les motifs Walker A et B, deux domaines sensor 1 et 2 et un doigt d'arginines (**Figure 16**) (Jha and Dutta, 2009; Neuwald et al., 1999; Patel and Latterich, 1998). Le motif Walker A lie l'ATP qui est ensuite hydrolysée par le motif Walker B, l'ensemble des deux motifs Walker fournissant ainsi une activité ATPase. Les domaines sensor détectent si de l'ATP ou de l'ADP est associée à la protéine. Quant au doigt d'arginines, il connecte les sous-unités dans les structures hexamériques, le motif d'une sous-unité interagissant avec l'ATP liée à la sous-unité adjacente (Guenther et al., 1997; Matias *et al.*, 2006; Ogura et al., 2004). Rvb1p et Rvb2p sont similaires en termes de séquence et de structure chez diverses espèces et leurs gènes sont essentiels pour la survie des cellules (Qiu *et al.*, 1998; von Morgen et al., 2015), ce qui n'est pas surprenant, vu qu'elles sont impliquées dans plusieurs processus biologiques allant de l'assemblage des complexes macromoléculaires (avec ou sans l'implication de Pih1p et Tah1p), le remodelage de la chromatine et la régulation de la transcription des gènes (Jonsson *et al.*, 2001; Nano and Houry, 2013).

RuvBL1 a été découverte en 1997 au sein d'un complexe avec la TATA-binding protein (TBP) chez le rat (Kanemaki et al., 1997). RuvBL1 et RuvBL2 ont été retrouvées présentes dans un complexe avec l'holoenzyme ARN polymérase II en 1998 (Qiu *et al.*, 1998) et, par la suite, RuvBL2 a été identifiée comme partenaire d'interaction de RuvBL1 dans des cellules humaines (Kanemaki et al., 1999). Ces protéines partagent une similarité de séquence limitée (env. 30%) avec l'hélicase bactérienne RuvB (Yamada et al., 2001). La protéine RuvB participe à la recombinaison homologue et la réparation de l'ADN, en entraînant la migration des brins d'ADN et la résolution des jonctions de Holliday dans un complexe avec RuvA et RuvC (Tsaneva et al., 1993). Il a été observé que la suppression des gènes *RVB1* et *RVB2* chez *S. cerevisiae* peut être complémentée par la surexpression du complexe RuvAB bactérien (Radovic et al., 2007). Ces données et la similitude entre les séquences a conduit à proposer que Rvb1/2 / RuvBL1/2 peuvent avoir une activité d'hélicase en utilisant la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Toutefois, cette activité hélicase n'est pas clairement démontrée, les protéines purifiées présentent en effet une très faible activité hélicase (Gribun *et al.*, 2008; Kanemaki *et al.*, 1999).

3.3.1.2.2.1 Structure

Les structures cristallines de RuvBL1 ont révélé trois sous-domaines structuraux : les domaines N terminal (domaine I) et C terminal (domaine III) qui forment le domaine AAA+, et un domaine central flexible, inséré dans le domaine I (appelé aussi domaine d'insertion) (domaine II). Le domaine I (DI) contient les motifs Walker A et B, le motif doigt d'arginines et le motif sensor I, tandis que le domaine III (DIII) contient le motif sensor II. Ensemble, ces deux domaines forment le noyau AAA+ et sont suffisants pour former des anneaux hexamériques (Gorynia et al., 2011). Le doigt d'arginines d'une sous-unité s'étend vers le site ATP-ase de la sous-unité adjacente, ce qui assure la coordination de l'hydrolyse de l'ATP entre les sous-unités du hexamère (Nano and Houry, 2013). Le domaine II (DII) correspond à une insertion de 160-170 acides aminés situés dans le domaine DI entre les motifs Walker A et B qui est unique aux Rvb1p/RuvBL1) et Rvb2p/RuvBL2 en comparaison des autres membres de la famille AAA+ (Matias *et al.*, 2006). DII, situé à l'extérieur du noyau de la protéine, adopte une conformation favorable à la liaison des nucléotides (OB-fold, oligonucleotide-binding fold), qui s'associent au noyau AAA+ par un élément de liaison souple formé de deux brins β antiparallèles (Petukhov et al., 2012). Le domaine DII est impliqué dans la liaison de l'ADN ou de l'ARN (Matias *et al.*, 2006), potentiellement dans la régulation de l'activité hélicase (Matias *et al.*, 2006; Niewiarowski et al., 2010; Petukhov *et al.*, 2012), dans les interactions protéine-protéine et dans l'assemblage en une structure dodécamérique (Lopez-Perrote et al., 2012; Matias *et al.*, 2006; Niewiarowski *et al.*, 2010). La suppression de DII augmente l'activité ATPase et hélicase, ce qui indique une fonction d'auto-inhibition de ce domaine (Petukhov *et al.*, 2012). Dans cette étude l'activité hélicase a été mesurée à partir de duplexes ADN en double brin et d'hybrides ARN/ADN avec un des brins radiomarqués et incubés avec Rbv1, Rvb2 ou Rvb1/2 en présence ou en absence d'ATP. La capacité des protéines à libérer la sonde a été évaluée sur gels natifs (TAE-PAGE) à différents moments (Petukhov *et al.*, 2012).

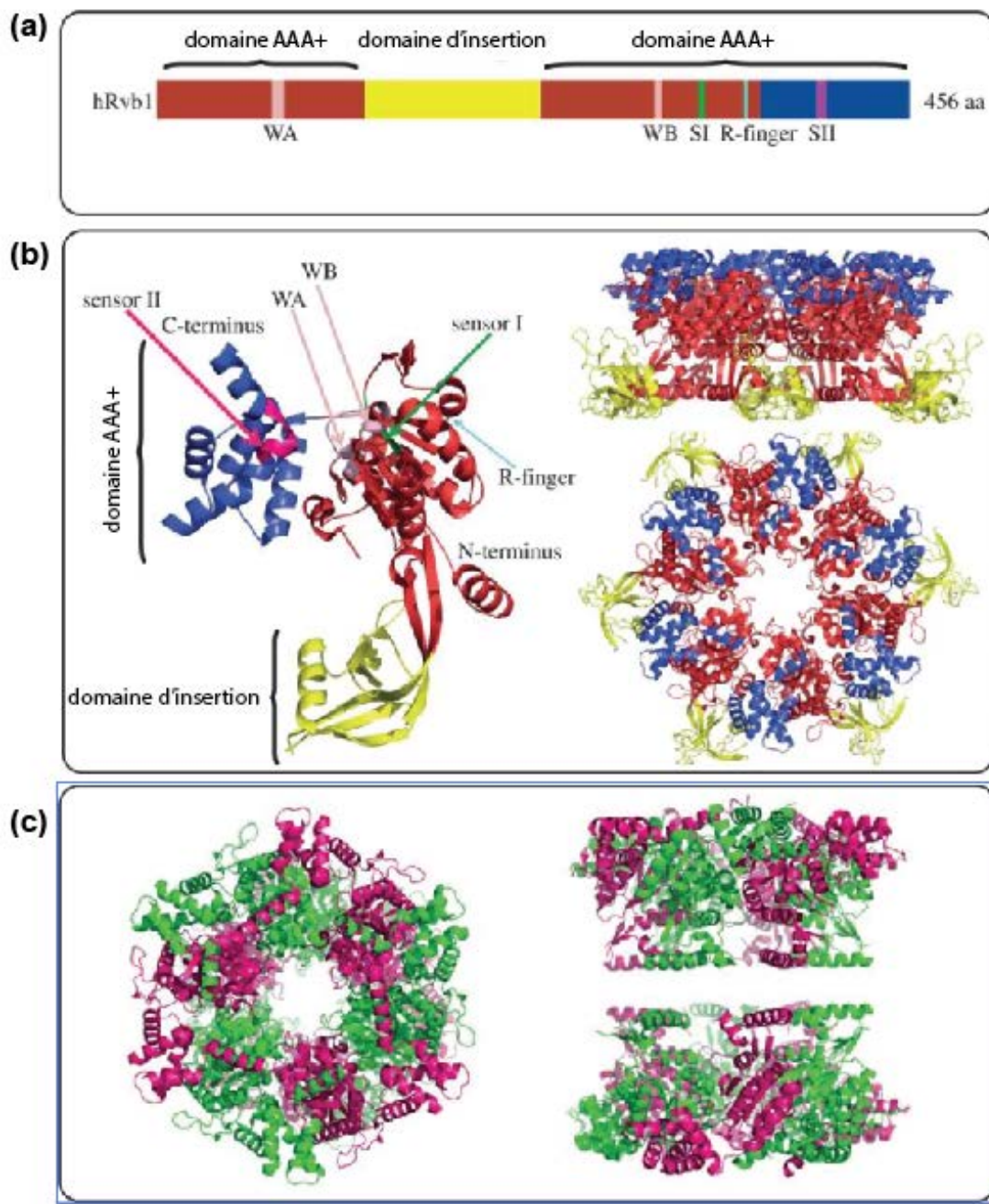


Figure 16 : Structure 3D des protéines Rvb1/2. (a) Organisation en domaines de la protéine Rvb1 humaine. En rouge est représenté le sous-domaine $\alpha\beta\alpha$ N-terminal et en bleu le sous-domaine α C-terminal du domaine AAA+, en jaune le domaine d'insertion. Les motifs conservés avec le domaine AAA+ sont aussi représentés: WA, Walker A; WB, Walker B; SI, Sensor I; SII, sensor II; R-finger, doigt d'arginine. (b) A gauche: structure cristalline d'un monomère de Rvb1 humaine. A droite: vue latérale et horizontale d'un hexamère formé par des monomères de Rvb1 humaine. Le code couleur est le même que dans la Figure (a). (c) Vue horizontale et latérale de la structure cristalline d'un complexe dodécamérique formé par Rvb1/2 humaines, avec une délétion partielle du domaine II. Les monomères humains de Rvb1 sont colorés en vert, et ceux de Rvb2 en rose. Adapté de Nano et al., 2013.

3.3.1.2.2.2 Organisation en structures hexamériques et dodécamériques

Les ATPases AAA+ constituent souvent des hexamères (Smith *et al.*, 2006) et en conséquence, Rvb1/RuvBL1 et Rvb2/RuvBL2 peuvent former des homo- ou hétéro-hexamères et/ou des structures doubles-hexamériques - des dodécamères.

RUVBL1/2 ont été associées à des maladies humaines et leur gènes sont surexprimés dans les poumons, le foie et le côlon de patients atteints de cancers (Nano and Houry, 2013). Les deux protéines forment des oligomères d'ordre supérieur, soit homogènes ou hétérogènes, qui peuvent influencer leur activité, leur fonction et l'association avec d'autres complexes protéiques (Jeganathan *et al.*, 2015; Lakomek *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2013; Tosi *et al.*, 2013). Des études de microscopie électronique sur SWR1 indiquent que Rvb1p et Rvb2p existent sous forme hétérohexamérique (Lakomek *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2015); des formes en anneaux hétérohéxameriques et dodécamériques ont été observés dans le complexe Ino80 (Lakomek *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2013; Tosi *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2015). L'oligomérisation de Rvb1/2/RuvBL1/2 dans plusieurs complexes est un champ intensément étudié, et il est de plus en plus évident que l'organisation moléculaire de ces protéines est complexe et variable en fonction des espèces.

La structure cristalline d'un mono-hexamère de RuvBL1 a révélé la liaison forte d'un ADP avec le domaine AAA+, ce qui pourrait expliquer sa très faible activité ATPase et indiquant que le mono-hexamère n'est peut-être pas la structure physiologiquement active (Matias *et al.*, 2006). Rvb1p et Rvb2p de levures incubées ensemble forment un cycle hexamérique, qui a pu être observé par microscopie électronique. Ensemble, ces protéines ont une activité ATPase et hélicase plus élevée par rapport aux protéines séparées (Gribun *et al.*, 2008). Dans cette étude, l'activité hélicase a été mesurée à partir d'une sonde ADN radiomarquée hybridée sur un plasmide simple brin et incubée avec Rbv1, Rvb2 ou Rvb1/2 en présence ou en absence d'ATP. La capacité des protéines à libérer la sonde a été évaluée sur gels d'électrophorèse natifs (TAE-PAGE) à différents temps de la réaction. De plus, dans ces conditions, Rvb1/2p se sont montrées inefficaces pour libérer une sonde plus longue, de 28 nt, ce qui suggère qu'individuellement, ces facteurs ont une capacité limitée d'activité hélicase, et que le complexe Rvb1/2 est probablement celui qui est le plus efficace en conditions physiologiques (Gribun *et al.*, 2008).

De nombreuses études montrent également la formation d'un dodécamère, comprenant à la fois RuvBL1 et RuvBL2 (Gorynia *et al.*, 2011; Niewiarowski *et al.*, 2010; Puri *et al.*, 2007; Torreira *et al.*, 2008). Un marquage avec des anticorps anti-Rvb2p chez la levure a révélé que seulement l'un des deux anneaux contenait cette protéine, plaidant pour

la formation de deux hexamères homogènes (Torreira *et al.*, 2008). La structure cristalline et une analyse par spectrométrie de masse du complexe RuvBL1/2 humain montre la formation d'un dodécamère composé de deux hexamères hétérogènes (Gorynia *et al.*, 2011; Niewiarowski *et al.*, 2010). Dans le complexe dodécamérique, l'activité ATPase des deux protéines est nécessaire pour catalyser l'hydrolyse de l'ATP (Puri *et al.*, 2007) et en fonction de l'arrangement du domaine d'insertion, les complexes RuvBL1/2 prennent une forme plus comprimée ou plus relaxée (Lopez-Perrote *et al.*, 2012).

De manière intéressante, des hexamères avec une stœchiométrie différente d'un rapport RuvBL1/2 de 3:3 ont également été détectés (Niewiarowski *et al.*, 2010). Les différentes conformations pourraient représenter la diversité des fonctions que ces protéines jouent *in vivo*: une conformation pourrait être importante pour l'activité hélicase, tandis qu'une autre peut être impliquée dans l'assemblage des complexes protéiques (Torreira *et al.*, 2008). En outre, les effets indépendants et parfois même opposés des RuvBL1/2 sur la transcription suggèrent que les ATPases peuvent agir indépendamment les unes des autres (Gallant, 2007); pour revue von Morgen *et al.*, 2015.

Les différents états oligomériques du complexe Rvb1/2/RuvBL1/2 ont fait l'objet de nombreuses études structurales (Gorynia *et al.*, 2011; Lopez-Perrote *et al.*, 2012; Gribun *et al.*, 2008). La structure de RuvBL1 humaine (Matias *et al.*, 2006) et une version tronquée de RuvBL2 sans le domaine DII (Petukhov *et al.*, 2012) ont révélé des arrangements homo-hexamériques similaires. Le domaine DII était également absent dans la structure cristalline du complexe humain RuvBL1/2 (Gorynia *et al.*, 2011), qui montre un arrangement dodécamériques des deux anneaux hétérohexamériques empilés les uns sur les autres. Les complexes dodécamériques présentent des interactions entre les anneaux hexamériques qui sont médiées par les domaines DII (Cheung *et al.*, 2010; Lopez-Perrote *et al.*, 2012; Torreira *et al.*, 2008).

3.3.1.2.2.3 Fonctions

Les différentes activités du complexe Rvb1/2/RuvBL1/2 ne sont pas seulement régulées par des cofacteurs, mais aussi en fonction de leurs divers états d'assemblage. Le complexe INO80 contient des dodécamères Rvb1/2 en tant que modules interagissant avec le nucléosome (Tosi *et al.*, 2013). Le complexe SWR1, qui effectue la réaction inverse, ne contient qu'un seul hétéro-hexamère Rvb1/2 (Nguyen *et al.*, 2013). La plasticité structurale du complexe Rvb1/2 semble être en corrélation avec ses diverses activités. Son activité ATPase est augmentée dans les dodécamères Rvb1/2 (Niewiarowski *et al.*, 2010), tandis que son activité hélicase semble augmenter lors de la suppression des domaines DII dans

les dodécamères (Gorynia *et al.*, 2011). En outre, l'association aux nucléosomes a été montrée pour des homo-hexamères de Rvb1 et Rvb2 (Queval *et al.*, 2014), et aussi pour des dodécamères Rvb1/2 dans le complexe INO80, mais pas pour les dodécamères isolés (Silva-Martin *et al.*, 2016; Tosi *et al.*, 2013).

Bien que les données *in vitro* pour les protéines humaines RuvBL1/2 ne montrent aucune ou tout au mieux une activité ATPase limitée (Grigoletto *et al.*, 2011), certaines fonctions *in vivo* sont altérées après la mutation des motifs Walker A ou B: par exemple, des mutations délétères de l'activité ATPase chez la levure ont comme conséquence des défauts de croissance graves, et l'inactivation de l'activité de RuvBL1/2 de mammifères diminue l'activation de la voie mTOR et la stabilité du composant TERC du complexe télomérase (Kim *et al.*, 2013; Venteicher *et al.*, 2008). Il est donc très probable que l'activité ATPase de RuvBL1/2 soit importante pour au moins une partie de leurs fonctions et qu'elles pourraient avoir besoin d'autres protéines, absentes dans les essais *in vitro*, qui favorisent l'activité ATPase. Comme nous l'avons déjà mentionné, les protéines purifiées présentent également une activité hélicase faible (Huen *et al.*, 2010).

Il est également intéressant de mentionner que Rvb1/2p ne peuvent se compléter mutuellement et ont des polarités de déplacement d'un brin d'ADN opposées : Rvb1p déplace l'ADN de 3' vers 5' (Makino *et al.*, 1999), tandis que Rvb2p le déplace de 5' vers 3' (Kanemaki *et al.*, 1999), ce qui peut entraîner des différences dans leur association avec d'autres protéines (Lakshminarasimhan *et al.*, 2016).

3.3.1.2.2.1 Les protéines Rvb1/2/RuvBL1/2 comme chaperonnes

Plusieurs études ont démontré un rôle des Rvb1/2 dans l'assemblage de nombreux complexes dans différents organismes suggérant qu'elles pourraient avoir une activité de chaperonnes. La faible abondance de Rvb1p et Rvb2 dans les cellules par rapport à d'autres composants de plusieurs complexes dont elles font partie suggère que les Rvb1/2 ne sont associées que transitoirement avec chaque complexe, offrant ainsi un argument pour une activité générale de chaperonne des Rvb1/2 / RuvBL1/2 plutôt qu'une activité catalytique définie dans chaque complexe (Gallant, 2007).

Complexe cible	Fonction		Interaction directe	
	Complexe cible	Complexe R2TP	Composant du R2TP	Composant du complexe cible
Confirmé				
ARN polymérase II	Transcription	Assemblage	?	?
snoRNP	Biogenèse des ribosomes, spliceosomes, et télomérase			
snoRNP à boîtes C/D	2'-O-méthylation du pré-ARN	Assemblage	PIH1D1?	NOP58?
snoRNP à boîtes H/ACA	Pseudouridylation du pré-rARN	Assemblage	PIH1D1?	NAP57?
SMG1	Nonsense mediated mARN decay	Assemblage	PIH1D1	TEL2
mTORC1	Régulateur central du métabolisme cellulaire	Assemblage	PIH1D1	TEL2
ATM/ATR/DNA-PK	Kinases impliquées dans la signalisation des dommages ADN	Possible assemblage	PIH1D1	TEL2
Potentiel				
ECD/p53	Facteur de transcription impliqué dans la réponse aux dommages ADN	Possible assemblage	PIH1D1	ECD
UBR5	E3 ubiquitine ligase impliquée dans la signalisation des dommages ADN	?	PIH1D1	UBR5
INO80	Complexe de remodelage de la chromatine, impliqué dans les réparations de l'ADN avec des coupures double brin	Possible chargement des RUVBL1/2	?	?, RUVBL1/2
TIP 60	Complexe de remodelage de la chromatine avec une activité acétyltransférase importante pour la réponse aux dommages ADN	Possible chargement des RUVBL1/2	?	?, RUVBL1/2
SWI/SCRAP	Complexe de remodelage de la chromatine, impliqué dans la signalisation des dommages ADN	Possible chargement des RUVBL1/2	?	?, RUVBL1/2
Fanconi anemia core complex	Reconnaissance et réparation des crosslinks ADN	Possible chargement des RUVBL1/2	?	?, RUVBL1/2

Tableau 9: Cibles potentielles et confirmées du complexe R2TP - d'après von Morgen *et al.*, 2015

3.3.1.2.3 La protéine Pih1 (Nop17p/NOP17)

Les protéines Pih1 et Tah1 (PIH1D1 et respectivement RPAP3 chez l'homme) sont des sous-unités spécifiques et exclusives du complexe R2TP. Pih1p (initialement connue sous le nom de Nop17/NOP17) est une protéine de ~40 kDa instable, stabilisée par l'interaction avec Tah1p (Paci et al., 2012). Pih1p est principalement localisée dans le nucléole et contient un domaine Pih à son extrémité N-terminale, deux régions IDR (régions désordonnées intrinsèquement) et une région C-terminale, qui est très sensible à la dégradation. Des analyses bio-informatiques et des études mutationnelles (Paci *et al.*, 2012) ont montré que la région IDR1 de Pih1p est largement responsable de l'interaction avec Rvb1/2 et que la région IDR2 et la partie C-terminale sont nécessaires pour la liaison à Tah1p (Lakshminarasimhan *et al.*, 2016).

Chez la levure, Pih1p joue un rôle central au sein du complexe R2TP vu qu'elle lie directement les autres composants du complexe (Kakihara and Houry, 2012). Il a été proposé que Hsp90 et Tah1p stabilisent Pih1p (Paci *et al.*, 2012). Comme Tah1p, Pih1p interagit avec Hsp90, bien que l'interaction soit relativement faible, et le domaine C-terminal de Pih1p interagit avec le domaine C-terminal de Tah1p (Back et al., 2013; Eckert et al., 2010; Paci *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2014). De plus, Pih1p interagit avec Rvb1p et Rvb2p par son domaine intermédiaire. Chez les mammifères, RPAP3 et Hsp90 agissent également ensemble pour stabiliser PIH1D1 et éventuellement PIH1D1 relie les composants du complexe R2TP (Paci *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2008). Alors que le domaine intermédiaire n'est pas présent chez PIH1D1 des mammifères, la partie C-terminale (acides aminés 250-290) porte l'interaction avec le reste du complexe R2TP, même s'il n'est pas clairement établi lequel des composants de R2TP interagit directement avec la partie C-terminale de Pih1p (Horejsi et al., 2014).

Deux articles récemment publiés ont identifié le domaine de liaison phospho-peptide de PIH1D1 (domaine PIH-N), qui est distinct de tout autre domaine phospho-peptide connus jusqu'à présent. Le domaine est capable de lier indépendamment du reste du complexe le partenaire d'interaction de PIH1D1, la protéine TEL2. Les structures des domaines PIH-N chez la souris et chez l'humain sont très similaires. Les deux études ont identifié un motif commun dans le domaine N-terminal de PIH1D1, qui est responsable de la liaison à TEL2, qui contient une séquence acide DpSDD phosphorylée au niveau du résidu sérine. La structure du complexe formé entre PIH1D1 humaine et un peptide phosphorylé de TEL2 ont révélé la formation de liaisons hydrogène avec la lysine 57, la lysine 64 et l'arginine 168 de PIH1D1 (résidus 57, 64 et 133 chez la souris) et la sérine phosphorylée et l'aspartate du motif DpSDD. Les mutations de ces résidus dans PIH1D1 inactivent l'interaction avec TEL2

in vivo (Horejsi *et al.*, 2014; Pal *et al.*, 2014). Le domaine PIH-N interagit directement d'une manière dépendante de la phosphorylation avec des partenaires nouveaux interagissant avec PIH1D1: ECD, SNRP116 et UBR5. Des données de spectrométrie de masse suggèrent également que l'interaction entre PIH1D1 et la sous-unité principale de l'ARN polymérase II, RPB1, dépend de la phosphorylation de la lysine 64. Néanmoins, il n'est pas clair si l'interaction avec RPB1 est directe ou médiée par un autre facteur (Horejsi *et al.*, 2014). Ces données indiquent que le domaine N-PIH reconnaît et recrute des substrats spécifiques au R2TP lors de l'assemblage des complexes PIKK, snoRNP et l'ARN polymérase II et, éventuellement, d'autres complexes.

Un domaine de liaison similaire au PIH-N est probablement aussi présent dans l'orthologue de PIH1D1 - la protéine Kintoun, qui est impliquée dans l'assemblage cytoplasmique des dynéines, nécessaires pour la motilité des cils (Omran *et al.*, 2008). Les lysines chargées positivement qui sont importantes pour la liaison au domaine PIH-N sont substituées par des arginines chargées positivement dans Kintoun qui est capable d'interagir avec TEL2 phosphorylée mais avec une affinité faible (Horejsi *et al.*, 2014; Pal *et al.*, 2014). Etant donné que Kintoun interagit avec DYX1C1, une protéine contenant un domaine TPR impliqué dans l'assemblage de la dynéine, il pourrait fonctionner en tant que co-chaperonne d'une manière similaire à celle de PIH1D1 dans le complexe R2TP (Tarkar *et al.*, 2013).

3.3.1.2.4 La protéine Tah1/RPAP3

Tah1 (RPAP3 ou hSpagh dans les humains) est l'élément le plus petit du complexe R2TP d'une taille de 111 acides aminés. Comme nous l'avons déjà évoqué, cette protéine connecte Pih1p à la chaperonne Hsp90. Chez la levure, le domaine C-terminal déplié (aa 93-111) de Tah1p interagit avec le domaine C-terminal de Pih1p (Back *et al.*, 2013; Lakshminarasimhan *et al.*, 2016). Tah1p peut stabiliser Pih1p en l'absence de l'activité de la chaperonne Hsp82p pendant la phase stationnaire de croissance, et par conséquent l'interaction Tah1p:Pih1p est suffisante pour assurer la stabilité de Pih1p (Quintern *et al.*, 2015). Elle porte également un domaine tétratricopeptide (TPR) (Millson *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005) qui est responsable de la liaison à l'extrémité C-terminale de Hsp90 (motif MEEVD) (Back *et al.*, 2013).

Les domaines TPR sont connus pour faciliter les interactions avec les chaperonnes Hsp70 ou Hsp90 et sont impliqués dans d'autres interactions protéine-protéine (Smith, 2004). Le domaine TPR de Tah1p est impliqué dans la liaison avec Hsp90(Hsp82p), mais pas avec Hsp70 dans les cellules en phase stationnaire de croissance et ce domaine n'est pas essentiel pour le recrutement de Hsp90(Hsp82p) au complexe R2TP (Millson *et al.*, 2008;

Zhao *et al.*, 2008). Alors que des mutations au niveau du domaine TPR de Tah1p diminuent l'interaction entre Tah1p et Hsp90(Hsp82p), elles n'ont pas d'incidence sur l'interaction entre Tah1p et Pih1p. Tah1p forme un dimère, qui se lie à chacun des monomères de Hsp90 présents dans le dimère Hsp90, en empêchant simultanément sa liaison à d'autres co-chaperonnes (Pal *et al.*, 2014).

L'homologue de RPAP3 chez la drosophile (Spagh) contient un domaine TPR qui interagit avec Hsp70 et avec Hsp90 et stimule leurs activités (Benbahouche Nel *et al.*, 2014). La présence de deux domaines TPR dans RPAP3 humaine et sa forte interaction avec chacune des chaperonnes Hsp90 et Hsp70 indiquent que RPAP3 couple le complexe R2TP à Hsp90 et peut-être avec d'autres chaperonnes (Chagot *et al.*, 2015; Smith, 2004). L'analyse cristallographique de RPAP3 montre une interaction entre les deux domaines TPR et des peptides de Hsp90 contenant la séquence conservée MEEVD. La suppression de l'interaction de RPAP3 avec Hsp90 nécessite des mutations dans les deux domaines TPR, ce qui suggère que le dimère de Hsp90 est lié par une molécule de RPAP3 (Pal *et al.*, 2014).

RPAP3 est exprimée sous trois isoformes. L'isoforme 1 (et éventuellement l'isoforme 3) coopère avec PIH1D1 et est nécessaire pour sa stabilisation. L'isoforme 2 ne dispose pas d'un codage en phase de l'exon pour les 34 acides aminés présents dans les deux autres isoformes, et de ce fait n'interagit pas avec PIH1D1. La partie C-terminale de RPAP3 interagit (indépendamment des domaines TPR) avec une sous-unité du complexe préfoldine-like WDR92 et peut donc servir de médiateur pour l'interaction entre R2TP et ce complexe (Back *et al.*, 2013; Itsuki *et al.*, 2008).

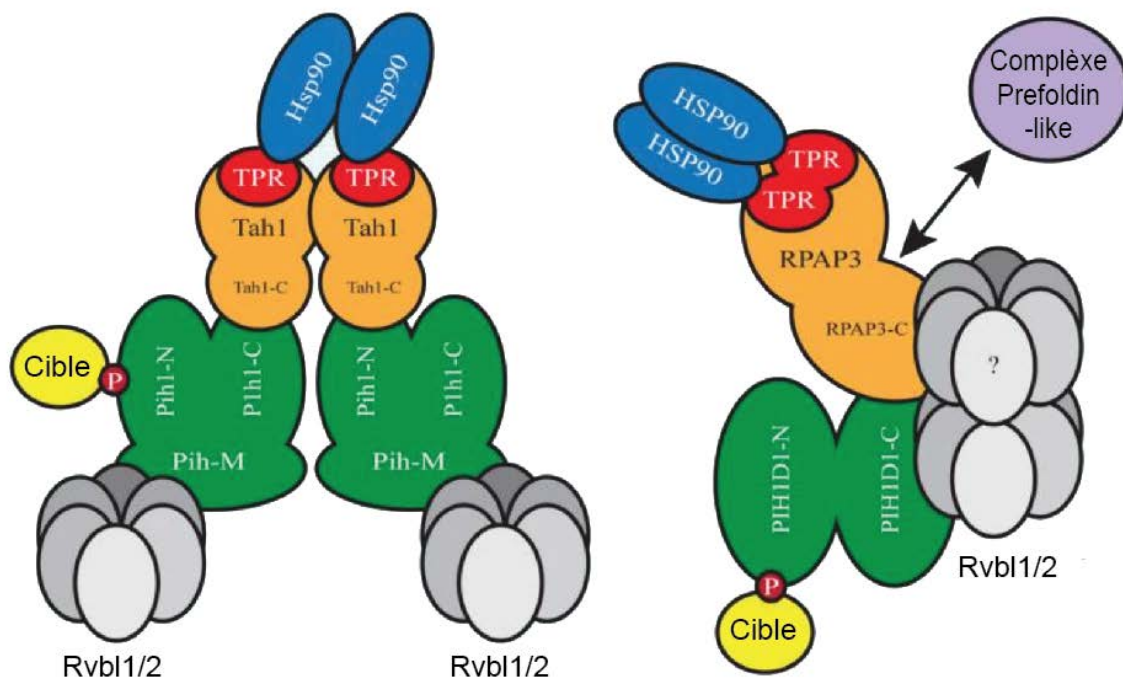


Figure 17 : Comparaison des complexes HSP90-R2TP de levure et de mammifères. Les protéines homologues entre levure et mammifères sont indiquées avec le même code couleur. N signifie le domaine N-terminal, C le domaine C-terminal et M le domaine intermédiaire d'une protéine. Tah1 de levure contient un seul domaine TPR et deux molécules de Tah1 sont nécessaires pour l'interaction avec le dimère HSP90. Tah1p interagit avec Pih1p, qui à son tour lie d'un côté les substrats de HSP90 avec son domaine N-terminal, et d'une autre part les protéines Rvb1/2 avec le domaine intermédiaire. Par comparaison, le complexe R2TP chez les mammifères interagit avec le dimère HSP90 avec une seule molécule de RPAP3, qui contient deux domaines TPR. Le domaine C-terminal de RPAP3 interagit de manière directe ou indirecte avec les autres composants du complexe (PIH1D1, RUVBL 1/2 et les composants du complexe prefoldin-like, absent dans le complexe R2TP de levure). Adapté de von Morgen et al., 2015

3.3.1.2.5 Fonctions du complexe R2TP

Le complexe R2TP est récemment devenu l'objet de nombreuses études, mais la fonction exacte est encore peu comprise et le mécanisme moléculaire de son action peu détaillé (von Morgen *et al.*, 2015). Il n'y a pas d'informations complètes disponibles sur les associations entre les membres de ce complexe et d'autres protéines cellulaires.

3.3.1.2.6 Rôle du complexe R2TP dans l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D

La réduction de l'expression de Tah1p chez la levure conduit à une diminution de la stabilité des snoRNA à boîtes C/D et cet effet est évident seulement dans les cellules en phase stationnaire de croissance, possiblement parce que Tah1p et Hsp90 sont nécessaires pour la stabilisation de Pih1p dans ces conditions (Zhao *et al.*, 2008). L'appauvrissement de Rvb2p et Pih1p conduit à un phénotype thermosensible et à une perturbation dans l'accumulation et la localisation des snoRNP à boîtes C/D et H/ACA (Boulon *et al.*, 2008; Newman *et al.*, 2000). Pih1p et Rvb1/2 interagissent avec Nop58p (Boulon *et al.*, 2008) et il a été montré que Pih1p lie directement la région C-terminale de Nop58p (Gonzales *et al.*, 2005), et que l'interaction est plus forte dans l'absence d'ARN. La fixation d'ADP, d'ATP et de l'analogue non hydrolysable ATP γ S par les Rvb1/2p, mais pas l'hydrolyse de l'ATP, conduit à la dissociation du complexe R2TP et libère également le complexe R2TP du domaine C-terminal de Nop58p. Étant donné que les motifs Walker A et Walker B de Rvb1/2p sont essentiels pour l'accumulation des snoRNA à boîtes C/D chez la levure, l'activité ATPase doit jouer un rôle à une étape autre que celles de l'assemblage des pré-snoRNP (Boulon *et al.*, 2008; McKeegan *et al.*, 2007).

Les protéines RuvBL1/2 de mammifères et tous les composants du complexe R2TP sont essentiels pour l'assemblage des snoRNA à boîtes C/D (Boulon *et al.*, 2008; Newman *et al.*, 2000). Les composants du complexe R2TP interviennent dès les étapes précoces de la biogenèse des snoRNP, lorsque des complexes de nature uniquement protéique sont pré-assemblés dans le cytoplasme. De même que la protéine Pih1 de levure, la protéine PIH1D1 humaine se lie à NOP58 et à NUFIP1. Une analyse protéomique récente a révélé que RuvBL1/2 sont des composants de pré-snoRNP à différents stades de maturation et sont libérées tardivement. PIH1D1 et RPAP3 ne sont pas présentes au niveau des pré-snoRNP, ce qui a conduit à proposer que PIH1D1 et RPAP3 pourraient charger les RuvBL1/2 de manière ATP dépendante aux premières étapes de formation des pré-snoRNP (sans l'implication de l'ARN), et ne pas participer aux étapes ultérieures de l'assemblage (Bizarro *et al.*, 2014).

Au moins deux facteurs d'assemblage - Shq1p/SHQ1 et Naf1p/NAF1 - sont importants pour la biogenèse des snoRNP à boîtes H/ACA (Machado-Pinilla *et al.*, 2012). Shq1p/SHQ1 se lie à la sous-unité catalytique Cbf5p/NAP57, et empêche la liaison de Cbf5p/NAP57 aux ARN (Grozdanov *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2002). En conséquence, la libération de SHQ1 de NAP57 est nécessaire pour l'assemblage des snoRNP à boîtes H/ACA sur les snoRNA H/ACA naissants. L'incubation en extraits cytosoliques de cellules HeLa a permis de supprimer l'interaction entre SHQ1 de NAP57 d'une manière ATP indépendante (Machado-Pinilla *et al.*, 2012). Le complexe R2TP apparaît contribuer à ce remodelage étant donné que la libération de SHQ1 du complexe a été inhibée en présence d'anticorps dirigés contre le complexe R2TP, mais pas par addition de Geldanamycine, un inhibiteur de Hsp90. NAP57 se lie directement à PIH1D1 *in vitro* et l'interaction de sa partie non structurée C-terminale avec RuvBL1/2 est essentielle pour sa désolidarisation de SHQ1 (Machado-Pinilla *et al.*, 2012). Ces expériences indiquent que le complexe R2TP intervient dans des étapes précoces de l'assemblage des snoRNP à boîtes H/ACA et est nécessaire pour l'élimination des inhibiteurs d'assemblage présents sur les précurseurs des snoRNP à boîtes H/ACA. NAP57 ne contient pas le motif DpSDD reconnu par le domaine N-terminal de PIH1D1, cependant il contient des séquences acides phosphorylés qui peuvent influencer l'interaction avec le domaine PIH-N. Étant donné que le complexe R2TP purifié a été incapable de libérer NAP57 de SHQ1, des facteurs supplémentaires peuvent être nécessaires pour cette réaction ou pour un assemblage correct du complexe R2TP lui-même (Machado-Pinilla *et al.*, 2012; von Morgen *et al.*, 2015).

3.3.1.2.7 Rôle du complexe R2TP dans l'assemblage de l'ARN polymérase II

Les cellules eucaryotes contiennent trois ARN polymérases différentes: (a) l'ARN polymérase I qui transcrit les ARN ribosomiques, (b) l'ARN polymérase II pour la transcription des ARNm, des U snARN Sm U1, U2, U4, U5, U7, LSm U11, U12, U4-atac et la plupart des miRNA et (c) l'ARN polymérase III qui produit une gamme de petits ARN, y compris les ARNt et les snRNA U6 et U6 atac.

L'ARN polymérase II est constituée de 12 sous-unités parmi lesquelles RPB1 et RPB2 forment le site actif, tandis que les autres sous-unités sont situées à la périphérie du complexe (Cramer *et al.*, 2008). Le complexe R2TP conjointement avec le complexe préfoldine-like interagit avec l'ARN polymérase II, et participe à son assemblage dans le cytoplasme et dans le transport de la polymérase assemblée vers le noyau. Une analyse quantitative par spectrométrie de masse a révélé que la polymérase est assemblée en plusieurs étapes, qui comprennent la formation de deux sous-complexes de l'ARN

polymérase II. Le complexe R2TP interagit préférentiellement avec RPB1 non-assemblée et avec des sous-complexes contenant RPB1. L'appauvrissement en RPAP3 et l'inhibition de HSP90 conduit à une déstabilisation du RPB1 dans le cytoplasme. Il est à noter que RPAP3 se lie également à la sous-unité RPB5 de l'ARN polymérase II indépendamment de RPB1 et est nécessaire pour son incorporation dans le complexe d'ARN polymérase. RPB5 interagit aussi avec URI, un composant du complexe préfoldine-like humain, également impliqué dans l'assemblage de l'ARN polymérase dans le cytoplasme (Miron-Garcia et al., 2013). Ainsi, le complexe préfoldine-like peut également être impliqué dans l'assemblage de RPB5 dans le complexe ARN polymérase II. Il est fortement possible que RPB1 soit recrutée au complexe R2TP par interaction directe ou indirecte avec le domaine PIH-N, car PIH1-N interagit avec RPB1 phosphorylée (Horejsi et al., 2014). RPB1 ne contient pas le motif DSDD, reconnu par le domaine PIH-N, mais il contient d'autres séquences acides phosphorylées par la Caséine Kinase 2 (CK2), qui pourraient interagir avec PIH-N. Sinon, l'interaction peut être médiée par un autre facteur de liaison au domaine PIH-N et à RPB1.

L'ARN polymérase I et III sont également des macrocomplexes. Vu que le complexe R2TP interagit avec plusieurs de leurs sous-unités, il est probable qu'il soit impliqué dans leur assemblage (Boulon et al., 2012; Jeronimo et al., 2007). En outre, PIH1D1 est directement impliqué dans la transcription des ARNr par l'ARN polymérase I (Zhai et al., 2012), dépendante de mTORC1.

Une étude récente par TAP-tag chez la levure (Lakshminarasimhan et al., 2016) basée sur une analyse protéomique par spectrométrie de masse des protéines co-purifiées avec les protéines Rvb1 ou Rvb2 fusionnées à l'étiquette TAP, montre que Rvb1/2p s'associent avec plusieurs complexes protéiques. Curieusement, l'analyse réalisée en utilisant des souches de levure dépourvues de Pih1p ou de Tah1p, indique que Rvb1/2p s'associent à Hsp90 et au complexe ARN Pol II. À l'appui de cette association indépendante de Pih1p et de Tah1p, des études *in vitro* suggèrent la formation d'interactions directes entre Rvb1/2p et Hsp90 ou entre Rvb1/2p et le complexe ARN Pol II. L'interaction entre Rvb1/2p et le complexe ARN Pol II / Hsp90 est renforcée en l'absence de Pih1p. L'analyse par ARN-Seq de ces souches n'exprimant plus Pih1p ou Tah1p a montré des liens inattendus avec des changements d'expression de gènes associés à la biogenèse des ribosomes, la biogenèse des complexes ribonucléoprotéiques, les stimuli abiotiques, et la réponse aux modifications de température (Lakshminarasimhan et al., 2016). Dans cette même étude, une analyse GO des 80 protéines présentant une expression modifiée indique que les complexes ribonucléoprotéiques représentent la catégorie la plus enrichie suggérant une fonction importante du complexe R2TP dans ce processus. Notamment, les protéines Nop1 et Nop56

co-purifient avec Rvb1/2p en l'absence de Pih1p et/ou Tah1p. De plus, en absence de Pih1p, les grandes sous-unités Rpb1p et Rpb2p du complexe ARN Pol II sont enrichies d'un facteur 10 dans les fractions co-purifiées avec Rvb1/2 (Lakshminarasimhan *et al.*, 2016).

3.3.1.2.8 Le complexe R2TP et cancer

Les membres du complexe R2TP sont surexprimés dans les cancers: les niveaux de PIH1D1 sont augmentés dans plusieurs lignées de cellules de cancer du sein (Kamano *et al.*, 2013), les RuvBL1/2 sont surexprimées dans les cancers du foie et du côlon (Grigoletto *et al.*, 2011; Jha and Dutta, 2009) et leur expression plus élevée dans les tissus cancéreux est positivement corrélée avec l'expression de gènes impliqués dans les processus métaboliques activés par la signalisation de mTOR (Kim *et al.*, 2013). Les taux de HSP90 sont augmentés aussi dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Calderwood *et al.*, 2006; Jegu *et al.*, 2013; Jeng *et al.*, 2015; Khajapeer and Baskaran, 2015) et son activité est essentielle pour le déroulement de divers processus dans les cellules cancéreuses. Il joue également un rôle clé dans la maturation conformationnelle des protéines de signalisation oncogéniques telles que HER-2/ERB2, Akt, Raf-1, Bcr-Abl, et p53 mutée. De nombreux médicaments agissant sur HSP90 sont actuellement utilisés ou testés pour le traitement du cancer (Khajapeer and Baskaran, 2015). HSP90 est devenue une cible antinéoplasique d'intérêt, et plusieurs molécules sont testées dans les différentes étapes des essais cliniques (Dong *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015; Neckers and Workman, 2012). L'inhibition de HSP90 révèle des effets significatifs *in vitro* dans différents types de cancers, comme le glioblastome, le cancer du poumon, et le cancer du pancréas (Choi *et al.*, 2014; Mayer *et al.*, 2012; Pillai and Ramalingam, 2014; Speranza *et al.*, 2016; Wachsberger *et al.*, 2014). L'inhibition ou l'épuisement des co-chaperonnes de HSP90 telles que p23, Cdc37 et Aha1 sensibilise en outre des cellules aux effets des médicaments ciblant HSP90 (Neckers and Workman, 2012). L'augmentation de l'activité de mTOR peut favoriser la croissance des tumeurs et les inhibiteurs de mTOR sont déjà utilisés en clinique (Fruman and Rommel, 2014). CK2 est essentielle pour la viabilité cellulaire et la progression du cycle cellulaire. Elle est nécessaire pour la tumorigenèse, mais le mécanisme précis n'est pas établi (Trembley *et al.*, 2010). Des sites phosphorylés par CK2 forment des motifs d'interaction protéine-protéine, critiques pour la régulation des voies de réponse aux dommages de l'ADN (Guerra *et al.*, 2014; Horejsi *et al.*, 2014; Yata *et al.*, 2012) et pour la reconnaissance des substrats spécifiques par le complexe R2TP. La pertinence de CK2 comme cible moléculaire dans le cancer a conduit au développement d'inhibiteurs des CK2 pour une utilisation clinique, qui sont puissants et hautement spécifiques et administrable par voie orale, avec une efficacité

anti-tumorale connue dans des modèles de xénogreffe du sein, du pancréas et de la prostate chez la souris (Cozza et al., 2013; Gyenis et al., 2013).

Le complexe R2TP reconnaît spécifiquement les sites phosphorylés par CK2 et fonctionne en association avec HSP90 pour assembler plusieurs complexes impliqués dans de nombreux processus cellulaires liés au cancer, ce qui en fait une cible prometteuse pour de nouveaux médicaments anticancéreux. Les cibles potentielles comprennent l'activité ATPase de RuvBL1/2 (Elkaim et al., 2012; Grigoletto et al., 2013) et des inhibiteurs de liaison au domaine PIH-N qui miment le motif DpSDD et devrait empêcher la fonction du R2TP. Les inhibiteurs du complexe R2TP pourraient être utiles dans un contexte clinique, soit pour stimuler l'effet des inhibiteurs de HSP90, CK2, ATM et ATR, afin de sensibiliser les cellules à un traitement du cancer basé sur l'induction de lésions de l'ADN (radiothérapie et certains types de chimiothérapie), ou comme alternative aux inhibiteurs de HSP90 (von Morgen *et al.*, 2015).

3.3.1.3 La protéine *Rsa1/NUFIP1*

Dans une étude visant à identifier des facteurs présentant des liens fonctionnels avec la protéine Dbp6, une hélicase d'ARN ATP-dépendante requise pour l'assemblage de la sous-unité ribosomique 60S chez *S. cerevisiae*, l'équipe de P. Linder avait trouvé la protéine YPL193W comme étant impliquée dans une phase nucléoplasmique tardive du processus d'assemblage de la sous-unité ribosomique 60S. L'équipe a alors proposé le nom de Rsa1p (Ribosome assembly 1) à cette ORF de fonction inconnue (Kressler et al., 1999). Cette protéine n'est pas essentielle à la viabilité cellulaire, mais sa délétion confère un défaut de croissance plus important à 37°C qu'à 30°C (Kressler *et al.*, 1999). Elle contient un motif de localisation nucléaire (NLS) potentiel dans sa partie C-terminale (acides aminés 363-PNYKNRK-369) et présente une localisation principalement nucléoplasmique (Kressler *et al.*, 1999) mais elle n'est pas présente au niveau du nucléole.

Dans une souche invalidée pour le gène *RSA1*, une réduction modérée du nombre de sous-unités 60S libres est observée mais des polysomes incomplets s'accumulent (Kressler *et al.*, 1999) et les taux d'ARNr 25S sont plus réduits. L'effet observé sur l'ARNr 25S n'est pas dû à une modification de sa stabilité, mais à une diminution de sa production. Ces effets sont plus évidents à 37°C et plus discrets à 30°C. De plus, la maturation de l'ARNr 18S semble elle aussi être affectée par l'absence de Rsa1p, car ses taux diminuent légèrement, en corrélation avec l'accumulation de l'intermédiaire de maturation 23S du pré-ARNr. Cette observation pouvait refléter l'effet d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif induit par le défaut de biogenèse de la sous-unité 60S (Kressler *et al.*, 1999). L'invalidation de *RSA1*

conduit à l'accumulation des sous-unités 60S libres dépourvues de la protéine Qsr1 (Kressler *et al.*, 1999). Cette protéine ribosomique est requise pour l'association des sous-unités 60S avec les sous-unités 40S et est incorporée dans la particule 60S après l'échange avec la protéine Nmd3, dans le cytoplasme (Hedges *et al.*, 2005). Qsr1p fonctionne en conjonction avec la protéine Sdo1 et la GTPase Efl1p (facteur d'élongation eucaryote 2 (eEF2)-like) pour favoriser la libération du facteur d'anti-association Tif6p (Menne *et al.*, 2007) et le facteur adaptateur pour l'export nucléaire Nmd3p (Hedges *et al.*, 2005). En plus, la combinaison des mutations *qsr1-1* et Δ *RSA1* conduit à une forte inhibition de la croissance. Ces données indiquaient que la protéine Rsa1 pouvait participer à des étapes tardives d'assemblage des sous-unités 60S (participation dans l'échange Nmd3p-Rpl10p).

La protéine Rsa1 a ensuite été identifiée, lors d'un crible par triple hybride (Y3H) réalisé dans le groupe de B. Charpentier au Laboratoire, visant à identifier des partenaires d'interaction du motif ARN formé par les boîtes B et C du snoRNA U3. Des études ultérieures ont révélé le fait que le fragment C-terminal de Rsa1p (aa 230 - 381) est suffisant pour compléter le défaut de croissance d'une souche Δ *RSA1*. L'interaction par Y3H s'est avérée être indirecte. En effet, la formation d'un complexe entre l'ARN U3 et Rsa1p n'était observée par retard de migration sur gel qu'en présence de Snu13p et nécessitait un K-turn fonctionnel. La protéine Rsa1 n'étant pas retrouvée dans les particules snoRNP U3 matures (Watkins *et al.*, 2000) et ne s'accumulant pas dans le nucléole (Kressler *et al.*, 1999), l'hypothèse d'une interaction transitoire au cours de la biogenèse de la snoRNP U3 a alors été émise.

En parallèle à ce travail, l'équipe d'E. Bertrand menait des études visant à identifier par crible double-hybride de nouveaux partenaires d'interaction de la protéine SNU13/15.5K (Boulon, 2005). C'est ainsi qu'a été identifiée la protéine NUFIP1 (Nuclear FMRP Interacting Protein). Il s'est avéré que NUFIP1 est l'homologue fonctionnel de Rsa1p et un travail collaboratif a débuté entre les deux laboratoires.

La protéine NUFIP1 contient un domaine à doigt de zinc de type C2H2, un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite et un site cdk. Elle se localise principalement dans le noyau, étant faiblement détectée au niveau du cytoplasme et des nucléoles (Bardoni *et al.*, 1999; Cabart *et al.*, 2004). En outre, ce nouveau facteur s'associe à la protéine nucléaire BRCA1 qui est un facteur de l'ARN polymérase II impliqué dans la régulation de la transcription (Cabart *et al.*, 2004). De plus NUFIP1 interagit en test double-hybride avec les protéines LSM4 et TGS1 (Boulon, 2005). NUFIP1 est exprimée dans de nombreux types cellulaires, est son expression est régulée au cours du cycle cellulaire (Bardoni *et al.*, 1999; Cabart *et al.*, 2004).

L'équipe de B. Bardoni avait initialement identifié NUFIP1 comme nouveau partenaire d'interaction de la protéine FMR1 (Fragile X Mental Retardation) son expression étant dérégulée au cours du développement du syndrome du X-fragile (Bardoni *et al.*, 1999). FMR1 est un facteur impliqué dans la stabilité, le transport et le contrôle de la traduction d'une population d'ARNm (De Rubeis and Bagni, 2010; Fatemi et al., 2010) et a été trouvée impliquée dans de nombreuses maladies psychiatriques, comme l'autisme, la schizophrénie, les troubles bipolaires et les troubles dépressifs majeurs (Fatemi and Folsom, 2011). Son rôle est essentiellement situé dans les neurones, où elle est intégrée dans des RNP de haut poids moléculaire, participant à l'export des ARNm vers le cytoplasme, ainsi qu'à leur traduction au niveau des dendrites. Les protéines FMR1 et NUFIP1 présentent une co-localisation nucléaire, leur profil d'expression est superposable dans le cortex, l'hippocampe et les cellules de Purkinje et interagissent physiquement *in vitro* avec les ARN poly(G) ou poly(U), mais cette interaction n'est néanmoins pas médiée par son domaine à doigt de zinc de type C2H2 (Bardoni *et al.*, 1999).

Vu le lien retrouvé entre NUFIP1 et BRCA1, une fonction potentielle pour la protéine NUFIP1 pouvait exister dans les étapes précoces de la biogenèse des ARNm (Cabart *et al.*, 2004). Bien caractérisé dans les cancers, le gène de prédisposition au cancer du sein *BRCA1* code une protéine suppresseur des tumeurs qui a des implications dans des processus tels que la réponse aux dommages à l'ADN, la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, la réponse aux hormones stéroïdiennes (Katiyar et al., 2006). Ces fonctions sont accomplies par des interactions avec des facteurs de transcription (Guendel et al., 2015). L'interaction existante entre les protéines NUFIP1 et BRCA1 (Cabart *et al.*, 2004) semble être en rapport avec l'activité de transcription car NUFIP1 active spécifiquement l'activité ARN polymérase II en fonctionnant comme activateur transcriptionnel basal *in vitro* et aussi *in vitro* quand il est exprimé de manière ectopique. L'activité maximale de stimulation de NUFIP1 peut être réalisée dans le cadre d'une coexpression transitoire de BRCA1 et de la cycline T1. Des données obtenues à partir de dosage de matrices d'ADN immobilisées, montrent que NUFIP1 est associée à la matrice tout au long du cycle de transcription. En plus, NUFIP1 augmente la libération de complexes de transcription ouverts de la forme hyper phosphorylée de l'ARN polymérase II d'une manière ATP-dépendante. Cela suggère que NUFIP1 peut agir directement sur des promoteurs activés (Cabart *et al.*, 2004). De plus, cette fonctionnalité est dépendante de la présence du domaine à doigt de zinc.

Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que la protéine NUFIP1 s'associe avec d'autres facteurs de transcription, autres que BRCA1, comme les deux membres du complexe PTEF-b, CDK9 et la cycline T1 (Cabart *et al.*, 2004). Le complexe

NUFIP1-CDK9 est résistant au traitement à la RNase A, ce qui indique que l'ARN n'est pas nécessaire pour l'association de NUFIP1 au complexe P-TEFb (Cabart *et al.*, 2004), mais celle-ci repose sur l'interaction avec la cycline T1, car une forte interaction entre ces deux partenaires a été détectée dans des expériences de GST-pull down (Cabart *et al.*, 2004).

La kinase cycline-dépendante 9 (CDK9), qui est la kinase du facteur positif de l'élongation de la transcription b (P-TEFb), est essentielle pour le cycle cellulaire et pour l'apoptose. CDK9 s'associe à chacune des quatre cyclines (T1, T2A T2b et K), formant des facteurs positifs distincts de l'élongation de la transcription (P-TEF). P-TEFb est régulée de manière positive avec l'élongation transcriptionnelle par la phosphorylation du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (Peng *et al.*, 1998), ainsi que par des facteurs d'élongation négatifs, qui bloquent l'élongation par l'ARN polymérase II peu après l'initiation de la transcription. P-TEFb apparaît moduler positivement les autres étapes lors de la transcription (Han *et al.*, 2014). NUFIP1 a un effet activateur de la transcription qui nécessite la présence de la cycline T1 (Cabart *et al.*, 2004).

La protéine NUFIP1 est également présente dans le complexe de pré-initiation de la transcription (PIC, Pré-Initiation Complex) et reste associée avec la polymérase au cours de l'élongation. En présence d'ATP, NUFIP1 utilise l'hydrolyse de l'ATP à des promoteurs activés pour induire un changement conformationnel dans les complexes contenant la polymérase II qui facilite la transition du PIC vers un complexe d'élongation (Cabart *et al.*, 2004). La transition de l'ARN polymérase II du PIC vers le complexe d'élongation est marquée par une augmentation de la phosphorylation de la sérine 2 dans les motifs conservé « YSPTSPS » de son domaine carboxyle-terminal (CTD) (Fuchs *et al.*, 2009; Phatnani and Greenleaf, 2006). Toutes ces données montrent que NUFIP1 interagit sélectivement avec le facteur de transcription P-TEFb, interaction médiée par la sous-unité cycline T1 et favorise l'activation transcriptionnelle dépendante de BRCA1.

Les protéines NUFIP et Rsa1 ne présentent pas de conservation dans leurs séquences primaires, à l'exception d'une région centrale de 36 résidus, nommée domaine PEP, pour lequel les deux facteurs partagent 35% d'identité et 60% de similarité. Cette région a été identifiée par des méthodes bio-informatiques en utilisant l'algorithme de recherche PSI-BLAST (Boulon, 2005). La protéine NUFIP1 est conservée chez de nombreux organismes eucaryotes, mais pas chez *S. cerevisiae*, tandis que la protéine Rsa1 est conservée spécifiquement chez les levures, en particulier sa région C-terminale. La conservation de ce petit domaine chez les plantes et les métazoaires et chez la levure suggère une implication fonctionnelle conservée. De plus, NUFIP1 a comme partenaire d'interaction la protéine SNU13, et Rsa1p interagit avec la protéine Snu13. Comme SNU13 et Snu13p sont des

homologues faisant partie de la même famille des protéines L7Ae, le domaine PEP a été suspecté, puis identifié comme étant impliqué dans les interactions des protéines NUFIP1 et Rsa1 avec SNU13 et Snu13p lors du métabolisme des snoRNP à boîtes C/D (Boulon *et al.*, 2008; Rothé *et al.*, 2014a). Les structures 3D établies pour les protéines SNU13 humaine et Snu13 de levure sont très similaires (Oruganti *et al.*, 2005; Vidovic *et al.*, 2000) et reconnaissent spécifiquement les motifs en K-turn.

3.3.1.4 Les protéines contenant un domaine ZF-HIT

Il est intéressant de noter que les protéines à doigt de zinc de la famille HIT semblent avoir des liens spécifiques avec les ATPases AAA+ RuvBL1/2. Il existe six protéines de cette famille dans le génome humain (ZNHIT1 à ZNHIT6) (pour revue Verheggen *et al.*, 2015). Deux d'entre elles, ZNHIT3 et hBcd1/ZNHIT6, sont impliquées dans la biogenèse des snoRNP et sont étroitement associées à RuvBL1/2 *in vivo*. Deux autres protéines de cette famille, ZNHIT1 et ZNHIT4, font partie, respectivement, des complexes de remodelage de la chromatine SRCAP et INO80 (Cai *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2007). RuvBL1/2 sont également des éléments clés de ces complexes. En outre, les données structurales récentes du complexe de levure INO80 révèlent que l'orthologue de ZNHIT4, les2p, interagit avec RuvBL1/2 et joue un rôle central dans leur intégration dans le reste du complexe (Tosi *et al.*, 2013). Les deux protéines restantes, ZNHIT2 et ZNHIT5/DDX59, sont mal caractérisées, mais ZNHIT2 a également été trouvée être étroitement associée à des protéines RuvBL (Jeronimo *et al.*, 2007; Verheggen *et al.*, 2015). Collectivement, ces données suggèrent que les protéines ZNHIT peuvent contribuer à la spécificité de substrat de RuvBL1/2. En outre, vu que hBCD1/ZNHIT6 réalise des contacts de manière ATP-dépendante avec RuvBL1/2 (McKeegan *et al.*, 2009), et que ZNHIT3 semble être libérée lors de la liaison du complexe pré-snoRNP aux snoRNA (Bizarro *et al.*, 2014), il est tentant de spéculer que les protéines à doigt de zinc de la famille HIT peuvent jouer un rôle particulièrement important dans la régulation de l'activité et la fonction des protéines RuvBL1/2, en contribuant à la spécificité de leur substrat (Bizarro *et al.*, 2014; Verheggen *et al.*, 2015).

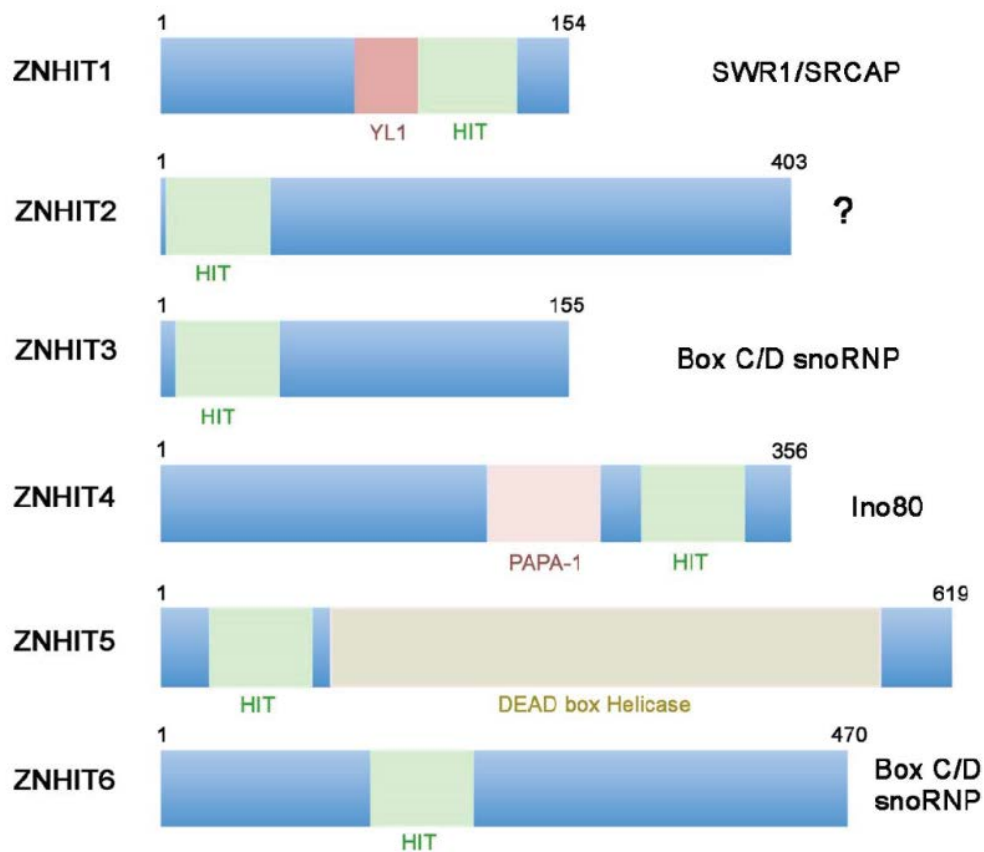


Figure 18 : Représentation schématique des 6 protéines présentant le domaine ZNHIT chez l'humain. Le domaine HIT est coloré en vert et les autres domaines avec des couleurs différentes. La plupart des protéines ZNHIT interagissent avec des complexes cellulaires dans lesquels les protéines RUVBL 1/2 détiennent des rôles importants, soit comme facteurs d'assemblage (snoRNP à boîtes C/D) ou comme partie intégrale des complexes purifiés (INO80, SWR1), comme indiqué dans la figure. Tiré de Verheggen *et al.*, 2015.

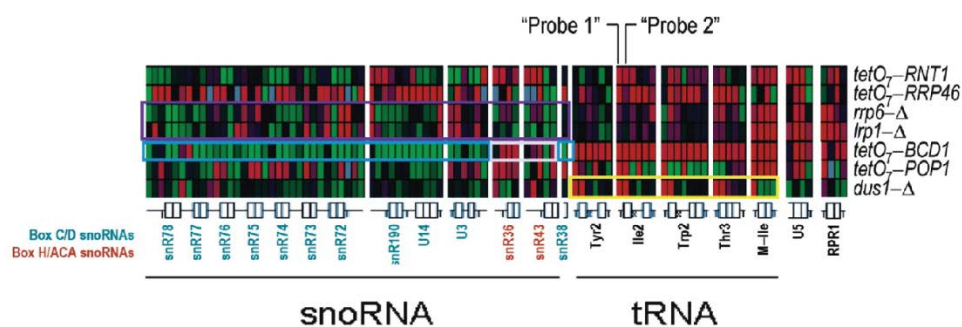


Figure 19 : Identification de Bcd1p (Box C/D snoRNA accumulation) comme facteur impliqué dans la stabilité des snoRNA à boîtes C/D. Hybridation des ARN sur des puces contenant des oligonucléotides ADN, afin de mesurer par rapport à une souche sauvage l'abondance des ARN non-codants dans des souches dont l'expression de certaines protéines a été réduite. La couleur rouge indique une augmentation relative, et la couleur verte une diminution relative de l'ARN testé. L'expression de Bcd1p a été mise sous le contrôle d'un promoteur inductible TetOff. Dans la souche *tetO₇-BCD1*, les taux des snoRNA à boîtes C/D sont fortement diminués par rapport à une souche sauvage, alors que l'expression des snoRNA à boîtes H/ACA était inchangée ou légèrement modifiée. Extrait de Peng *et al.*, 2003

3.3.1.4.1 La protéine Bcd1/ZNHIT6

La protéine Bcd1 (Box C/D snoRNA 1) a été identifiée pour la première fois chez la levure comme possiblement impliquée dans la biogenèse des snoRNA à boîtes C/D en 2003 par l'équipe de T.R. Hughes, dans un crible à grande échelle à partir de mutants de levure. L'étude visait à identifier de nouveaux acteurs participant au métabolisme d'ARN non-codants (Peng *et al.*, 2003). Dans cette étude, le taux d'ARN de 468 souches de *S. cerevisiae* génétiquement modifiées a été étudié par Northern blot. Soit les parties codantes de gènes non essentiels à la viabilité cellulaire étaient mutées, soit pour les gènes essentiels, l'expression a été placée sous le contrôle d'un promoteur *tetO₇* qui est régulé négativement en présence de la doxycycline, un antibiotique de la famille des tétracyclines. Le système *tetO₇*, comme tout système d'arrêt de la transcription, présente l'inconvénient que les phénotypes se manifestent progressivement, ce qui rend difficile la distinction entre effets primaires et effets secondaires; cependant, il présente l'avantage que la présence de doxycycline à faible concentration est physiologiquement non toxique pour la levure (Hughes *et al.*, 2000).

La protéine Bcd1 est essentielle pour la viabilité cellulaire et s'est avérée essentielle pour l'accumulation spécifique des snoRNA à boîtes C/D (Hiley *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2003), car le taux de snoRNA à boîtes H/ACA n'est pas modifié par rapport à une souche sauvage (Peng *et al.*, 2003). En condition d'épuisement de Bcd1p, des défauts de biogenèse des ARNr ont été observés. Mis à part un doigt à zinc dans sa région N-terminale et un signal de localisation nucléaire, aucun autre motif connu n'est détecté dans sa séquence primaire. Sans autres données fonctionnelles, il a été proposé que Bcd1p pouvait jouer un rôle dans la biogenèse des snoRNA à boîtes C/D qui serait analogue à celui joué par la protéine Naf1 dans la biogenèse des snoRNA à boîtes H/ACA (Peng *et al.*, 2003). Il a été proposé que Bcd1p pourrait agir comme facteur d'échange avec la protéine Nop56 (Matera *et al.*, 2007).

La protéine ZNHIT6 est l'homologue humain de Bcd1p de levure (Zinc Finger, HIT-Type Containing 6). Elle existe chez l'humain sous deux isoformes, une première contenant 470 acides aminés (ZNHIT6-001), codée par 10 exons et une deuxième plus courte de 431 acides aminés (ZNHIT6-201), codée par 11 exons, qui se différencie de la première par la séquence dans sa partie C-terminale à qui il manque 39 acides aminés. Un intron alternatif est présent dans la deuxième isoforme, entre les exons 10 et 11. Par contre, l'isoforme plus courte se caractérise par un ARNm qui possède une région 3'UTR plus longue que la première. La région codante contient 11 exons, tandis que la protéine de levure est codée

par un seul exon. Elle contient un motif à doigt de zinc qui est situé au milieu de la protéine, tandis que chez la levure, le doigt à zinc de Bcd1p est présent dans la partie N-terminale.

Un alignement des séquences entre les deux homologues, humain (isoforme longue) et de levure, montre que le domaine conservé de ZHHIT6 débute à l'acide aminé 220, ce qui correspond au domaine à doigt de zinc. Le domaine qui est présent à l'extrémité N-terminale de ZNHIT6 contenant les acides aminés 1-216, n'est pas présent dans Bcd1p. Au sein de la protéine ZNHIT6, la séquence correspondant à la protéine de levure débute à l'acide aminé 220. De manière intéressante, tout le domaine ZNHIT6₁₋₂₁₈ est codé au niveau génomique par un seul exon, tandis que le domaine ZNHIT6₂₁₉₋₄₇₀ est codé par les 9 autres exons.

La protéine ZNHIT6 a été trouvée être associée à toutes les formes des pré-snoRNP U8 et U3, (McKeegan *et al.*, 2007). Ces travaux de l'équipe de N. Watkins ont montré que l'absence de ZNHIT6 conduit à une réduction significative des taux des snoRNA U3, U8 et U14. Cet effet n'a pas été retrouvé pour l'ARN 7SL, démontrant que les effets observés sont spécifiques pour les snoRNA à boîtes C/D (McKeegan *et al.*, 2007). La même équipe a réalisé des expériences de GST pull down afin de rechercher les interactions protéine-protéine potentielles entre ZNHIT6, NUFIP1, PIH1D1(NOP17) et TAF9. A cette fin, une forme tronquée de ZNHIT6 (ZNHIT6₁₋₃₆₀) a été produite chez *E.coli* sous forme recombinante et fusionnée à la GST. La protéine de pleine taille portant des étiquettes GST ou HIS a été produite *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapin en présence d'acides aminés marqués au S³⁵. GST-ZNHIT6₁₋₃₆₀ est capable de s'associer *in vitro* avec NUFIP1 et ZNHIT6 de pleine taille (acides aminés 1-470) mais pas avec TAF9 et PIH1D1(NOP17). ZNHIT6₁₋₄₇₀ de pleine taille interagit avec TAF9. Cependant, vu que la forme tronquée ZNHIT6₁₋₃₆₀ ne portait plus un segment de 111 acides aminés de l'extrémité C-terminale, les auteurs ont suggéré que TAF9 interagit avec cette région manquante de la protéine. GST-ZNHIT6₁₋₃₆₀ interagit efficacement avec la protéine TIP48 (Rvb2p chez *S. cerevisiae*) en présence d'ADP et une interaction plus faible a été observée en présence d'ATP. Une faible interaction a été observée entre GST-ZNHIT6₁₋₃₆₀ et TIP49 en présence d'ATP, mais pas en présence d'ADP ou en absence de nucléotide (McKeegan *et al.*, 2007). GST-SNU13 a été aussi montrée capable d'interagir avec ZNHIT6 pleine taille, mais pas avec la forme tronquée 1-360, ce qui indique que le doigt à zinc et la partie N-terminale présents dans GST-BCD1₁₋₃₆₀ ne sont pas suffisants pour cette interaction. ZNHIT6 est aussi été retrouvée dans des complexes purifiés à partir de GST-NOP58. L'ensemble de ces données suggèrent que (i) ZNHIT6 interagit avec NUFIP1, TAF9, SNU13, NOP58, RUVBL1 et RUVBL2, (ii) qu'elle est capable de multimérisation et (iii) l'interaction avec TIP48 et TIP49 peut être régulée par la fixation d'un nucléotide.

La réduction du taux ZNHIT6 par interférence ARN conduit à une réduction du taux du snoRNA U3 dans les corps de Cajal. Cela pourrait être le résultat soit d'une perte de localisation dans les corps de Cajal ou, plus probablement, d'une réduction du taux global des snoRNA dans le nucléoplasme (McKeegan *et al.*, 2007).

3.3.1.4.2 La protéine Hit1/ZNHIT3

Dans un crible visant à identifier chez *S. cerevisiae* des mutations conférant un phénotype thermosensible à haute température mais qui n'influencent pas la croissance en conditions normales (Kawakami *et al.*, 1992), une protéine de 164 acides aminés baptisée Hit1 (High Temperature growth, YJR055W) dont le gène est localisé sur le chromosome X a été identifiée. Pendant une longue période sa fonction est restée inconnue. Pendant les travaux menés au laboratoire par Benjamin Rothé durant son doctorat, une analyse détaillée de la relation entre les facteurs Rsa1p et Pih1p par co-purification, suivie d'une analyse exhaustive des protéines associées, ont retrouvé Hit1p associée à la protéine TAP-Rsa1 dans des extraits cellulaires (Rothé *et al.*, 2014b). Cette interaction directe est nécessaire pour assurer la stabilité de Rsa1p. Rsa1p, Hit1p et des membres du complexe R2TP ont été montrés être associés aux pré-snoRNA U3, ce qui indique leur association transitoire avec ces ARN. En même temps, l'analyse des souches de levure invalidées pour des différents gènes des facteurs d'assemblage ($\Delta PIH1$, $\Delta RSA1$, $\Delta HIT1$) a montré la présence de liens fonctionnels entre ces facteurs, car un phénotype synthétique létal a été identifié pour les souches issues du croisement entre la souche $\Delta PIH1$ et les souches $\Delta RSA1$ ou $\Delta HIT1$ (Rothé *et al.*, 2014b). Hit1p contribue à la stabilité de Rsa1p *in vivo*, car dans la souche $\Delta HIT1$, les taux de Rsa1p sont réduits par rapport à une souche de type sauvage. L'interaction Rsa1p-Hit1p a été initialement observée par double hybride (Ito *et al.*, 2001) et a été confirmée par notre équipe (Rothé *et al.*, 2014b). Les effets observés sur les taux de snoRNA en absence de Hit1p sont similaires avec ceux en absence de Rsa1p (Rothé *et al.*, 2014a; Rothé *et al.*, 2014b): des niveaux réduits pour tous les snoRNA à boîtes C/D testés, sauf le U3, et des taux normaux de snoRNA à boîtes H/ACA et de UsnARN ont été observés. Pour la maturation du snoRNA U3, il a été montré que Hit1p et Rsa1p jouent probablement un rôle dans le traitement de l'extrémité 3' (Rothé *et al.*, 2014a).

En utilisant une approche de protéolyse ménagée, couplée à une analyse par spectrométrie de masse, R. Back, M. Quinternet, X. Manival et J.M. Saliou ont réussi à isoler un complexe minimal Rsa1p₃₁₇₋₃₅₂-Hit1p₇₀₋₁₆₄, dont la structure par RMN a été résolue (Travail de thèse R. Back) (Rothé *et al.*, 2014a).

La protéine ZNHIT3, aussi appelée TRIP3 (Thyroid Hormone Receptor Interacting protein 3), l'homologue humain de Hit1p est aussi requise pour maintenir la stabilité de NUFIP1 avec qui il s'associe de manière stable dans des cellules HeLa. Il a été montré que, comme Hit1p, la protéine ZNHIT3 est importante pour la stabilité de NUFIP1 (Rothé *et al.*, 2014a).

3.3.2 Modèle d'assemblage des snoRNP à boîtes C/D chez les eucaryotes

L'assemblage des particules snoRNP à boîtes C/D dans un extrait cellulaire préparé à partir de cellules humaines commence avec la fixation de la protéine Snu13/SNU13 sur le motif en K-turn formé par les boîtes C et D (Watkins *et al.*, 2002). Les protéines Fibrillarine et NOP56 ont été retrouvées dans des études de microscopie électronique *in vivo* à être associées entre elles, indépendamment de leur association aux snoRNP (Lechertier *et al.*, 2009). Cette interaction, indispensable pour l'association des deux protéines avec les snoRNA à boîtes C/D, ne requiert pas le domaine riche en glycine et en arginine, ni le domaine de liaison à l'ARN, mais l'hélice alpha de la Fibrillarine (Lechertier *et al.*, 2009).

Des études *in vitro* des snoRNP à boîtes C/D ont suggéré une voie d'assemblage ordonné qui a lieu directement sur le snoRNA (Schultz *et al.*, 2006b). En plus du domaine coiled-coil (cf. **Chapitre 3.3.1.2.2**), Nop56p et Nop58p contiennent un domaine NOP, qui est un module de liaison aux RNP et qui interagit avec un complexe préformé SNU13-snoRNA (Liu *et al.*, 2007). Plusieurs études *in vitro* avaient conduit à l'hypothèse selon laquelle l'assemblage des snoRNP est initiée par la liaison de SNU13 au motif C/D du snoRNA suivie par le recrutement du dimère NOP58/Fibrillarine, l'interaction avec NOP56/Fibrillarine qui sont associés à l'extrémité C'/D', et la formation de la structure mature active (Watkins *et al.*, 2002).

In vivo, l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D nécessite plusieurs facteurs d'assemblage: le complexe chaperonne HSP90-R2TP qui est également nécessaire pour la biogenèse des snoRNP H/ACA (Boulon *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008) et les deux facteurs spécifiques aux snoRNP C/D : NUFIP1, qui relie SNU13 au R2TP (Boulon *et al.*, 2008; Rothé *et al.*, 2014a), et BCD1, dont la fonction reste mal caractérisée (Peng *et al.*, 2003). NOP58 et/ou SNU13 sont des clientes probables de HSP90 (Boulon *et al.*, 2008), et les sous-unités RuvBL1/RUVBL2 du complexe R2TP ont été supposées contribuer à un événement de remodelage sur la snoRNP immature (Boulon *et al.*, 2008) (Watkins *et al.*, 2004), car elles réalisent des interactions dépendant de l'ATP avec des protéines des snoRNP à boîtes C/D et avec d'autres facteurs d'assemblage (Cheung *et al.*, 2010; McKeegan *et al.*, 2009).

Le travail en collaboration avec le groupe d'Edouard Bertrand a apporté des informations supplémentaires sur le processus d'assemblage des snoRNP chez l'humain (Bizarro *et al.*, 2014). Des expériences de protéomique quantitative de type SILAC réalisées à Montpellier et de biologie structurale réalisées à Nancy ont révélé l'existence d'un complexe contenant cinq facteurs d'assemblage et les deux protéines SNU13 et NOP58 des snoRNP (Bizarro *et al.*, 2014). Une étape tardive conduit à la libération de NUFIP1 et l'activation de l'activité catalytique de la snoRNP (Bizarro *et al.*, 2014). Dans des cellules humaines HeLa transfectées avec un mutant du snoRNA U3 qui présente une association réduite avec NOP56, NOP58 et la Fibrillarine, un complexe protéique uniquement composé de ZNHIT3, BCD1(ZnHIT6), NUFIP1, RuvBL1/2, NOP58 et SNU13 peut être caractérisé. C'est ce complexe qui s'associerait aux snoRNA naissants accompagné de la libération rapide de ZNHIT3, alors que NUFIP1 et RuvBL1/2 resteraient liées jusqu'à un stade avancé de la biogenèse. La dissociation de ZNHIT3 mènerait à un renforcement de l'association de la Fibrillarine au complexe qui est déclenchée par l'interaction de NOP58 avec le motif C/D (Bizarro *et al.*, 2014). Par conséquent, le complexe protéique précurseur semble être remodelé après sa liaison aux snoRNA naissants (Bizarro *et al.*, 2014). RuvBL1/2 s'associent avec NUFIP1, ZNHIT3 et ZNHIT6, mais l'interaction avec les deux derniers facteurs semble plus labile que celle avec NUFIP1 (Bizarro *et al.*, 2014). Leur relâchement du complexe se réalise dans une phase tardive du processus d'assemblage (Bizarro *et al.*, 2014). Dans la même étude, un nouveau facteur potentiellement impliqué dans ce processus a été identifié, la protéine c12orf45, qui a été retrouvée associée au complexe et partenaire potentiel d'interaction avec RuvBL1/2.

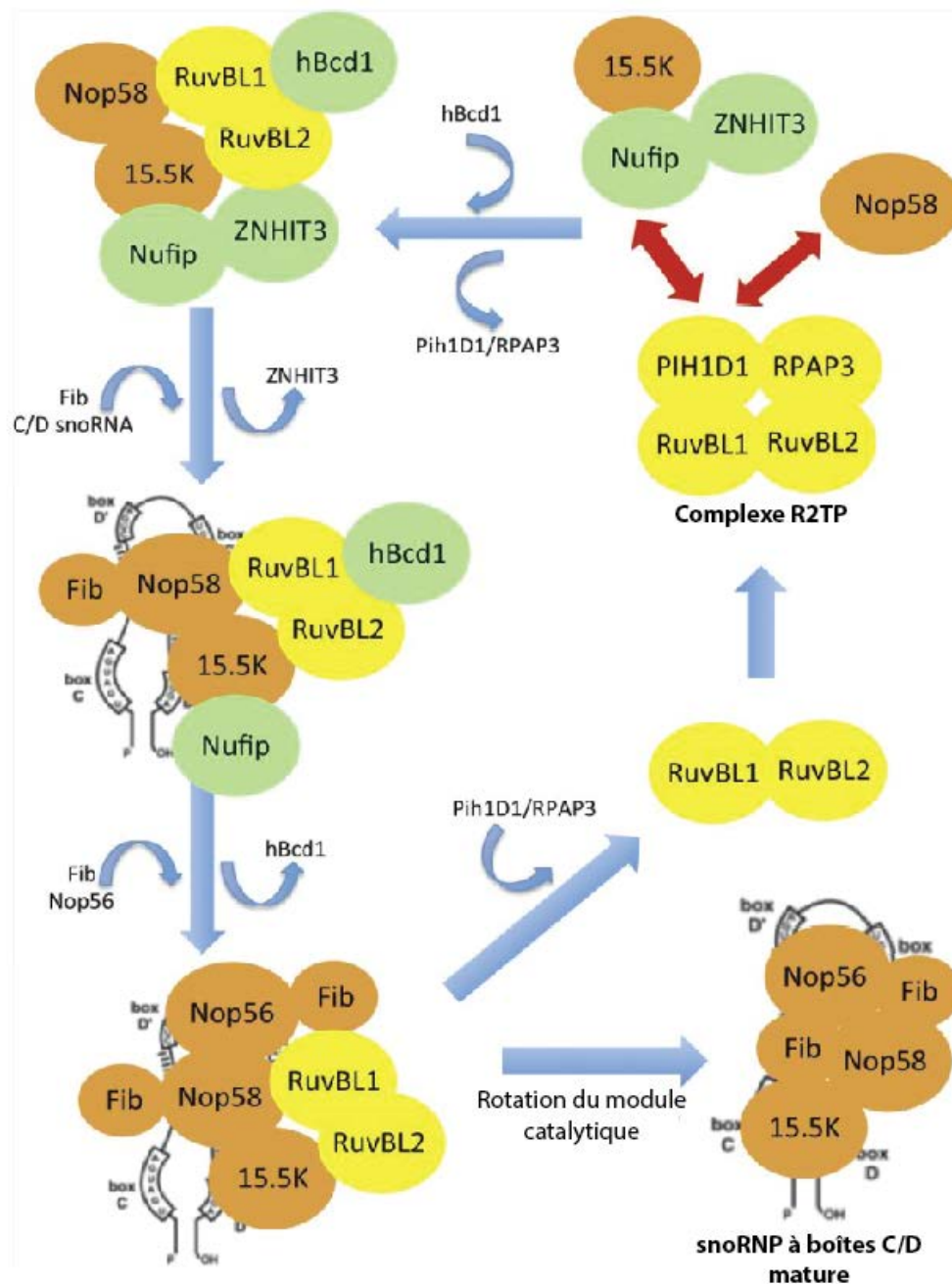


Figure 20 : Modèle d'assemblage des snoRNP à boîtes C/D. Les diverses étapes intermédiaires sont montrées et le rôle potentiel du complexe R2TP dans ce processus est montré. Au début, un complexe protéique contenant ZNHIT3, NUFIP1, BCD1, et RuvBL1/2 s'associe à SNU13 et NOP58. A la suite, le snoRNA à boîtes C/D est incorporé dans la particule naissante, et la Fibrillarine interagit avec NOP58. Pendant cette étape, ZNHIT3 est libéré, mais NUFIP et SNU13 restent associées afin de prévenir un état catalytiquement actif de la particule. La rotation du module catalytique, formé par la Fibrillarine et le domaine N-terminal de NOP58, est déterminée par la libération de NUFIP1, et réalise l'activation de la particule. Dans cet état, le dimère NOP58/Fibrillarine interagit avec le snoRNA et avec le domaine TIP de NOP56, qui stabilise la particule dans une configuration active fermée. Fib: Fibrillarine. Tiré de Bizarro *et al.*, 2014. Dans ce schéma les protéines ne respectent pas la nomenclature définie pour les protéines des RNP humaines.

3.3.3 Transport et localisation des snoRNP à boîtes C/D

Le motif C/D s'est avéré être nécessaire et suffisant pour la localisation nucléolaire des snoRNA (Lange et al., 1998; Narayanan et al., 1999; Samarsky and Fournier, 1998; Verheggen et al., 2001). Pendant leur biogenèse, les snoRNP à boîtes C/D réalisent des passages par des structures spécialisés, comme les corps de Cajal chez les vertébrés ou les corps nucléolaires (nucleolar bodies ou NB) chez la levure. Ces structures contiennent l'hyperméthylase Tgs1p/TGS1 qui catalyse la réaction d'hyperméthylation de la coiffe m⁷G de certains snoRNA.

Chez la levure, les protéines constitutives des snoRNP à boîtes C/D Snu13p, Nop1p/Fibrillarine, Nop56p et Nop5p/Nop58p sont importantes pour la localisation nucléolaire (Verheggen *et al.*, 2001). En effet, l'expression d'un snoRNA U14 avec une tige terminale allongée afin de le stabiliser (Huang, 2002), a montré que l'appauvrissement de ces protéines conduit à une accumulation de l'ARN dans le nucléole, et cet effet est plus marqué pour Snu13p et Nop1p (Verheggen *et al.*, 2001). De plus, seules les snoRNP correctement assemblées sont adressées au nucléole, car la localisation nucléolaire de Nop1p et Nop58p est dépendante de l'expression des autres protéines constituantes de la RNP (Verheggen *et al.*, 2001). Les snoRNA U3 et U14 surexprimés à partir d'un vecteur ou placé dans un contexte intronique s'accumulent dans les NB (Verheggen *et al.*, 2001). L'adressage de ces snoRNA vers le nucléole s'effectue après l'assemblage des protéines constitutives, car en leur absence ainsi qu'en absence du motif C/D, ils présentent une délocalisation hors du nucléole. L'accumulation nucléolaire des snoRNP à boîtes C/D est régulée par les facteurs Srp40p/NOPP140 et Nsr1p/Nucléoline, qui ont des effets opposés. En effet, l'absence de Srp40p conduit à une perte des snoRNA au niveau des NB, alors que l'absence de Nsr1p stimule cette accumulation et ces effets sont spécifiques pour les snoRNP à boîtes C/D (Verheggen *et al.*, 2001). Comme nous le verrons plus loin (**Chapitre 3.4.1.3.1**), le snoRNA U3 est probablement recruté sur le pré-ARNr pendant les étapes intermédiaires d'assemblage du processome SSU par les protéines Nsr1/Nucléoline et Rrp5. La Nucléoline n'est associée que transitoirement au SSU, où elle favorise l'appariement du snoRNA avec le pré-ARNr et probablement quitte le complexe peu après le recrutement de la snoRNP U3 (Turner et al., 2009).

Dans une recherche systématique de mutants délétères pour la localisation nucléolaire des snoRNA chez *S. cerevisiae* (Qiu et al., 2008) les facteurs Nop4p, Prp21p et Tao3p ont été identifiés et sont requis pour l'accumulation de certains snoRNA dans les NB

et deux autres protéines, Sec14 et Htl1, comme impliquées dans leur dispersion depuis les NB vers le reste du nucléole.

Nop4 est une protéine nucléolaire critique pour le traitement correct des pré-ARNr et la production de ribosomes fonctionnels (Berges *et al.*, 1994; Sloan *et al.*, 2013; Sun and Woolford, 1994). L'épuisement cellulaire en Nop4p se traduit par une inhibition du clivage au niveau des sites A0, A1 et A2 du pré-ARNr 35S (Berges *et al.*, 1994; Sloan *et al.*, 2013), sites connus pour nécessiter l'activité du snoRNA U3 (Hughes and Ares, 1991), ainsi qu'à l'accumulation de l'ARN 27SA et de ses produits de maturation (Berges *et al.*, 1994; Sun and Woolford, 1994), mais le mécanisme moléculaire de la fonction de Nop4p n'est pas connu.

Sec14p est une protéine cytosolique de transfert des phospholipides, requise pour la sécrétion des protéines depuis l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (Bankaitis *et al.*, 1989; Tschopp *et al.*, 1984). Toutefois, la sécrétion continue de la protéine est essentielle pour la synthèse des ribosomes (Mizuta and Warner, 1994), ce qui indique des liens indirects avec des fonctions possibles à l'intérieur du noyau.

Htl1p n'est pas une protéine essentielle pour la viabilité cellulaire, mais est importante pour la croissance de la levure à 37°C (Lanzuolo *et al.*, 2001). Htl1p est une protéine nucléaire (Romeo *et al.*, 2002) et est un composant du complexe de remodelage de la chromatine RSC, qui fonctionne dans la régulation et l'élongation de la transcription de l'ARN polymérase II (Oum *et al.*, 2011; Romeo *et al.*, 2002). Il est possible que les défauts d'élongation de la transcription retrouvés en absence de Htl1p génère des défauts dans le traitement des extrémités 3' des snoRNA et/ou dans l'assemblage des snoRNP (et un défaut dans le ciblage nucléolaire) (Qiu *et al.*, 2008).

Chez les vertébrés, l'adressage des snoRNA vers les CB nécessite aussi la présence du motif C/D (Boulon *et al.*, 2004; Narayanan *et al.*, 1999; Samarsky and Fournier, 1998). Les facteurs NOP56 et NOP58 sont importantes pour l'adressage nucléolaire, car leur domaine C-terminal basique (Turner *et al.*, 2009) est nécessaire et suffisant pour leur localisation nucléaire et nucléolaire (Pradet-Balade *et al.*, 2011). Par rapport à l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D de levure, seule la protéine SNU13 est nécessaire pour l'accumulation du snoRNA U3 au niveau des CB (Boulon *et al.*, 2004). La protéine NOPP140 (nucleolar phosphoprotein 140 kDa) est également impliquée dans le transport des snoRNA, fonctionnant comme une navette entre les CB et les nucléoles (Morimoto and Boerkoel, 2013; Watkins *et al.*, 2004) et régulant l'accumulation des particules dans ces compartiments. La Nucléoline est l'une des protéines non ribosomiques les plus abondantes dans le nucléole où elle joue un rôle central dans la transcription par la Polymérase I. Elle se

trouve également à l'extérieur du nucléole, dans le nucléoplasme, le cytoplasme ainsi que dans la membrane cellulaire (Berger *et al.*, 2015). Elle a notamment un rôle important dans la localisation nucléolaire des snoRNA, en favorisant leur incorporation dans les complexes pré-ribosomiques (Ginisty *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2009).

PHAX et CRM1 sont deux facteurs importants dans le transport et la localisation intranucléaire des snoRNP (Boulon *et al.*, 2004). Ils sont connus pour participer à la biogenèse des UsnRNP spliceosomales, en assurant l'export des UsnRNA coiffés m⁷G vers le cytoplasme. L'export des UsnARN est médié par un ensemble de cinq protéines: CBC (heterodimeric nuclear Cap Binding Complex) (Izaurralde *et al.*, 1995), PHAX (Ohno *et al.*, 2000), CRM1, le récepteur de l'export nucléaire de la famille importin β et Ran-GTP (Izaurralde *et al.*, 1997). CBC et PHAX sont des protéines adaptateur associant les snARN à la machine d'export nucléaire. CBC reconnaît et lie la coiffe m⁷G des snARN et PHAX interagit directement avec CBC et le snRNA (Segref *et al.*, 2001). Un complexe stable de pré-export est initialement formé entre CBC, PHAX et le snRNA (Mourao *et al.*, 2010). La phosphorylation de PHAX par la kinase CK2 est une condition préalable pour la liaison du signal d'export nucléaire (NES) de PHAX à CRM1-Ran-GTP conduisant à l'exportation nucléaire du complexe CBP-PHAX-snRNA-CRM1-Ran-GTP (Kitao *et al.*, 2008; Ohno *et al.*, 2000). Dans le cytoplasme, l'hydrolyse de Ran-GTP et la déphosphorylation de PHAX par la phosphatase 2A (Kitao *et al.*, 2008; Ohno *et al.*, 2000) conduisent à la libération de CRM1 et Ran-GDP. La libération de PHAX et CBC se produit simultanément avec la liaison du complexe protéique SMN au snRNA (Massenet *et al.*, 2002; Mourao *et al.*, 2010).

Le snoRNA U3 représente une exception, car bien que possédant une coiffe m⁷G, il n'est pas exporté (Boulon *et al.*, 2004; Terns and Dahlberg, 1994). Cependant, sa coiffe m⁷G est importante pour son transport vers les CB (Boulon *et al.*, 2004). Les protéines PHAX et CRM1 interviennent de manière séquentielle dans le transport du snoRNA U3. La protéine PHAX s'associe dans un premier temps au snoRNA U3 porteur de la coiffe m⁷G et favorise son accumulation dans les CB. Ensuite, le complexe CRM1/Ran-GTP est recruté sur l'ARN porteur d'une coiffe m^{2,2,7}G et intervient dans son transport vers le nucléole.

Le facteur CRM1 participe au trafic nucléaire des snoRNP en coopération avec l'isoforme longue de l'hyperméthylase cytoplasmique TGS1 (TGS1-LF) et NOP58. TGS1-LF contient un signal d'export nucléaire riche en leucine, alterne entre le noyau et le cytoplasme de manière CRM1-dépendante, et interagit avec le signal de localisation nucléolaire (NoLS) situé dans la partie C-terminale basique de NOP58 (Pradet-Balade *et al.*, 2011). Des données *in vitro* indiquent que CRM1 interagit avec TGS1-LF et favorise sa dissociation du NoLS de NOP58 (Pradet-Balade *et al.*, 2011). La protéine TGS1-LF, est principalement

localisée au niveau du cytoplasme (Pradet-Balade *et al.*, 2011) et son interaction avec le domaine C-terminal de la protéine NOP58 inhibe la localisation nucléolaire des snoRNP (Pradet-Balade *et al.*, 2011). En présence du complexe Ran-GTP, CRM1 reconnaît le signal d'export (NES) spécifique de la protéine TGS1-LF conduisant à la dissociation de NOP58 et en favorisant ainsi l'adressage cytoplasmique de TGS-LF et le transport des snoRNP vers le nucléole (Pradet-Balade *et al.*, 2011).

D'autres ARN présentant une coiffe m⁷G sont transportés par ce mécanisme dépendant de PHAX, comme les snoRNA U8, U13 ou bien l'ARN du complexe télomérase (Boulon *et al.*, 2004; Watkins *et al.*, 2004), mais aussi le snoRNA U14 intronique qui n'est pas coiffé m⁷G, ce qui indique que son rôle ne s'arrête pas seulement dans les ARN portant la coiffe m⁷G (Watkins *et al.*, 2004). Cette observation a été confirmée par la démonstration du transport d'un ARN U3 variant ne portant pas de coiffe m⁷G (Boulon *et al.*, 2004). Ainsi, le système PHAX/CRM1 participe au trafic intranucléaire des ARN non codants indépendamment de la coiffe m⁷G incluant les snoRNA H/ACA (Pradet-Balade *et al.*, 2011). Ce système pouvait en effet avoir le rôle de régulation des taux des snoRNP produits en corrélation avec le nombre des ribosomes. L'indisponibilité de la protéine CRM1 due à une séquestration par les sous-unités 40S et 60S pourrait moduler l'adressage des snoRNP vers les nucléoles, en ralentissant ainsi la production de nouveaux ribosomes (Pradet-Balade *et al.*, 2011).

3.3.4 Importance des modifications post-traductionnelles (MPT) pour la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D

La MPT par SUMOylation est un mécanisme important de régulation de la fonction des protéines, en particulier dans le noyau. Ces modifications ont été identifiées chez certaines protéines des snoRNP humaines, en particulier la protéine NOP58 (Matic *et al.*, 2010; Westman and Lamond, 2011; Westman *et al.*, 2010). Des expériences de protéomique quantitative par SILAC ont permis d'identifier Nhp2p et Nop58p comme faisant partie des protéines SUMOylées (Westman *et al.*, 2010). Cela révélait un rôle potentiel de la SUMOylation dans la biogenèse et/ou la fonction des snoRNP. Des analyses mutationnelles ont révélé la présence de ces modifications au niveau de la lysine K5 de Nhp2p, et les résidus de la région C-terminale K467 et K497 de Nop58p (Westman *et al.*, 2010). La SUMOylation du résidu K497 est plus importante que celle du résidu K467 (Westman *et al.*, 2010). Néanmoins, un alignement des séquences de la protéine Nop58 chez différentes espèces révèle que les résidus K467, K497 et le motif consensus pour la SUMOylation (ψ -K-

X-[E/D]) les entourant, sont conservés entre l'homme et la souris, mais pas chez les organismes inférieurs, ce qui suggère que la SUMOylation de Nop58p est apparue récemment dans l'évolution (Westman *et al.*, 2010). L'ajout des groupements SUMO sur NOP58 au niveau du nucléoplasme ou des Corps de Cajal est principalement catalysé par les enzymes SUMO2/3 et moins par SUMO1. Les isopeptidases SEN3/5 sont impliquées dans l'élimination du groupement SUMO se produisant au niveau du nucléole (Westman *et al.*, 2010).

Une étude récente a analysé la présence de structures spécifiques nucléolaires nommées CNoBs (CRM1-Nucleolar bodies) et INB (Intranucleolar bodies) dans les cellules HeLa humaines (Souquere *et al.*, 2015). Les INB sont fibrillaires et présentent une forte concentration des enzymes SUMO1 et SUMO-2/3.

La phosphorylation de la serine 502 de NOP58 est un pré-requis pour la conjugaison d'un groupement SUMO avec la lysine 497. De manière remarquable, les trois acides glutamiques aux positions 503-505 ne se sont pas capables de compenser l'absence de la sérine dans le mutant S502A (Matic *et al.*, 2010). La sérine 502 est situé dans le site consensus de phosphorylation de la caséine kinase II (CK2) ([ST]xx[ED]) (Matic *et al.*, 2010). De plus, la phosphorylation par la caséine kinase II d'un peptide correspondant au motif SUMO-phospho dans NOP58 apparaît favoriser la SUMOylation de NOP58. Fonctionnellement, la SUMOylation de NOP58 est importante pour la liaison au snoRNA (Westman *et al.*, 2010).

Les protéines NOP56 et SNU13 ne semblent pas être des cibles pour des modifications par SUMO. Le fait que la protéine NOP56 humaine est relativement peu SUMOylée même si elle contient aussi un domaine C-terminal riche en lysines, suggère que ce mode de régulation est spécifique pour la protéine NOP58. La modification sélective des certaines protéines cœur mais pas sur d'autres pouvaient indiquer que les modifications post-traductionnelles, et en particulier les SUMOylations, constituent un système général de régulation de la biogenèse des snoRNP.

Chez l'humain, les différences dans les MPT, telles que la SUMOylation des K467 et K497 de NOP58 pourraient souligner les différences fonctionnelles de NOP56 et NOP58 dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D. Le domaine C-terminal (~aa 441-529) très chargé de NOP58 pourrait agir comme un capteur pour réguler la fonction et/ou la quantité de la protéine par le biais des MPT. Les domaines de NOP58 (aa 482-529) et NOP56 (aa 505-603) présentent une localisation nucléolaire et dans les CB, et des versions tronquées de ces domaines NOP58 (aa 1-482) et NOP56 (aa 1-505) résident dans le cytoplasme

(Westman *et al.*, 2010). Ceci suggère que les domaines C-terminaux de NOP56/58 contiennent chacun un NoLS et sont impliqués dans la régulation de la biogenèse et/ou le transport des snoRNP à boîtes C/D vers le nucléole (Westman *et al.*, 2010). Dans le modèle proposé par Westman *et al.*, NOP58 nouvellement traduite est importée rapidement dans le nucléoplasme et s'accumule dans les CB. NOP58 s'associe avec des facteurs d'assemblage des snoRNP et les protéines cœur des snoRNP à boîtes C/D (Westman and Lamond, 2011). La SUMOylation se produit soit dans le nucléoplasme, soit dans les CB ou dans les deux, et favorise les interactions avec les facteurs d'assemblage nécessaires à la restructuration des événements soutenant une association stable de protéines des snoRNP avec le snoRNA (Watkins *et al.*, 2004). Le complexe mature s'accumule ensuite dans le nucléole, où une ou plusieurs molécules SUMO sont libérées de NOP58 par SENP3 et/ou SENP5. Les protéines NOP58 nucléolaires sont plus stables que les protéines NOP58 nucléoplasmiques ce qui peut indiquer le fait que la SUMOylation peut agir comme une « étiquette » de signalisation pour les snoRNP qui ont été assemblées correctement, avec des défauts empêchant la SUMOylation et permettant l'ubiquitination de NOP58 et la dégradation subséquente par le protéasome dans le nucléoplasme (Westman and Lamond, 2011).

La poly(ADP-ribosy)lation (PARylation ou pADPr) est une MPT réversible trouvée chez les eucaryotes supérieurs. Cette modification représente l'un des premiers mécanisme de réponse et de signalisation suite à un stress génotoxique (Lukas *et al.*, 2011). L'activation des poly(ADP-ribose)(PAR) polymérases (PARP, aussi appelé ADP-ribosyltransférases) entraîne la synthèse rapide des chaînes longues ramifiées de PAR, et ce phénomène peut conduire à une augmentation transitoire rapide de 10 à 500 fois plus des niveaux de PAR cellulaires (Hassa *et al.*, 2006). Les polymères PAR sont proposés de jouer un rôle clé dans la régulation de la structure et la modulation de la chromatine, dans la réparation de l'ADN, dans la transcription et dans l'apoptose (Luo and Kraus, 2012).

Des travaux récents montrent que la FBL humaine porte des résidus PARylés (Boamah *et al.*, 2012; Gagne *et al.*, 2012; Jungmichel *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013b). Chez la Drosophile, la perturbation du métabolisme de pADPr soit par PARP1 ou par le PARG (PARG poly(ADP-ribose) glycohydrolase) provoque une mauvaise localisation de la FBL et la fragmentation du nucléole. La PARylation de la Fibrillarine a lieu dans les CB (Kotova *et al.*, 2009).

Une étude spécifique à FBL rapporte que FBL peut être poly-ubiquitinylée, mais ne précise pas sur quel(s) site(s) (Chen *et al.*, 2002). Dans cette étude, l'inhibition de la transcription nucléolaire par le mercure induit une redistribution de la Fibrillarine nucléolaire

(Chen and von Mikecz, 2000), et une co-localisation avec les protéasomes nucléoplasmiques, ainsi qu'une dégradation de la Fibrillarine dépendante du protéasome.

La base de données PhosphoSitePlus (www.phosphositeplus.org) référence 31 résidus modifiés chez la FBL humaine, dont 4 résidus acétylés (K102, K121, K205 et K206), 10 résidus ubiquitinylés (K102, K109, K121, K131, K143, K158, K205, K206, K285, K292), 3 résidus méthylés (R15, R27, R34, R36), 4 résidus SUMOylés (K102, K109, K143, K158), 8 résidus phosphorylés (S6, S116, Y118, S124, S126, T208, T298, Y302) et 1 résidu succinylé (K121). Néanmoins, une partie de ces données sont issues d'expériences de spectrométrie de masse à haut débit, et donc ne sont pas toutes confirmées.

Des études de mutations du domaine GAR, de SILAC, et de spectrométrie de masse ont identifié quatre mono-méthylations d'arginine dans le domaine GAR (Ai et al., 1999; Guo et al., 2014). Des acétylations de lysines ont été décrites chez la FBL humaine dans des échantillons enrichis en peptides acétylés avec des anticorps spécifiques de lysine acétylée (Choudhary et al. 2009; Mertins et al. 2013). Deux phosphosérines pS6 et pS124 (la plus documentée, 28 études) ont été détectées lors d'étude du phosphoprotéome mitotique (Dephoure et al., 2008; Hegemann et al., 2011; Kettenbach et al., 2011; Malik et al., 2009; Olsen et al., 2010; Santamaria et al., 2011) suggérant que certaines MPT de la FBL humaine puissent avoir lieu en réponse à des signaux régulant la prolifération cellulaire, ou lors de l'arrêt de la biogenèse des ribosomes pendant la mitose.

Aucune de ces MPT n'a été l'objet d'études biochimiques dédiées, et bien que les rôles globaux de l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la PARylation soient très étudiés, nous ne disposons d'aucune information concernant leur rôle exact vis-à-vis de FBL et de son activité.

3.4 Les fonctions des snoRNP à boîtes C/D

Les ARN ribosomiques (ARNr) contiennent plusieurs résidus 2'-O-méthylés et pseudouridines, dont la plupart sont regroupés dans des régions fonctionnellement importantes du ribosome, telles que le centre peptidyl transférase (PTC), le centre de décodage et l'interface entre sous-unités (Decatur and Fournier, 2002). La 2'-O-méthylation stabilise les paires de bases uniques ou les liaisons d'hydrogène et peut renforcer ou modifier le repliement de l'ARN (Helm, 2006). Ce type de modification est essentiel pour la croissance cellulaire, tandis que la suppression de certaines modifications individuelles augmente la sensibilité cellulaire à des stress et aux antibiotiques agissant sur le ribosome (Baudin-Baillieu et al., 2009; Liang et al., 2007, 2009). Chez les eucaryotes les 2'-O-méthyles

sont introduits dans les ARNr par l'activité des snoRNP à boîtes C/D. De plus, quelques snoRNP non catalytiques comme la snoRNP U3 est essentielle pour la maturation du précurseur des ARNr. Ainsi, les snoRNP C/D, tout comme les snoRNP H/ACA, sont des acteurs essentiels de la biogenèse des ribosomes.

3.4.1 La biogenèse des ribosomes

Les ribosomes organisés en deux sous-unités ribonucléoprotéiques (**Tableau 10**) sont les composants cellulaires qui participent au décodage du code génétique des phases ouvertes de lecture des ARNm et catalysent la synthèse des protéines dans tous les organismes. Leur biogenèse est l'un des processus les plus complexes et les plus coûteux en énergie de la cellule. Il est ainsi essentiel d'avoir une coordination de l'expression des différents composants participant à ce processus, en fonction des différents statuts cellulaires (nutritionnels, stress environnemental, présence des facteurs de croissance) (Warner, 1999). Cela nécessite une coordination très fine entre la production des protéines ribosomiques, des ARNr et des snoRNP (Fromont-Racine et al., 2003; Henras et al., 2008; Lafontaine and Tollervey, 2001; Venema and Tollervey, 1999). Chez les eucaryotes, ce processus a lieu de manière séquentielle, depuis le nucléole, puis le nucléoplasme, et enfin le cytoplasme. Il implique la transcription et la maturation des ARN pré-ribosomiques, leur repliement correct et l'assemblage avec les protéines ribosomiques, ainsi que le transport des particules pré-ribosomiques dans le cytoplasme, pour les étapes finales de leur maturation. Des nombreux facteurs intermédiaires (protéines et petits ARN) participent de manière transitoire dans les différentes étapes de maturation (Henras *et al.*, 2008), et parmi ces facteurs, les snoRNP C/D et H/ACA réalisent des étapes de modifications de nucléotides, des clivages endonucléolytiques et participent à la formation des particules pré-ribosomiques.

	Archées	Bactéries	Eucaryotes
Ribosome (coefficient de sédimentation)	70S	70S	80S
Grande sous-unité (coefficient de sédimentation)	50S	50S	60S
Nombre de protéines	33	34	46
ARNr	23S 5S	23S 5S	28S 5S 5,8S
Petite sous-unité (coefficient de sédimentation)	30S	30S	40S
Nombre de protéines	20	21	33
ARNr	16S	16S	18S

Tableau 10: Comparaison entre les ribosomes d'archées, bactériens et eucaryotes.

L'assemblage des ARNr (soit un total de ~5500 nt) avec les 79 r-protéines pour former des ribosomes nécessite 76 snoRNA différents et plus de 200 facteurs d'assemblage différents. Non seulement ce processus est coûteux en énergie pour la cellule, mais aussi il doit être réalisé à une vitesse très rapide et en continu, car plus de 2000 ribosomes sont assemblés chaque minute dans une cellule de levure en croissance rapide (Warner, 1999)(Warner 1999).

La biogenèse du ribosome est également soumise à une inspection rigoureuse, et des mécanismes complexes assurent un contrôle qualité. Ce contrôle est couplé à l'export des pré-ribosomes vers le nucléoplasme et comprend des étapes cytoplasmiques de contrôle, juste avant les dernières étapes de la construction des sous-unités.

Parce que la production des ribosomes est étroitement liée à la croissance et à la prolifération cellulaire, la dérégulation de leur assemblage a de profondes conséquences. Des mutations dans la plupart des facteurs d'assemblage et des r-protéines qui mènent à leur perte de fonction complète sont létales chez la levure et chez les embryons des métazoaires. Une perte de fonction partielle, ou haplo-insuffisance des ribosomes chez l'homme peut se manifester comme une variété de maladies, dites ribosomopathies, y compris une petite taille, du retard mental, des anomalies articulaires, des aplasies médullaires, des dysmorphies cranio-faciales, ou encore la prédisposition au cancer.

3.4.1.1 Transcription des pré-ARNr par l'ARN polymérase I

Chez les eucaryotes, la biogenèse des ARNr et son incorporation dans les sous-unités ribosomiques est un processus complexe qui commence dans le nucléole avec la synthèse par l'ARN polymérase I d'un précurseur pré-ARNr 35S chez la levure et 45S chez l'homme et par la transcription dans le nucléoplasme du pré-ARNr 5S par l'ARN polymérase III. Les ARNr 18S, 5,8S et 28S sont libérés durant les étapes de maturation du pré-ARNr 35S/45S. Dans le précurseur pré-ARNr, les séquences des ARNr sont bordées au niveau des extrémités du transcrit par des régions appelées 5'-ETS et 3'-ETS (*External Transcribed Spacer*); les séquences 18S, 5.8S et 25/28S sont séparées par les régions ITS1 et ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*). Le transcrit primaire naissant est modifié par des snoRNA et s'associe avec une multitude de facteurs d'assemblage et de protéines ribosomiques dans des particules pré-ribosomiques 90S (Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002; Osheim et al., 2004). Il subit alors des étapes successives de maturation, qui consistent dans un premier temps à éliminer la région 5'-ETS de l'ARNr 35S (donnant naissance à l'ARNr 32S) (Gallagher et al., 2004; Lee and Baserga, 1997). Puis, après clivage au niveau du site A2 présent dans la séquence ITS1, entre les ARNr 18S et ARNr 5.8S, la particule pré-ribosomique 90S se divise alors en deux complexes indépendants correspondant aux particules ribosomiques pré-40S et pré-60S. Les sous-unités ribosomiques sont ensuite maturées et assemblées pour former les ribosomes dans la cytoplasme (Henras *et al.*, 2008).

3.4.1.2 Les étapes de maturation des pré-ARNr

Les quatre séquences espaceurs transcrites au sein du pré-ARNr sont éliminées par des réactions de clivage endonucléolytique et exonucléolytique (Venema and Tollervey, 1995) (**Figure 21**). Ce processus commence habituellement avec le clivage par l'endonucléase RNase III Rnt1p pour générer l'extrémité 3' du pré-ARNr primaire 35S (Kufel et al., 1999). Les clivages du pré-ARNr 35S peuvent se produire soit dans la région 5' ETS soit dans la séquence ITS1, à l'un des sites A0, A1, ou A2. La séquence 5' ETS est éliminée en deux étapes: le clivage au site A0 qui génère le pré-ARNr 33S, puis le clivage au site A1 qui produit le pré-ARNr 32S (Beltrame et al., 1994; Hughes and Ares, 1991). Le clivage au site A2 dans l'ITS1 génère les pré-ARNr 20S et 27SA2, divisant la voie de biogenèse des pré-ARNr et la maturation des sous-unités (Udem and Warner, 1972). Le clivage dans l'ITS1 peut également être fait par la RNase MRP (mitochondrial ARN processing) au niveau du site A3, produisant les pré-ARNr 23S et 27SA3 (Lygerou et al., 1996).

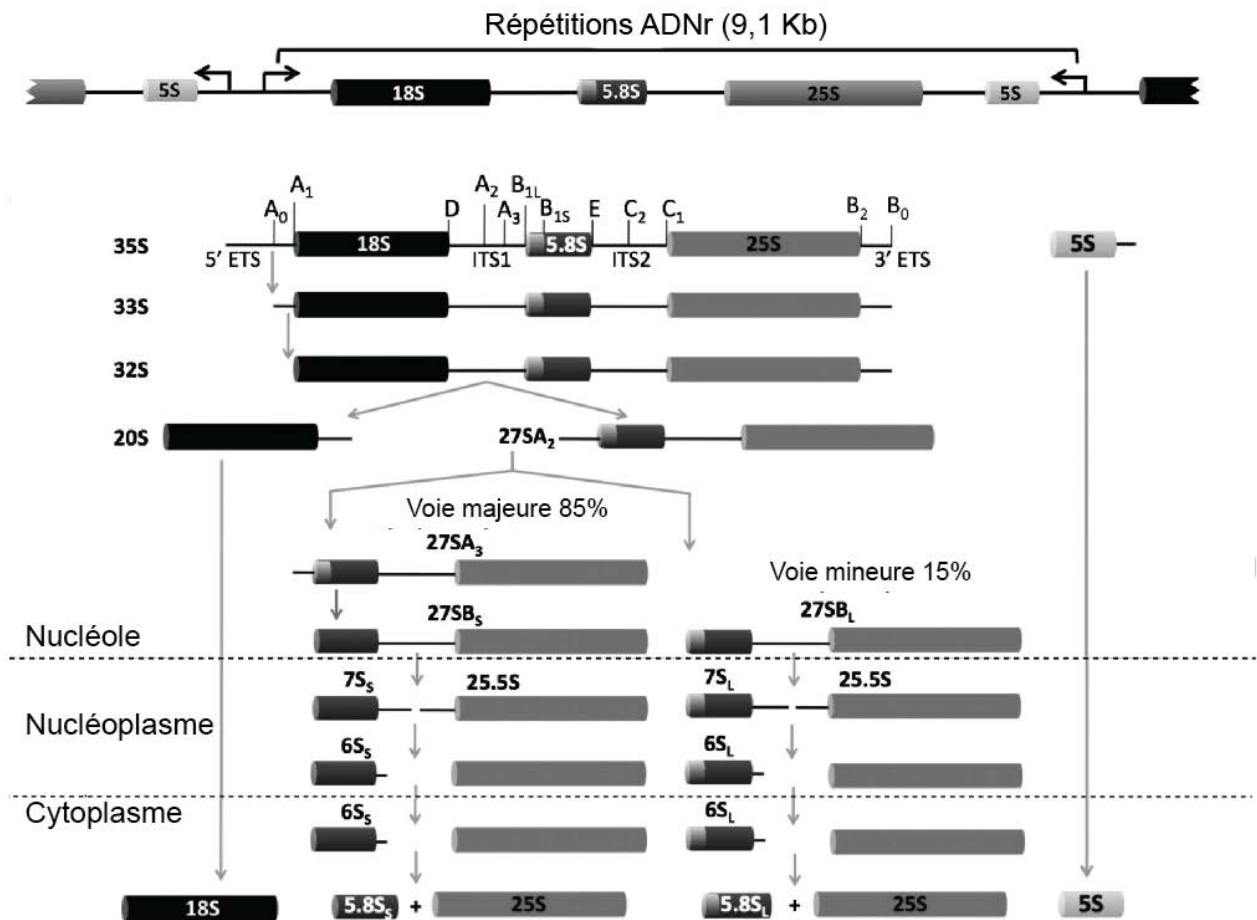


Figure 21 : Maturation des pré-ARNr chez la levure. Le pré-ARNr 35S est transcrit par l'ARN Polymérase I et contient les séquences pour les ARNr 18S, 5.8S, et 25S (cylindres noirs, gris foncé et gris claire), séparées par des séquences ETS (External Transcribed Spacer) et ITS (Internal Transcribed Spacer), représentées par des lignes solides. Le pré-ARNr 5S (cylindre blanc) est transcrit par l'ARN Polymérase III. Les séquences espaceurs sont éliminées du pré-ARNr par des étapes de clivage endo- et exonucléolytique, au niveau des sites indiqués. Le processus commence dans le nucléole mais des étapes de maturation ont lieu dans le nucléoplasme et cytoplasme. Pendant les divisions cellulaires rapides, la plupart des pré-ARNr subissent des clivages co-transcriptionnelles aux sites A0, A1 et A2, avant la fin de la transcription. Tiré de Woolford and Baserga, 2013.

Le pré-ARNr 20S est intégré dans des particules pré-RNP 43S et le pré-ARNr 27SA2 se trouve dans le pré-rRNP 66S (Udem and Warner, 1972). Les pré-rRNP 43S sont exportées du nucléole à travers le nucléoplasme vers le cytoplasme, où le pré-rARN 20S subit un clivage endonucléolytique au niveau du site D pour supprimer les séquences ITS1 restantes, produisant ainsi l'ARNr 18S mature (Fatica et al., 2003). En revanche, la maturation de préribosomes 66S est plus complexe et plus longue. La maturation du pré-ARNr 27SA2 continue dans le nucléole par deux voies alternatives:

1. Environ 85 à 90% de pré-ARNr 27SA2 évoluent vers l'intermédiaire 27SA3 par clivage endonucléolytique par la RNase MRP sur le site A3 dans l'ITS1 (Lygerou et al., 1996; Shuai and Warner, 1991). Les autres séquences ITS1 sont éliminées du pré-ARNr 27SA3 par les exonucléase 5'-3' Rat1p et Rrp17p qui s'arrêtent au niveau du site B1S pour former l'extrémité 5' du pré-ARNr 27SBS (Oeffinger et al., 2009).
2. Les autres 10 à 15% des pré-ARNr 27SA2 sont directement clivés au niveau du site B1L dans le pré-ARNr 27SA2, par une endonucléase inconnue, pour générer le pré-ARNr 27SBL. Les pré-ARNr 27SB_S et 27SB_L subissent un traitement identique par un clivage endonucléolytique au site C2 dans l'ITS2 pour générer le pré-ARNr 25.5S et 7S_S ou 7S_L. L'extrémité 5' de l'ARNr 25.5S est clivée par Rat1p pour former les ARNr 25S matures (Geerlings et al., 2000). Les extrémités 3' du pré-ARNr 7S sont traitées en plusieurs étapes pour produire les ARNr 5.8S_S et 5.8S_L matures (différence de 6 nt à leur extrémité 5') (Henry et al., 1994; Mitchell et al., 1996). Cette hétérogénéité dans l'extrémité 5' des ARNr 5.8S est conservée parmi les eucaryotes, bien que sa signification reste incertaine. Les deux formes sont fonctionnelles, étant donné que les deux sont présentes dans les polyribosomes.

Bien que les intermédiaires pré-ARNr soient des repères utiles pour la progression de l'ensemble de la sous-unité, il n'y a pas nécessairement un ordre obligatoire dans la voie de biogenèse complète. Bien que parfois une étape de maturation soit un prérequis pour initier l'étape suivante (Lamanna and Karbstein, 2011; Vos et al., 2004), dans d'autres cas, le blocage d'une étape n'empêche pas des étapes ultérieures de se produire (Torchet and Hermann-Le Denmat, 2000). Ainsi, l'ordre apparent des étapes peut être dicté par la vitesse relative à laquelle ces sites sont identifiés et sont utilisés, plutôt que simplement par la fin d'une étape précédente.

3.4.1.3 La maturation et la modification des ARNr s'effectue de manière co-transcriptionnelle

Des études portant sur l'analyse de la chromatine chez la levure (Osheim *et al.*, 2004) ont révélé un clivage co-transcriptionnel dans la majorité des transcrits pré-ARNr naissants. D'autres études, basées sur des dosages biochimiques quantitatifs et des modélisations mathématiques du clivage (Kos and Tollervey, 2010), montrent que 70% des transcrits ont été clivés de manière co-transcriptionnelle. Cependant, le clivage en ITS1 n'est pas obligatoire. Chez la levure le mécanisme peut être à la fois post- et co-transcriptionnel. L'ARNr naissant s'associe précocement avec de nombreux facteurs dans une particule pré-ribosomique 90S appelée processome SSU (Zhang *et al.*, 2016b).

Chez l'homme, la nucléoline se lie à un motif évolutivement conservé (ECM) au niveau du site A' dans la région 5' ETS et stimule le recrutement de la snoRNP U3 sur le pré-ARNr *in vitro* (Ginisty *et al.*, 1998). Cette étape n'est pas dépendante de l'appariement des bases entre le snoRNA U3 et l'ARNr pour l'intégration de la snoRNP U3 dans le processome SSU (Ginisty *et al.*, 1998). Cela suggère que la nucléoline joue un rôle clé dans le recrutement de la snoRNP U3. La nucléoline, la protéine nucléolaire la plus abondante, est impliquée dans de nombreux processus, et un excès de cette protéine bloque la maturation du pré-ARNr chez des oocytes de *Xenopus sp.* (Roger *et al.*, 2003). Par conséquent, l'association de la nucléoline avec la snoRNP U3 peut aider à réguler l'interaction de cette protéine avec le pré-ARNr. En outre, la nucléoline contribue possiblement au recrutement du complexe 50S sur le pré-ARNr et sur les séquences du snoRNA U3 qui s'apparient avec l'extrémité 5' ETS, qui ne sont pas nécessaires pour la formation de la SSU processome. Le recrutement du complexe 50S sur le pré-ARNr est probablement aussi médié par la protéine de liaison à l'ARN RRP5. En effet, cette protéine s'est avérée essentielle pour la production d'ARNr 18S dans les cellules humaines (Sweet *et al.*, 2008).

En plus de la RNase MRP et de la snoRNP U3, il y a 3 autres snoRNP qui jouent un rôle dans le traitement du pré-18S: U14, snR30 (U17, E1) et snR10 (Kiss *et al.*, 2010; Watkins and Bohnsack, 2012). U14 est un snoRNA à boîtes C/D et snR30 et snR10 sont des snoRNA à boîtes H/ACA (**Tableau 11**). Les snoRNA U14 et snR30 sont codés par des gènes essentiels mais pas le snR10. Le U14 et le snR10 effectuent un double rôle à la fois dans le traitement des pré-ARNr et il réalise des modifications sur l'ARNr (Liang *et al.*, 2010). Contrairement à ces deux snoRNP mais de la même manière que le U3, le snR30 s'apparie au pré-ARNr pour participer au traitement pré-18S mais il n'a pas de cible ARN connue (Atzorn *et al.*, 2004; Lemay *et al.*, 2011). Le snoRNP snR30 s'associe spécifiquement avec les protéines Utp23 et Kri1 (Hoareau-Aveilla *et al.*, 2012) et il y a des données suggérant que

Utp23p est nécessaire pour la libération de snR30 des pré-ribosomes en cours d'assemblage. L'ARN snR30 a été montré être requis pour l'assemblage du processome SSU (Hoareau-Aveilla *et al.*, 2012).

snoRNA	Classe	Essentiel ?	Fonction
U3	Box C/D	Oui	Maturation
U14	Box C/D	Oui	Maturation et 2'-O-méthylation
snR30	Box H/ACA	Oui	Maturation
snR10	Box H/ACA	Non	Maturation et pseudouridylation
RNase MRP	Unique	Oui mais pas pour la maturation	Maturation

Tableau 11: Les snoRNA de levure participant dans le traitement du pré-rARN 18S.

Alors que de nombreux facteurs protéiques et des complexes snoRNP sont nécessaires pour réaliser les clivages dans la biogenèse nucléolaire du pré-ARNr SSU, l'identification des enzymes de clivage pour la biogenèse du 18S a été plus difficile. La protéine Utp24, qui contient un domaine PINc (associé avec une activité nucléase) a été proposée comme enzyme de clivage aux sites A1 et A2 (Bleichert *et al.*, 2006). Des mutations des résidus dans le site actif prédit de la Utp24p provoquent une croissance réduite des cellules et des défauts de clivage au niveau des sites A1 et A2, en accord avec un rôle d'endonucléase de clivage pour ces étapes de la biogenèse nucléolaire de la SSU. La protéine cyclase-like, Rcl1, a également été proposé avoir une activité endonucléase qui clive au niveau du site A2 (Horn *et al.*, 2011) car Rcl1p recombinante clive l'ARNr contenant le site A2 *in vitro* (Delprato *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2011).

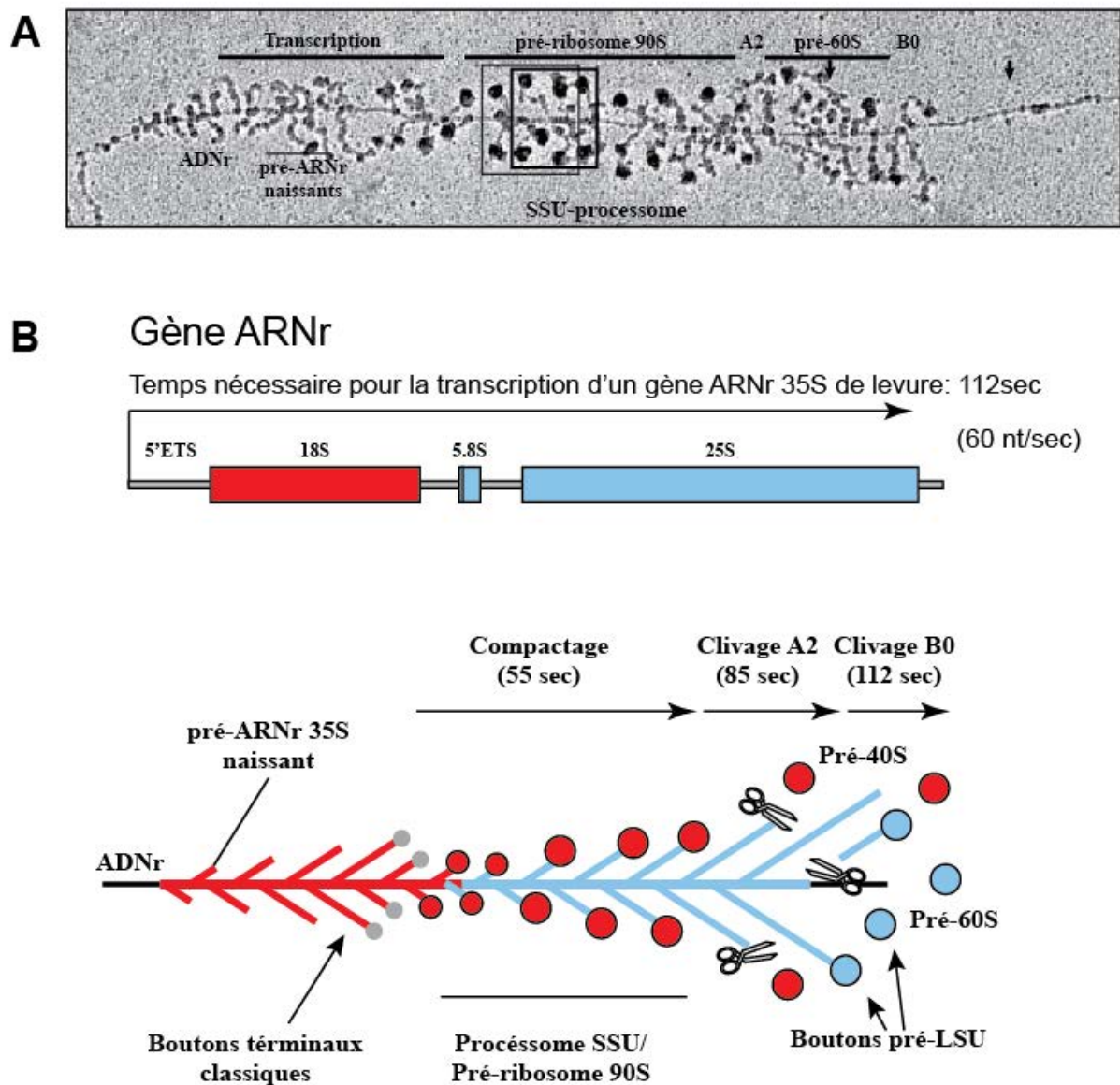


Figure 22 : Formation co-transcriptionnelle des particules pré-ribosomiques chez *Saccharomyces cerevisiae*. **(A)** Image de microscopie électronique d'un gène d'ADNr en cours de transcription. **(B)** Représentation schématique des divers étapes d'assemblage des pré-ribosomes sur le pré-ARNr naissant. Chez *S. cerevisiae* les clivages aux sites A0, A1 et A2 ont lieu de façon co-transcriptionnelle. Adapté de Osheim et al., 2004.

L'assemblage des ribosomes débute de manière co-transcriptionnelle, par la formation d'une grande particule contenant le pré-ARNr 35S, sur lequel des nombreux facteurs non-ribosomiques s'associent de manière transitoire (Tschochner and Hurt, 2003). Cette particule initiale a un haut poids moléculaire, et contient en principal des facteurs impliqués dans la maturation de l'ARNr 18S, qui est incorporé dans la particule pré-40S. Le complexe pré-60S est assemblé ultérieurement, mais ce processus commence aussi de manière co-transcriptionnelle (Osheim *et al.*, 2004). L'assemblage des ribosomes débute par le recrutement de protéines ribosomiques, d'autres facteurs non-ribosomiques et des RNP sur le pré-ARNr 35S naissant. (Kressler *et al.*, 2010). Dans ce stade, un bouton terminal se forme à l'extrémité 5' de l'ARNr 35S (Miller and Beatty, 1969; Osheim *et al.*, 2004) (**Figure 22B**). L'observation par microscopie électronique de ces éléments permet la visualisation des structures dites en « arbre de Noël » (Osheim *et al.*, 2004) (**Figure 22A**). Après le clivage au site A2, d'autres bourgeons terminaux apparaissent, l'extrémité 5' du transcrit primaire, qui vont être incorporés dans la particule pré-60S (Osheim *et al.*, 2004) (**Figure 22**).

Alors que la fonction de guidage des modifications est relativement bien comprise pour les snoRNP à boîtes C/D, ces particules peuvent également exercer d'autres fonctions. Certains snoARN eucaryotes à boîtes C/D ou H/ACA exercent des fonctions autres que la modification de l'ARN (Henras *et al.*, 2008; Phipps *et al.*, 2011). Un exemple est la snoRNP à boîtes C/D U3, qui est un acteur essentiel de l'activité au sein du processome, et nous allons par la suite détailler son mécanisme d'action. D'autres snoRNP participent à l'activité du processome. En plus de la snoRNP U3 et d'autres snoRNP de modification, de nombreux facteurs participant à la biogenèse de la SSU s'associent à la pré-ARNr SSU. Un grand nombre des composants protéiques de processome SSU contiennent des domaines d'interaction protéine-protéine, comme des répétitions WD, bien qu'il existe aussi des domaines de liaison à l'ARN connus identifiables. Certaines r-protéines de la SSU peuvent également être retrouvées associés avec la snoRNP U3 (Bernstein *et al.*, 2004). Cependant, des facteurs d'assemblage spécifiques pour la biogenèse de la LSU ne sont pas retrouvés associés au processome SSU chez la levure. Lorsqu'elles sont épuisées, la quasi-totalité des protéines essentielles provoquent des défauts de clivage du pré-ARNr au niveau des sites A0, A1, et A2. La perturbation ou la déplétion des protéines non essentielles provoque une cryosensibilité, une caractéristique bien connue dans les défauts d'assemblage des ribosomes (Guthrie *et al.*, 1969), et dans les défauts de clivage au niveau des sites A1 et A2. La voie de l'assemblage et de la structure de la particule 90S a été étudiée récemment en analysant les constituants des particules 90S de levure associés à l'ARNr 18S (Zhang *et al.*, 2016b). Il a été déterminé qu'un nombre de 65 protéines et les snoRNA C/D U3, U14 et snoRNP H/ACA snR30 sont co-purifiés, révélant un processus d'assemblage dynamique et

séquentiel. La nucléation du complexe 90S peut être initiée par la région 5' ETS. Lorsque la structuration de l'ARNr 18S est presque terminée, le processome 90S subit une réorganisation, libérant des snoRNP U14, snR30, et un jeu de 14 protéines. Il existe aussi des complexes 90S entièrement assemblés n'ayant pas subi de maturation de la région 5' ETS (Zhang *et al.*, 2016b).

Chez la levure, les snoRNP à boîtes H/ACA catalysent la pseudouridylation de 55 sites sur l'ARNr, alors que les snoRNP à boîtes C/D catalysent la 2'-O-ribose méthylation de 44 sites (Decatur and Fournier, 2002). La méthylation co-transcriptionnelle a aussi lieu dans les ARNr humains, où il y a deux fois plus de modifications que chez l'ARNr de levure (102 sites pseudouridylés et 93 sites méthylés) (Decatur and Fournier, 2002 et pour revue Lafontaine, 2015; Watkins and Bohnsack, 2012).

Les modifications se produisent dans des séquences des ARNr matures qui ont une importance fonctionnelle dans le ribosome (Decatur and Fournier, 2002). Ces modifications sont importantes pour un fonctionnement optimal du ribosome, car les ribosomes où celles-ci font défaut présentent une efficacité réduite de traduction (Jack *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2007).

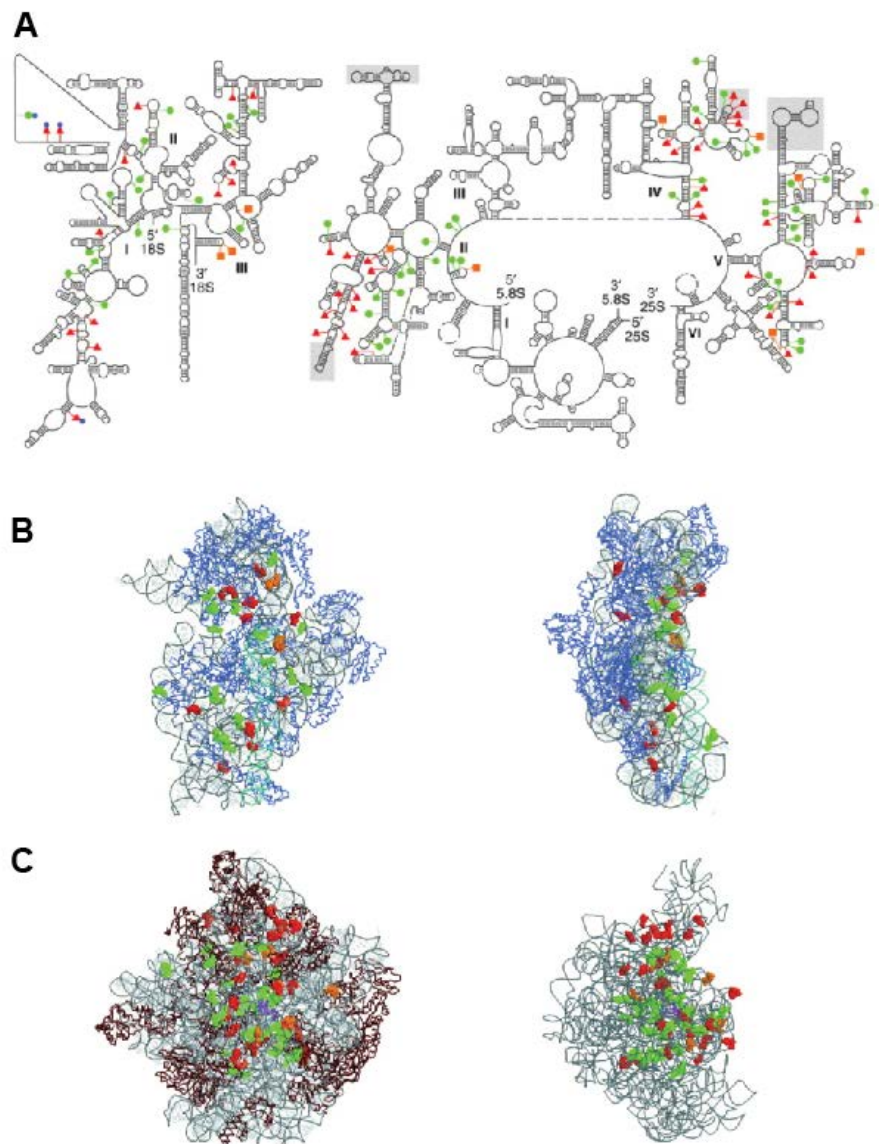


Figure 23 : Sites de modification des ARNr chez la levure. L'ARNr de *Saccharomyces cerevisiae* est estimé à contenir 109 modifications, et les positions de nucléotides sont connus pour 108 d'entre eux. Les sites prédits sont présentés dans les sous-unités ribosomiques tridimensionnelles pour toutes les 44 pseudouridines (Ψ), 54 (sur 55) 2'-O-méthylations (Nm) et 10 (~10) méthylations de bases (mN). La distribution de ces modifications dans la petite (SSU) et grande sous-unité (LSU) sont les suivantes: Ψ (rouge), 14/30; mN (orange), 3/7; Nm (vert), 17/37. **(A)** Structure secondaire des ARNr montrant les sites de modification pour l'ARNr 18S (à gauche) et les ARNr 25S-5.8S (à droite). Les domaines d'ARNr sont identifiés par des chiffres romains; les zones ombrées indiquent des segments importants présents chez la levure mais absents dans la structure cristalline de la LSU. Les points bleus marquent des modifications situées dans l'ARNr 18S sans équivalent dans les organismes archées ou bactériens, et absentes dans la structure tridimensionnelle de la SSU. **(B)** Les positions des modifications chez la levure dans deux vues de la SSU. L'hélice 44 est représentée en cyan. **(C)** Sites de modification chez la levure dans deux vues de la LSU. Le code couleur est le même que dans (A) et des nucléotides modifiés se distinguent en montrant le volume atomique plein; le squelette de l'ARNr est coloré en gris et les protéines en bleu pour la SSU, marron pour la LSU. Extrait de Decatur and Fournier, 2002.

3.4.1.3.1 Le snoRNA U3

Le snoRNA à boîtes C/D U3 a été le premier snoRNA identifié (découvert en 1968 et initialement dénommé snR17 chez la levure), et est devenu depuis le plus largement étudié des snoRNA. Il est enrichi dans le nucléole et co-purifie avec les ribosomes. C'est un élément central du processome SSU et il est essentiel pour les étapes précoces de la maturation de l'ARNr 18S (Phipps *et al.*, 2011). Le snoRNA U3 est le snoRNA le plus abondant dans la cellule, et a des particularités par rapport aux autres snoRNA : il ne réalise pas de réactions de 2'-O-méthylation, et il est essentiel pour les clivages précoces du pré-ARNr aux sites A0, A1 et A2. Son absence conduit à un arrêt de la maturation des pré-ARNr aux sites A0, A1, et A2, ce qui entraîne une accumulation des complexes 35S non traités, l'absence des ARNr 18S, et une létalité cellulaire (Phipps *et al.*, 2011). Il est évolutivement conservé et il a été identifié chez tous les eucaryotes examinés jusqu'à présent (Charette and Gray, 2009).

Les précurseurs du snoRNA U3 sont transcrits chez la plupart des eucaryotes par l'ARN Polymérase II. Chez la levure, l'ARN mature est généré à partir de ces précurseurs qui subissent un clivage endonucléolytique à leur extrémité 3', suivi d'un traitement exonucléolytique. Ces précurseurs se terminent par des séquences poly(U) et sont normalement stabilisés par la liaison de la protéine Lhp1. Ce processus nécessite la participation des protéines Lsm (Like-Sm) nucléaires. Le complexe heptamérique Lsm 2-8 joue un rôle de chaperonne permettant de stabiliser l'extrémité 3' durant les étapes de clivage (Kucera *et al.*, 2011) en conjonction avec Lhp1p. Le complexe Lsm semble fonctionner comme un « back-up » pour stabiliser les extrémités 3' qui ne sont pas protégés par Lhp1p. Ces facteurs sont également impliqués dans la maturation des transcrits de l'ARN polymérase III.

Ses particularités structurelles sont dues à son architecture unique: il contient deux motifs en K-turn, le motif C'/D qui recrute les protéines cœur des snoRNP à boîtes C/D, et un motif B/C qui recrute les protéines Snu13/SNU13 et Rrp9/h55K. Cette dernière est spécifique pour le snoRNA U3 (Fournier *et al.*, 1998; Jeppesen *et al.*, 1988; Parker and Steitz, 1987; Samarsky and Fournier, 1998; Segault *et al.*, 1992) (**Figure. 24**). Sa structure secondaire peut être divisée en trois domaines, chacun avec des éléments de séquences spécifiques, des composants protéiques et des fonctions distinctes: un domaine impliqué dans des interactions d'appariement de bases avec le pré-ARNr, une partie constituée par les régions charnières 5' et 3', et une domaine terminal en tige-boucle 3' contenant les motifs C/D (Mereau *et al.*, 1997; Samarsky and Fournier, 1998).

Le domaine 5' est aussi nommé le domaine fonctionnel, et contient les boîtes très conservées GAC, A' et A (Myslinski *et al.*, 1990). Ces éléments de séquence sont complémentaires à l'extrémité 5' et à une région interne de l'ARNr 18S (Antal *et al.*, 2000; Beltrame and Tollervey, 1992; Mereau *et al.*, 1997). Des interactions entre les séquences antisens dans le snoRNA U3 et le pré-ARNr ont été identifiées, et ces interactions sont conservées dans la phylogénie (Hughes, 1996).

La région « charnière » (3'-hinge), du snoRNA U3 est généralement non structurée (Jeppesen *et al.*, 1988; Parker and Steitz, 1987), exceptée une petite structure en tige-boucle centrale trouvée dans de nombreux organismes (y compris la levure - Mereau *et al.*, 1997), qui est associée au sous-complexe Mpp10 du processome SSU (Gerczei and Correll, 2004; Gerczei *et al.*, 2009). Les séquences 5' et 3' de cette région peuvent fournir un espacement approprié entre le domaine 5' (avec fonction de liaison au pré-ARNr) et le domaine 3' du snoRNA U3 (lié aux complexes protéiques) (Borovjagin and Gerbi, 2000; Samarsky and Fournier, 1998). Des appariements se produisent également entre la séquence de la région charnière et la région 5' ETS du snoRNA U3 (Borovjagin and Gerbi, 2004, 2005).

La structure secondaire du domaine 3' du snoRNA U3 s'organise en une tige-boucle prolongée et ponctuée par un certain nombre de structures en tige-boucle courtes, formant une structure cruciforme chez la levure (Samarsky and Fournier, 1998). Toute cette région est très variable chez les snoRNA U3 de différents organismes (Samarsky and Fournier, 1998) et il varie significativement entre les espèces (en structure et taille) (Parker and Steitz, 1987; Segault *et al.*, 1992). Toutefois, ce domaine en tige-boucle 3' contient dans cet ordre les boîtes C', B, C et D et est impliqué dans les interactions avec les protéines de la snoRNP U3 (Jeppesen *et al.*, 1988; Parker and Steitz, 1987), dans la stabilité de l'ARN, et dans la localisation nucléolaire (Clery *et al.*, 2007; Granneman *et al.*, 2009; Marmier-Gourrier *et al.*, 2003). Cette région contient également deux motifs en K-turn formés par l'association entre les séquences C' et D formant le motif C'/D qui est l'analogue des motifs présents dans les autres snoRNA C/D, et les séquences B et C formant le motif B/C qui est spécifique du snoRNA U3 (Marmier-Gourrier *et al.*, 2003).

L'importance de ces éléments structuraux a été intensivement étudiée par rapport à leur biogenèse et leur fonction chez la levure. (Hughes, 1996; Marmier-Gourrier *et al.*, 2003; Mereau *et al.*, 1997). Ainsi, les boîtes C' et D sont nécessaires pour la stabilité du snoRNA U3, pour l'hyperméthylation de la coiffe et pour sa localisation dans le nucléole. Les boîtes B et C sont en revanche importantes pour la fonction de la snoRNP U3, mais elles ne sont pas nécessaires pour la production du snoRNA ou pour son adressage nucléolaire. Le domaine 5' n'est pas nécessaire non plus pour la production de l'ARN U3. Chez l'homme, la boîte C

est nécessaire pour le maintien des taux normaux de snoRNA U3 (Granneman et al., 2004), ce qui représente une différence par rapport à la levure, qui indique le fait que la biogenèse et la stabilité de la snoRNP U3 humaine est plus complexe et plus dépendante du motif B/C (Granneman et al., 2004).

3.4.1.3.1.1 La snoRNP U3

En utilisant l'appariement de bases avec son snoRNA, la snoRNP U3 participe au clivage du pré-ARNr 35S et peut agir comme une chaperonne dans le repliement de l'ARN (Beltrame and Tollervey, 1992, 1995; Mereau et al., 1997). De plus, il existe d'autres snoRNA eucaryotes qui ont acquis des fonctions dans la biogenèse des pré-ARNr (Chen et al., 2016; Watkins and Bohnsack, 2012).

La snoRNP U3 contient les quatre protéines cœur retrouvés associées aux snoRNP à boîtes C/D (Snu13p/SNU13, Nop1p/Fibrillarine, NOP56/58) et en plus une cinquième protéine qui lui est spécifique, Rrp9/U3-55K (Lubben et al., 1993; Venema et al., 2000; Watkins et al., 2004; Watkins et al., 2000), et qui est essentielle à la viabilité cellulaire et pour la fonction de la snoRNP U3. Ces deux protéines homologues, qui sont requises pour la viabilité cellulaire, se sont avérées essentielles pour la fonction de la snoRNP U3 (Granneman et al., 2004; Lukowiak et al., 2000; Venema et al., 2000), et contiennent dans leur structure 7 domaines WD40 (Granneman et al., 2002; Pluk et al., 1998). Le recrutement de Rrp9p/U3-55K sur l'ARN nécessite le recrutement préalable de la protéine Snu13/SNU13 au niveau du motif B/C (Clery et al., 2007; Granneman et al., 2002). Chez l'humain, les motifs WD40 C-terminaux participent à l'interaction avec U3-55K *in vitro* (Clery et al., 2007; Granneman et al., 2002). Chez la levure, il a été montré au laboratoire que 3 paramètres sont importants pour la liaison de Rrp9p sur l'ARN : une paire de bases G-C inversée dans l'hélice II du K-turn, l'hélice I contenant une seule paire de bases, et un résidu G en position 1 du K-turn (Clery et al., 2007). De plus, il existe deux sites au niveau des hélices 2 et 4 du snoRNA U3 importants pour la fixation de Rrp9p sur l'ARN (Granneman et al., 2009).

Après l'incorporation dans les pré-ribosomes, d'autres facteurs sont recrutés, comme le complexe MPP10 (Mpp10p-Imp3p-Imp4p) et les protéines Dhr1, Rcl1, Sof1 et Bms1, (Bax et al., 2006; Colley et al., 2000; Granneman et al., 2003; Horn et al., 2011; Karbstein et al., 2005; Lee and Baserga, 1999).

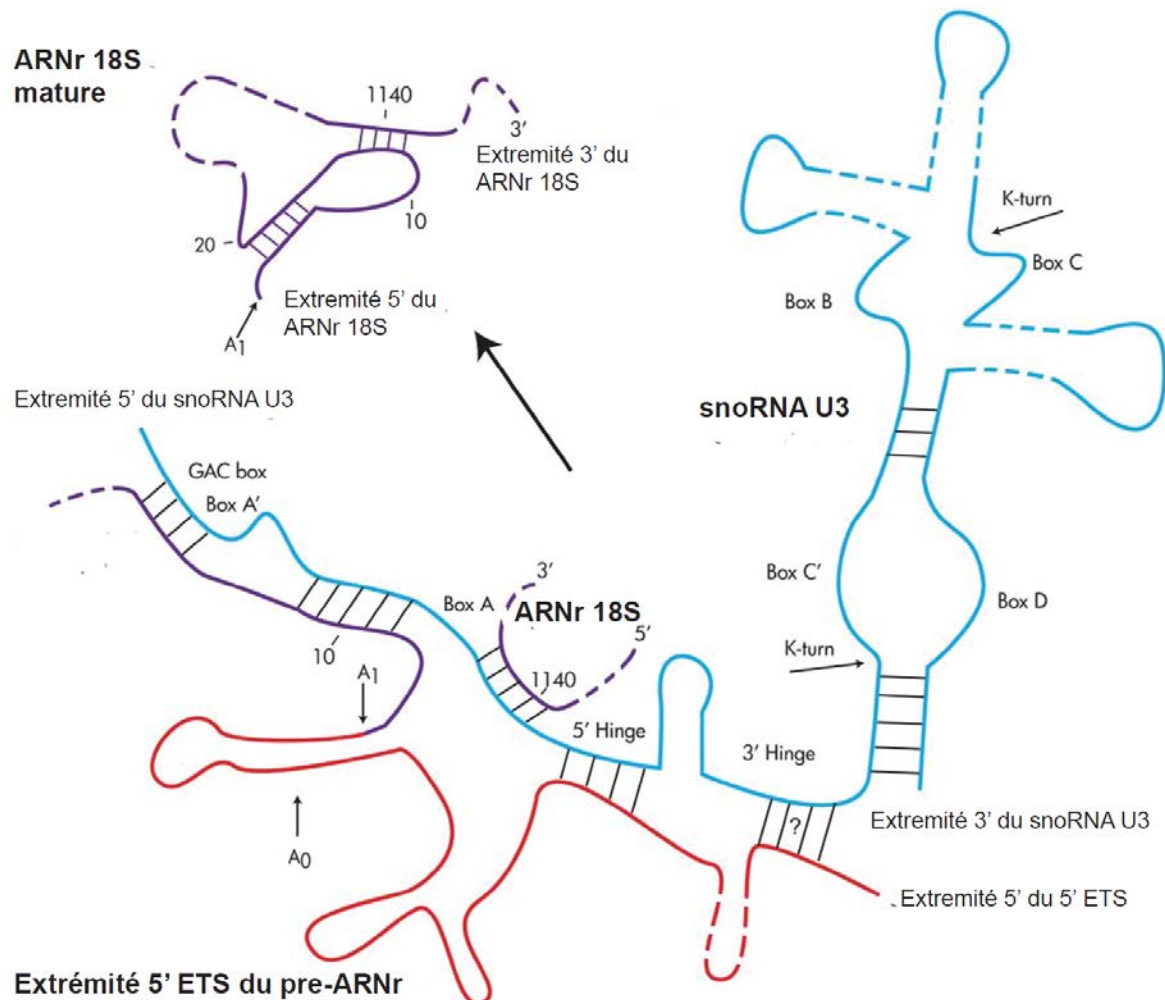


Figure 24 : Structure secondaire du snoRNA U3 (snR17A) de *Saccharomyces cerevisiae* interagissant avec le pré-ARNr 18S. Les différentes séquences conservées sont indiquées. Le domaine 5' (domaine fonctionnel) et le domaine 3' sont séparés du par une région charnière. (3' *hinge*). Le snoRNA U3 s'apparie avec le pré-ARNr 18S pour diriger les clivages au niveau des sites A0, A1, et A2. Les lignes colorées correspondent aux différents ARN. snoRNA U3 - bleu; ARNr 18S mature - violet; Extrémité 5' ETS du pré-ARNr - rouge. Adapté de Phipps *et al.*, 2011.

. Le motif C'/D du snoRNA U3 est un motif C/D non canonique, qui détermine une structuration du motif en K-turn qui est non-optimale pour la fixation de la protéine Snu13/U3-55K (Marmier-Gourrier *et al.*, 2003; Nottrott *et al.*, 1999). Cependant le motif C'/D est fonctionnel dans la snoRNP U3. L'équipe de N.J. Watkins (Knox *et al.*, 2011) a montré que le recrutement de la protéine Rrp9 sur le motif B/C favorise une fonctionnalité optimale du motif C'/D pour le recrutement des autres protéines cœur sur le motif C'/D.

Les interactions entre l'ARN et les protéines de la snoRNP U3 de levure ont été identifiées par une approche CRAC (séquençage à haut débit des fragments d'ARN retenus après pontage covalent avec les protéines d'intérêt) (Granneman *et al.*, 2009). Ces expériences ont montré que la protéine Nop58 se fixe sur l'hélice II du motif C'/D et la Fibrillarine et Nop56p à la base de l'hélice 3, à proximité du motif B/C. Dans un modèle pseudo-symétrique d'assemblage de la snoRNP U3 (**Figure 25**), le motif C'/D est associé aux protéines SNU13 et NOP58, alors que le motif B/C est associé avec les protéines SNU13, U3-55K et NOP56. Deux protéines Fibrillarine seraient aussi associées au complexe, par interaction avec NOP56/NOP58.

La protéine humaine SIRT7 (une déacétylase NAD(+)-dépendante), a des rôles importants dans la biogenèse des ribosomes et dans la prolifération cellulaire. Elle est associée à l'ARN polymérase I, interagit avec les ARN pré-ARNr et favorise la synthèse des ARNr. SIRT7 est également associée à des snoRNA. L'absence de SIRT7 altère les étapes précoces de clivage dépendantes du snoRNA U3, nécessaires pour la génération de l'ARNr 18S. Mécaniquement, SIRT7 déacétyle la protéine U3-55k (Rrp9p chez *S. cerevisiae*) spécifique du snoRNA U3 et l'acétylation réversible de U3-55k module l'association de U3-55k avec le snoRNA U3. La déacétylation par SIRT7 améliore la liaison de U3-55k au snoRNA U3, qui est une condition préalable pour la maturation des pré-ARNr. Dans des conditions de stress, SIRT7 est libérée des nucléoles, conduisant à une hyperacétylation de U3-55k et des défauts dans la maturation des ARNr (Chen *et al.*, 2016).

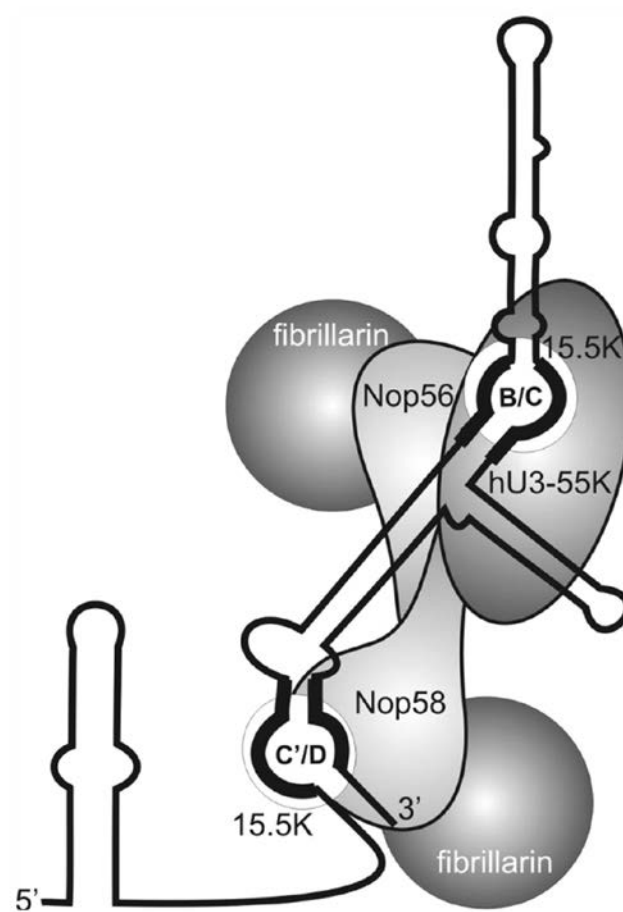


Figure 25 : Représentation schématique de la snoRNP U3. La structure secondaire de U3 est montrée en noir, avec les motifs C'/D et B/C et les protéines associées indiquées. Tiré de Knox *et al.*, 2011.

3.4.1.3.2 Le snoRNA U14

Le snoRNA à boîtes C/D U14 est présent chez tous les eucaryotes, où il a une double fonction. Il est nécessaire à la fois pour le traitement de l'ARNr 18S chez la levure (mais pas chez le xénope), et pour la méthylation de l'ARNr 18S (Dunbar and Baserga, 1998; Enright et al., 1996; Li et al., 1990). Il s'apparie avec deux régions adjacentes dans la boucle présente dans la moitié 5' de l'ARNr 18S. Un site d'appariement de bases, adjacent à la boîte D sert de guide pour la méthylation et l'autre est essentiel pour la maturation de l'ARNr (Liang and Fournier, 1995). Fait intéressant, chez *Caenorhabditis elegans*, le snoRNA U14 ne contient pas la séquence requise pour la maturation de l'ARNr (Huang et al., 2007b), tandis que chez la drosophile, la séquence guide de la méthylation est absente (Yuan et al., 2003). Par des expériences pontages covalents *in vivo* chez la levure, U14 a été également montré interagir avec l'ARNr de la grande sous-unité (Kudla et al., 2011; Morrissey and Tollervey, 1997).

3.4.1.3.3 Les snoRNA U8 et U13

Ces snoRNA à boîtes C/D ont été trouvés seulement chez les animaux. Ces ARN, comme le snoRNA U3, présentent une coiffe m³G à l'extrémité 5' et une séquence « *leader* » entre la coiffe et la boîte C, et ne guident pas la méthylation des ARNr (Henras *et al.*, 2008). Les séquences « *leader* » ont été proposées s'apparier avec des séquences de l'ARNr/pré-ARNr pour réguler le repliement de l'ARNr. Le snoRNA U8 est essentiel pour les étapes de maturation de l'ARNr 28S chez le xénope (Peculis and Steitz, 1993). Il a été initialement proposé s'apparier à l'extrémité 5' de l'ARNr 28S (Peculis, 1997). Plus tard, il a été suggéré qu'il s'apparie avec une région centrale de l'ARNr 28S ainsi qu'avec l'extrémité 3' de l'ITS2 et l'extrémité 5' de l'ARNr 5.8S (Michot et al., 1999). Dans les deux modèles, le snoRNA U8 inhiberait l'appariement de bases entre les ARNr 28S et 5.8S, mais des données concluantes pour ces modèles manquent. Concernant le snoRNA U13, il est connu que son extrémité 5' et une boucle vers l'extrémité 3' sont complémentaires à des régions présentes à l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Watkins and Bohnsack, 2012). Il est possible que ce snoRNA soit important pour la formation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Cavaille et al., 1996a). L'appariement de base chevauche également le site méthylé par Dim1p à l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Lafontaine et al., 1994), et U13 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la liaison et/ou de l'activité de Dim1p. L'importance fonctionnelle de ce snoRNA reste cependant, à déterminer (Watkins and Bohnsack, 2012).

3.4.1.4 Les snoRNA à boîtes C/D avec fonction de guide de méthylation

Dans le modèle original, 10 à 12 appariements de bases entre la séquence en 5' de la boîte D du snoRNA et la région cible sélectionnée sur le site de la modification, est suffisant pour assurer la spécificité et la force de l'interaction efficace pour la méthylation catalysée par la snoRNP à boîtes C/D (Kiss-Laszlo *et al.*, 1996). Plus de la moitié des snoRNA à boîtes C/D analysés à la fois chez la levure et chez l'homme, contiennent des régions conservées supplémentaires qui sont complémentaires à une région de l'ARNr adjacente à ces sites cible (van Nues *et al.*, 2011). Des interactions supplémentaires avec le site cible pour les snoRNA snR75 et snR76 de levure se sont avérées importantes pour la méthylation efficace, avec des niveaux de modification réduits jusqu'à cinq fois lorsque les régions supplémentaires ont été mutées (van Nues *et al.*, 2011). L'appariement supplémentaire des bases pourrait stabiliser les interactions snoRNA-ARNr ou augmenter la spécificité de la cible. De plus, ces interactions pourraient aider le snoRNA à rivaliser soit avec d'autres snoRNA qui lient l'ARNr dans la même région ou contre la formation de structures secondaires dans l'ARNr, qui pouvaient gêner l'accès des snoRNA. Pour plusieurs snoRNA, les appariements additionnels à l'ARNr chevauchent ceux des interactions canoniques (van Nues *et al.*, 2011) suggérant la possibilité d'un mécanisme de régulation de la fonction des snoRNA. Il est aussi possible que la combinaison d'interactions entre les régions guide canoniques et les régions non-canoniques puissent orchestrer le repliement correct de l'ARNr (Watkins and Bohnsack, 2012).

Chez la levure, la 2'-O-méthylation de l'ARNr 18S et une partie de l'ARNr 25S a lieu de manière co-transcriptionnelle (Kos and Tollervey, 2010). Cela signifie que les snoRNA sont en interaction avec le pré-ARNr naissant, ce qui aura des répercussions importantes sur le repliement de l'ARNr. Les interactions avec les snoRNA sont probablement rompues séquentiellement pour permettre un repliement par étapes du pré-ARNr (Watkins and Bohnsack, 2012).

3.4.2 Autres fonctions des snoRNP à boîtes C/D

3.4.2.1 Fonctions métaboliques

Les snoRNA à boîtes C/D ont été récemment identifiés comme participant à la régulation de la réponse au stress métabolique chez les mammifères. Ainsi, la perte des trois snoRNA à boîtes C/D (U32a, U33 et U35a - snR39, snR55 et snR73 chez la levure), codés au locus d'une protéine de la grande sous-unité ribosomique L13a (rpL13a) est suffisante

pour conférer une résistance au stress oxydatif et lipotoxique *in vitro* et empêche la propagation du stress oxydatif *in vivo* (Michel et al., 2011). Pour identifier les gènes critiques nécessaires à la réponse lipotoxique, les auteurs ont effectué un criblage génétique dans des cellules CHO (ovaire de hamster chinois) en utilisant la technique « *retroviral promoter trap mutagenesis* ». Cette technique est basée sur l'emploi d'un vecteur rétroviral contenant une cassette avec un gène rapporteur et un gène de résistance sans promoteur propre. Le gène rapporteur est exprimé uniquement s'il est inséré en aval du promoteur d'une unité transcriptionnelle. Ainsi la séquence codante du gène ciblé peut être interrompue, le gène rapporteur est alors exprimé et le gène ciblé peut être identifié. Une lignée cellulaire mutante dans lequel le locus de la protéine ribosomique L13a est affecté a ainsi été isolée. Cette technique permet la génération d'un transcrit de fusion unique, contenant l'extrémité 5' de l'ARNm du gène d'intérêt, suivi de la séquence codant le gène de résistance. De façon intéressante, les introns de ce gène, contenant les trois snoRNA à boîtes C/D retrouvés affectés (U32a, U33, U35a), sont essentiels pour la lipotoxicité, et non la séquence codante. U32a méthyle la position A1511 de la LSU, U33 méthyle U1326 de la SSU et U35a méthyle C4506 de la LSU. De plus ces trois snoRNA sont retrouvés de façon surprenante dans le cytosol dans des conditions de cytotoxicité. En outre, un quatrième snoRNA à boîtes C/D, U34, qui méthyle la position U2824 de la LSU, est présent dans un intron du transcrit de L13A, mais il n'a pas été retrouvé comme ayant une influence sur la lipotoxicité (Michel *et al.*, 2011). Les auteurs ne retrouvent pas de différences de méthylation de leurs cibles entre la lignée mutée et une lignée sauvage, ce qui suggère que le rôle de ces snoRNP dans la régulation du stress métabolique ne passe pas par l'activité de méthylation de l'ARNr mais par un autre mécanisme qui suppose leur passage dans le cytosol.

Une autre étude a identifié un lien entre les snoRNA et le métabolisme lipidique (Brandis et al., 2013). Les données montrent que le snoRNA U60 (SNORD60) joue un rôle dans la régulation du trafic intracellulaire de cholestérol. Dans le modèle cellulaire CHO, les auteurs ont sélectionné une lignée qui est déficiente pour le transport rétrograde de cholestérol (de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique). Cette lignée a été retrouvée comme étant haplo-insuffisante pour ce snoRNA à boîtes C/D canonique. Dans la lignée sélectionnée, l'altération du trafic de cholestérol peut être restaurée après complémentation avec du U60 murin. De plus, il n'y a pas de différences de méthylation de l'ARNr cible par le U60 par rapport à une lignée sauvage. Cela indique de nouveau un mécanisme d'action différent de celui de la modification nucléotidique de l'ARNr. Le rôle bien connu des snoRNA à boîtes C/D dans la méthylation des ARNr a été extensivement étudié chez les cellules eucaryotes, mais une grande partie de ces études a été menée chez des organismes qui ne présentent pas de conservation importante des boîtes C ou D ou pour

lesquelles la structure intron-exon est différente (*Xenopus laevis*, *Gallus gallus*, lézards). Il est fort possible que la fonction pour la méthylation de l'ARNr soit la seule fonction de ce snoRNA exprimé dans ces organismes. Sa conservation chez les mammifères soutient la notion des possibles fonctions supplémentaires, spécifiques qui serait apparu au cours de l'évolution (Brandis *et al.*, 2013).

Toujours dans le modèle cellulaire CHO, une autre équipe a identifié le snoRNA à boîtes H/ACA U17 (SNORA73/E1 chez l'humain, snR30 chez *S.cerevisiae*, snoRNA orphelin) comme participant aussi au trafic intracellulaire du cholestérol. En réalisant un criblage des mutants présentant des défauts dans le trafic intracellulaire de cholestérol, les auteurs ont identifié un mutant haplo-insuffisant du snoRNA U17. U17 n'a pas d'autres fonctions décrites en plus de sa fonction de clivage du pré-ARNr dans la région 5' ETS (**Chapitre 3.4.1.3**) (Enright *et al.*, 1996; Jinn *et al.*, 2015).

3.4.2.2 Les snoRNA et l'épissage alternatif / l'édition des ARN

Au cours des dernières années, plusieurs études ont identifié une multitude de petits fragments (<35 nt) dérivés de snoRNA qui ont été baptisés « sdRNA » (ARN dérivés de snoRNA, snoRNA-derived RNAs) (cf. Chapitre 3.4.2.3) qui s'accumulent de manière stable dans la cellule. Certains de ces fragments peuvent participer à la régulation de l'épissage ou de la traduction (Brameier *et al.*, 2011; Ender *et al.*, 2008; Kishore *et al.*, 2010; Ono *et al.*, 2011; Saraiya and Wang, 2008; Scott *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2012). Une comparaison de l'ensemble des petits ARN humains issus des données de séquençage à haut débit révèle que les profils d'accumulation des sdRNA à boîtes C/D sont conservés dans de multiples types cellulaires, et que les taux des différents sdRNA issus d'un snoRNA donné varient. Les profils d'expression des sdRNA pour des nombreux snoRNA sont spécifiques et ressemblent aux profils de clivage des miRNA. Beaucoup de ces petits ARN ne montrent pas les caractéristiques de la dégradation générale des ARN, comme c'est le cas pour les petits fragments issus des snARN ou des ARNr. Alors que 53% des sdRNA contiennent un motif à boîte C dérivé de snoRNA d'origine, les boîtes D et D' sont aussi fréquemment retrouvées dans les sdRNA (54%). Relativement peu (12%) contiennent une région guide contenant les deux motifs (C et D).

Dans une étude de 2012, le snoRNA à boîtes C/D HBII-180C a été analysé plus en détail, révélant la présence de la boîte C' dans le sdRNA dérivé et la présence d'une complémentarité des séquences avec plusieurs ARN pré-messagers, y compris celui du gène FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3). Les analyses fonctionnelles ont démontré que cette région du HBII-180C peut influencer l'épissage alternatif de l'ARNm de

FGFR3. En effet, la surexpression du snoRNA HBII-180C dans des cellules HeLa (cancer du col de l'utérus) détermine des taux réduits de l'isoforme épissée de FGFR3. Par contre, la surexpression d'un snoRNA muté au niveau de la boîte D ne reproduit pas le même effet. De plus, la surexpression d'un ARN portant la séquence cible de HBII-180C montre une surexpression de FGFR3 épissé. Ces données soutient l'implication de ce snoRNA dans la régulation de l'épissage (Scott *et al.*, 2012).

Une étude récente réalisée chez l'humain a montré que, dans un extrait nucléaire soluble préparé dans des conditions natives, un sous-ensemble de snoRNA à boîtes C/D n'est pas associé à la Fibrillarine, ce qui indique qu'une fraction de ces snoRNA s'assemble dans des complexes protéiques différents des snoRNP canoniques (Falaleeva *et al.*, 2016). Le snoRNA à boîtes C/D SNORD27 réalise la 2'-O-méthylation de A27 dans l'ARNr 28S. Dans cette étude, SNORD27 est proposé réguler l'épissage alternatif du pré-ARNm du facteur de transcription E2F7, et cette fonction se réalise par interaction directe ARN-ARN sans la méthylation de l'ARN, probablement par un mécanisme de compétition avec la snRNP U1 spliceosomale (Falaleeva *et al.*, 2016). En outre, l'épuisement de SNORD27 active des exons auparavant « silencieux » dans plusieurs autres gènes grâce à la complémentarité de bases situées dans la séquence entière de SNORD27. Ainsi, certains snoRNA peuvent intervenir à la fois dans le traitement des pré-ARNr et dans celui des pré-ARNm, ce qui augmente le répertoire des facteurs régulateurs d'épissage et relie les deux processus (Falaleeva *et al.*, 2016).

3.4.2.3 Les sdRNA

Il y a plus de vingt ans, le groupe de V. Ambros identifiait lin-4, un gène de *C. elegans* ne codant pas une protéine mais un ARN d'environ 21-23 nt dont l'invalidation affectait de façon très importante le développement du ver (Lee *et al.*, 1993). Au début considéré comme spécifique à *C. elegans*, des petits ARN apparentés à lin-4 ont été ultérieurement décrits pour d'autres organismes (*A. thaliana*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. musculus*, *H. sapiens*). Certains d'entre eux sont très conservés au cours de l'évolution, suggérant une fonction biologique importante. Les membres de cette nouvelle classe d'ARN n'ayant pas de fonction codante ont été collectivement appelés microRNA ou miRNA (Cavaille, 2004).

En plus de leur fonction bien caractérisée dans le guidage des modifications enzymatiques des ARNr, les snoRNA peuvent générer des molécules plus petites, correspondant à la taille des miRNA, et qui sont capables de lier les protéines Argonaute et peuvent exercer des effets spécifiques des miRNA. Ces molécules sont appelées sno-miRNA ou sdRNA (*snoRNA-derived small ARN*, petits ARN dérivés de snoRNA) (Brameier *et*

al., 2011; Falaleeva and Stamm, 2013; Taft *et al.*, 2009b; Yu *et al.*, 2015a). Ces nouveaux ARN peuvent être générés à partir de snoRNA précurseurs à boîtes C/D ou à boîtes H/ACA (Taft *et al.*, 2009b). Une partie de ces sno-miRNA ressemble aux miRNA et peuvent s'associer aux protéines Argonaute pour réguler la traduction d'ARNm cible. D'autres sdRNA sont de taille plus longue et forment des complexes avec les hnRNP, avec des effets sur l'expression des gènes. Elles ont été décrites pour la première fois par le laboratoire de G. Meister qui a montré l'existence de petits ARNnc stables issus des précurseurs de snoRNA (Ender *et al.*, 2008), suite à une analyse à haut débit des ARN associés aux protéines Ago1 et Ago2 humaines, protéines qui s'associent aux microARN au sein du complexe RISC (ARN induced silencing complex) et qui sont impliquées dans le silencing des gènes (Dunoyer, 2009; Saraiya and Wang, 2008). Le premier ARN de ce type identifié provenait du snoRNA ACA45, et sa cible potentielle a été identifiée être l'ARNm de CDC2L6, une protéine qui fait partie du complexe Médiateur. Cela a suggéré un rôle fonctionnel pour les produits issus de la maturation du snoRNA ACA45, en lien avec le *silencing* post-traductionnel des gènes et dont le mécanisme d'action est similaire à celui des miRNA (Abel *et al.*, 2014).

3.4.2.4 Les snoRNA-piRNA

Une autre classe de petits ARN, les piRNA, est exprimée dans les cellules somatiques ovariennes et dans des cellules neuronales chez les invertébrés, mais aussi dans de nombreuses autres cellules somatiques de mammifères (Rajasethupathy *et al.*, 2012; Ross *et al.*, 2014; Siensi *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2011). L'analyse fonctionnelle indique que les piRNA régulent l'expression de gènes cibles dans de nombreux processus. Principalement, les piRNA sont capables de cliver l'ARN cible et de médier sa dégradation (Brennecke *et al.*, 2007). Néanmoins, il a été montré que les piRNA induisent *de novo* à la fois la méthylation de l'ADN dans les testicules de souris et dans les neurones (Aravin *et al.*, 2007; Rajasethupathy *et al.*, 2012). Les piRNA peuvent également promouvoir la formation d'hétérochromatine à travers la régulation de la marque de triméthylation de H3K9 et sont capables de transmettre cette marque de silence épigénétique d'une génération à l'autre (Ashe *et al.*, 2012; Shirayama *et al.*, 2012). Dans la plupart des cas, les piRNA jouent des rôles dans la suppression de l'expression des rétrotransposons afin d'augmenter la stabilité du génome. Cependant, il a également été révélé que les piRNA peuvent activer l'expression génique par la régulation épigénétique globale en *cis* de l'hétérochromatine subtélomérique de la drosophile (Yin and Lin, 2007). Ces travaux montrent que les piRNA participent à la formation de la marque de modification d'histone H3K4me3 et inhibent la formation de celle de type H3K27me3, mais ils montrent également que la méthylation H3K9me3 et d'autres modifications des histones, tels que l'acétylation, sont également présentes. Les

mécanismes moléculaires par lesquels les piRNA médient le recrutement de divers complexes d'activation épigénétique restent encore très peu compris.

Récemment, il a été montré que des piRNA dérivés de snoRNA à boîtes C/D peuvent jouer des rôles dans la différenciation lymphocytaire CD4⁺ chez l'humain. Le piRNA piR30840 dans les lymphocytes T CD4⁺ a été retrouvé associé aux protéines PIWI4 et AGO4 et cette association est spécifique des cellules T CD4⁺ humaines. Ces données suggèrent un rôle spécifique de cette classe d'ARNnc dans les lymphocytes humains: cet ARNnc régule les taux d'ARNm de l'interleukine 4 par une augmentation de sa dégradation par l'exosome nucléaire via le complexe TRAMP (Trf4-Air2-Mtr4), par un mécanisme de complémentarité des séquences entre le piRNA et une région intronique de l'ARNm de IL-4 (Zhong *et al.*, 2015).

3.4.2.5 La découverte de nouveaux membres de snoRNA

Le séquençage à haut débit a permis l'identification de nouveaux membres potentiels faisant partie des snoRNA à boîtes C/D et H/ACA. Des études récentes par PAR-CLIP (photoreactive nucleotide-enhanced cross-linking and immunoprecipitation) des protéines cœur associées aux snoRNA, suivi par le séquençage des ARN liés ont permis la détection des dizaines de nouveaux snoRNA humains, dont certains ont également été détectés par Northern blot et/ou représentent des copies ou des homologues de snoRNA connus identifiés chez l'homme ou chez d'autres organismes (Kishore *et al.*, 2013). Ces techniques ont révélé l'existence des molécules snoRNA-like de taille très petite ou très grande (**Figure 26**) (Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015). Des mini-snoRNA de type C/D avec des boîtes C et D, mais dépourvues des boîtes C' et D' ont été ainsi détectées associées aux protéines cœur des snoRNP dans des cellules HEK293 (Kishore *et al.*, 2013). Ces mini-snoRNA peuvent être aussi d'une taille réduite à 27 nucléotides ce qui les rend trop courtes pour contenir deux séquences guide (Kishore *et al.*, 2013). En même temps, des ARN non codants de grande taille avec des extrémités snoRNA (sno-lncARN) ont été identifiés par séquençage à haut débit des transcriptomes non-polyadénylés de cellules humaines HeLa et de cellules souches embryonnaires humaines et, dans une autre étude, de cellules souches embryonnaires de singe et de souris (Yin *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Les sno-lncARN sont produits à partir des loci contenant deux snoRNA au sein du même intron. Alors qu'ils sont censés être traités par la machinerie d'assemblage des snoRNP canoniques, ils interagissent aussi avec le facteur d'épissage RBFOX2 et ont été proposés agir par la modulation des taux de RBFOX2 dans des types cellulaires spécifiques, en régulant ainsi l'épissage alternatif (Yin *et al.*, 2012). Le nombre réduit de paires de snoRNA codés dans le

même intron hôte semble limiter le nombre de sno-lncARN possibles; bien qu'un exemple de sno-lncARN produit à partir de snoRNA dans les introns voisins a été décrit chez la souris, son expression est régulée par des phénomènes d'épissage alternatif (Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

La découverte de nouvelles fonctions potentielles des snoRNA provient en grande partie des études de séquençage de l'ARN à haut débit qui ont révélé l'association étroite entre les snoRNA et d'autres espèces d'ARN avec la chromatine (Caudron-Herger *et al.*, 2011; Mondal *et al.*, 2010). En outre, plusieurs composants protéiques de snoRNP à boîtes C/D ont été identifiés en liaison avec le remodelage de la chromatine et la transcription, les protéines Rvb1/2 en sont un exemple (cf. **Chapitre 3.3.1.2.2**). Leurs homologues humains, les protéines RuvBL1/2 ont aussi été retrouvées en interaction avec l'histone acétylase TIP60, qui acétyle les nucléosomes *in vitro* et possède une activité ATPase et ADN hélicase (Ikura *et al.*, 2000; Ravens *et al.*, 2015). De plus, les protéines cœur des snoRNA à boîtes C/D Nop56p/Nop58p interagissent avec les régions d'attachement à la matrice (MARs) chez les plantes, et auraient un rôle dans l'organisation des domaines chromatiniennes (Hatton and Gray, 1999). De plus, RuvBL1 été identifiée dans ces domaines MARs, suggérant une fonction des protéines en lien avec des snoRNA dans l'organisation structurale de la chromatine (Holzmann *et al.*, 1998). Un autre indice concernant l'activation de la transcription est fourni par l'association de RuvBL1 de rat avec la TBP et avec l'ARN polymérase II (Gentili *et al.*, 2015; Kanemaki *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1998).

Les composants protéiques des complexes snoRNP ont été identifiés dans des processus spécifiques à la chromatine, soulevant la possibilité qu'ils fonctionnent en conjonction avec les snoRNA. Cependant, la preuve directe de la présence des snoRNA est absente, et il est possible que les protéines fonctionnent en l'absence de molécules d'ARN. En ce qui concerne la fonction spécifique des snoRNA sur la chromatine, il est possible que les snoRNA associés à la chromatine forment de nouveaux complexes RNP contenant des protéines spécifiques de la chromatine, qui remplacent les protéines présentes dans les snoRNP classiques (Schubert and Langst, 2013).

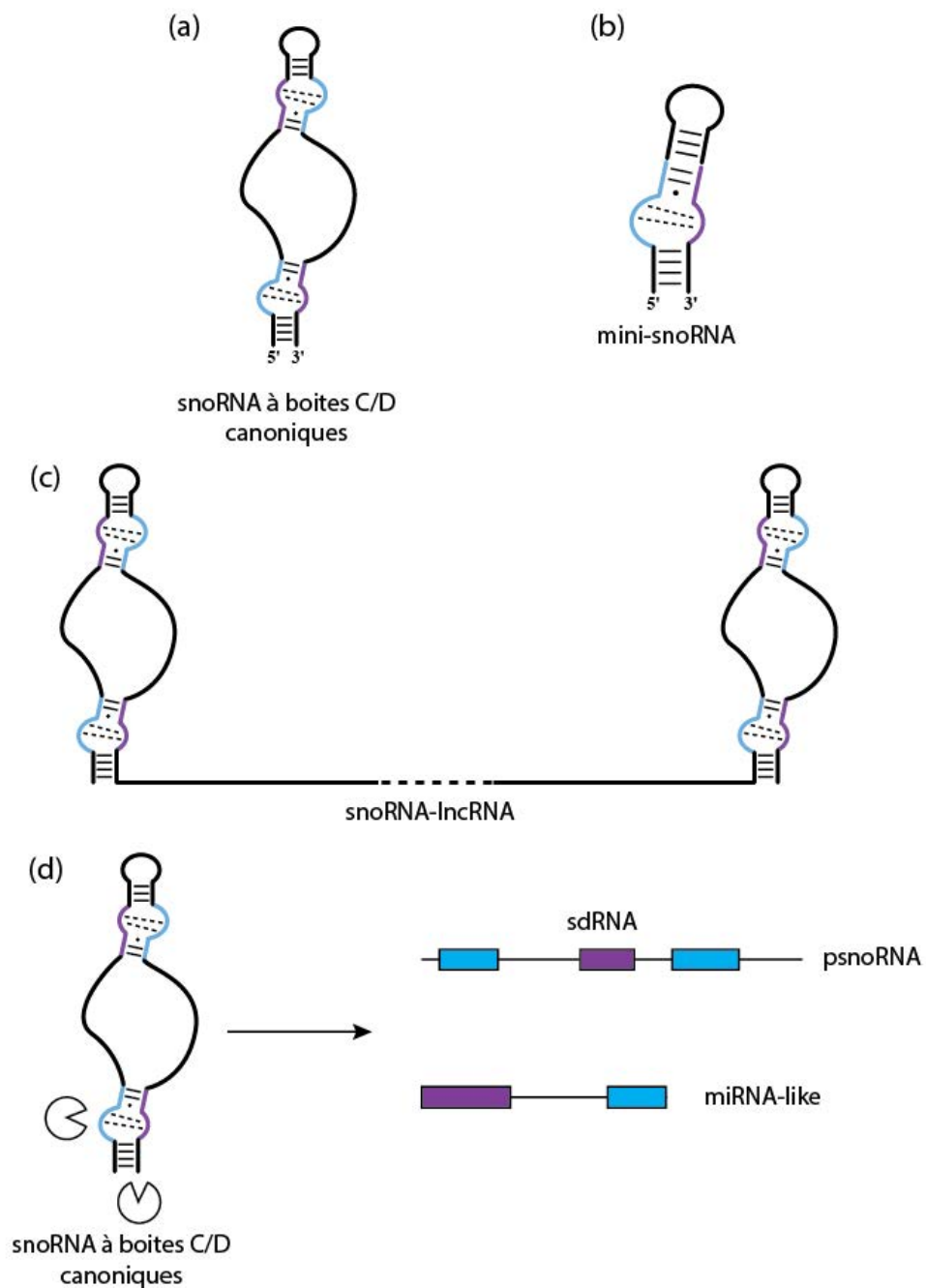


Figure 26 : Diversité des snoRNA à boîtes C/D-like. Alors que les snoRNA à boîtes C/D varient habituellement en longueur entre 60-90 nucléotides (a), les mini-snoRNA, lient les mêmes partenaires d'interaction que les snoRNA classiques, mais ne portent pas les boîtes C'et D' (b). Les snoRNA-lncRNA (longs ARN non codants) sont composés de deux snoRNA à boîtes C/D à chaque extrémité et de la séquence intronique qui les sépare (c). De nombreuses études ont également détecté des ARN dérivés des snoRNA stables (probablement sdRNA), générés par l'action des endonucléases ou des exonucléases. Certains sont des sdRNA miARN like, tandis que d'autres sont plus longs (d). Les boîtes C/C' et D/D' sont représentées, respectivement, par des couleurs bleu et violet. Extrait de Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015.

3.4.2.6 Médiateurs de stress et régulateurs du trafic lipidique

En 2011, un crible génétique mené afin d'identifier les gènes critiques pour la survie dans des conditions de croissance lipotoxique, correspondant à un stress métabolique impliqué dans la pathogenèse des complications du diabète, a retrouvé de façon inattendue trois snoRNA à boîtes C/D hautement conservés (Michel *et al.*, 2011): U32A (SNORD32A), U33 (SNORD33) et U35A (SNORD35A), qui sont codés dans les introns du gène de la protéine ribosomique Rpl13a. Ces snoRNA s'accumulent dans le cytoplasme des cellules d'ovaire de hamster chinois après traitement par palmitate, utilisé pour reproduire un état physiopathologique lipotoxique. En outre, la déplétion de ces snoRNA confère une protection contre la lipotoxicité (Michel *et al.*, 2011). D'autres expériences ont démontré que ces snoRNA sont des médiateurs de stress oxydatif général, réagissant de la même manière en présence de H₂O₂ et à la lipotoxicité. Il a donc été conclu que les snoRNA U32A, U33 et U35A jouent un rôle non canonique dans la régulation des réponses au stress oxydatif, peut-être grâce à la régulation de la traduction de l'ARNm ou à la séquestration des ARN spécifiques (Michel *et al.*, 2011).

Plus récemment, deux autres études ont identifiées des snoRNA à boîtes C/D supplémentaires éventuellement impliqués dans la régulation de la fonction du réticulum endoplasmique et dans la réponse au stress. Le snoRNA à boîtes C/D SNORD3A est surexprimé chez les patients atteints de la maladie Creutzfeldt-Jacob, dans un modèle de souris de la maladie et chez les souris infectées (Cohen *et al.*, 2013). Les taux de SNORD3A sont également corrélés avec l'activation de ATF6, un événement central dans la réponse aux protéines mal repliées (Cohen *et al.*, 2013). Ensuite, une étude visant à identifier les gènes impliqués dans l'internalisation du cholestérol a identifié le snoRNA à boîtes C/D SNORD60 comme impliqué dans le transport du cholestérol vers le réticulum endoplasmique (Brandis *et al.*, 2013). L'expression réduite du SNORD60 conduit à un défaut dans le trafic du cholestérol qui est restauré par complémentation avec SNORD60 (Brandis *et al.*, 2013). En outre, SNORD60 est capable de s'associer aux protéines des snoRNP canoniques (Brandis *et al.*, 2013). De manière intéressante, comme pour les snoRNA U32A, U33 et U35A, la régulation négative du SNORD60 ne conduit pas à une plus faible méthylation de sa cible dans l'ARNr 28S, ce qui indique que les phénotypes observés ne sont pas dus à des effets sur les ARNr (Brandis *et al.*, 2013; Michel *et al.*, 2011). Bien que le mécanisme par lequel ces snoRNA réalisent la régulation de ces processus ne sont pas clairs et plusieurs hypothèses ont été proposées, il implique un appariement de bases de la région guide, dans le cas du SNORD60 et la localisation cytoplasmique des snoRNA de la protéine Rpl13a (Dupuis-Sandoval *et al.*, 2015).

3.4.2.7 Facteurs associés à la chromatine

En 2012, Schubert et al. ont montré que des snoRNA spécifiques contrôlent le compactage de la chromatine et son accessibilité dans les cellules de drosophile (Schubert et al., 2012). Ils ont identifié un mécanisme dépendant de l'ARN qui maintient la structure de la chromatine ouverte dans des régions euchromatiques dans des cellules de Drosophile (Schubert and Langst, 2013). Ce mécanisme réversible d'ouverture de la chromatine, reconstitué *in vitro*, dépend du facteur de décondensation Drosophila 31 (Df31) qui se lie spécifiquement à l'ARN et se localise dans les régions euchromatiques (Schubert and Langst, 2013; Schubert *et al.*, 2012). Df31 est capable d'attacher à la chromatine une sous-classe hétérogène d'ARN courts simple brin (Schubert *et al.*, 2012). Cette classe d'ARN nommées caARN (chromatin associated ARN) est stablement liée à la chromatine et est en grande partie composée de snoRNA, qui sont préférentiellement liés par DF-31. Cette liaison des snoRNA à la chromatine, médiée par DF-31, conduit à la formation d'un réseau d'ARN-chromatine, avec la création des domaines de chromatine ouverts pour la transcription. L'analyse de caARN dans les cellules humaines a révélé aussi un fort enrichissement en snoRNA à ce niveau, ce qui implique un rôle conservé pour ces molécules dans les structures chromatinienne d'ordre supérieur (Schubert and Langst, 2013; Schubert *et al.*, 2012).

Plusieurs composants protéiques des snoRNP à boîtes C/D étaient déjà liés au remodelage de la chromatine et à la transcription. Il avait été montré que chez la levure, les protéines Rvb1 et Rvb2 forment un dimère ayant une activité ATPase *in vitro* et possèdent une activité de remodelage de la chromatine *in vivo*. Ces protéines affectent la transcription de 5% du génome (Avner and Heard, 2001; Jonsson *et al.*, 2001; Khurana and Bhattacharyya, 2015). En outre, Rvb1p et Rvb2p sont des composantes du complexe de remodelage de la chromatine INO80 qui est impliqué dans la régulation de la transcription et de la stabilité génomique (Lafon et al., 2015; Papamichos-Chronakis et al., 2011; Shen *et al.*, 2000). Les protéines humaines p50 et p55 ont aussi été retrouvées d'interagir avec l'histone acétylase TIP60, acétylant les nucléosomes *in vitro* et possédant une activité ATPase et ADN hélicase (Ikura *et al.*, 2000). En plus, la protéine Nop56/Nop58 interagit avec les régions de fixation à la matrice (MARS) chez les plantes, qui sont supposé à organiser les domaines de la chromatine (Hatton and Gray, 1999). La protéine p55 a aussi été identifiée dans le MARs, suggérant une fonction des protéines des snoRNA dans l'organisation structurelle de la chromatine (Holzmann *et al.*, 1998). Un autre lien avec l'activation de la transcription est fournie par l'association de p55 de rat avec la TBP et l'ARN polymérase II (Gentili *et al.*, 2015; Kanemaki *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1998; Queval *et al.*, 2014).

Les composants protéiques des complexes snoRNP ont été identifiés dans des processus spécifiques à la chromatine, soulevant la possibilité qu'ils fonctionnent en conjonction avec le snoRNA. Cependant, la preuve directe de la présence des snoRNA est absente, et il est possible que les protéines fonctionnent en l'absence des molécules d'ARN. En ce qui concerne la fonction spécifique des snoRNA sur la chromatine, il est possible que les snoRNA associés à la chromatine forment de nouveaux complexes RNP contenant des protéines spécifiques à la chromatine, en remplacement des protéines des snoRNA classiques (Schubert and Langst, 2013).

4 Les chaperonnes d'histones

Une analyse des données issues de cribles en double hybride nous a permis d'identifier plusieurs partenaires potentiels d'interaction avec la protéine Bcd1 (Hazbun et al., 2003; Ito et al., 2001). Les expériences menées au cours de mon travail de thèse ont permis de valider et caractériser l'une de ces interactions : l'interaction avec la protéine Rtt106, connue comme membre de la famille des chaperonnes d'histones et impliquée dans la régulation de la structure de la chromatine des régions transcrites, mais également celles transcriptionnellement inactives. De façon intéressante, des expériences de cartographies d'interactions génétiques (GIM) chez la levure, menées durant le travail de thèse de B. Rothé en collaboration avec l'équipe de C. Saveanu (Institut Pasteur), ont montré un effet épistatique de la délétion du gène *RSA1* codant le facteur d'assemblage des snoRNP et la délétion du gène *RTT106* (*YNL206C*) codant la chaperonne d'histone Rtt106p. Ces données suggéraient donc également un lien fonctionnel potentiel entre Rtt106p et la biogenèse des snoRNP C/D (Rothé, 2013). Un état des connaissances sur les chaperonnes des histones H3 et H4 en particulier centré sur Rtt106p et son rôle fonctionnel est donc présenté en clôture de cette partie introductive.

4.1 Chaperonnes d'histones et assemblage des nucléosomes

La structure de la chromatine est régulée de manière dynamique et étroite. Cette régulation repose sur la présence ou l'absence de modifications post-traductionnelles (MPT) des histones, mais aussi par l'action de protéines chaperonnes d'histones, qui peuvent également réguler le trafic et l'assemblage des histones en nucléosomes par des interactions non-covalentes avec les histones et les enzymes les modifiant (Dahlin et al., 2015).

Au cours de la phase S du cycle cellulaire, les nucléosomes situés avant les fourches de réplication sont désassemblés pour faciliter le passage de la machinerie de réplication. Une fois l'ADN répliqué, des nucléosomes doivent être reformés en utilisant les histones parentales qui ont été précédemment désassemblées, ainsi que des histones nouvellement synthétisées, dans un processus appelé assemblage des nucléosomes couplé à la réplication de l'ADN (Replication-coupled nucleosome assembly, RCNA; **Figure 27**) (Dahlin et al., 2015). Ce processus est important pour l'héritage épigénétique et pour l'intégrité génomique (Ransom et al., 2010).

Au cours de certaines réponses aux dommages de l'ADN, les histones parentales doivent également être enlevées pour ouvrir la voie à la machinerie de réparation d'ADN. Ce processus présente de nombreuses similitudes avec le processus RCNA (Morrison and Shen, 2009; Polo, 2015; Yao et al., 2016). En outre, l'assemblage des nucléosomes lors de la transcription et l'échange d'histones peut se produire au cours du cycle cellulaire pendant l'assemblage des nucléosomes indépendant de la réplication de l'ADN (RINA, Replication-independent nucleosome assembly ; **Figure 27**) (Dahlin *et al.*, 2015).

4.1.1 Assemblage des nucléosomes couplé à la réplication de l'ADN (RCNA)

L'incorporation de l'ADN répliqué dans des structures de type nucléosomes est proposée être liée à la réplication de l'ADN (McKnight and Miller, 1977; Stillman, 1986). Selon une estimation, la RCNA génère environ 30 millions de nucléosomes par réplication par cellule humaine (Kadyrova et al., 2013). Si la synthèse d'ADN et l'assemblage des nucléosomes sont découplés par l'appauvrissement des facteurs d'assemblage des nucléosomes, les cellules présentent des phénotypes d'instabilité génomique (Mattioli *et al.*, 2015; Tyler et al., 1999). Pendant la phase S, les nucléosomes déjà présents sur l'ADN génomique en aval des fourches de réplication doivent être désassemblés pour faire place à la machinerie de réplication (**Figure 36**). Après la réplication de l'ADN, les histones parentales peuvent être recyclées et rechargées sur les brins d'ADN naissant (Henikoff, 2008). Cependant, le doublement de la quantité d'ADN lors de la réplication nécessite le doublement de la quantité des histones dont la synthèse doit donc rester active pour assembler de nouveaux nucléosomes (Dahlin *et al.*, 2015).

En dépit de sa complexité, le processus d'assemblage des nucléosomes dans des cellules de mammifères est conceptuellement similaire à celui de levure, et par conséquent de nombreuses caractéristiques de l'assemblage des nucléosomes sont conservées de la levure aux cellules humaines. Par exemple, les nucléosomes doivent être désassemblés en débutant par le retrait des dimères H2A-H2B, suivi par celui des tétramères (H3-H4)₂. Leur assemblage débute par le chargement des tétramères (H3-H4)₂ néo-synthétisés sur les duplex d'ADN naissant, qui est ensuite suivi par le dépôt rapide de deux dimères H2A-H2B pour former un nucléosome complet (Verreault, 2000). Un système complexe de chaperonnes d'histones, des histones modifiées et d'enzymes de modification d'histones coordonnent ce processus (**Figure 28**) (Burgess and Zhang, 2013).

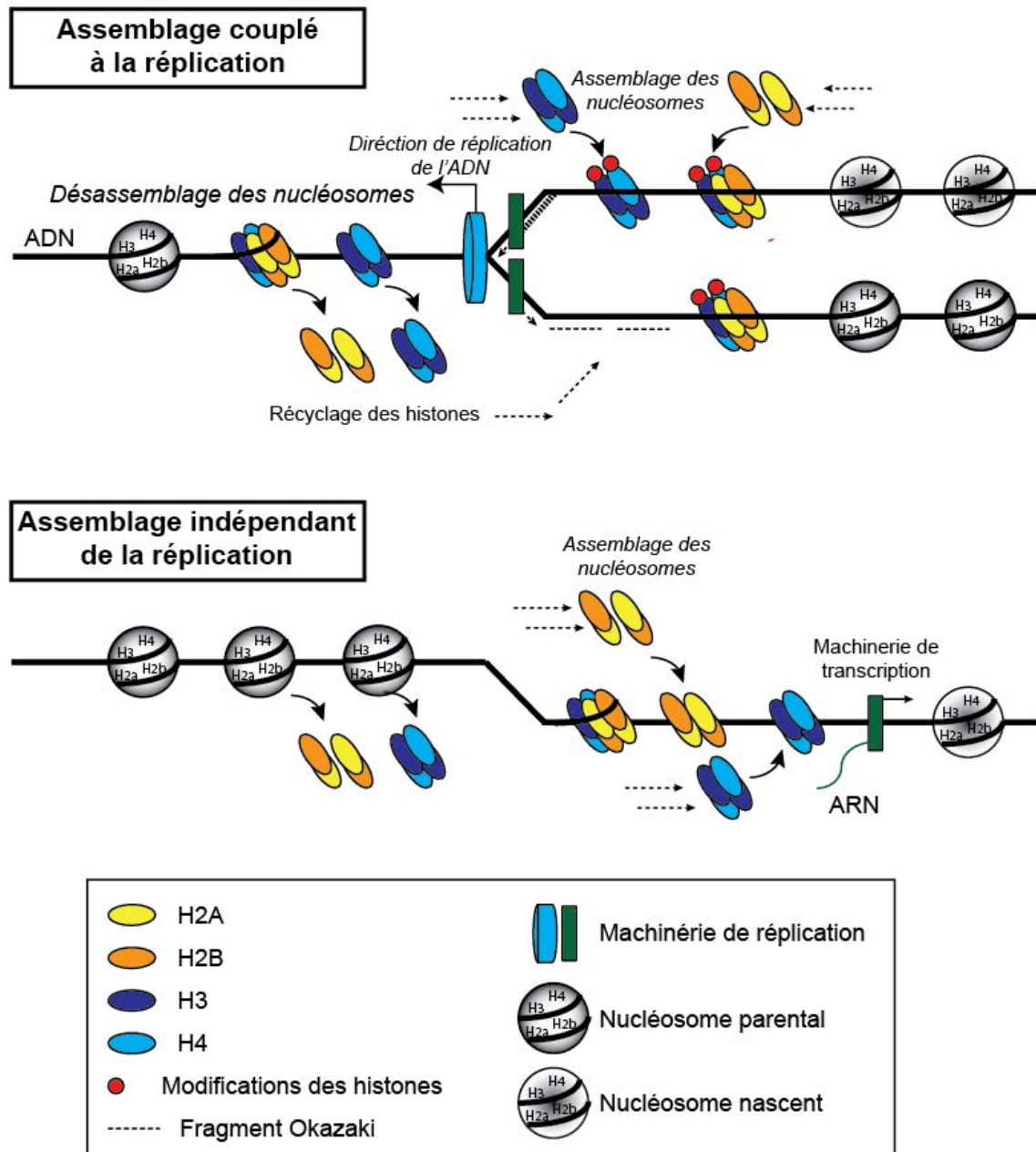


Figure 27 : Représentation générale des mécanismes RCNA et RINA. (Haut) Assemblage des nucléosomes couplé à la réplication (RCNA). Les nucléosomes sont désassemblés afin de laisser la place à la machinerie de réplication et notamment la progression de la fourche de réplication. Les nucléosomes sont ensuite réassemblés par un mécanisme s'effectuant en relation étroite avec la réplication de l'ADN. (Bas) Assemblage des nucléosomes indépendant de la réplication (RINA). Les mécanismes de désassemblage, d'accès à l'ADN et de réassemblage des nucléosomes sont retrouvés dans des processus indépendants de la réplication, comme la transcription des gènes. Adapté de Dahlin *et al.*, 2015.

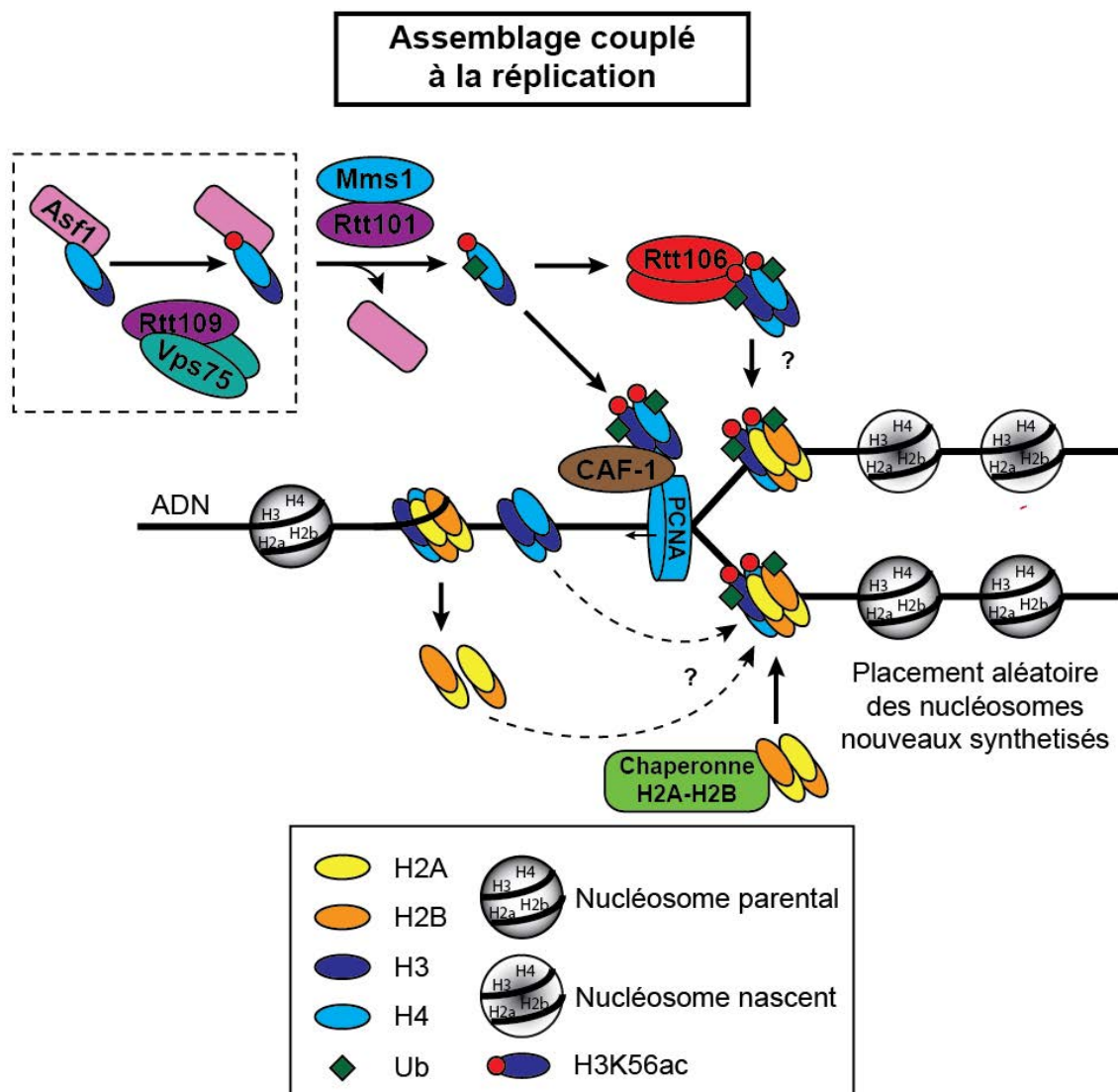


Figure 28 : Voies du mécanisme RCNA chez la levure. Le chargement des nucléosomes parentaux et naissants s'effectue de façon aléatoire sur les ADN double brin produits. Les complexes H3-H4 nouvellement synthétisés forment un premier hétéro-complexe avec le facteur Asf1p (Asf1p-H3-H4), qui servira de substrat pour l'acétylation de H3K56 (H3K56ac) par le complexe histone acétyltransférase Rtt109p-Vps75p chez *S. cerevisiae* (Han et al., 2007b). H3K56ac favorise l'ubiquitinylation de H3K121, K122 et K125 par Rtt101p-Mms1p (Han et al., 2013), qui affaiblit l'interaction entre Asf1p et H3-H4, ce qui facilite le transfert des dimères H3-H4 vers CAF-1 et Rtt106p. Ensuite, CAF-1 et Rtt106p réalisent l'assemblage des tétramères H3-H4 pour la formation des nucléosomes. PCNA: antigène nucléaire de prolifération cellulaire. Adapté de Dahlin *et al.*, 2015.

Chez la levure. Les complexes H3-H4 nouvellement synthétisés forment un premier hétéro-complexe avec le facteur Asf1p (Asf1p-H3-H4), qui servira de substrat pour l'acétylation de H3K56 (H3K56ac) par le complexe l'histone acétyltransférase Rtt109p-Vps75p (Han et al., 2007b). H3K56ac favorise alors l'ubiquitinylation de H3K121, K122 et K125 par Rtt101p-Mms1p (Han et al., 2013). Cette MPT affaiblit l'interaction entre Asf1p et H3-H4, ce qui facilite le transfert des dimères H3-H4 vers CAF-1 et Rtt106p. Ensuite, CAF-1 et Rtt106p réalisent l'assemblage des tétramères H3-H4 pour la formation des nucléosomes (Fazly et al., 2012; Liu et al., 2012; Winkler et al., 2012). Des études chez la levure et dans des cellules humaines indiquent que la capacité de CAF-1 pour assembler de manière préférentielle l'ADN en cours de réplication dans les nucléosomes dépend, au moins en partie, de sa capacité à interagir avec l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (la pince glissante PCNA du réplisome). PCNA est associée à des molécules d'ADN répliquées et recrute CAF-1 au site de réplication de l'ADN (Sharp et al., 2001; Zhang et al., 2000).

Les dimères H3-H4 nouvellement synthétisés s'associent au facteur Asf1 (antisilencing function protein 1) et sont importés du cytoplasme vers le noyau sous la forme hétérotrimérique Asf1-H3-H4 (Dennehey et al., 2013; English et al., 2006). Les histones H3 nouvellement synthétisées sont modifiées par l'acétylation de la lysine 56 conduisant à une marque caractéristique H3K56ac avant leur assemblage dans des nucléosomes (Costelloe and Lowndes, 2010; Masumoto et al., 2005). H3K56ac est une modification d'histone atypique, car elle se situe dans le domaine globulaire du tétramère des histones et non au niveau de leur extrémités N-terminales qui sont exposées hors du macrocomplexe (Chen et al., 2015; Kenseth and Coldiron, 2004). Les niveaux de H3K56ac sont maximaux pendant la phase S et diminuent dans les phases ultérieures. L'acétylation de H3K56 (ainsi que d'autres résidus de H3) est catalysée par l'histone acétyl transférase Rtt109p chez la levure, qui peut former un complexe avec la protéine chaperonne d'histones Vps75 (vacuolar protein sorting 75) *in vivo* (Driscoll et al., 2007; Han et al., 2007a). Rtt109p est unique parmi les HAT connues, car elle est la seule enzyme responsable de la formation de H3K56ac et utilise le complexe Asf1-H3-H4 comme substrat (**Figure 28**).

Les chaperonnes d'histones telles que Vps75p et Asf1p sont cruciales pour la réplication RCNA. Outre son rôle dans la stabilisation de Rtt109p, Vps75p participe au trafic de Rtt109p dans le noyau (Keck and Pemberton, 2011) et facilite l'acétylation des lysines N-terminales sur H3 catalysée par Rtt109p. Alors que Rtt109p catalyse la formation de H3K56ac via le substrat Asf1-H3-H4 *in vivo*, le rôle de Vps75 semble se rapporter plutôt à l'acétylation de la queue de H3 catalysée par Rtt109. Récemment, une étude sur le domaine C-terminal de Rtt109p a fourni des preuves que Vps75p peut jouer un rôle dans la formation

de H3K56ac *in vivo* (Radovani et al., 2013), ce qui démontre les interactions complexes entre Rtt109p, les chaperonnes d'histones et les substrats des histones (Dahlin et al., 2015).

Des défauts dans la génération de H3K56ac conduisent à une croissance cellulaire réduite, une sensibilité génotoxique accrue et à la formation de foyers Rad52 (coupures chromosomiques) - phénotypes liés à des perturbations dans la RCNA (Han et al., 2007a; Li et al., 2008). H3K56ac favorise l'interaction de H3-H4 avec l'ubiquitine ligase E3 Rtt101^{Mms1} *in vivo* et *in vitro* (Han et al., 2013). Cette interaction favorise à son tour l'ubiquitinylation de H3 sur les lysines K121, K122 et K125 par Rtt101^{Mms1}. Des perturbations dans ce processus conduisent à des phénotypes correspondants à des erreurs du mécanisme RCNA. En particulier, l'ubiquitinylation H3K122ub affaiblit l'interaction Asf1-H3, ce qui facilite ensuite le transfert en aval du dimère H3K56ac-H4 de l'Asf1 vers Rtt106p (regulator of Ty1 transposition 106) et CAF-1 (chromatin assembly factor-1) (Su et al., 2012). CAF-1 a un rôle bien connu dans le ciblage sur l'ADN des histones nouvellement synthétisées H3-H4 (Krude, 1999; Smith and Stillman, 1991; Verreault et al., 1996). Il interagit avec l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) par l'intermédiaire de sa plus grande sous-unité p150, liant efficacement la réplication de l'ADN avec l'assemblage des nucléosomes (Georgescu et al., 2015; Zhang et al., 2000). Comme nous le verrons en détail, Rtt106p favorise probablement l'assemblage des nucléosomes en aidant à l'assemblage des tétramères (H3-H4)₂ (Dahlin et al., 2015; Fazly et al., 2012; Lombardi et al., 2015; Su et al., 2012; Zunder et al., 2012). Fait important, le dépôt des tétramères (H3-H4)₂ néo-synthétisés par CAF-1 et Rtt106p devrait inhiber la formation des nucléosomes mixtes contenant un dimère parental et un autre dimère nouvellement synthétisé H3-H4 (Burgess and Zhang, 2013; Xu et al., 2010).

Après le dépôt des dimères (H3-H4)₂, deux dimères H2A-H2B sont déposés pour compléter l'octamère de nucléosome. Des expériences *in vitro* montrent que la chaperonne FACT peut déposer des dimères H2A-H2B sur l'ADN (Belotserkovskaya et al., 2003). Cependant, il n'est pas encore clairement établi comment les chaperonnes d'histones sont impliquées dans le dépôt des dimères H2A-H2B (et aussi l'histone H1) sur l'ADN nouvellement répliqué. Parfois, au cours de ce processus complexe d'assemblage, H3K56ac est déacétylée par Hst3/Hst4, des histone déacétylases (HDAC) dont l'expression est maximale pendant les phases G2/M et qui sont régulées par la kinase MEC1 (Halder and Kamakaka, 2008; Simoneau et al., 2015; Thaminy et al., 2007; Yang et al., 2008). Aussi, une autre HDAC, la protéine Sir2, a également été impliquée dans l'éviction des histones H3K56ac au niveau de l'hétérochromatine télomérique (Xu et al., 2007).

Chez les mammifères. Le mécanisme d'assemblage RCNA dans des cellules de mammifères semble être plus complexe que chez la levure. Par rapport aux cellules de levure où il y a seulement une histone H3, les cellules de mammifères expriment à la fois l'histone canonique H3 (H3.1/H3.2) et la variante d'histone H3 (H3.3). Différente par "seulement" cinq acides aminés, l'histone H3.1 canonique est assemblée dans les nucléosomes pendant la phase S dans le contexte de la RCNA. En outre, les dimères d'histones H3.1-H4 sont recrutés par les facteurs Asf1a et Asf1b et sont transférés sur CAF-1 (Alvarez et al., 2011). Le facteur Cul4A-DDB1, un paralogue de la protéine de levure Rtt101^{Mms1}, apparaît également réguler négativement l'interaction entre Asf1p et le complexe d'histones H3-H4 (Han et al., 2013).

Par rapport à la levure, les marqueurs d'histones essentiels pour l'assemblage des nucléosomes de mammifère et leur contribution dans les mécanismes moléculaires d'assemblage des nucléosomes ne sont pas bien connus. Bien que détectables, les niveaux de H3K56ac apparaissent moins élevés dans les cellules humaines par rapport à la levure (Jasencakova et al., 2010). Ainsi, les H3K56ac représentent moins de 1% des H3 totales dans des cellules de mammifères (Drogaris et al., 2012). Cependant, comme chez la levure, les niveaux de H3K56ac dans les cellules de mammifères semblent augmenter sur la chromatine après traitement génotoxique et également peuvent co-localiser aux sites de réparation de l'ADN (Das et al., 2009), bien que des rapports contradictoires existent (Miller et al., 2010; Tjeertes et al., 2009). Ces observations suggèrent que le rôle de H3K56ac dans l'assemblage des nucléosomes chez les mammifères est soit moins critique soit bien plus complexe, est très localisée et/ou correspond à un phénomène transitoire en comparaison de sa fonction identifiée dans des organismes moins complexes (Dahlin et al., 2015). Il est toutefois établi que CAF-1 est nécessaire pour incorporer H3K56ac dans la chromatine, et Asf1 (Asf1a) est cruciale pour réaliser la H3K56ac *in vivo* (Das et al., 2009). Les enzymes catalysant la formation de H3K56ac et son élimination dans des cellules de mammifères ont également été décrites. Les HAT p300 et Gcn5 peuvent acétyler H3K56 dans des cellules de mammifères (Das et al., 2009; Tjeertes et al., 2009). La modification H3K56ac est éliminée par différentes déacétylases (HDAC1, HDAC2, SIRT1, SIRT2 et SIRT6) dans des cellules de mammifères (Miller et al., 2010; Toiber et al., 2013; Yang et al., 2009; Yuan et al., 2009).

Les niveaux de H3K56ac sont plus élevés dans certains cancers et dans les cellules indifférenciées (Das et al., 2009) et ont été liés à des signatures épigénétiques globales uniques (Li et al., 2014) et aux facteurs de pluripotence comme NANOG, SOX2 et OCT4 dans les cellules souches embryonnaires (Tan et al., 2013; Xie et al., 2009).

En plus de H3K56ac, les histones nouvellement synthétisées H3-H4 dans des cellules de mammifères apparaissent être acétylées sur les lysines H4K5 et H4K12 (catalysée par la HAT1) et porter la méthylation H3K9 (Loyola et al., 2009; Nagarajan et al., 2013; Verreault et al., 1998). La marque H4K12ac est conservée de la levure à l'homme, et la perte de HAT1 conduit à des défauts dans la prolifération et la réparation des dommages de l'ADN. Cependant, cette acétylation apparaît aussi être indispensable pour la réplication RCNA (Barman et al., 2006). Il est probable que H4K5 et K12ac régulent l'assemblage des nucléosomes en partie par la modulation de l'import nucléaire des histones H3.1-H4 nouvellement synthétisées car des mutations de ces résidus sont liées à des niveaux réduits de H3.1-H4 dans le noyau (Ejlassi-Lassalette et al., 2011).

4.1.2 Assemblage des nucléosomes indépendant de la réplication de l'ADN (RINA)

Comme dans la réplication de l'ADN, les nucléosomes doivent être réassemblés après la transcription des gènes dans un processus d'assemblage RINA (**Figure 27**). Le mécanisme mis en jeu comprend également un échange d'histones où les histones libres sont incorporées dans des nucléosomes intacts. L'échange d'histones fournit aux cellules ne se divisant pas la possibilité de régler de manière dynamique la structure de la chromatine, et de disposer d'un mécanisme pour le remplacement des histones endommagées.

Beaucoup d'histones sont échangées, y compris CenH3 (liée aux centromères), H3.3 et quelques formes variantes de H2A de mammifères. Le dimère H2A-H2B, dernier incorporé lors de l'assemblage du nucléosome, est échangé plus facilement que $(H3-H4)_2$, premier complexe désassemblé, même si le tétramère $(H3-H4)_2$ peut être divisé et les dimères H3-H4 peuvent être échangés au niveau des gènes activement transcrits (Katan-Khaykovich and Struhl, 2011). Alors que l'échange d'histones est supposé se produire fréquemment sur les gènes fortement transcrits, ce processus a été aussi observé dans les promoteurs inactifs (Das and Tyler, 2013). Il semble que le dépôt et l'échange de H2A-H2B se produisent de façon similaire dans les processus RCNA et RINA. Contrairement aux tétramères $(H3-H4)_2$ qui sont relativement stables, les dimères H2A-H2B peuvent subir un échange rapide avec H2A-H2B libre (non lié). Cela se produit même lors de la phase S, ce qui suggère que le dépôt de H2A-H2B se produit de manière similaire dans le contexte de réplication de l'ADN et de la transcription.

L'une des chaperonnes des histones H2A-H2B la plus largement étudiée est Nap1p, qui lie préférentiellement H2A-H2B *in vivo* (Mosammaparast et al., 2002). Nap1p contribue au dépôt et à l'échange de H2A-H2B à plusieurs niveaux, à l'import des dimères H2A-H2B

du cytoplasme vers le noyau, perturbe des interactions histone-ADN non productives ou bien permet le dépôt direct des deux dimères H2A-H2B et H3-H4 sur l'ADN pour l'assemblage des nucléosomes *in vitro* (Andrews et al., 2010; D'Arcy et al., 2013; Fan et al., 2015; Ito et al., 1997; Mosammaparast et al., 2002).

FACT est une autre chaperonne d'histones impliquée dans l'assemblage des complexes H2A-H2B dans les nucléosomes, qui favorise la liaison H2A-H2B sur H3-H4 *in vitro* (Jamai et al., 2009; McCullough et al., 2015).

Dans les cellules de mammifères, l'histone H3.3 est déposée lors du mécanisme de RINA (avec H4) par des chaperonnes telles que HIRA, DAXX et DEK. HIRA est impliquée dans l'assemblage et l'échange d'histones H3.3-H4, les cellules dépourvues de cette chaperonne ont des niveaux réduits de H3.3 au niveau des gènes réprimés et actifs. DAXX est impliquée dans le dépôt de H3.3 au niveau des régions télomériques, tandis que DEK est impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'hétérochromatine. Par conséquent, par rapport à RINA, l'incorporation de H3.3 est régulée par différentes chaperonnes d'histones à différents sites sur la chromatine (Dahlin et al., 2015).

Par rapport à la réplication (RCNA), il existe des différences notables dans la façon dont le dimère H3-H4 est incorporé lors du processus RINA. Par exemple dans RCNA, les tétramères (H3.1-H4)₂ sont rarement fractionnés. Cependant, au cours de la phase S, un faible pourcentage des tétramères parentaux (H3.3-H4)₂ est divisé en dimères H3.3-H4, qui forment alors des nucléosomes mixtes contenant des dimères H3.3-H4 naissants et parentaux (Ramachandran and Henikoff, 2015; Xu et al., 2010). Chez la levure, ces nucléosomes mixtes sont concentrés dans les régions fortement transcrites ainsi qu'au niveau des régions régulatrices (Katan-Khaykovich and Struhl, 2011). Par conséquent, contrairement à H3.1-H4, il est possible que H3.3-H4 puisse être déposé soit sous forme de dimère soit de tétramère (Dahlin et al., 2015).

Les rôles de la modification H3K56ac sont intimement liées à Asf1p, car cette chaperonne est également importante pour le désassemblage de la chromatine. Les perturbations liées à Asf1p sont corrélées avec une diminution du remodelage des nucléosomes, l'expulsion des histones et l'incorporation de nouvelles histones H3 aux niveaux de sites de transcription (Gkikopoulos et al., 2009; Rufiange et al., 2007). Lorsque la levure est incapable d'acétyler H3K56, les taux d'échange des histones baisse globalement (Kaplan et al., 2008). Néanmoins, Asf1p peut avoir des rôles dans l'assemblage de la chromatine en dehors de RINA, indépendamment de son rôle dans le désassemblage de la chromatine. Rtt109p et Asf1p (mais curieusement, pas H3K56ac) sont importantes pour la

répression de la transcription dans certains cas (Erkina and Erkin, 2015; Lin and Schultz, 2011), attestant de l'interaction complexe entre l'échange des histones, la transcription, les chaperonnes d'histones et les MPT des histones. D'autres MPT d'histones peuvent affecter RINA, en particulier le dépôt des histones H3.3-H4 nouvellement synthétisées. La phosphorylation de l'histone H4K47 (H4K47ph) par PAK2 favorise l'assemblage de H3.3-H4 tout en inhibant l'assemblage de H3.1-H4 (Dahlin *et al.*, 2015).

4.1.3 L'assemblage des nucléosomes dans la réparation de l'ADN

L'intégrité de l'ADN est constamment mise à l'épreuve, par des erreurs intrinsèques à la machinerie cellulaire qui réplique l'ADN, des rayonnements électromagnétiques, des produits chimiques (mutagènes par exemple). Des défauts dans la réparation d'ADN sont une caractéristique des cancers humains (Jackson and Bartek, 2009). Plusieurs voies de réparation d'ADN existent, notamment la recombinaison homologue (HR), non-homologous end joining (NHEJ), par excision de nucléotides (NER), par excision des bases. En ce qui concerne la chromatine, le modèle actuel de réparation de l'ADN est « accès, réparation, restauration » (Smerdon, 1991). Autrement dit, la chromatine doit être d'abord désassemblée pour que la machinerie de réparation d'ADN puisse accéder au site endommagé(s) (accès) ; cette machine doit effectuer les réparations nécessaires sur l'ADN (réparation), et ensuite la machinerie de réparation doit se détacher et la chromatine est réassemblée (restauration). Des erreurs dans l'assemblage des nucléosomes associés au processus de réparation d'ADN peuvent avoir des conséquences importantes, un montage incorrect pourrait endommager l'héritage épigénétique ou conduire à une instabilité génomique. Par exemple, le dommage de l'ADN a le potentiel de se propager rapidement, car les nucléosomes flanquant une cassure double brin (DSB) peuvent être perturbés au cours de réparation de l'ADN (Adam *et al.*, 2014; Tsukuda *et al.*, 2005).

Le rôle précis des chaperonnes d'histones dans la réparation de l'ADN reste méconnu. La résection des extrémités ADN peut conduire à un désassemblage des nucléosomes via des complexes de remodelage de la chromatine comme INO80 (Chambers and Downs, 2012; Morrison *et al.*, 2004). Il existe aussi un échange dynamique de formes variantes d'histones au niveau des sites de lésions et de réparation de l'ADN (Volle and Dalal, 2014). L'histone H2A.Z est incorporée près de DSB dans les cellules humaines (Xu *et al.*, 2012), et des défauts de son incorporation mènent à une sensibilité génotoxique augmentée et à des défauts de réparation de l'ADN. Les nucléosomes sont alors plus faciles à démonter, ce qui permet un meilleur accès de la machinerie de réparation (Dahlin *et al.*, 2015). La forme variante d'histone H2A.X, qui a une distribution aléatoire à travers la

chromatine, est phosphorylée sur la sérine 129/139 chez la levure et chez les mammifères, respectivement, par le système de contrôle des dommages à l'ADN. Cette forme variante d'histone est donc impliquée dans la signalisation de la présence de lésions de l'ADN, et est éliminée (via des dimères H2A.X-H2B) et remplacée par des dimères canoniques H2A-H2B par l'action du complexe FACT (Heo et al., 2008).

L'assemblage des nucléosomes pendant les réparations de l'ADN se produit de façon similaire celui de la réplication RCNA, peut-être parce que la réparation de l'ADN implique la synthèse de l'ADN. Conformément à cette idée, le complexe CAF-1 est recruté aux sites endommagés par les UV, où il favorise le dépôt des nouvelles histones H3.1-H4 aux sites de réparation de l'ADN à l'aide de PCAF (Adam *et al.*, 2014). Récemment, la chaperonne d'histones H3.3 HIRA a été montré être enrichie dans les sites d'ADN endommagés dans les cellules humaines, avant l'arrivée du complexe CAF-1 (Adam et al., 2013). Chez la levure, une composante importante de l'assemblage des nucléosomes après les réparations de l'ADN est la modification H3K56ac dépendante d'Asf1p (Chen et al., 2008a).

4.2 Les différents types de chaperonnes d'histones

Du fait de leur propriété hautement basique, les histones ont tendance à former des agrégats insolubles avec l'ADN lorsqu'ils sont mélangés ensemble dans des conditions physiologiques. Pour éviter ces effets délétères, des chaperonnes permettent la liaison et la livraison des histones à l'ADN pour former des nucléosomes lors, comme nous venons de le décrire dans le chapitre précédent, de la réplication de l'ADN, après le passage du complexe d'élongation de la transcription ainsi que la réparation de l'ADN (Krude and Keller, 2001; Tyler, 2002; Verreault, 2000; Zhang et al., 2016a).

En général, les chaperonnes d'histones peuvent être classées en deux catégories : les chaperonnes H3-H4 et les chaperonnes H2A-H2B en fonction de leur liaison préférentielle soit aux histones H3-H4 ou soit aux histones H2A-H2B (Zhang *et al.*, 2016a). Je ne détaillerai que les chaperonnes d'histones CAF-1, FACT et Rtt106p spécifiques des histones H3-H4.

4.3 Le complexe CAF-1 : activité chaperonne H3-H4

Le mécanisme par lequel les histones accèdent et s'assemblent sur l'ADN nouvellement synthétisé a commencé à être caractérisé en 1975 (Germond et al., 1975; Oudet et al., 1975). Depuis, il a été constaté que, bien que des extraits cytoplasmiques provenant de cellules 293T permettent une réplication efficace de l'ADN plasmidique, seuls les extraits nucléaires permettent un assemblage de nouveaux mini-chromosomes contenant des nucléosomes (Stillman, 1986). Ce fut cette observation qui a conduit à suggérer l'existence d'une machinerie spécifique qui suit le mécanisme de réplication au long de l'ADN et favorise l'assemblage des nucléosomes (Stillman, 1986). Trois ans plus tard le complexe CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1) a été identifié et purifié (Smith and Stillman, 1989). Il s'agit d'un complexe hétérotrimérique, composé de trois sous-unités, et qui possède la capacité d'assembler des histones sur l'ADN nouvellement synthétisé. Chaque sous-unité a été nommée sur la base de son poids moléculaire apparent en électrophorèse : une sous-unité de 150 kDa (CAF-1-p150, CHAF1a), une sous-unité de 60 kDa (CAF-1-p60, CHAF1b), et une sous-unité de 48 kDa (CAF-1-p48, RbAp48, p48) (**Figure 29**). La stœchiométrie des sous-unités est de 1:1:1. Le complexe CAF-1 contient fréquemment des dimères d'histones acétylées H3/H4 nouvellement synthétisés (Verreault *et al.*, 1996).

Chez *S. cerevisiae*, CAF-1 se compose de Cac1p (Rlf2p – Rap1 protein Localisation Factor), Cac2p (Chromatin Assembly Complex) et Cac3p (Msi1p – Multicopy Suppressor of Ira1) (**Tableau 12**).

Organismes	Grande sous-unité	Sous-unité intermédiaire	Petite sous-unité
<i>H. sapiens</i>	p150, CHAF1a	RbAp48, p48	RbAp48, p48
<i>M. musculus</i>	p150	p60	p48
<i>D. melanogaster</i>	p180	p105	p55
<i>C. elegans</i>	Chaf1	Chaf2	Chaf3
<i>S. cerevisiae</i>	Cac1p, Rlf2p	Cac2p	Cac3p, Msi1p
<i>A. thaliana</i>	FAS1	FAS2	FAS3

Tableau 12: Comparaison des sous-unités du complexe CAF-1 chez divers organismes. Extrait de Yu et al., 2015b.

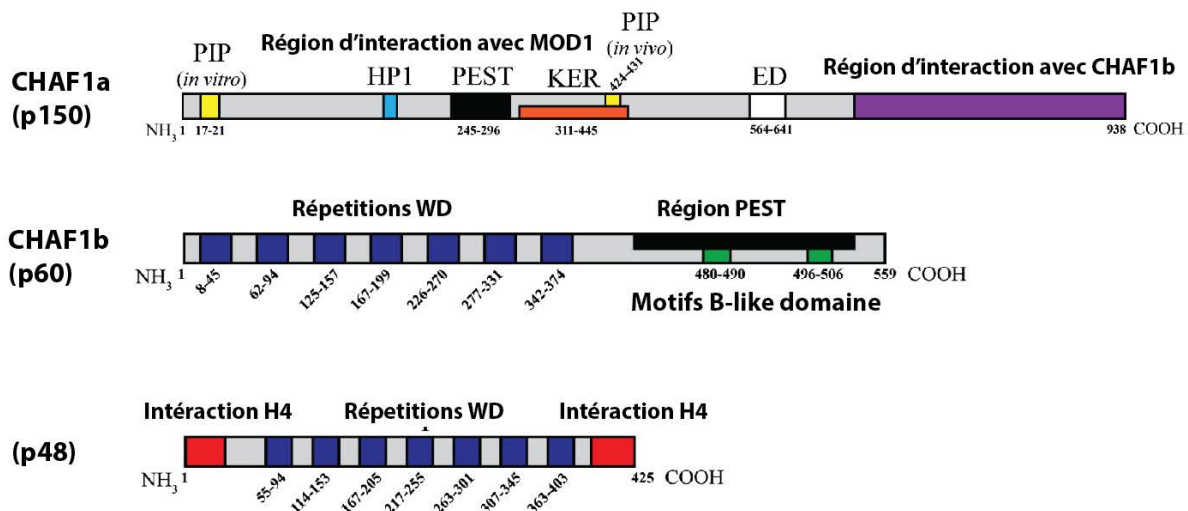


Figure 29 : Diagrammes des composants du complexe CAF-1 chez l'humain. CHAF1a contient un domaine N-terminal PIP (PCNA Interacting Motif), qui a une forte activité *in vitro*, suivi d'une région d'interaction MOD-1, qui est nécessaire pour l'interaction avec l'hétérochromatine. Dans cette région il existe un domaine d'interaction HP1 (Hétérochromatin Protéin 1), suivi d'un domaine PEST qui entraîne la dégradation rapide des protéines. Le domaine KER est une région très acide, candidate pour l'interaction avec les histones. Le domaine PIP a été montré expérimentalement comme requis pour l'interaction *in vivo* avec PCNA et la formation des nucléosomes. Enfin, la région ED et une région d'interaction avec CHAF1b se trouvent à l'extrémité C-terminale de CHAF1a. CHAF1b est l'une des nombreuses protéines contenant des répétitions WD. Elle contient 7 répétitions WD, suivies par un domaine PEST, ainsi que deux motifs B-domaine-like qui facilitent les interactions directes avec ASF1a. p48 est également une protéine contenant 7 répétitions WD et qui comprend également deux domaines α -hélicoïdale aux extrémités N et C terminales qui facilitent la liaison à H4. Extrait de Volk and Crispino, 2015.

L'association de CAF-1 avec les histones nouvellement synthétisées suggère que ce complexe est impliqué dans le dépôt des histones nouvellement synthétisées sur l'ADN, par opposition aux complexes chaperonnes d'histones qui déstabilisent les histones en amont ou en aval sur l'ADN matrice (Ruiz-Carrillo et al., 1975; Sobel et al., 1995; Stillman, 1986). Dans la phase S, CAF-1 est localisée à la fourche de réplication (Krude, 1995). Cette localisation permet à CAF-1 de faciliter la première étape de la formation des nucléosomes, le dépôt de dimères H3/H4 sur l'ADN nouvellement synthétisé. Au cours de cette phase, des protéines H3 et H4 nouvellement synthétisées dans le cytoplasme forment des complexes hétérotrimériques avec la chaperonne d'histone Asf1p dans un mélange stœchiométrique 1 : 1 : 1 (**Figure 30**) (pour revue Volk and Crispino, 2015). Au sein de ce complexe, Asf1p lie H3, empêchant son homodimérisation naturelle. Ainsi, les hétérodimères H3/H4 ne s'assemblent pas en tétramères. À la suite de l'interaction avec l'ADN et l'histone H2A dans le nucléosome en cours de formation, H4 subit un changement de conformation qui libère le domaine globulaire d'Asf1p et permet la formation de l'hétérotétramère (H3-H4)₂ (English et al., 2006) (**Figure 30**).

CAF-1 a une préférence particulière pour la forme variante d'histone H3.1, qui est produite principalement au cours de la phase S et est considérée comme étant la forme d'histone H3 dépendante de la réplication. La variante H3.2 diffère de H3.1 par un acide aminé (Cystéine substituée par une Sérine en position 96) et est également produite lors de la réplication de l'ADN, bien qu'il n'y ait aucune preuve fonctionnelle montrant les interactions avec CAF-1 (Franklin and Zweidler, 1977). Les cellules sont capables de se diviser et de se différencier quand H3.2 est totalement absente, mais qu'elle est remplacée par la forme variante H3.3 (Hodl and Basler, 2012). H3.3 est continuellement synthétisée tout au long de la durée de vie de la cellule, ses niveaux sont maintenus indépendamment de la régulation du cycle cellulaire, et elle peut être incorporée dans la chromatine à tout moment au cours du cycle cellulaire (Ahmad and Henikoff, 2002; Brown et al., 1985). Cependant, H3.3 semble préférentiellement être trouvée avec le complexe HIRA au lieu de CAF-1 (Tagami et al., 2004).

Les dimères d'histones H3/H4 nouvellement synthétisées sont acétylés dans le cytoplasme par une histone acétyltransférase de type B (HAT) qui est connue pour acétyler les résidus K5 et K12 sur les histones H4 non-liées au nucléosome (Imhof and Wolffe, 1999; Kleff et al., 1995; Parthun et al., 1996; Verreault et al., 1998).

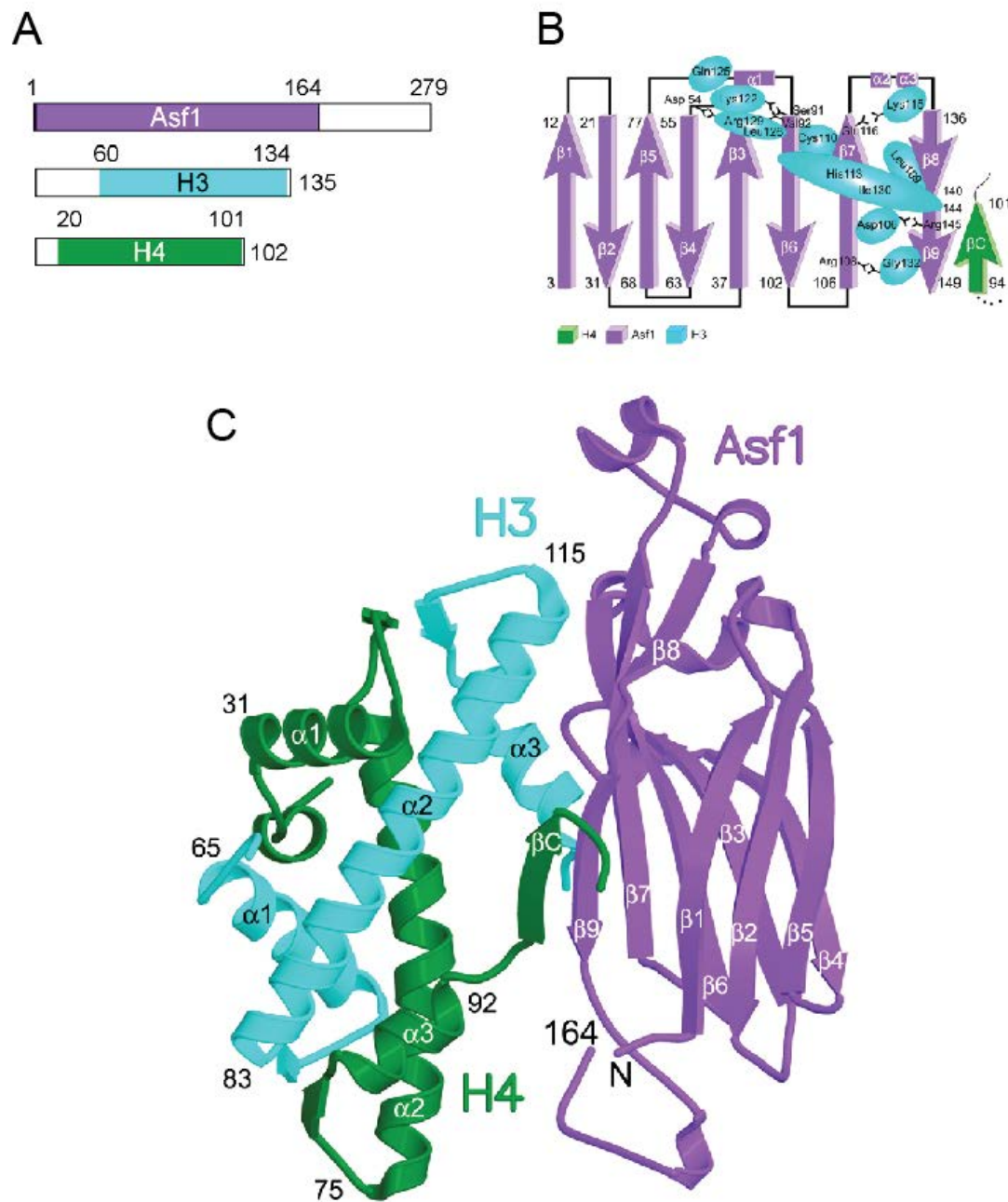


Figure 30 : Structure du complexe Asf1-H3-H4. (A) Les régions des protéines Asf1, H3 et H4 qui apparaissent dans cette structure sont présentées sous forme de cases colorées représentant les protéines de pleine longueur. (B) Représentation de Asf1p avec les contacts qui se forment avec H3. Les acides aminés de l'histone H3 qui contribuent de façon importante à l'interface Asf1p sont représentés par des ovales cyan, dont les dimensions sont proportionnelles à l'étendue de la surface enterrée et sont étiquetés en conséquence. (C) Structure générale du complexe Asf1p-H3-H4, avec Asf1p en violet, H3 en cyan et H4 en vert. Les principaux éléments de la structure secondaire sont marqués. Extrait de English *et al.*, 2006.

Des expériences d'épuisement de CHAF1a ou de CHAF1b par shRNA conduit à la perte immédiate de l'activité chaperonne sur la chromatine et la dégradation concomitante rapide des deux autres sous-unités, très probablement en raison de l'exposition et de l'activation des domaines PEST (signal de protéolyse) (Rechsteiner and Rogers, 1996) présents dans celles-ci (Kaufman et al., 1995; Lee et al., 2009). La sous-unité p48 est critique pour la formation des nucléosomes dépendante de la réplication de l'ADN (Kadyrova et al., 2013). Chez la levure, la perte de l'activité de CAF-1 n'est pas létale, mais conduit à la formation de fragments Okazaki plus longs, à cause d'un mauvais placement des nucléosomes, suggérant également un défaut dans la réplication de l'ADN (Smith and Whitehouse, 2012). En plus des changements de taille des fragments Okazaki, d'autres défauts réplcatifs sont observés, comme l'activation des points de contrôle mitotique dues à des défauts chromosomiques au niveau des centromères et la formation du kinétochore, en particulier lorsqu'elle est associée à des mutations supplémentaires dans les protéines HIR (Histone Regulatory) (Krude, 2002). Des études récentes ont suggéré que CAF-1 est également impliqué dans les voies de développement, mémoire épigénétique et la division cellulaire asymétrique (Huang et al., 2010; Nakano et al., 2011; Yu et al., 2013; Zeng et al., 2013).

4.3.1 La sous-unité CHAF1a

L'une des principales fonctions de CHAF1a (p150) est de diriger le complexe CAF-1 à la fourche de réplication par une interaction directe avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Shibahara and Stillman, 1999). PCNA forme un complexe coulissant sur l'ADN lors de la synthèse de l'ADN, et sert d'échafaudage pour plusieurs protéines différentes, dont les ADN polymérases et des chaperonnes d'histones (Maga et al., 1999; Maga et al., 2000; Shibahara and Stillman, 1999). Bien que CHAF1a ait deux domaines peptidiques séparées mais conservés interagissant avec PCNA (PIP, PCNA Interacting Peptide), le second PIP (PIP2), situé vers le milieu de la protéine, est principalement responsable de l'interaction *in vivo* avec PCNA. Les deux PIP de CHAF1a ont des affinités différentes pour PCNA, car le motif PIP1 en N-terminal lie fortement PCNA dans des études *in vitro*, mais semble être inutile dans un contexte cellulaire. En revanche, PIP2 est nécessaire pour la liaison de PCNA *in vivo* et diffère de PIP1 par un seul acide aminé (Q-K) (Rolef Ben-Shahar et al., 2009). Alors qu'une région PIP2 potentielle a été identifiée dans CHAF1b, des expériences ultérieures ne révèlent aucune preuve de la liaison directe avec PCNA. Il a été proposé que les régions du PIP de CHAF1a interfèrent avec l'activité des nucléosomes plutôt que directement avec les processus de réplication de l'ADN, ce qui permet à CAF-1 de

fonctionner derrière la fourche de réplication, sans empêcher d'autres processus médiés par PCNA (Rolef Ben-Shahar *et al.*, 2009).

En plus de son rôle dans la réplication de l'ADN en phase S, CHAF1a est également impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN en interphase, en particulier pendant la réparation NER (nucléotide excision repair) dans un processus dépendant de l'ATP impliquant PCNA (Moggs *et al.*, 2000). CHAF1a a aussi des fonctions supplémentaires dans la réparation de l'ADN mais de manière indépendante de PCNA pendant la réparation DSB (double strand break). Dans la réparation DSB, CHAF1a est enrichie à des sites DSB par une interaction directe PCNA-indépendante avec les protéines 14-3-3 ζ et KU70/80 (également connu comme Complexe Protein Kinase ADN-dépendant) (Hoek *et al.*, 2011). Ce complexe est connu pour recruter les facteurs nécessaires à la réparation des DSB et facilite le mécanisme de jonction des extrémités non homologues (NHEJ, Non-homologous end joining) et la recombinaison homologue (Lees-Miller, 1996).

CHAF1a peut également interagir avec le facteur HP1 (Heterochromatin-binding Protein 1), permettant au complexe CAF-1 de cibler l'hétérochromatine par l'intermédiaire d'un domaine de liaison HP1 à l'extrémité N-terminale de CHAF1a qui est situé dans la région d'interaction Mod (Murzina *et al.*, 1999; Quivy *et al.*, 2008). L'extrémité N-terminale de CHAF1a abrite également un fragment qui est suffisant pour maintenir l'association des régions chromosomiques et des protéines associées avec les nucléoles, y compris la liaison avec l'antigène de prolifération Ki67, avec la nucléophosmine et la nucléoline. Cependant, ce fragment est incapable d'interagir avec CHAF1b, suggérant que cette fonction nucléolaire est très probablement indépendante de CAF-1, et ne comporte pas d'activité histone chaperonne (Smith *et al.*, 2014).

4.3.2 La sous-unité p48

La sous-unité p48 a initialement été caractérisée comme membre de la famille des protéines du rétinoblastome (Rb) chez la levure dans des expériences de chromatographie d'affinité et a ensuite été séquencée et rebaptisée protéine associée au rétinoblastome p48 (RbAp48) (Qian and Lee, 1995; Qian *et al.*, 1993). P48, se compose de 7 répétitions WD et interagit avec H4 indépendamment de CAF-1 par des domaines alpha-hélicoïdale situés à son extrémité N et C-terminale (Zhang *et al.*, 2013a). Elle est également étroitement associée à la sous-unité catalytique de l'histone déacétylase humaine HDAC1, ce qui avait suggéré un rôle dans la déacétylation des histones H4 nouvellement synthétisées, une fois déposées dans le nucléosome (Song *et al.*, 2008). Ceci est en contraste avec les prédictions de ses fonctions dans le complexe histone acétyltransférase de levure (HAT), vu son degré

de conservation élevé avec l'histone chaperonne de levure Hat2b. Cependant, des études ultérieures ont montré que p48 seule n'a pas d'activité enzymatique (Verreault *et al.*, 1996).

Seule une petite fraction de p48 cellulaire est associée à CAF-1, la majorité des protéines étant présentes dans d'autres grands complexes (Marheineke and Krude, 1998). P48 est ainsi également présente dans un complexe avec les deux formes variantes de H3, H3.1 et H3.3, ce qui suggère qu'elle joue des rôles supplémentaires en dehors de l'activité de chaperonne d'histone médiée par CAF-1 (Tagami *et al.*, 2004). Ces rôles comprennent le fonctionnement au sein du complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Dans les cellules humaines, l'interaction entre p48 et PRC2 joue un rôle dans la limitation de la déposition de la marque d'histone H3K27me3, ce qui permet à certaines régions du génome de rester actives (Vizan *et al.*, 2015). En plus du complexe répresseur Polycomb, p48 a également été identifiée comme jouant un rôle crucial dans le complexe de remodelage/déacétylation NuRD et le complexe de remodelage NURF (Kuzmichev *et al.*, 2002; Martinez-Balbas *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Des mutations dans l'homologue CHAF1a humain chez *S. cerevisiae*, la protéine Cac1, réduisent l'interaction avec Cac3p (homologue de p48 humaine) et conduisent à des défauts dans le *silencing* télomérique (Krawitz *et al.*, 2002).

4.3.3 La sous-unité CHAF1b

CHAF1b se compose de 7 répétitions WD, suivies par une région B-like et un domaine PEST. Bien que les répétitions WD de CHAF1b ont été considérées fournir l'échafaudage nécessaire pour faciliter une interaction directe entre la chaperonne H3/H4 et ASF1a/b et de promouvoir son activité de chaperonne d'histones, des expériences de délétion des résidus N-terminaux 1-418 de CHAF1b ont révélé que ce domaine n'est pas nécessaire pour la liaison à ASF1a/b (Tang *et al.*, 2006). Au contraire, il a été déterminé que l'extrémité C-terminale permet une liaison directe avec ASF1a. La région C-terminale de CHAF1b contient un domaine B-like, d'abord identifié dans p105, l'homologue CHAF1b chez la drosophile, et cette région B-like est nécessaire et suffisante pour la liaison de CHAF1b à ASF1 (Tyler *et al.*, 2001). CHAF1b partage également une homologie de sa région B avec HIRA, une chaperonne de histone H3 indépendante de la réplication qui est activée en premier lieu en dehors de la phase S et a une préférence pour la variante H3.3 (Loppin *et al.*, 2005; Rai and Adams, 2012). Notamment la liaison de ASF1a avec HIRA ou avec CHAF1b est mutuellement exclusive, ce qui suggère que l'expression HIRA peut être une méthode indirecte de régulation de l'activité de CHAF1b (Tagami *et al.*, 2004). En outre, ASF1 est l'une des deux chaperonnes d'histones connues pour avoir en même temps des fonctions

dépendantes et indépendantes de la réplication, vu ses interactions avec CHAF1b et HIRA (Tagami *et al.*, 2004). Enfin, en plus des répétitions WD à l'extrémité N-terminale et le domaine B-like de l'extrémité C-terminale, CHAF1b possède également un domaine PEST à son extrémité C-terminale (Kaufman *et al.*, 1995). L'activité de ce domaine PEST est en outre soutenue par la constatation que l'élimination de CHAF1a par shRNA conduit à la dégradation ultérieure et rapide de CHAF1b (Ye *et al.*, 2003).

Alors qu'une stœchiométrie stricte 1:1:1 des composants CAF-1 (CHAF1a, CHAF1b et p48) a été initialement proposé (Krude and Knippers, 1993), il a été ultérieurement retrouvé que la perte de la sous-unité p48 peut provoquer des défauts dans la capacité de CAF-1 à chaperonner la chromatine au niveau de la fourche de réplication (Marheineke and Krude, 1998; Tagami *et al.*, 2004; Verreault *et al.*, 1996). Cependant, ce sont des effets secondaires dus à la perte de CHAF1a ou CHAF1b, qui rend le complexe CAF-1 non-fonctionnel (Lee *et al.*, 2009; Nakano *et al.*, 2011). La perte des sous-unités CHAF1a ou CHAF1b conduit à une perte complète de la fonction de CAF-1, pour deux raisons. Tout d'abord, la perte de CHAF1b rend CHAF1a instable à cause de l'exposition et de l'activation subséquente du domaine C-terminal PEST (Ye *et al.*, 2003). Deuxièmement, CHAF1b interagit directement avec ASF1a/b, la chaperonne H3/H4 responsable du maintien du contact direct avec les hétérodimères H3/H4 (Tang *et al.*, 2006). Par conséquent, pendant la phase S, CHAF1b/ASF1a/H3/H4 sont dans un complexe avec CHAF1a, qui à son tour est en contact avec PCNA au niveau de la fourche de réplication. Ce réseau d'interaction permet au complexe CAF-1 de fournir à l'ADN des dimères H3/H4 après le passage de la fourche de réplication.

CHAF1b est également nécessaire pour la synthèse d'ADN par le mécanisme de réparation NER des lésions de l'ADN (De Koning *et al.*, 2007). Après irradiation, CHAF1b est phosphorylée, en une quantité qui est directement liée à l'intensité des dommages induites par des UV (Gaillard *et al.*, 1996). Cette phosphorylation conduit CHAF1b à former des complexes avec CHAF1a et PCNA, qui ensuite se localisent aux sites de lésions de l'ADN (Martini *et al.*, 1998). L'interaction CHAF1b-ASF1a, qui est indépendante de la phosphorylation de CHAF1b (Mello *et al.*, 2002), est responsable de l'incorporation de H3.1 dans les nucléosomes pendant la réparation NER. Cette capacité à fonctionner indépendamment de son état de phosphorylation est critique pour le rôle de CHAF1b dans le mécanisme NER (Volk and Crispino, 2015). CHAF1b est nécessaire aussi pour le recrutement de l'histone H2A ubiquitinylée (H2Au) aux sites de l'ADN endommagés par les UV (Zhu *et al.*, 2009). Cependant, ces observations peuvent résulter de la perte d'un

complexe CAF-1 intact, réduisant ainsi globalement le dépôt des H3/H4 aux sites des lésions de l'ADN, et en réduisant ensuite le recrutement de H2A (Volk and Crispino, 2015).

Enfin, CHAF1b est le chaperon primaire d'un groupe de protéines d'histone, appelées protamines, qui sont de petites protéines de liaison riches en arginine fortement basiques qui partagent un degré élevé d'homologie avec la protéine histone de liaison H1 (Braun, 2001). Les protamines permettent un très haut degré de compaction de la chromatine, protégeant fonctionnellement l'ADN des spermatozoïdes des dommages physiques et de mutagenèse (Caldwell and Handel, 1991). En effet, les protamines sont capables de condenser l'ADN à une taille qui est près de 200 fois plus petite que dans son état initial, ce qui permet à la moitié du génome de tenir à l'intérieur d'une spermatide. Chez les mammifères, les protamines ne remplacent pas directement les histones, mais fonctionnent par interaction avec des protéines intermédiaires appelées protéines de transition 1 et 2 (TNP1 et TNP2) (Caldwell and Handel, 1991). Une nouvelle fonction de chaperonne histone-indépendante de CHAF1b a récemment été élucidée dans des testicules chez la drosophile: l'homologue de CHAF1b, le facteur p75 est requis pour le dépôt de protamines sur l'ADN au cours de la phase tardive de la spermatogenèse (Doyen et al., 2013). Ces protamines remplacent complètement les histones traditionnelles dans le sperme mature (Eirin-Lopez et al., 2006). Alors que l'homologue de CHAF1a chez la drosophile, le facteur p180 est responsable du ciblage des protamines sur la chromatine des spermatides, l'homologue de CHAF1b, le facteur p75 est responsable de leur dépôt sur l'ADN (Doyen *et al.*, 2013).

4.4 Le complexe FACT : chaperonne des complexes histones H2A-H2B, H3-H4

Le complexe FACT (Facilitates Chromatin Transcription) est un complexe nucléaire abondant, qui a été identifié à l'origine dans les cellules de mammifères comme un facteur nécessaire pour l'élongation de la transcription sur les modèles chromatine. Il permet à l'ARN Pol II de transcrire des matrices d'ADN incorporées dans les nucléosomes (Orphanides et al., 1998; Reinberg and Sims, 2006). Le complexe déstabilise l'interaction entre le dimère H2A/H2B et le tétramère H3/H4 du nucléosome, en réorganisant ainsi la structure du nucléosome. De cette façon, le complexe FACT peut jouer un rôle dans la réplication de l'ADN et dans d'autres processus de la chromatine, ainsi que dans l'élongation de la transcription.

4.4.1 Les composants du complexe FACT

FACT est composé des deux protéines Spt16 et Pob3 (et leur homologues respectifs chez les mammifères SPT16 et SSRP1) (**Figure 31**). Chez les métazoaires, les homologues de SSRP1 contiennent un domaine HMG. Ce domaine, situé à l'extrémité C-terminale dans le cas de SSRP1 humaine, est impliqué dans la liaison à l'ADN; cependant, chez les levures et les protistes, ce domaine est absent (Brewster et al., 1998; Wittmeyer and Formosa, 1997). En revanche, le complexe FACT de levure interagit avec les nucléosomes à des loci où de multiples copies de la protéine Nhp6, qui contient des domaines HMGB, sont déjà présentes et qui fournit au complexe FACT l'activité de liaison à l'ADN (Brewster et al., 2001; Stillman, 2010). Néanmoins, Nhp6p ne forme pas de complexe stable avec l'hétérodimère Spt16p/Pob3p, et un excès molaire d'environ 10 fois de cette protéine par rapport à l'hétérodimère Spt16p-Pob3p est nécessaire pour l'activité *in vitro*, et pour favoriser la fonction de FACT *in vivo* (Brewster *et al.*, 2001; Formosa et al., 2001; Rhoades et al., 2004; Ruone et al., 2003). FACT est essentiel pour la viabilité cellulaire, mais les cellules de levure peuvent se développer lentement en absence de Nhp6p, suggérant que la fonction de liaison d'ADN peut ne pas être un élément central de l'activité de FACT, ou que d'autres facteurs pourraient remplacer Nhp6p. Nhp6p soutient également les activités de plusieurs autres facteurs chromatinien (pour revue Stillman, 2010), où il semble avoir un rôle général dans des processus liés à la chromatine chez la levure.

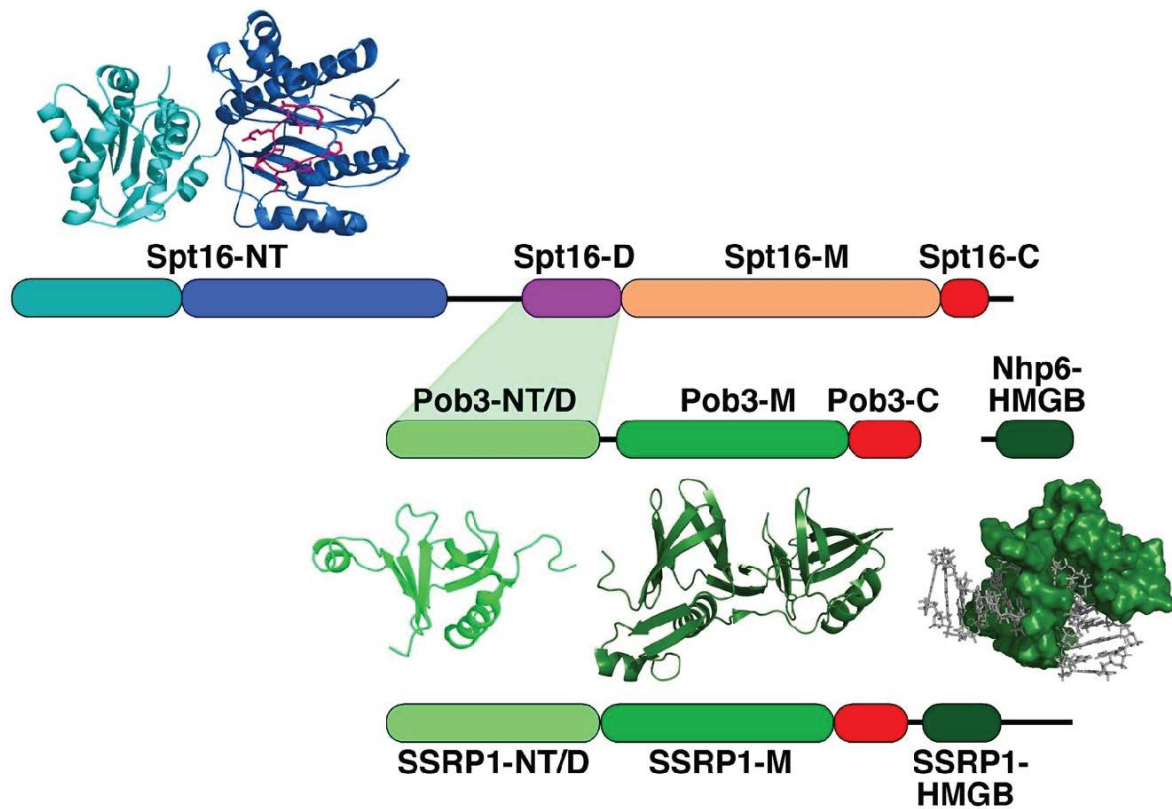


Figure 31 : Schéma montrant l'organisation structurale de Spt16p et Pob3p. Les domaines N-terminal (NT), de dimérisation (D), intermédiaire (M), C-terminal (C), et HMGB de Spt16p et Pob3p de *S. cerevisiae* et Nhp6 ainsi que la protéine SSRP1 humaine sont schématisées à l'échelle. Les domaines acides sont colorés en rouge. SSRP1 porte une extension C-terminale riche en sérine qui ne se retrouve pas chez la levure. Le domaine SPT16-NT possède deux lobes comme indiqué en cyan et bleu, avec la boucle entourant le domaine potentiel de liaison peptidique conservé indiquée en magenta. Les diagrammes en ruban des domaines dont les structures cristallographiques sont connus sont représentés, ainsi qu'une représentation de la surface de Nhp6p liée à l'ADN déterminée par RMN (SPT16-NT - PDB: 3BIQ, Pob3-NT/D - PDB: 3F5R, Pob3-M - PDB: 2GCL, et Nhp6-ADN - PDB: 1J5N). Extrait de Formosa et al., 2012.

Le complexe FACT humain lie les dimères d'histones H2A-H2B et H3-H4 *in vitro*, mais il a une plus grande affinité pour H2A-H2B (Hainer and Martens, 2016; Marciano and Huang, 2016; Orphanides et al., 1999; Winkler et al., 2011). Il maintient le contact avec des composants multiples du nucléosome simultanément, ce qui empêche la dispersion du nucléosome lors de la transcription (Formosa, 2012; Jamaï *et al.*, 2009). Les structures de plusieurs domaines ont été déterminées : pour les domaines N-terminal (SPT16-N) (Stuwe et al., 2008) et intermédiaires (Spt16-M) de Spt16 (**Figure 32**) (Kemble et al., 2013) et l'extrémité N-terminale/de dimérisation (Pob3-N/D) et le domaine intermédiaire (Pob3-M) de Pob3p (**Figure 33**) (Baker et al., 2001; VanDemark et al., 2006; VanDemark et al., 2008).

La structure 3D de SPT16-N suggère une fonction de liaison peptidique, mais le ligand physiologique et le rôle de ce domaine non essentiel demeurent incertains. Le domaine Pob3-N/D forme un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) (Belotserkovskaya et al., 2004), et le domaine Pob3-M comprend deux domaines PH qui sont fixés de façon rigide l'un par rapport à l'autre dans un arrangement inhabituel appelé à double domaine pleckstrine (VanDemark *et al.*, 2006). Notamment, la chaperonne Rtt106p de H3-H4 forme aussi un domaine double PH, et des modèles de l'interaction entre Rtt106p et H3-H4 ont été proposés (cf. **Chapitre 4.5.1**) (Su *et al.*, 2012; Zunder *et al.*, 2012). Les domaines PH et double PH, qui partagent souvent peu d'homologie au niveau de la séquence primaire et sont donc difficiles à reconnaître en absence d'informations structurales, apparaissent donc comme des éléments communs des chaperons d'histones.

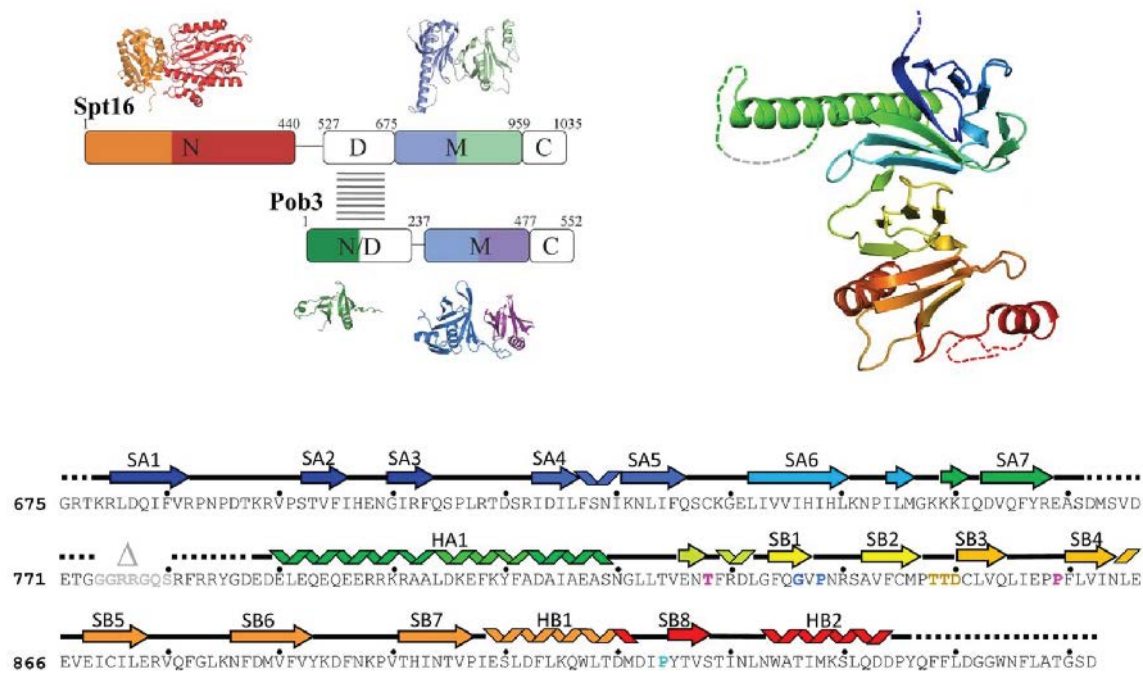


Figure 32 : Structure de Spt16p chez *S. cerevisiae*. **Gauche:** Organisation des domaines et structures de Spt16p associée à Pob3p. Les limites des domaines N-terminal (N), de dimérisation (D), Intermédiaire (M), et C-terminal (C) sont précisées. Les structures se basent sur les données PDB suivantes: Spt16-N (PDB: 3BIT), Spt16-M (PDB: 4IOY), Pob3-N/D (PDB: 3F5R), et Pob3-M (PDB: 2GCL). **Droite:** Représentation de Spt16-Mp coloré en gradient de l'extrémité N-terminale (bleu) vers l'extrémité C-terminale (rouge). Les résidus désordonnés sont représentés en lignes pointillées. La région supprimée dans la construction Spt16-Mp est marquée en lignes pointillées grises. **Bas:** La séquence en aminoacides de Spt16-Mp avec affichage des éléments de structure secondaire en haut de la séquence. Après Kemble *et al.*, 2013.

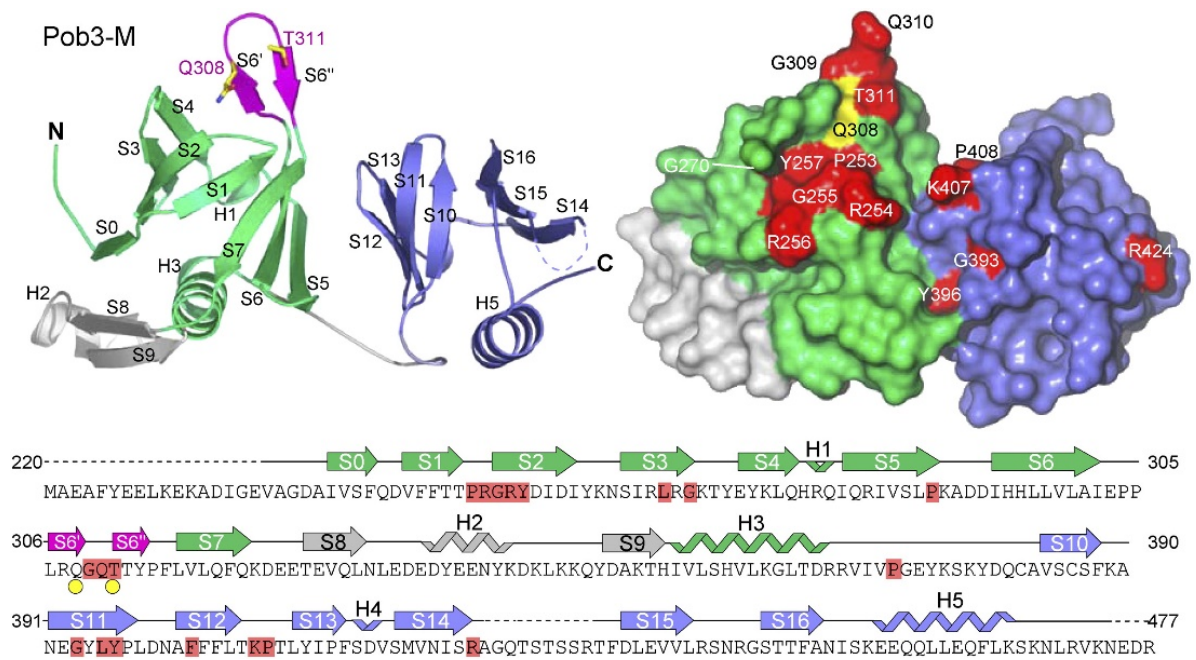


Figure 33 : Structure de la protéine Pob3-M. **Gauche:** Représentation de Pob3Mp. Les domaines PH (rose), N-terminal (vert) et C-terminal (bleu) sont montrés. **Droite:** Représentation des surfaces du Pob3Mp. Les surfaces de Pob3p/SSRP1 conservées dans 12 organismes sont montrées en rouge. **Bas:** La séquence en acides aminés de Pob3Mp avec affichage des éléments de structure secondaire en haut de la séquence. D'après VanDemark *et al.*, 2006.

4.4.2 Les fonctions du complexe FACT

FACT est essentiel pour la viabilité cellulaire chez les eucaryotes, bien que des souches viables de *S. pombe* dépourvues de la sous-unité Pob3p ont été décrites (Formosa, 2008; Van Lijsebettens and Grasser, 2010). Spt16p a été identifiée dans deux cribles génétiques. L'un visait à rechercher des facteurs responsables du renforcement de l'initiation de la transcription dans un système rapporteur. Ainsi, une dérégulation de l'activité de Spt16p, soit augmentée soit diminuée, est capable de réprimer l'insertion du transposon Ty1 dans un système de gène rapporteur, en permettant l'initiation de la transcription à des sites inappropriés. Un autre crible avait pour objectif d'identifier des facteurs qui contrôlent la progression du cycle de division cellulaire. Ainsi, une diminution de l'activité de Spt16 a provoqué la baisse des taux de transcription des cyclines G1, raison pour laquelle il a également été nommé Cdc68 (Clark-Adams et al., 1988; Malone et al., 1991; Prendergast et al., 1990; Rowley et al., 1991).

Tandis que des mutations de Pob3p entraînent également des défauts dans la transcription, Pob3p a d'abord été identifiée comme un facteur associé à l'ARN Pol II et physiquement associé à la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase α chez la levure (Wittmeyer and Formosa, 1997), impliquant ainsi FACT dans la réplication de l'ADN. Des travaux ultérieurs ont renforcé les liens avec des facteurs de transcription et la machinerie de réplication (Formosa, 2008; Kundu et al., 2011; Reinberg and Sims, 2006), et il a été proposé un rôle dans la fonction centromérique (Lejeune et al., 2007). Ces activités peuvent toutes être attribuées à la capacité principale de FACT de modifier les propriétés de la chromatine par sa liaison aux histones et aux nucléosomes, mais la gamme des processus dont il est impliqué suggère que ses rôles dans les processus liés à la chromatine sont très étendus (pour revue Formosa, 2012).

FACT a également été impliquée dans la réparation de l'ADN en tant que facteur de spécificité pour la caséine kinase II, qui l'amène à phosphoryler le résidu sérine 293 de la p53 humaine en réponse à des lésions dues aux UV (Keller and Lu, 2002), et le transport de l'ARNm (Hautbergue et al., 2009). Ces fonctions ne semblent pas impliquer l'activité de chaperonne d'histones, mais peuvent plutôt compter sur la capacité de FACT d'interagir avec une large gamme de protéines à travers ses multiples motifs de liaison.

FACT interagit physiquement avec Swi6p, un facteur du complexe de liaison à l'ADN site-spécifique (Takahata et al., 2009a) et avec le facteur de liaison à l'ADN simple brin RPA (VanDemark et al., 2006), mais ces interactions semblent recruter FACT respectivement, sur des promoteurs spécifiques ou dans des étapes intermédiaires pendant la réplication de l'ADN.

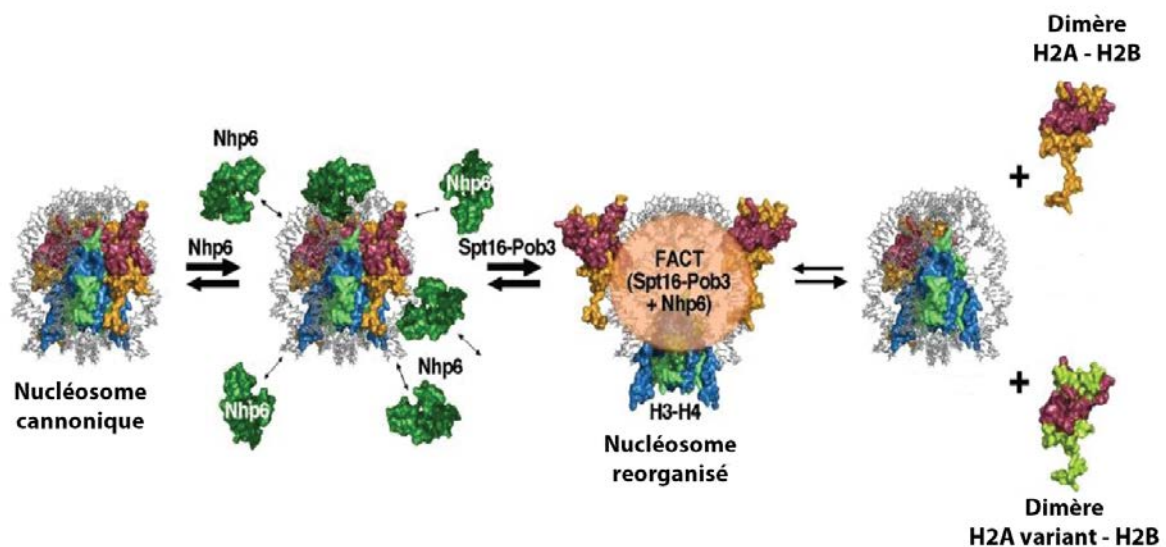


Figure 34 : Modèle pour la réorganisation des nucléosomes par le complexe FACT. Nhp6p se lie à l'ADN à la surface d'un nucléosome canonique, pliant l'ADN et déstabilisant les contacts histones-ADN. Les cycles répétés de liaison-flexion-libération dans un court intervalle de temps rendent le nucléosome moins stable et plus adapté à la réorganisation par Spt16p-Pob3p. La réorganisation implique la rupture des contacts entre les dimères H2A-H2B et H3-H4, mais les composants du nucléosome restent associés ensemble par l'intermédiaire de FACT sous une forme dans laquelle l'ADN est largement accessible. Cette forme dynamique perd les dimères H2A-H2B à une fréquence plus élevée que les nucléosomes canoniques. Dans le modèle de "déplacement des dimères" FACT procède directement au déplacement d'un dimère H2A-H2B pour former un hexasome. FACT pourrait favoriser l'insertion de formes variantes de H2A-H2B. L'extrémité C-terminale prolongée de H2A, qui constitue le domaine d'ancrage et qui est en partie responsable de la stabilité du dimère-tétramère dans l'octamère de base est montré. Extrait de Formosa, 2012.

4.4.2.1 Réorganisation des nucléosomes

FACT lie les nucléosomes *in vitro* avec un KD apparent d'environ 10 nM (Ruone *et al.*, 2003). Cette liaison est associée à une plus grande accessibilité globale de l'ADN au sein du nucléosome (ADN nucléosomique) pour certaines endonucléases (Formosa *et al.*, 2001; Rhoades *et al.*, 2004). En présence de FACT, les nucléosomes sont dans une configuration plus ouverte dans laquelle l'ADN est nettement plus accessible (**Figure 34**).

FACT peut interagir avec des complexes de remodelage des nucléosomes (Takahata *et al.*, 2009b). Ainsi, des enzymes de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes augmentent l'accessibilité à l'ADN nucléosomique, dans la plupart des cas par une translocation du noyau d'octamère d'histones au long de l'ADN pour déplacer le site de reconnaissance dans l'ADN en dehors du nucléosome (Clapier and Cairns, 2009). FACT n'hydrolyse pas l'ATP, ne partage pas la similarité de séquence avec des enzymes de remodelage ATP-dépendantes, et ne diffuse pas dans les noyaux des histones (Orphanides *et al.*, 1998; Rhoades *et al.*, 2004).

La réorganisation des nucléosomes nécessite une déstabilisation de l'interaction entre les dimères H2A-H2B et les tétramères (H3-H4)₂ mais la réorganisation de nucléosomes par FACT n'implique pas l'expulsion complète des dimères H2A-H2B (Xin *et al.*, 2009). La réorganisation implique un équilibre entre une forme canonique fermée et une forme réorganisée ouverte de nucléosomes (**Figure 34**). Chaque forme a la même composition, mais la forme réorganisée est intrinsèquement plus favorable à un déplacement de dimères H2A-H2B.

4.4.2.2 Lien avec l'ARN Pol II

FACT a initialement été purifiée en utilisant sa capacité à favoriser l'élongation de l'ARN Pol II *in vitro* (Orphanides *et al.*, 1998). Pol II s'arrête principalement à deux sites, environ 15 et 45 nt dans le nucléosome, et FACT favorise principalement la progression à travers la pause à 45 nt. La pause à 15 nt est due au contact entre le dimère H2A-H2B et l'ADN, tandis que la pause à 45 nt marque la transition vers la phase de contacts H3-H4:ADN, ce qui suggère que FACT aide principalement la polymérase à surmonter les liaisons entre l'ADN et le tétramère (H3-H4)₂. FACT pourrait donc modifier la stabilité de l'association des tétramères avec l'ADN, ou en modifiant la dynamique interne des nucléosomes en supprimant les dimères H2A-H2B. Dans les deux cas, l'effet principal de FACT *in vitro* sur la transcription de l'ARN Pol II ne se produit pas au moment où la polymérase approche le nucléosome mais dans les étapes ultérieures.

4.4.2.3 Eviction des nucléosomes

L'activation de la transcription implique l'expulsion des nucléosomes pour permettre l'assemblage des complexes de transcription sur les sites d'ADN de promoteurs, qui sont autrement inaccessibles. Des chaperonnes d'histones, tels que Asf1p ont été impliqués dans l'expulsion des nucléosome (Adkins et al., 2004), mais il est actuellement difficile de savoir si les chaperonnes jouent un rôle actif dans l'initiation du désassemblage des nucléosomes ou un rôle passif, de transport des histones libérées au niveau des sites où d'autres facteurs, tels que des facteurs de remodelage ATP-dépendants fonctionnent. FACT semble capable de jouer les deux rôles. Conformément à cette possibilité, FACT a été démontré être nécessaire pour l'expulsion des nucléosome pendant l'activation de plusieurs promoteurs de levure inductibles ou régulés en fonction du cycle cellulaire (Ransom et al., 2009; Takahata et al., 2009a, b; Xin et al., 2009).

L'éviction des nucléosomes dans la région la plus distale du promoteur commence avant que l'ARN polymérase soit recrutée, et dépend de la reconnaissance des sites dans l'ADN par Swi5p, suivie par le recrutement des complexes coactivateurs SWI/SNF, SAGA et Médiateur. Cette expulsion initiale ne nécessite pas FACT ou Asf1p, mais une deuxième vague d'expulsion de nucléosomes plus proche du site de début de transcription nécessite FACT, et une troisième vague adjacente à la seconde nécessite Asf1p. Le dépôt des histones sur les sites de liaison de Swi5p commence de manière précoce et concomitante à d'autres expulsions à des sites plus éloignés, et ce processus exige à la fois la présence de FACT et Asf1p. Il n'est pas connu comment l'expulsion affecte certains nucléosomes sans que la déstabilisation se propage dans les régions voisines jusqu'à ce que d'autres facteurs comme FACT ou Asf1p soient recrutés.

4.4.2.4 Rôle dans la transcription

La transcription est associée à des taux élevés de remplacement des histones, en partie à cause de l'expulsion des nucléosomes de certains promoteurs lors de l'activation, et en partie à cause de la déstabilisation de nucléosomes lors de l'élongation de la transcription (Kulaeva et al., 2007; Williams and Tyler, 2007). La mesure des taux de remplacement des histones dans les cellules normales et dans des cellules avec une activité FACT diminuée (Jamai et al., 2009) a montré que les taux de recyclage des histones en présence de FACT étaient faibles, mais augmentent de façon spectaculaire quand l'expression de FACT est réduite. Les taux de recyclage augmentent pour les dimères H2A-H2B et aussi pour les tétramères (H3-H4)₂. Les gènes fortement transcrits montrent des effets plus importants, et l'inhibition de la transcription diminue le taux de recyclage. Un rôle physiologique de FACT

est donc d'empêcher la transcription au niveau de nucléosomes désassemblés, probablement en empêchant les histones de se disperser ou en favorisant le réassemblage rapide des nucléosomes avec les composants d'origine, afin que de nouvelles histones ne soient pas recrutées.

Une deuxième ligne de preuves liant FACT à la stabilisation des nucléosomes provient d'études portant sur l'activation des promoteurs cryptiques. Des séquences typiques de promoteur sont présentes au sein de certaines unités de transcription. Cependant, ces sites ne sont pas capables d'initier la transcription, en raison des effets répresseurs de la structure de la chromatine locale, mais ils peuvent être activés si la structure de la chromatine est modifiée (Kaplan et al., 2003; Mason and Struhl, 2003). Les facteurs qui favorisent le réassemblage des nucléosomes perturbés par la transcription ou qui inversent les marques d'activation de l'initiation de la transcription sont donc nécessaires pour éviter que ces promoteurs cryptiques soient fonctionnels. Ainsi, des mutations dans les gènes qui codent des chaperonnes d'histones tels que FACT activent des promoteurs cryptiques (Carrozza et al., 2005; Cheung et al., 2008).

4.4.2.5 Echange des histones

La réorganisation des nucléosomes implique des déplacements de dimères H2A-H2B et leur remplacement par des formes variantes d'histones, comme par exemple le variant H2A.X lors de la réparation des cassures d'ADN double brin. Dans des cellules de mammifères, l'introduction de cette forme dans les nucléosomes est inhibée par l'absence de FACT (Heo et al., 2008). FACT semble être à la fois chaperonne et facteur d'échange pour cette réaction.

FACT est impliquée dans la fonction de la forme variante H2A.Z (Htz1p chez la levure). La suppression de HTZ1 augmente les défauts causés par des mutations de FACT (Biswas et al., 2006; Santisteban et al., 2011). Par ailleurs, des allèles de Spt16p qui suppriment les défauts causés par la perte de Htz1p ont également été décrits (Santisteban et al., 2011). Bien que FACT humain ne favorise pas l'échange d'H2A.Z *in vitro* (Santisteban et al., 2011), la preuve d'un rôle direct pour FACT chez la levure comme chaperonne d'H2A.Z a été décrite *in vivo* (Luk et al., 2007).

4.4.2.6 Assemblage des nucléosomes pendant la réplication

Comme nous l'avons décrit auparavant, la réplication nécessite une production rapide d'un grand nombre de nucléosomes. Plusieurs chaperonnes d'histones ont été impliquées dans ce processus (**Figure 28**), y compris Asf1p, CAF-1, et Rtt106p (**Chapitre 1.5**) (Groth et al., 2007; Ransom *et al.*, 2010). FACT est un candidat probable pour un rôle central dans la formation des nucléosomes naissants, car il est physiquement associé à la machinerie de réplication de l'ADN, il est essentiel pour la viabilité, il peut déposer les histones sur l'ADN (Belotserkovskaya *et al.*, 2003; Xin *et al.*, 2009). Une autre ligne de preuves à l'appui d'un rôle de FACT dans le dépôt des nucléosomes lors de la réplication provient de l'analyse des phénotypes de cellules cumulant des mutations délétères dans les gènes des composants du complexe FACT et des mutations dans les gènes d'histones. La létalité synthétique entre Pob3p et des mutants de l'histone H4 qui ont perdu la capacité d'être acétylées suggère que lorsque Pob3p est défectueux, les cellules ne peuvent pas tolérer une autre mutation qui perturbe également le dépôt des nucléosomes. Les cellules dépourvues de FACT fonctionnel sont également incapables de tolérer des pertes de l'histone acétyltransférase Gcn5p (Formosa et al., 2002). Néanmoins, une des difficultés dans l'interprétation des effets génétiques entre FACT et Gcn5p est le fait que Gcn5p est également importante pour la régulation de la transcription, donc on ne peut pas apprécier si le défaut de synthèse observé sur les taux de croissance reflète un problème dans la réplication, un problème dans la transcription, ou les deux.

4.5 La protéine Rtt106 : chaperonne des histones H3 et H4

Rtt106p (Regulator of Ty1 Transposition) est l'une des premières chaperonnes identifiée parmi celles ayant une activité d'interaction avec des histones portant des modifications spécifiques. Chez la levure, elle participe au dépôt des histones H3 et H4 nouvellement synthétisées sur la chromatine au cours de la réplication et de la transcription (Fillingham et al., 2009; Li *et al.*, 2008). Rtt106p joue également un rôle dans la formation de l'hétérochromatine (Huang et al., 2005a; Huang et al., 2007a). L'affinité de liaison aux histones de Rtt106p est renforcée par l'acétylation de la lysine 56 de H3 (H3K56ac) (Li *et al.*, 2008). Au cours de la phase S de réplication, toutes les protéines H3 nouvellement traduites sont acétylées au niveau de K56, et sont incorporées dans la chromatine au cours de l'assemblage des nucléosomes dépendant ou indépendant de la réplication, puis déacétylées à mesure que les cellules passent en phase G2 (Celic et al., 2006; Masumoto *et al.*, 2005). Par conséquent, la spécificité de Rtt106p pour l'interaction avec H3K56ac peut

agir comme un mécanisme de tri qui fait la distinction entre les histones nouvellement synthétisées et les histones recyclées portant d'autres modifications post-traductionnelles (Zunder *et al.*, 2012). Rtt106p prend en charge les dimères H3-H4 ubiquitinylés libérés de leur interaction avec Asf1p et réalise l'assemblage des tétramères H3-H4 pour la formation des nucléosomes (Fazly *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Winkler *et al.*, 2012).

Rtt106p oligomérise *in vivo*. La forme tronquée de Rtt106 (1-315), qui conserve la fonction complète *in vivo*, forme des homodimères via sa région N-terminale (Fazly *et al.*, 2012). Le domaine PH de Rtt106 est le site de liaison du dimère d'histones H3-H4 *in vivo* et *in vitro* (Li *et al.*, 2008). Des mutations à l'interface des homo-dimères inactivent la liaison de Rtt106p avec H3-H4 *in vivo*, ce qui appuie fortement l'idée que l'oligomérisation de Rtt106, et vraisemblablement la dimérisation, est nécessaire à Rtt106p pour lier H3- H4 *in vivo* (Fazly *et al.*, 2012).

L'incorporation des histones H3 acétylées (H3K56ac) médiée par Rtt106p dans la chromatine est importante pour plusieurs processus cellulaires. Lors de l'assemblage des nucléosomes pendant la réplication, Rtt106p fournit H3K56ac aux sites de synthèse de l'ADN par l'intermédiaire d'une interaction physique directe avec les sous-unités Cac1p et Cac2p du complexe chaperonne d'histones CAF-1 (Cac1p, Cac2p et Msi1p) de *S. cerevisiae* (Huang *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2012). Comme Rtt106p, CAF-1 lie spécifiquement H3K56ac (Li *et al.*, 2008). Les souches invalidées pour les gènes *RTT106* et *CAC1* ($\Delta RTT106\Delta CAC1$) présentent des sensibilités synergiques à des agents endommageant l'ADN dans la phase S, ce qui suggère que Rtt106p et CAF-1 exercent des fonctions qui se superposent pendant le *turnover* des nucléosomes couplé avec la réplication (Li *et al.*, 2008). Au cours de la répression chromatinienne, Rtt106p interagit physiquement avec Sir4p, un membre du complexe Sir (silent information regulator), qui forme un domaine répressif au niveau des régions silencieuses du génome (Huang *et al.*, 2007a; Rusche *et al.*, 2003). Ce type de répression est défectueux dans les souches $\Delta RTT106\Delta CAC1$ (Huang *et al.*, 2005a; Huang *et al.*, 2007a).

4.5.1 Structure de la protéine Rtt106

Rtt106p est une protéine de 455 acides aminés, 52 KDa, codée sur le chromosome XIV de la levure *S. cerevisiae*. Sa structure 3D a été résolue par plusieurs groupes (Liu *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2012; Zunder *et al.*, 2012). Les premières données structurales ont été obtenues en 2010 par l'équipe de Shi (Liu *et al.*, 2010) et concernent le domaine central de la protéine (Rtt106-M, résidus 65–320), qui adopte une architecture organisée par deux domaines homologues à la pleckstrine PH (pleckstrin homology) (**Figure 35**), PH1 et PH2,

qui sont intimement associés par un réseau d'interactions hydrophobes. Il s'est avéré impossible de produire chacun des domaines de façon séparée. L'organisation est donc de type à double domaine PH.

Ces premières données structurales de Rtt106p-M ont identifié que cette structure est très proche de celle déjà connue du domaine central de Pob3p/SSRP1 (VanDemark et al., 2006) (cf. **Chapitre 4.4.1**). Pob3p et SSRP1 sont structurellement et fonctionnellement plus étroitement liées, et Rtt106p est liée du point de vue évolutif à ces protéines, mais fonctionne dans des processus différents. Il est intéressant de noter que l'homologue fonctionnel de Rtt106p chez les mammifères n'a pas encore été identifié.

L'affinité de Rtt106p pour les histones acétylées est inattendue, car il lui manque l'un ou l'autre des deux domaines connus de liaison à l'acétyl-lysine: un bromodomaine ou comme chez les plantes un homéodomaine (Andrews et al., 2016; Deeney et al., 2016; Jacobson et al., 2000; Zeng et al., 2010). Dans cette première structure 3D de Rtt106p-M, une boucle hautement conservée entre les brins β S12 et S13 dans le second feuillet β anti-parallèle (S12-S14) de PH2 a été identifiée comme étant cruciale pour la liaison au tétramère des histones (H3-H4)₂ (Liu et al., 2010). Les résidus exposés aux solvants sur ce feuillet sont soit hautement conservés soit sont du même type dans les homologues de Rtt106p, et ils forment une surface essentiellement neutre, bien que partiellement acide. Cette surface juxtapose étroitement la boucle conservée et peut également contribuer à l'interaction entre Rtt106p-M et le tétramère (H3-H4)₂. De l'autre côté de la boucle, trois résidus conservés (Glu133, Glu230 et Asp287) constituent un motif acide, par lequel Rtt106p-M pourrait neutraliser la charge positive des histones (**Figure 36**).

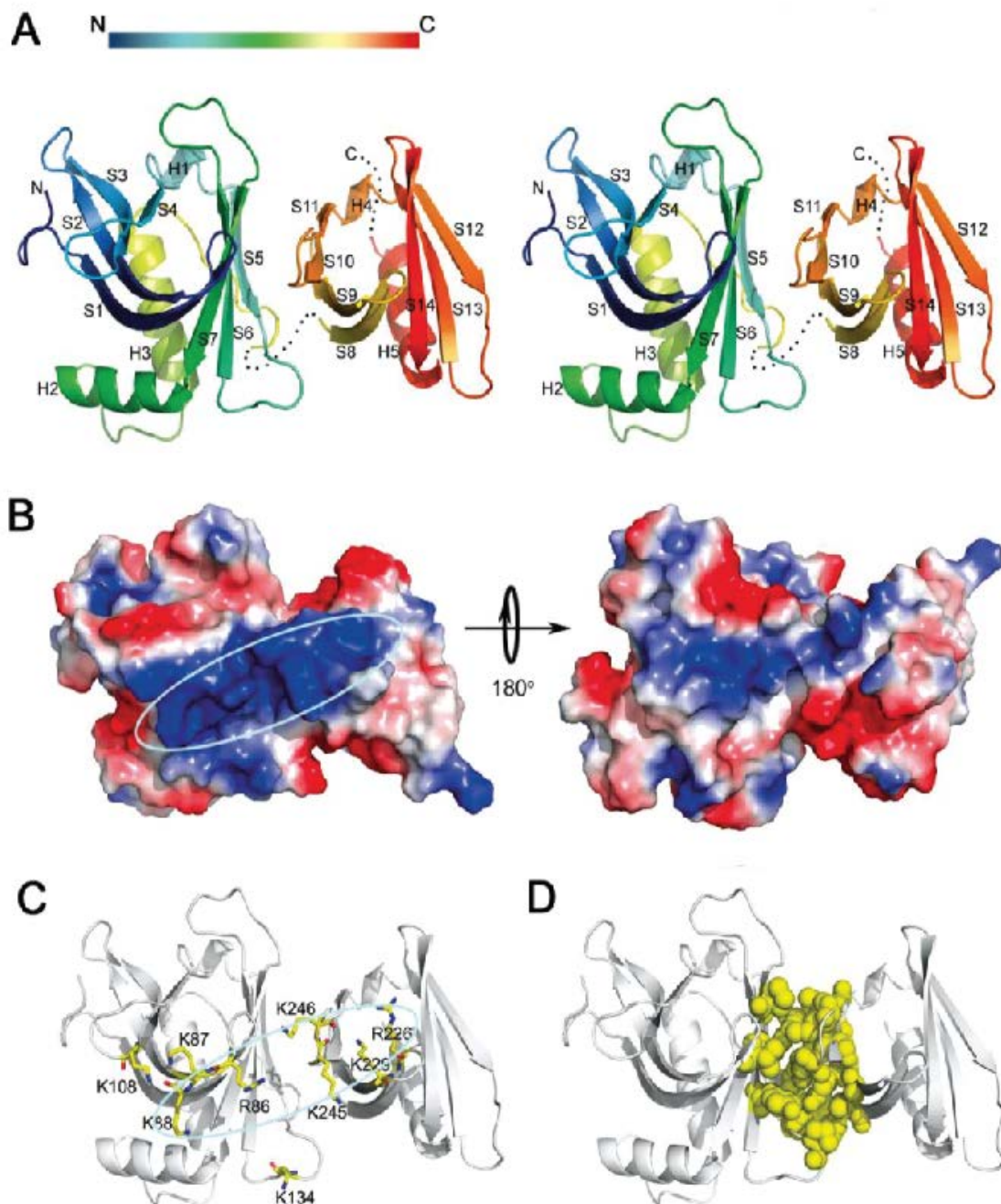


Figure 35 : Structure tridimensionnelle de Rtt106-Mp (aa 65-320). (A) Modèle tridimensionnel de Rtt106-Mp. Les résidus désordonnés entre les deux domaines PH et à l'extrémité C-terminale sont montrés en lignes pointillées. (B) Surface accessible au solvant du modèle de Rtt106-Mp. L'orientation de l'image à gauche est la même que dans la figure (A). L'ellipse indique la région chargée positivement. (C) Illustration sur le modèle tridimensionnel des résidus participant à la formation de la surface chargée positivement. (D) Résidus conservés à l'interface des deux domaines PH. Les modèles dans les figures (C) et (D) ont la même orientation que dans la figure (A). Extrait de Liu *et al.*, 2010.

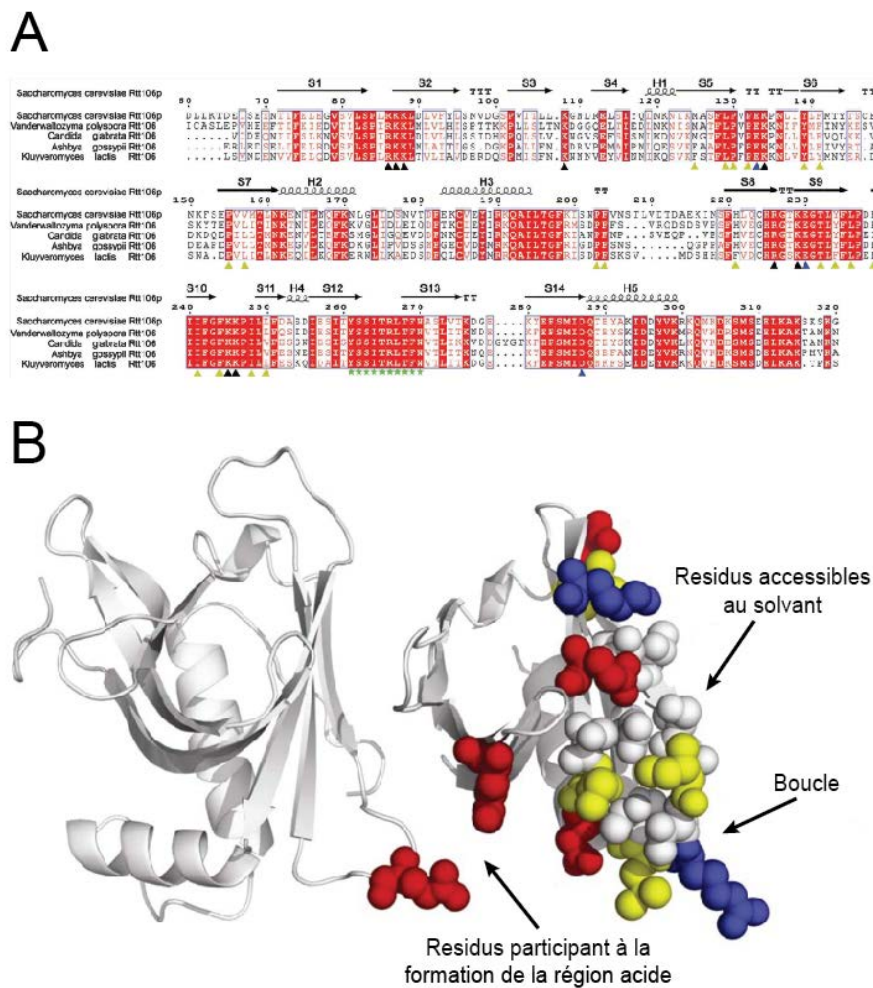


Figure 36 : Représentation de la région acide de Rtt106p chez *S. cerevisiae*. (A) Alignement de séquences des domaines à doubles domaines PH entre Rtt106p et ses homologues. Alignement réalisé avec ClustalW2 avec les séquences suivantes: *S. cerevisiae* Rtt106p (gi|6324123|NP_014193.1); *Vanderwaltozyma polyspora* Rtt106p (gi|156837701|XP_001642870.1); *Candida glabrata* Rtt106p (gi|50289433|XP_447148.1); *Ashbya gossypii* Rtt106p (gi|45185065|NP_982782.1), et *Kluyveromyces lactis* Rtt106p (gi|50307819|xp_453.903,1). Les structures secondaires et les numéros de résidus de Rtt106-Mp sont affichés en haut. Les résidus comprenant la zone chargée positivement impliquée dans la liaison à l'ADN sont désignés par un triangle noir; les résidus hydrophobes à l'interface des deux domaines PH sont désignés par un triangle orange; les résidus comprenant la boucle cruciale pour la liaison avec H3-H4 sont désignés par un astérisque. Les trois résidus chargés négativement hautement conservés qui forment un patch négatif près de la boucle conservée sont indiqués par un triangle bleu. (B) Représentation des résidus exposés au solvant mis en évidence sur le deuxième domaine PH de Rtt106-Mp: le second feuillet β (S12-S14), les régions en boucle S12 et S13 et une région acide voisine formée par trois résidus très conservés (E133, E230 et D287). Les résidus neutres sont représentés en blanc, les résidus hydrophobes en jaune, les résidus chargés positivement en bleu et les résidus acides en rouge. Extrait de Liu *et al.*, 2010.

Par la suite, la structure 3D d'autres versions de Rtt106p tronquée de ses extrémités N et C terminales (Rtt1106-Mp) a été résolue par les groupes de G. Mer et J. Rine (résidus 69-300 dans Zunder *et al.*, 2012; et 68-301 dans Su *et al.*, 2012). De plus, la structure du domaine de dimérisation (acides aminés 1-42) a été établie par RMN (Su *et al.*, 2012). Ces deux études ont apporté des informations sur le mode d'interaction de Rtt106p avec l'histone H3: l'équipe de G. Mer a étudié par ITC l'interaction entre deux fragments de Rtt1106p (1-42 et 68-301) et le complexe H3-H4 acétylés ou non au niveau de la lysine 56 de l'histone H3, et a résolu la structure cristalline du complexe formé entre un peptide acétylé de H3 et Rtt106p₆₈₋₃₀₁ (Su *et al.*, 2012) ; l'équipe de J. Rine a analysé l'effet de mutations, introduites par mutagenèse dirigée, sur les fonctions *in vivo* de Rtt106p dans la réplication et le *silencing* par formation d'hétérochromatine. Le choix des résidus à muter s'est basé sur les informations des structures 3D de Rtt106p et de Pob3p, (Zunder *et al.*, 2012).

La publication de la première structure 3D de Rtt106p a permis d'identifier que le domaine PH2 porte la région d'interaction avec le complexe d'histones H3-H4 (Liu *et al.*, 2010). Dans le complexe avec le peptide de H3 acétylé, la lysine acétylée se place dans une cavité de PH2 bordée par les résidus A253, D238, P237, Y297, R300 et K301 (Su *et al.*, 2012). Le rôle de ces résidus a été confirmé par des expériences de co-immunoprécipitation de H3 avec des variants de Rtt106p mutés au niveau de ces résidus. Cette étude montre également une interaction, mais de plus faible affinité, du domaine 1-42 de Rtt106p avec le complexe H3-H4. Cette étude propose que l'interaction de Rtt106p avec le complexe H3-H4 serait donc la combinaison d'au moins deux zones d'interaction : l'un de forte affinité entre le domaine PH2 et H3 acétylée et la seconde de plus faible affinité entre le domaine 1-42 et H3-H4.

Dans la deuxième étude, l'approche par mutagenèse a permis d'identifier deux zones importantes pour la fonction de Rtt106p: l'une impliquant des résidus (S80 et R86) présents dans des brins β du domaine PH1, et l'autre une boucle de neuf résidus qui connecte deux brins β dans le domaine PH2 (Zunder *et al.*, 2012). La propriété basique de la zone identifiée au niveau de PH1 mais pas celle de la boucle de PH2 s'est avérée essentielle pour l'activité de Rtt106p. L'importance de ces deux zones pour l'interaction avec H3 a été confirmée par des expériences d'immunoprécipitation. Il est connu que des surfaces distinctes de la chaperonne d'histones Asf1p sont mises en jeu pour interagir avec H3 et H4 (English *et al.*, 2006).

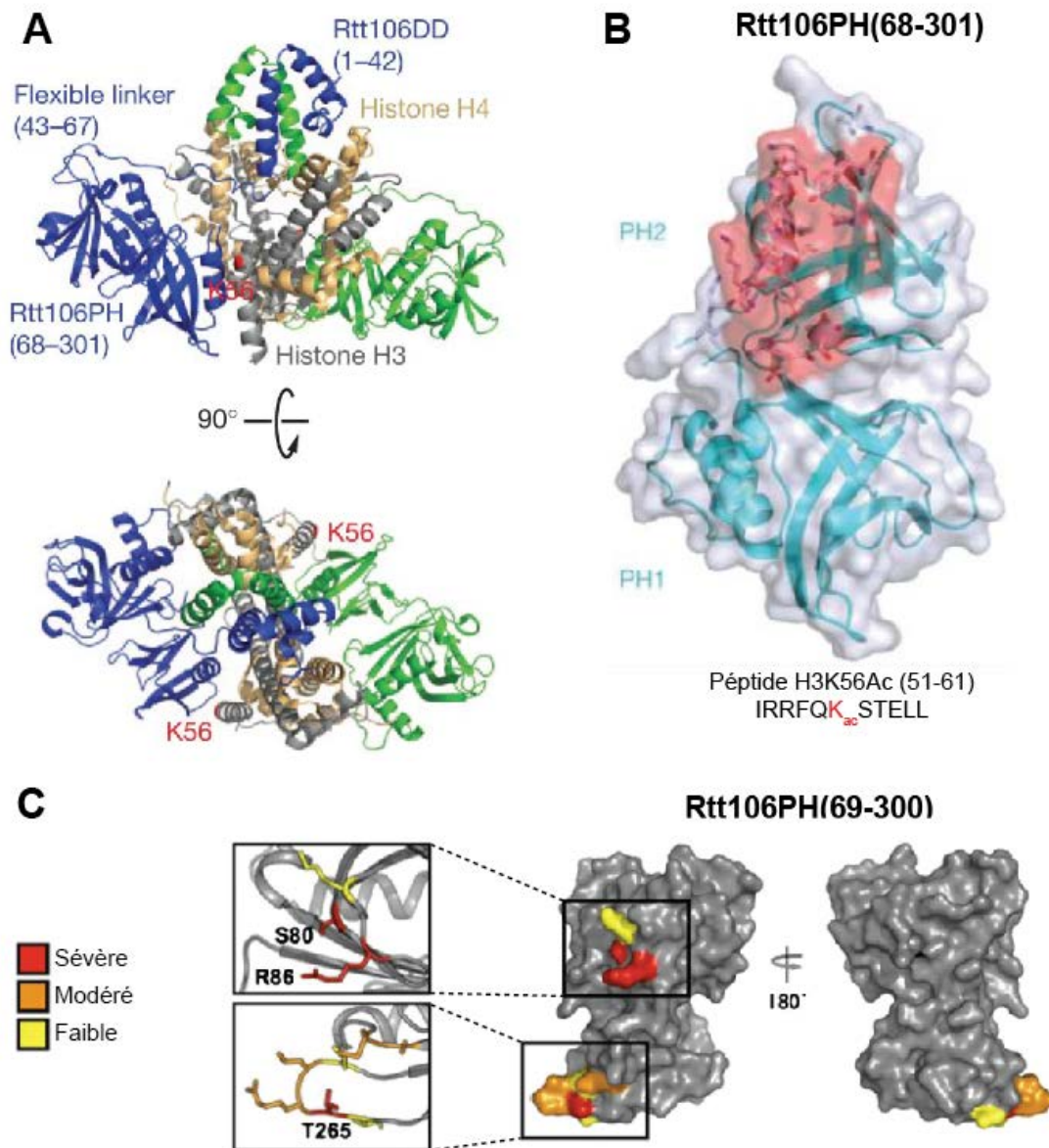


Figure 37 : Modélisation du complexe Rtt106K56Ac-(H3-H4)₂. (A) Modèle structural de Rtt106p (résidus 1–301) en complexe avec un tétramère (H3-H4)₂. Structure de Rtt106p: PDB 3TW1. Structure de (H3-H4)₂: PDB: 1ID3. (B) Structure cristalline du double domaine PH de Rtt106p (résidus 68–301) avec la surface d'interaction avec H3K56ac colorée en rouge. (C) Deux surfaces importantes dans les deux motifs PH pour la fonction de Rtt106p. Des résidus qui altèrent la fonction de Rtt106p quand ils sont mutés sont colorés en fonction de la sévérité de l'effet: sévère (rouge: S80E, R86A, et T265E), modéré (orange: RL266, 267AA et SM284, 285AA) ou faible (jaune: I264A, K88A, and T268E). Adapté de Su *et al.*, 2012; Zunder *et al.*, 2012; Zunder and Rine, 2012.

Bien qu'il soit contre-intuitif qu'une surface basique sur Rtt106p puisse permettre l'interaction avec les histones fortement basiques, les histones possèdent des régions acides qui ont déjà été impliquées dans des interactions avec d'autres histones (Luger et al., 1997). Par conséquent, Rtt106p peut exploiter un mécanisme d'association similaire pour réguler l'assemblage des nucléosomes en masquant par exemple ces régions avant la formation de l'octamère d'histones (Zunder et al., 2012). Alternativement, le motif basique pourrait coordonner la liaison des histones par l'intermédiaire d'une interaction intramoléculaire avec le domaine acide C-terminal de Rtt106p. Cette idée est en accord avec la constatation que Rtt106p est capable d'interagir avec H3 *in vivo*, alors que Rtt106-Mp ne l'est pas (Zunder et al., 2012).

Par contraste avec les résidus conservés dans les domaines N-terminaux PH1 de Rtt106p et Pob3p et qui sont impliqués dans l'interaction avec les histones, la boucle C-terminale de Pob3p peut être mutée entièrement sans engendrer de perte de fonction, contrairement à Rtt106p. Ainsi, au sein des structures à double domaine PH, telles que présentes dans Rtt106p ou Pob3p, la surface basique de PH1 correspond à une surface conservée pour l'interaction de ces protéines avec l'histone H3 ou H4 alors que la boucle C-terminale n'est importante que pour Rtt106p où elle contribue à la spécificité de Rtt106p pour H3K56ac et son interaction avec cette histone (Zunder et al., 2012).

De plus, une surface basique présente dans le domaine de PH1 de Rtt106p, est nécessaire pour une faible activité de liaison à l'ADN ($K_d \sim 22 \mu\text{M}$) (Liu et al., 2010). Deux mutants qui ont été testés (R186A/K187A et K245A/K246A), ont perdu complètement la capacité d'interagir avec de l'ADNdb utilisé dans ces expériences. Cette perte d'interaction n'est pas due à une altération de la structure de la protéine mais à la perte de charge positive globale de cette région (Liu et al., 2010). Une région similaire chargée positivement se trouve à la surface de Pob3p-M, de sorte que Pob3p peut également se lier à l'ADN, mais avec une affinité plus faible que Rtt106 (Liu et al., 2010). L'association à l'ADN a été rapportée pour une seule autre chaperonne, la protéine humaine SET, membre de la famille NAP-1 (Muto et al., 2007). Fait intéressant, SET utilise des surfaces d'interaction qui se chevauchent pour interagir avec les histones et l'ADN (Zunder et al., 2012). Comme Rtt106p, des mutations au sein de cette surface perturbent les interactions avec les histones et avec l'ADN, ce qui suggère que la liaison à chaque cible pourrait être mutuellement exclusive (Liu et al., 2010). Ces résultats suggèrent que la compétition entre l'ADN et les histones pour établir une interaction avec cette surface peut fonctionner comme un mécanisme ATP indépendant conservé pour permettre la dissociation des histones de l'ADN (Zunder et al., 2012).

4.5.2 Autres partenaires identifiés de Rtt106p

4.5.2.1 *Les complexes de remodelage de la chromatine RSC et SWI/SNF*

Rtt106p interagit directement avec les deux complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF et RSC, et cette interaction est essentielle pour la localisation de ces deux complexes aux *loci* des gènes d'histones dont l'expression est dépendante de HIR (cf. **Chapitre 4.5.2.2**). De plus, SWI/SNF est recruté à ces gènes juste avant leur pic d'expression en phase S, et ce recrutement dépend de Rtt106p. Le complexe HIR interagit avec SWI/SNF et est essentiel pour la localisation de SWI/SNF aux gènes d'histones (Dimova et al., 1999). Le complexe RSC est également présent au niveau de ces gènes (Ng et al., 2002). Cependant, l'interaction directe entre RSC et le complexe HIR n'a pas été signalée. Fillingham et ses collègues (Fillingham *et al.*, 2009) ont rapporté que le recrutement de Rtt106p au niveau des gènes des histones est dépendante de HIR. Le fait que Rtt106p interagit à la fois avec SWI/SNF et RSC (Rsc1p, Rsc8p), et que Rtt106p est essentielle pour leur recrutement aux gènes des histones à expression HIR-dépendante, suggère que la localisation des complexes RSC et SWI/SNF au niveau des gènes d'histones est indirecte et est médiée par Rtt106p. En d'autres termes, la suppression des gènes HIR/HPC, qui perturbe la fonction du complexe HIR, conduit à l'absence de Rtt106p au niveau des gènes d'histones, empêchant ainsi le recrutement des complexes SWISNF et RSC. En outre, l'absence d'expression de Rtt106p ne modifie pas la présence du complexe HIR ni du facteur Asf1p sur les gènes d'histones (Fillingham *et al.*, 2009). Donc ni le complexe HIR ni Asf1p ne peuvent recruter SWI/SNF ou RSC sur les gènes des histones en absence de Rtt106p. Cependant, HIR et SWI/SNF peuvent interagir *in vitro*, suggérant qu'*in vivo* le complexe HIR pourrait recruter SWI/SNF à d'autres loci indépendamment de Rtt106p (Ferreira et al., 2011).

Alors que le recrutement du SWI/SNF aux gènes d'histones à expression HIR-dépendantes est régulé au cours du cycle cellulaire et est limité à la phase tardive G1 juste avant l'expression des gènes d'histones dans la phase S (Dimova *et al.*, 1999), la présence de RSC au locus HTA1-HTB1 a été montrée être limitée aux phases du cycle cellulaire pendant lesquelles les gènes des histones sont inactifs (début de G1, phases G2 et M) suggérant un rôle répressif (Ng *et al.*, 2002). Etant donné que Rtt106p joue un rôle essentiel dans le recrutement des deux complexes SWI/SNF et RSC aux gènes des histones, les signaux de régulation du cycle cellulaire pourraient cibler Rtt106p et moduler directement ces interactions (Ferreira *et al.*, 2011). Rtt106p a été montrée interagir avec les sous-unités Swe1p (Ptacek et al., 2005) et Swp82p (Ferreira *et al.*, 2011).

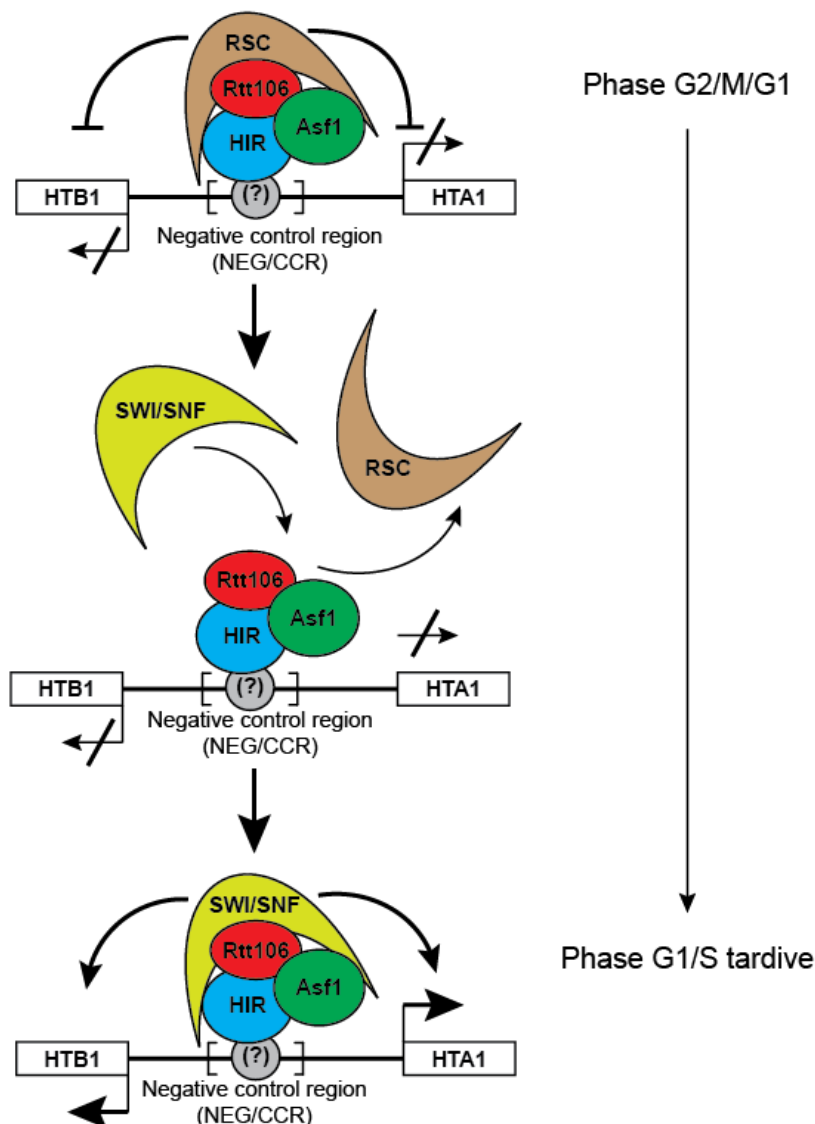


Figure 38 : Modèle proposé pour le recrutement des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF et RSC au niveau des gènes des histones dépendantes de HIR par Rtt106p, en fonction du cycle cellulaire. Rtt106p est retrouvée associée avec HIR et Asf1p au niveau des promoteurs des gènes HTA1 et HTA2. La séquence NEG est essentielle pour la répression médiée par HIR, et est associée à un facteur non encore identifié, qui maintient le complexe HIR et ses co-facteurs au niveau de ces promoteurs. Rtt106p est possiblement un facteur clé du complexe HIR/Asf1p/Rtt106p, qui régule le recrutement du complexe RSC en fonction du cycle cellulaire, en dehors de la phase S, dans la phase G2/M et G1 précoce, quand les gènes des histones sont réprimés. Dans la phase G1 tardive, des signaux spécifiques du cycle cellulaire déclenchent une modification qui permet à Rtt106p de recruter SWI/SNF dans la phase G1 tardive, et le largage du complexe RSC des promoteurs des gènes des histones. Dans la phase G1 tardive et S, SWI/SNF est présent au niveau des promoteurs des gènes des histones via son interaction avec Rtt106p, ce qui permet l'activation de la transcription des gènes des histones. Adapté de Ferreira et al., 2011.

4.5.2.2 Le complexe HIR

En dehors de la phase S, la répression de la transcription des histones est maintenue par le complexe chaperonne HIR (Hir1p, Hir2p, Hir3p et Hpc2p). Le complexe HIR est localisé au niveau des éléments NEG (negative regulatory elements) dans les régions régulatrices des gènes HTA1-HTB1, HHT1-HHF1 et HHT2-HHF2 (Osley et al., 1986; Osley and Lycan, 1987; Xu et al., 1992). Bien que la transcription de HTA2-HTB2 soit spécifique de la phase S, son promoteur ne contient pas d'éléments NEG (Zunder and Rine, 2012). Le principal activateur de HTA1-HTB1 est Spt10p, une protéine de liaison à l'ADN séquence spécifique contenant un domaine histone acétyltransférase (HAT) (Eriksson et al., 2011). Spt10p reconnaît deux paires de séquences en amont des éléments UAS (Upstream Activation Sequences) du promoteur de HTA1-HTB1: UAS1 et UAS2 régulent l'expression de HTA1, et UAS3 et UAS4 celle de HTB1. UAS3 et UAS4 contiennent également des sites de liaison pour le régulateur du cycle cellulaire SBF (un hétérodimère Swi4p-Swi6p), qui chevauchent les sites de liaison de Spt10p. La liaison de Spt10p et la liaison du SBF au niveau des UAS3 et UAS4 sont mutuellement exclusifs *in vitro* (Eriksson et al., 2011).

À la fin de la phase G1, la répression des gènes d'histones est réduite par la dissociation du complexe RSC et par le recrutement dépendant de Rtt106p du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Dimova et al., 1999; Ferreira et al., 2011). SWI/SNF favorise la transcription active, possiblement en exposant les séquences UAS aux facteurs régulés en fonction du cycle cellulaire Spt10p et SBF (Dollard et al., 1994; Eriksson et al., 2011; Xu et al., 2005). Les facteurs d'activation supplémentaires comprennent Yta7p (Fillingham et al., 2009; Gradolatto et al., 2009; Kurat et al., 2011; Tackett et al., 2005) et Rtt109p, une histone acétyltransférase qui acétyle les lysines 56 des histones H3 nouvellement synthétisées (H3K56ac) (Driscoll et al., 2007; Han et al., 2007a; Schneider et al., 2006; Tsubota et al., 2007). L'acétylation H3K56 est spécifique de la phase S (Masumoto et al., 2005) et est nécessaire pour surmonter la répression des gènes d'histones médiée par les chaperonnes par un mécanisme inconnu (Fillingham et al., 2009). Yta7p bloque la propagation de Rtt106p et RSC le long des cadres de lecture des gènes d'histones et facilite l'élongation par ARN polymérase II (Fillingham et al., 2009; Kurat et al., 2011; Zunder and Rine, 2012).

Le complexe HIR a un rôle de chaperonne d'histones et peut assembler les nucléosomes indépendamment de la réplication de l'ADN (Green et al., 2005; Prochasson et al., 2005). La chaperonne d'histones Asf1p peut être copurifiée avec le complexe HIR (Green et al., 2005) et est également nécessaire pour la répression de la transcription de gènes d'histones portant des éléments *cis* NEG (Sutton et al., 2001). Le complexe HIR se lie de

manière stable à l'ADN et aux nucléosomes sans spécificité de séquence connue. Une fois lié aux nucléosomes, un complexe protéines/ADN distinct est formé, qui est résistant au remodelage par SWI/SNF (Prochasson *et al.*, 2005). Comme le complexe HIR se lie à l'ADN sans spécificité de séquence, il est probable que la séquence NEG présente au niveau du promoteur des loci de HTA1-HTB1 est lié par un facteur de liaison à l'ADN encore non caractérisé qui permet le recrutement direct du complexe HIR (Ferreira *et al.*, 2011).

Les rôles du complexe HIR sont évolutivement conservés, car chez l'homme, HIRA (l'homologue de Hir1p et Hir2p) est nécessaire pour le dépôt des histones H3.3 en dehors de la phase S (Ahmad and Henikoff, 2002; Lamour *et al.*, 1995; Tveteraas *et al.*, 2015). HIRA se trouve associé à de multiples protéines, y compris Cabin1 et Ubinuclein-1 (UBN1) qui sont les homologues respectivement, de Hir3p et de Hpc2p (Balaji *et al.*, 2009; Banumathy *et al.*, 2009). Ces protéines se rassemblent probablement dans un complexe qui est homologue au complexe de levure HIR (Anderson *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011).

Rtt106p est recrutée au niveau des régions régulatrices des gènes d'histones d'une manière dépendante de HIR, mais l'interaction entre Rtt106p et les protéines Hir est probablement médiée par des histones H3:H4 (Zunder and Rine, 2012). En faveur de cette hypothèse, des mutations qui perturbent l'interaction Rtt106:H3 conduisent à une perte de l'enrichissement de Rtt106p aux promoteurs des gènes d'histones (Lambert *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

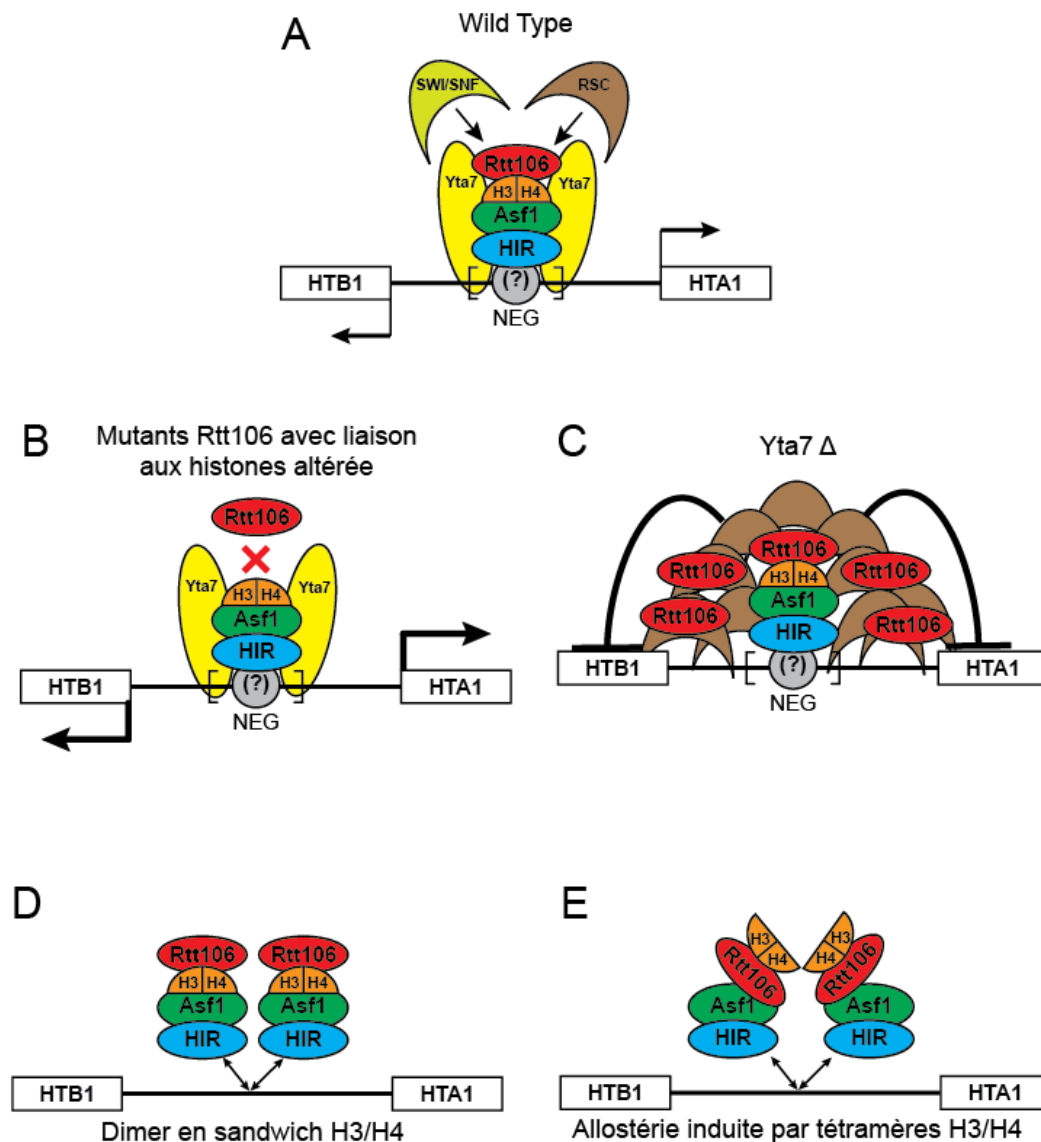


Figure 39 : Modèle de régulation négative de la transcription des gènes des histones. (A) Dans les cellules de phénotype sauvage, HIR, Asf1p et Rtt106p se localisent avec Yta7p au niveau des régions régulatrices de la transcription des histones. Rtt106p recrute les complexes de remodelage de la chromatine RSC et SWI/SNF pour réguler la transcription en fonction du cycle cellulaire. (B) Des mutants de Rtt106p qui perdent l'interaction avec l'histone H3 présentent un enrichissement réduit de Rtt106p au niveau des régions régulatrices des gènes des histones et une transcription augmentée. (C) Dans les cellules Yta7 Δ , la liaison Rtt106p:H3 est augmentée, ce qui conduit à un enrichissement de Rtt106p au loci des histones et une transcription réduite. (D) et (E) Deux modèles pour l'interaction entre Rtt106p et Asf1p. Adapté de Zunder *et al.*, 2012.

4.5.2.3 Le complexe SIR

Le locus HM, dans les régions sous-télomériques, et environ la moitié des répétitions d'ADNr sont soumis à la répression génique transcriptionnelle chez la levure (Aparicio et al., 1991; Smith and Boeke, 1997). Tous ces loci silencieux nécessitent l'activité de Sir2p, une enzyme NAD-dépendante qui déacétyle les lysines dans les queues d'histones (Imai et al., 2000; Tanner et al., 2000). En outre, la répression aux loci HM exige des interactions entre Sir2p, Sir3p, et Sir4p pour former le complexe SIR (Cockell et al., 1995; Cockell et al., 2000; Moazed, 2001). La répression au sein de l'ADNr utilise un mécanisme différent impliquant le complexe RENT (regulator of nucleolar silencing and téléphase) (Shou et al., 1999; Straight et al., 1999), dans lequel Sir2p est dans un complexe avec une protéine nucléaire, Net1, et la phosphatase Cdc14p. La fonction la plus importante du complexe RENT au niveau de l'ADNr n'est pas la répression de la transcription en soi, mais la prévention de la recombinaison des ADNr, par laquelle les répétitions ADNr sont excisés sous forme de cercles extra chromosomiques (Gottlieb and Esposito, 1989). L'accumulation de ces cercles conduit à un vieillissement prématuré (Kaeberlein et al., 1999), reliant Sir2p de levure à la régulation de la durée de vie des cellules (Kueng et al., 2013).

CAF-1 et Rtt106p sont impliqués dans les premières étapes de la formation d'hétérochromatine. Il a été montré que dans les cellules invalidées pour les gènes codant Rtt106p et CAF-1, la liaison des protéines Sir à l'hétérochromatine télomérique est considérablement réduite et les protéines Sir sont délocalisées (Huang *et al.*, 2007a). CAF-1 et Rtt106p sont nécessaires au locus HMR pour le recrutement initial de Sir2p et Sir3p, mais pas Sir4p (Huang *et al.*, 2007a). Rtt106p interagit avec Sir4p *in vitro* et *in vivo* (Huang *et al.*, 2007a). En outre, la répression au niveau du locus HMR est considérablement réduite dans des cellules dépourvues de CAF-1, Rtt106p et Sir1p (Huang *et al.*, 2007a).

4.5.2.4 Le facteur PCNA

L'interaction entre Rtt106p et la pince coulissante PCNA du réplisome a été identifiée lors d'un crible visant à rechercher des régulateurs de l'expression des gènes d'histones (Fillingham *et al.*, 2009), mais elle n'a pas été confirmée par d'autres études. Néanmoins, dans cette étude, les autres partenaires connus de Rtt106p (données BioGRID) tels que Hir1p, Hir2p, Hhf1p, Cac2p, Hpc2p ont été identifiés. Le rôle du facteur PCNA dans la réplication a été décrit dans le **Chapitre 4.3**.

5 Objectifs des travaux

Comme montré dans le chapitre « Introduction », chez les eucaryotes, la maturation et la modification des séquences des ARN ribosomiques s'effectue de façon co-transcriptionnelle et fait intervenir dans le nucléole des centaines de particules ribonucléoprotéiques (RNP) appartenant aux deux familles des snoRNP, celles à boîtes H/ACA et celles à boîtes C/D. Le trait commun entre ces RNP est leur organisation basée sur un ARN non codant spécifique associé à un ensemble invariable de protéines dont l'une constitue la sous-unité catalytique de la particule. Ainsi, chacune des snoRNP C/D est composée d'un parmi la centaine de snoARN à boîtes C/D exprimés dans la cellule, sur lequel s'assemblent les protéines Snu13, Nop1, Nop56 et Nop58. Nop1p porte l'activité 2'-O-méthylase dépendant du cofacteur donneur de méthyl SAM. Cet assemblage nécessite l'intervention transitoire de plusieurs facteurs protéiques. La protéine Rsa1/NUFIP1 associée au pré-complexe Snu13p-snoARN, sert de plateforme pour des interactions avec les autres protéines des snoRNP ainsi qu'avec le complexe R2TP composé des protéines Rvb1(RuvBL1/TIP49), Rvb2(RuvBL2/TIP48) de la famille des ATPases AAA+, de Pih1(PIH1D1) et de Tah1(RPAP3) qui est une co-chaperonne de la protéine HSP90.

Mon travail de thèse visait à étudier le rôle fonctionnel chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de deux autres protéines nommées Hit1 et Bcd1 qui ont été identifiées comme étant impliquées dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D. Celles-ci sont conservées chez les vertébrés : TRIP3(ZNHIT3) est l'homologue fonctionnel de Hit1p et BCD1(ZNHIT6) celui de Bcd1p. Ce travail a été effectué en collaboration avec le groupe de X. Manival, et en particulier avec B. Bragantini, qui réalise un travail de thèse sur la structure de ces deux protéines.

Il avait été démontré précédemment au laboratoire que Rsa1p de *S. cerevisiae* pouvait servir de plateforme d'interaction avec d'une part la protéine Snu13 associée au motif en K-turn des snoARN à boîtes C/D et d'autre part des protéines du complexe R2TP (Boulon *et al.*, 2008). Afin de mieux caractériser la série de complexes formés au cours de la biogenèse de ces particules, Benjamin Rothé a recherché les partenaires protéiques associés à Rsa1p et à Pih1p par une approche de double purification de type TAP-tag suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Les composants Rvb1p, Rvb2p et Tah1p du complexe R2TP ont été trouvés uniquement en quantités importantes dans la fraction copurifiée avec la protéine étiquetée Pih1-TAP. En revanche, un partenaire inattendu de

Rsa1p, la protéine Hit1, a été détecté dans la fraction co-purifiée avec Rsa1p-TAP (Rothé *et al.*, 2014b).

Suite à ces résultats, des expériences de purification ont été réalisées en utilisant des cellules exprimant Hit1p-TAP, afin de vérifier l'association entre Rsa1p et Hit1p. Rsa1p a bien été retrouvée dans la fraction co-purifiée avec Hit1p-TAP. L'ensemble de ces données suggère l'existence, dans les cellules de levure d'un complexe contenant Rsa1p et Hit1p. Une interaction possible entre Rsa1p et Hit1p avait auparavant été trouvée dans un crible général par double hybride chez la levure (Y2H) (Ito *et al.*, 2001). Au laboratoire, des expériences de coexpression chez *E. coli* des protéines Rsa1, Hit1 et Snu13 ont montré la formation d'un hétérotrimère contenant ces trois partenaires dans une stoechiométrie de 1:1:1 (Rothé *et al.*, 2014b).

Dans ce contexte, mes travaux ont porté sur 5 axes.

(I) Une partie a consisté à **identifier des domaines importants pour la fonction de Hit1p liée à la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D**, ainsi que **des déterminants pour l'interaction avec Rsa1p**. Des variants de Hit1p ont été créés pour lesquels des mutations générant une perte d'interaction avec Rsa1p conduisent à une baisse du taux des snoRNP à boîtes C/D. Ces expériences ont été réalisées afin de fournir des informations fonctionnelles concernant l'interface d'interaction entre Rsa1p et Hit1p qui a été caractérisée par la résolution de la structure 3D, par le groupe de Xavier Manival au laboratoire.

(II) Il est connu depuis longtemps que la stabilité des snoARN à boîtes C/D dépend de Bcd1p et cette protéine est de plus essentielle à la viabilité cellulaire (Hiley *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2003). Cependant, le rôle joué par Bcd1p dans le processus d'assemblage de ces particules reste inconnu. Afin de mieux caractériser le rôle de la protéine Bcd1 dans le processus de biogenèses des snoRNP C/D, j'ai recherché **les domaines importants pour sa contribution à la croissance cellulaire**, mais aussi à **l'assemblage de ces particules**.

(III) Les protéines **Hit1 et Bcd1** partagent un domaine homologue à double motif doigt de zinc. J'ai entrepris la caractérisation fonctionnelle de ce domaine. Benoît Bragantini dans le groupe de Xavier Manival a mené de son côté des études structurale par RMN.

(IV) Les protéines Nop58 et Rvb1/2 ont été trouvées très enrichies dans la fraction protéique co-purifiée avec Bcd1p-TAP (Rothé, 2012). De plus, des tests par Y2H réalisés dans le cadre de la collaboration avec l'équipe d'E. Bertrand (IGM, Montpellier) ont montré

que Bcd1p interagissait avec Pih1p et avec la protéine Rrp9 spécifique de la snoRNP U3. Dans le cadre d'une collaboration avec C. Saveanu de l'Institut Pasteur à Paris, une approche par crible d'interactions génétiques (crible GIM) mise au point par cette équipe, a été utilisée afin de rechercher des interactions génétiques avec les gènes codant les protéines Rsa1, Pih1 et Tah1. Dans une souche invalidée pour le gène codant Rsa1p, la délétion supplémentaire de l'ORF codant la protéine Rtt106 conduit à un effet épistatique. Ainsi, la souche invalidée pour les deux ORF présentait une plus forte capacité de croissance ou *fitness*. Ceci indiquait un rôle fonctionnel potentiel de Rtt106p dans la biogenèse des RNP C/D. Compte tenu de ces données, j'ai testé par Y2H les interactions possibles de Rtt106p avec les composants de la machinerie de biogenèse des snoRNP C/D. J'ai ainsi pu identifier l'interaction de Rtt106p avec Bcd1p. Ce résultat a ouvert une **nouvelle direction du travail de thèse (V), vers la caractérisation de cette interaction et la recherche de son rôle potentiel dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D.**

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1. Les souches de cellules

1.1.1. Les souches de la bactérie *Escherichia coli*

- Pour l'amplification et l'extraction de plasmides: *E. coli* DH5 α (*supE44*, Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*).

1.1.2. Les souches de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

- Pour les études de caractérisation phénotypique :

Les souches parentales **de *S. cerevisiae* BY4741** (*Mat a*) et **BY4742** (*Mat α*) (*his3* Δ 1; *leu2* Δ 0; *met15* Δ 0; *ura3* Δ 0) (Euroscarf), de *mating-type* opposé, ont été utilisées pour la création d'inactivations de gènes par recombinaison homologue, pour générer les souches suivantes:

BY4741 Δ RS Δ 1 et BY4742 Δ RS Δ 1: YPL193w::kanMX4;

BY4741 Δ HIT1 et BY4742 Δ HIT1: YJR055w::kanMX4;

BY4741 Δ PIH1 et BY4742 Δ PIH1: YHR034c::kanMX4;

By4741 Δ RTT106: YCR060w::kanMX4.

By4741 Δ YNL165W: YNL156w::kanMX4.

By4741 Δ LIN1: YHR156c::kanMX4.

S. cerevisiae tetO₇::BCD1 (*Mat a*; pYHR040w::kanR-tet07-TATA; *URA3*::CMV-tTA ; *his3*- 1 ; *leu2*-0 ; *met15*-0) (Peng *et al.*, 2003); aimablement fournie par T.R. Hughes, a été employée dans les tests de complémentation du défaut d'expression de Bcd1p.

- Pour les tests de double-hybride :

S. cerevisiae Y187 (*Mat α*) et **Y190** (*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) Ces souches ont été invalidées par recombinaison homologue pour le gène *PIH1* B.Rothé : Y187- Δ PIH1 et Y190- Δ PIH1 : YHR034c::kanMX6 (Boulon *et al.*, 2008) ; construites par B. Charpentier.

- Pour les expériences d'immunosélection :

***S. cerevisiae* TAP-tag (Mat a)**

Toutes ces souches partagent le génotype suivant : *ade2; arg4; leu2-3,112; trp1-289; ura3-52*. Les différentes souches, commercialisées par Euroscarf expriment une protéine étiquetée à son extrémité C-terminale par l'étiquette TAP. Ces souches génétiquement modifiées ont été obtenues après recombinaison au locus codant la protéine d'une construction portant le marqueur d'auxotrophie *HIS3*:

RSA1-TAP: HIS3:: YPL193w-TAP;

HIT1-TAP: HIS3:: YJR055w-TAP;

BCD1-TAP: HIS3:: YHR040w-TAP.

1.2. Les plasmides

Vecteurs bactériens

Vecteur pCR2.1 (Invitrogen). Le clonage de fragments d'ADN obtenus par amplification par la technique de PCR a été réalisé dans le plasmide pCR2.1 fourni avec le kit *PCR T/A cloning*. Le plasmide est commercialisé sous forme linéarisée et porte un résidu thymine protubérant sur chaque extrémité 3'. Il contient des gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Il possède également le gène *lacZ* codant la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur *P_{lac}* et interrompu par la cassette de clonage. Ce plasmide a été utilisé pour cloner et séquencer certaines ORF isolées à partir d'ADN génomique, ainsi que pour vérifier la nature des produits amplifiés par RT-PCR.

Vecteurs navettes *E. coli* – *S. cerevisiae*

Ces plasmides possèdent l'origine de réplication du plasmide pUC (dérivant de *colE1* de pBR322) permettant la réplication chez *E. coli*, et une origine soit 2 μ ou soit CEN/ARS permettant leur réplication dans le noyau des levures.

Vecteur pG1 (Addgene). Ce vecteur a été utilisé pour l'expression ectopique de différentes protéines dans les cellules de levure. Il possède l'origine CEN/ARS, permettant sa réplication à copie unique chez la levure. Il contient un gène de résistance à l'ampicilline et le marqueur TRP1. La cassette de clonage est située en aval du promoteur du gène *GLD1* (alias *GPD*) codant la GAPDH. Les clonages dans ce vecteur ont été réalisés entre les sites de restriction *Bam*HI et *Sal*I.

Vecteur p413-TEF (ATCC). Ce vecteur a été utilisé pour l'expression ectopique de différentes protéines dans les cellules de levure. Il possède l'origine de réplication CEN/ARS. Il contient un gène de résistance à l'ampicilline et le marqueur d'auxotrophie *HIS3*. La cassette de clonage est située en aval du promoteur TEF. Les clonages dans ce vecteur ont été réalisés entre les sites de restriction *Bam*HI et *Sall*.

Vecteur pGFP (aimablement fourni par E. Bertrand). Ce vecteur a été utilisé pour l'expression ectopique d'une protéine de fusion GFP-Rsa1p dans les cellules de levure. Il contient le marqueur d'auxotrophie *URA3*.

Vecteur pACT2 (Clontech). Ce vecteur a été utilisé pour les tests de double-hybride. Il possède l'origine de réplication 2 μ , un gène de résistance à l'ampicilline et le marqueur d'auxotrophie *LEU2*. Il permet l'expression d'une protéine d'intérêt fusionnée, à son extrémité N-terminale, au domaine d'activation de la transcription du facteur Gal4 (Gal4-AD). Cette expression est sous le contrôle du promoteur *ADH1*. Les clonages dans ce vecteur ont été réalisés entre les sites de restriction *Bam*HI et *Xho*I.

Vecteur pGBKT7 (Clontech). Ce vecteur a été utilisé pour les tests de double-hybride. Il possède l'origine 2 μ permettant sa réplication en copies multiples chez la levure. Il contient un gène de résistance à la kanamycine et le marqueur d'auxotrophie *TRP1*. Il permet l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée, à son extrémité N-terminale, au domaine de fixation à l'ADN du facteur Gal4 (Gal4-BD). Cette expression est sous contrôle du promoteur *ADH1*. Les clonages dans ce vecteur ont été réalisés entre les sites de restriction *Bam*HI et *Sall*.

Les principaux plasmides recombinants utilisés au cours des différentes études sont listés dans le **Tableau 13**.

Plasmide	Nom de la construction	Date	Plasmide	Nom de la construction	Date
p413TEF	Bcd1-1-62	12-07-10	pACT2	Bcd1-1-62	08-10-10
	Bcd1-1-168	12-07-10		Bcd1-1-168	08-10-10
	Bcd1 1-260	12-07-10		Bcd1 1-260	08-10-10
	Bcd1 1-305	12-07-10		Bcd1 1-305	08-10-10
	Bcd1 FL	12-07-10		Bcd1 FL	08-10-10
	Bcd1-63-366	12-07-10		Bcd1-63-366	08-10-10
	Bcd1 169-366	12-07-10		Bcd1 261 -366	08-10-10
	Bcd1 261 -366	12-07-10		Ynl65w FL	09-02-11
	Bcd1 306-366	12-07-10		Rtt106 FL	09-02-11
	Bcd1 63-305	12-07-10		Lin1 FL	09-02-11
	Bcd1 169-305	12-07-10		Rtt106M	01-06-12
	Bcd1 63-260	12-07-10		Hit1 1-43	05-07-13
	Bcd1-1-45	30-01-14		Hit1 1-70	05-07-13
	Bcd1-46-366	30-01-14		Hit1 FL	05-07-13
	Hit1(1-45)/Bcd1(44-366)	30-01-14		Hit1 44-70	05-07-13
	Bcd1(1-46)/Hit1(44-366)	30-01-14		Hit1 71-a64	05-07-13
	Hit1 1-43	16-05-11		Hit1p 44-164	05-07-13
	Hit1 1-70	16-05-11		Spt16M	29-05-13
	Hit1 FL	16-05-11		Pob3M	29-05-13
	Hit1 44-70	16-05-11		Rtt106PH	29-05-13
	Hit1 71-a64	16-05-11	pGBKT7	Bcd1-1-62	08-10-10
	Hit1p 44-164	16-05-11		Bcd1-1-168	08-10-10
	Hit1(1-43)/Bcd1(44-366)	16-05-11		Bcd1 1-260	08-10-10
	Bcd1(1-43)/Hit1(44-366)	16-05-11		Bcd1 1-305	08-10-10
	flagNOP58 - mut1	12-01-12		Bcd1 FL	08-10-10
	flagNOP58 - mut2	12-01-12		Bcd1-63-366	08-10-10
	flagNOP58 - mut3	02-05-12		Bcd1 261 -366	08-10-10
	flagNOP58 - mut1+3	02-05-12		Lin1 FL	09-02-11
	flagNOP58 - mut2+3	02-05-12		Rtt106Mp	16-01-12
	Rtt106Mp	16-01-12		Bcd1-63-366	06-06-12
	Rtt106p	28-02-12		ZnHIT/Bcd1	06-06-12
	flagNOP58 - mut1+3	02-05-12		Ynl65w FL	20-12-12
	flagNOP58 - mut2+3	02-05-12		Hit1 1-43	05-10-13
	Pob3M	04-11-13		Hit1p 44-164	05-10-13
	Rtt106PH	04-11-13		Taf9	29-05-13
	Sua7	04-11-13		She2	29-05-13
	Taf9	04-11-13		Ahc2	29-05-13
	She2	24-04-13		Spt16M	29-05-13
	Ahc2	24-04-13		Tfb4	29-05-13
	Spt16M	24-04-13		Mot3	29-05-13
	Tfb4	24-04-13		Pob3M	29-05-13
	Mot3	24-04-13		Rtt106PH	29-05-13
	Msa2	24-04-13	pGEX 6P-1	Rtt106p	12-01-12
	ZF-Swi5/Bcd1	03-10-14	pGEX 6P-1	Rtt106M	12-01-12
	ZF-Vps71/Bcd1	03-10-14	pnCS	Rtt106Mp	16-01-12
	ZF-Hit1new/Bcd1	03-10-14	pnYC	Rtt106Mp	16-01-12
	Znmut58yBcd1 1-168	26-05-15	pnEA3	Rtt106Mp	28-02-12
	Znmut1720yBcd1 1-168	26-05-15	p416	HA-RSA1 mut1	15-06-12
	Znmut581720yBcd1 1-168	26-05-15	p416	HA-RSA1 mut2	15-06-12
	Znmut58yBcd1	26-05-15	pPS808	RSA mut2	05-03-13
	Znmut1720yBcd1	26-05-15	pPS808	RSA mut3	05-03-13
	Znmut581720yBcd1	26-05-15	pPS808	RSA mut4	05-03-13
	HA-BCD1 1-115	26-05-15			
	HA-BCD1 1-96	26-05-15			

Tableau 13 : Les principaux plasmides recombinants créés et utilisés au cours de la thèse.

1.3. Les oligonucléotides

Les principaux oligonucléotides utilisés sont décrits dans le **Tableau 14**.

No	Séquence de 5' vers 3'	nt	Usage
7731	CCCGGGATCCCGATG CGCGGTGTTGTGTGG	29	Oligo 5' de clonage de l'ORF BCD1 (1-62) avec site BamHI 1F
7732	ACCGGTCGACCGG TCACTTGTGTCGTCCGCC	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF BCD1 (1-62) avec site Sall STOP 1R
7733	CCCGGGATCCCGATG CACGAACGAAATGCTTATG	34	Oligo 5' de clonage de l'ORF BCD1 (63-168) avec site BamHI et ATG 2F
7734	ACCGGTCGACCGG TCAACATAGAATCCACTCCACG	35	Oligo 3' de clonage de l'ORF BCD1 (63-168) avec site Sall STOP 2R
7735	CCCGGGATCCCGATG CCCTATGCAGGAAAGGGT	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF BCD1 (169-260) avec site BamHI et ATG 3F
7736	ACCGGTCGACCGG TACACCAGTTTTTTGAATCCA	36	Oligo 3' de clonage de l'ORF BCD1 (169-260) avec site Sall STOP 3R
7737	CCCGGGATCCCGATG GAGTTGGCTATACATGAGA	34	Oligo 5' de clonage de l'ORF BCD1 (261-305) avec site BamHI et ATG 4F
7738	ACCGGTCGACCGG TACGGGGTTCTCGGTGT	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF BCD1 (261-305) avec site Sall STOP 4R
7739	CCCGGGATCCCGATG CCCACTTGAGCATACGAGT	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF BCD1 (306-366) avec site BamHI et ATG 5F
7740	ACCGGTCGACCGG TATGCAGTGAGGAAATCC	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF BCD1 (306-366) avec site Sall 5R
7947	CCCGGGATCCCGATG GATAGAGTACGCTCTT	31	Oligo 5' de clonage de l'ORF yYNL165W avec site BamHI (yYNL165W-F)
7948	ACCGGTCGACCGG TTACATCAGTAATCCTGCC	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF yYNL165W avec site Sall (yYNL165W-R)
7949	CCCGGGATCCCGATG TCAAAATTTGTTCTTAGAT	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRTT106 avec site BamHI (yRTT106-F)
7950	ACCGGTCGACCGG TCAATCGTATTCTACTCCG	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF yRTT106 avec site Sall (yRTT106-R)
7951	CCCGGGATCCCGATG TCGAAAAGGTTCTATCG	31	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRRB1 avec site BamHI (yRRB1-F)
7952	ACCGGTCGACCGG TTAGACACTGATTGTTTTCC	33	Oligo 3' de clonage de l'ORF yRRB1 avec site Sall (yRRB1-R)
7953	CCCGGGATCCCGATG AAATATACGCAATACCC	32	Oligo 5' de clonage de l'ORF yLIN1 avec site BamHI (yLIN1-F)
7954	ACCGGTCGACCGG TTACATGAACTTAAACACGA	33	Oligo 3' de clonage de l'ORF yLIN1 avec site Sall (yLIN1-R)
7965	GAAGATGATGAGGATG TTCCGGAGTAGAATACG	34	Oligo Direct de mutagenèse dirige pour éliminer le site BamHI de l'ORF de la protéine RTT106 (RTT106-Dmut Gly449)
7966	CGTATTCTACTCCGGA ACCATCCTCATCATCTTC	34	Oligo Reverse de mutagenèse dirige pour éliminer le site BamHI de l'ORF de la protéine RTT106 (RTT106-Rmut Gly449)
7967	GATGATGAAGATGATG TGACCCAGTCATTGAGAATG	37	Oligo Direct de mutagenèse dirige pour éliminer le site BamHI de l'ORF de la protéine RRB1 (RRB1-Dmut Val197)
7968	CATTCTCAATGACTGG TCACATCATCTTCATCATC	37	Oligo Reverse de mutagenèse dirige pour éliminer le site BamHI de l'ORF de la protéine RRB1 (RRB1-Rmut Val197)
8130	CCCGAGATCTCGATG TCAAAATTGTTCTTAGAT	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRTT106 avec site BglII (compatible BamHI) (yRTT106-F)
8131	CCCGAGATCTCGATG TCGAAAAGGTTCTATCG	31	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRRB1 avec site BglII (compatible BamHI) (yRRB1-F)
8232	GCGCCCTAAGCTCTACTA	18	Oligonucléotide pour détecter snRNA snR64 de levure par Northern
8233	CACCTCGCGCAGTACCGAT	18	Oligonucléotide pour détecter snRNA snR8 de levure par Northern
8234	CCCGAGATCTCGATG TCAAAATTTGTTCTTAGAT	34	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRTT106 avec site BglII (yRTT106-F_pGEX)
8235	CCCGAGATCTGCAATG GATGAAATTCGGAACCA	35	Oligo 5' de clonage de fragment 65-320 de yRTT106 avec site BglII ATG (yRTT106-M-F_pGEX)
8236	ACCGGTCGACCGG TACGCTTTGCTCTTGGAT	32	Oligo 3' de clonage de fragment 65-320 de yRTT106 avec site Sall STOP (yRTT106-M-R_pGEX)
8283	CCCGGGATCCCGATG GTATCTAGTGCAGTTAA	32	Oligo 5' de clonage de l'ORF yHIT1 (1-43) avec site BamHI 1F (yHIT1-1F)
8284	ACCGGTCGACCGG TATTCCTTATGAACATGCTTTG	36	Oligo 3' de clonage de l'ORF yHIT1 (1-43) avec site Sall STOP 1R (yHIT1-1R)
8285	CCCGGGATCCCGATG AGCGAACAACCCAGGG	31	Oligo 5' de clonage de l'ORF yHIT1 (44-69) avec site BamHI ATG 2F (yHIT1-2F)
8286	ACCGGTCGACCGG TATGCGAGTGAAGTGTATG	35	Oligo 3' de clonage de l'ORF yHIT1 (44-69) avec site Sall STOP 2R (yHIT1-2R)
8287	CCCGGGATCCCGATG AAATAAAACATTAAAGACG	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF yHIT1 (70-164) avec site BamHI 3F (yHIT1-3F)
8288	ACCGGTCGACCGG TATTCTTCACCGCATTTAA	34	Oligo 3' de clonage de l'ORF yHIT1 (70-164) avec site Sall STOP 3R (yHIT1-3R)
8289	CAAAGCATGTTCA TAGGAACATGATCCTAAGGAGTATAT	40	Oligo de clonage pour protéine hybride BCD1 avec le Zn finger de HIT1 (ZnHIT1_BCD1_F)
8290	GTTTCGTACAAGTATTC CTTGACTAGGATTCCTCATATA	40	Oligo de clonage pour protéine hybride BCD1 avec le Zn finger de HIT1 (ZnHIT1_BCD1_R)
8291	CAATTGCTCAGGTCA AAACAGCGAACAACCCAGGG	35	Oligo de clonage pour protéine hybride HIT1 avec le Zn finger de BCD1 (ZnBCD1_HIT1_F)
8292	GTTAACGAGTCCAG TTGTTGCGCTGTGGGTCCC	35	Oligo de clonage pour protéine hybride HIT1 avec le Zn finger de BCD1 (ZnBCD1_HIT1_R)
8303	CCCGGGATCCCGATG GTGCTGCTATCAGTGAA	30	Oligo 5' de clonage de l'ORF RVB1 (1-463) avec site BamHI (yRVB1-F)
8304	ACCGGTCGACCGG TTACAAATAATTTGCGGAAG	33	Oligo 3' de clonage de l'ORF RVB1 (1-463) avec site Sall (yRVB1-R)
8305	CCCGGGATCCCGATG TCGATTCAAACATAGTG	31	Oligo 5' de clonage de l'ORF RVB2 (1-471) avec site BamHI (yRVB2-F)
8306	ACCGGTCGACCGG TTATTCGCTAGTATCCATG	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF RVB2 (1-471) avec site Sall (yRVB2-R)
8688	CCCGGGATCCCGATG GATGAAATTCGGAAACC	32	Oligo 5' de clonage de fragment 65-320 de yRTT106 avec site BamHI ATG (yRTT106M-F) dans p413TEF, pACT2, pGBK
8689	CCCGCATATG TCAAAATTTGTTCTTAGATGAAC	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRTT106 avec site NdeI (yRTT106-pn_F) dans pnCS, pnYC et pnEA3CH
8690	ACCGGGATCCTCA ATCGTATTCTACTCCGGAAC	33	Oligo 3' de clonage de l'ORF yRTT106 avec site BamHI (yRTT106-pn_R) dans pnCS, pnYC et pnEA3CH, avec mutagenèse silencieuse du site BamHI de l'ORF de RTT106
8691	CCCGCATATG GATGAAATTCGGAAACCA	29	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRTT106M (65-320) avec site NdeI (yRTT106M-pn_F) dans pnCS, pnYC et pnEA3CH; apporte l'ATG
8692	ACCGGGATCCTCA GCCTTTGCTCTTGATTT	31	Oligo 3' de clonage de l'ORF yRTT106M (65-320) avec site BamHI (yRTT106M-pn_R) dans pnCS, pnYC et pnEA3CH, avec codon STOP
8693	CCTTAATTTCTTGCCG GC ATCACCAGCTTCTACC	35	Oligo Direct pour introduire la mutation K311A dans yNOP58p (yNOP58p_K311A_F)
8694	GGTAGAAGCTGGTGAT CG GGCCAAGGAAATTAAGG	35	Oligo Reverse pour introduire la mutation K311A dans yNOP58p (yNOP58p_K311A_R)
8695	CCTTAATTTCTTGCCG GA ATCACCAGCTTCTACC	35	Oligo Direct pour introduire la mutation K311E dans yNOP58p (yNOP58p_K311E_F)
8696	GGTAGAAGCTGGTGAT TC GGCCAAGGAAATTAAGG	35	Oligo Reverse pour introduire la mutation K311E dans yNOP58p (yNOP58p_K311E_R)
8697	GCGTTATGATGCT GC AGCTGAAGATAGAGACG	32	Oligo Direct pour introduire la mutation L376A dans yNOP58p (yNOP58p_L376A_F)
8698	CGTCTCTATCTCAGCT GC AGCATCATAACGC	32	Oligo Reverse pour introduire la mutation L376A dans yNOP58p (yNOP58p_L376A_R)
8832	AGTACAATTATACGAGTCT GCC AA TGCA ACAGAAAATTACATACCGCC	49	Oligo Direct pour introduire les mutations P95P96N97Y98 -> P95A96N97A98 dans yRSA1p (yRSA1_PANA_F)
8833	GCGGGATGTAATTTCTGTT GCC ATT GGC AGGACTCGTATAATTG	49	Oligo Reverse pour introduire les mutations P95P96N97Y98 -> P95A96N97A98 dans yRSA1p (yRSA1_PANA_R)
8834	CTCAGTACAATTACGAGTACAGAAAATTACATACCGCC	40	Oligo Reverse pour introduire la délétion ΔP95P96N97Y98 dans yRSA1p (yRSA1_2_ΔPANA_F)
8835	GCGGGATGTAATTTCTGTA CT CGTATAATTGTACTGAG	40	Oligo Reverse pour introduire la délétion ΔP95P96N97Y98 dans yRSA1p

No	Séquence de 5' vers 3'	nt	Usage
			(yRSA1 2. ΔPANA_R)
8865	TGTTGCAATACCGACCGTAA	20	Oligo 5' RSA1 - PCRq
8866	TTTCTGTAGGCTCCGAGAT	20	Oligo 3' RSA1 - PCRq
8867	ATCTGCGGAGCCTACAGAA	20	Oligo 5' RSA1 - PCRq
8868	CCTTACCAACCCCTCTGAT	20	Oligo 3' RSA1 - PCRq
8869	TGTCACGATAGTGGCTTTG	20	Oligo 5' ORF ALG9 (Protein amino acid glycosylation) - Contrôle interne PCRq
8870	TACCATTACGTCCTCGTACA	20	Oligo 3' ORF ALG9 (Protein amino acid glycosylation) - Contrôle interne PCRq
8871	ACACTCCAGGCGGTATTGAC	20	Oligo 5' ORF TFC1 (Transcription initiation on Pol III) - Contrôle interne PCRq
8872	CTTCTGCAATGTTTGGCTCA	20	Oligo 3' ORF TFC1 (Transcription initiation on Pol III) - Contrôle interne PCRq
8894	CATTTTGACGGGTTTT	16	Oligo interne direct de séquençage pour yRTT106 (yRTT106-Fseq)
8895	GTCAGAAGCGTCAAT	16	Oligo interne reverse de séquençage pour yRTT106 (yRTT106-Rseq)
9148	GTTAATGACGCGCTGTGCT	19	Vérification disruption yRTT106 (fixation amont de ORF yRTT106). A utiliser avec oligo 1287 (reverse KanMX4)
9149	GGTGTGATTGCTTTATCTATCACGC	25	Vérification insertion promoteur TetO7 avant ORF de yBCD1 (fixation amont de ORF yBCD1). A utiliser avec oligo interne reverse de BCD1
9456	AACCCGGGATCCGTCGACC	20	Oligo 3' pour vérifier insertion Tap-Tag. A utiliser avec oligo 5' dans l'ORF de la protéine concernée (Tap-Tag-R)
9552	CCCGGGATCCGATGGGAAGAACGAAAGACTG	33	Oligo 5' de clonage de fragment 675-958 de ySPT16 avec site BamHI ATG (ySPT16M-F) dans p413TEF, pACT2, pGBK
9553	ACCGGTCGACCTAATCTGAACAGTAGCCAG	31	Oligo 3' de clonage de fragment 675-958 de ySPT16 avec site SalI STOP (ySPT16M-F) dans p413TEF, pACT2, pGBK
9554	CCCGGGATCCGATGGCAGAAGCATTCTATG	31	Oligo 5' de clonage de fragment 220-477 de yPOB3 avec site BamHI (yPOB3M-F) dans p413TEF, pACT2, pGBK
9555	ACCGGTCGACCTATCTATCTTCACTTTCACCC	33	Oligo 3' de clonage de fragment 220-477 de yPOB3 avec site SalI STOP (yPOB3M-F) dans p413TEF, pACT2, pGBK
9556	ACCGGTCGACCTATTCCTTTTAACGTAGTCG	32	Oligo 3' de clonage du fragment 65-301 de yRTT106 avec site SalI STOP (yRTT106PH-R)
9557	CCCGAGATCTCGATGACTAGGGAGAGC	30	Oligo 5' de clonage de l'ORF ySUA7 avec site BglII (ySUA7-F)
9558	ACCGGTCGACTTATTTCTTTTCAACGCC	29	Oligo 3' de clonage de l'ORF ySUA7 avec site SalI (ySUA7-R)
9559	CCCGGGATCCCGATGAACGGCGGAGGCA	29	Oligo 5' de clonage de l'ORF yTAF9 avec site BamHI (yTAF9-F)
9560	ACCGGTCGACTACATAGACTTTGGGTC	28	Oligo 3' de clonage de l'ORF yTAF9 avec site SalI (yTAF9-R)
9561	CCCGGGATCCCGATGGATGCAATATCTGATC	31	Oligo 5' de clonage de l'ORF yTFB4 avec site BamHI (yTFB4-F)
9562	ACCGGTCGACTCATGGTTTTCGTACCTT	28	Oligo 3' de clonage de l'ORF yTFB4 avec site SalI (yTFB4-R)
9563	CCCGGGATCCCGATGAATGCGGACCATCAC	30	Oligo 5' de clonage de l'ORF yMOT3 avec site BamHI (yMOT3-F)
9564	ACCGGTCGACCTATTGTTGTGACTAACAA	30	Oligo 3' de clonage de l'ORF yMOT3 avec site SalI (yMOT3-R)
9565	CCCGGGATCCCGATGAGCAAGACAAAGATAT	32	Oligo 5' de clonage de l'ORF ySHE2 avec site BamHI (ySHE2-F)
9566	ACCGGTCGACTCAGTTTTCATTTACCAAA	31	Oligo 3' de clonage de l'ORF ySHE2 avec site SalI (ySHE2-R)
9567	CCCGGGATCCCGATGATCACCCCAAGGG	29	Oligo 5' de clonage de l'ORF yAHC2 avec site BamHI (yAHC2-F)
9568	ACCGGTCGACTCATAATAAGCCATCTTCAT	30	Oligo 3' de clonage de l'ORF yAHC2 avec site SalI (yAHC2-R)
9569	CCCGGGATCCCGATGGTATACACAACACCG	30	Oligo 5' de clonage de l'ORF yMSA2 avec site BamHI (yMSA2-F)
9570	ACCGGTCGACCTACTCTCTGGAGACAAG	28	Oligo 3' de clonage de l'ORF yMSA2 avec site SalI (yMSA2-R)
9854	TACGCTATAGCGCATTAGTGTGTAGTAATAACTATGATGTAAGG TGCTGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	70	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène RTT106 de levure
9855	ATCTTTGCGCTGAGAGACTCAGGCACTTCTAAGAACAAATTTT GACATGCACTGAGCAGCGTAACTCG	70	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène RTT106 de levure
9856	GAAACGCTGACCAAAAAGCCATTTTCAACGTAAGTCCCTACA GATTTGGACATGGAGGCCGAGAATAC	70	Oligo 5' invalidation gène RTT106 KanMX6 ou HIS3
9857	TGAACCTTACATATGCGTATTCATGCTATATTATAATATCGAATC TAAGCAGTATAGCGACCGACATTC	70	Oligo 3' invalidation gène RTT106 KanMX6 ou HIS3
9858	CCCGGGATCCCGATGGCCAGAACAAAGCAA	30	Oligo 5' de clonage de l'ORF yHHT1 avec site BamHI (yHHT1-F)
9859	ACCGGTCGACCTATGATCTTTACCTCTT	29	Oligo 3' de clonage de l'ORF yHHT1 avec site SalI (yHHT1-R)
A056	ACCGGTCGACTCATCATGTGTTTGACCTGAG	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF BCD1 (1-45) avec site SalI STOP
A057	CCCGGATCCCGATGCCAAGGAGTATATATCGAG	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF BCD1 (46-366) avec site BamHI et ATG
A058	CCCGAGATCTCGATGGAGTTTGCTGCTGAAAAT	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF hBCD1 (1-470) avec site BglII
A059	ACCGGTCGACTCAATTTTCATTGCCAACGTTT	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF hBCD1 (1-470) avec site SalI
A060	CTCGATATATACTCCTTAGGTTGTTGCTTTCCTTATGAAC	41	Oligo 3' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de HIT1(1-46) (ZnHIT1_BCD1_R) A utiliser avec oligo 8283 (oligo 5' de ZnF de Hit1p) = PCR ZnF Hit1(1-46) PCR=170 nt Tm=58°C
A061	GTTTCATAAGGAAAGCGAACAACTAAGGAGTATATATCGAG	41	Oligo 5' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de HIT1(1-46) (ZnHIT1_BCD1_F) A utiliser avec oligo 7740 (oligo 3' de Bcd1p) = PCR Bcd1(46-366) Tm=56°C, PCR=1000 nt
A062	CCCGGGATCCCGATGGATCGGCCATATTCCTGTG	34	Oligo 5' de clonage de l'ORF ySwi5 (577-606) correspondant à un ZnF avec site BamHI
A063	CTCGATATATACTCCTTAGGTTCTTGGTGCGATTTTGTG	41	Oligo 3' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de ySwi5(577-606) (ZnSwi5_BCD1_R) A utiliser avec oligo précédent (oligo 5' de ZnF de ySwi5p) = PCR ZnF Swi5(577-606) Tm=58°C, taille PCR=125 nt
A064	CACAAAAATCGACCAAGAACTAAGGAGTATATATCGAG	41	Oligo 5' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de ySwi5(577-606) (ZnSwi5_BCD1_F) A utiliser avec oligo 7740 (oligo 3' de Bcd1p) = PCR Bcd1(46-366) Tm=56°C, taille PCR=1000 nt
A065	CCCGGGATCCCGATGGACCGCTTTGTCTACACC	33	Oligo 5' de clonage de l'ORF hCREBBP (1701-1747) correspondant à un ZnF avec site BamHI. Tm=56°C
A066	CTCGATATATACTCCTTAGGCGAGCCCACTTCACCATC	39	Oligo 3' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de hCREBBP(1701-1747) (ZnCREBBP_BCD1_R) A utiliser avec oligo précédent (oligo 5' de ZnF de hCREBBP) = PCR ZnFCREBBP Tm=57°C, taille PCR=156 nt
A067	GATGGTGAAGTGGGGGCTGCCTAAGGAGTATATATCGAG	39	Oligo 5' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de hCREBBP(1701-1747) (ZnCREBBP_BCD1_F) A utiliser avec oligo 7740 (oligo 3' de Bcd1p) = PCR Bcd1(46-366) Tm=56°C, taille PCR=998 nt
A340	TCTGGGGTAATTAATCAGCGAAG	23	Oligo interne 5' dans le promoteur Gal1 pour vérifier souches Gal-3HA; position -183; A utiliser avec oligo interne reverse dans l'ORF
A341	CCCGGGATCCCGATGGCCACCGCTAACAGCATCATCGTGCTGG ATGAT	46	Oligo 5' de clonage de l'ORF de hDAXX avec site BamHI dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7
A342	ACCGGTCGACTTAATCAGAGTCTGAGAGCAGCATGATCTCTTCT GG	45	Oligo 3' de clonage de l'ORF de hDAXX avec site SalI dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7
A343	CCCGGGATCCCGATGCTTGGCCTCCCCGACAGCAGCTC	39	Oligo 5' de clonage de l'ORF de hDAXX (302-xxx) avec site BamHI, dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7
A344	ACCGGTCGACTTACGCTTGGAGCGAGCTCTTCTCTT	37	Oligo 3' de clonage de l'ORF de hDAXX (xxx-400) avec site SalI, dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7
A345	CCCGGGATCCCGATGGCCATGCAAGGTGTGAGACTTGT	37	Oligo 5' de clonage de l'ORF de hBCD1 zf (216-260) avec site BamHI, dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7
A346	ACCGGTCGACTTATTTATCTCGAACTCCATTACATGT	36	Oligo 3' de clonage de l'ORF de hBCD1 zf (216-260) avec site SalI dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7
A347	CCCGGGATCCCGATGTCATTTACCTGCAGTGTATAGA	37	Oligo 5' de clonage de l'ORF de yRTT106 (219-xxx) avec site BamHI, dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7; A utiliser avec oligo 7950
A348	CCCGGGATCCCGATGGCGGTGTTGAGTGGTGAAGCGGAATAA AAGAGTTC	52	Oligo 5' de mutation de l'ORF d'yBcd1p C5S et C8S avec site BamHI, dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7

No	Séquence de 5' vers 3'	nt	Usage
A349	ACCG GTGACG TTATTCTCTTCGTCCTCCTC	31	Oligo 3' de clonage de l'ORF de hDAXX (xxx-484) avec site Sall, dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7
3733	GTTAGGATTGGCACTGAGG	20	Oligo 5' complémentaire à la région 304-324 du promoteur TEF
3800	CGCTAACATTGATTAAATAGAACAACTAC	31	Oligo 3' complémentaire à la région 304-324 du terminateur TEF
A354	ACCG GTGACG TTATTTTCTATGTA CTACGAGTTGACT	37	Oligo 3' de clonage de l'ORF de hBCD1 zf (216-362) avec site Sall dans les vecteurs p413TEF, pACT2 et pGBKT7
A410	GAGTTCAAA GCC AAGAGTCC	20	Oligo 5' de mutation de la tyrosine 15 (TAC) de l'ORF d'yBcd1p en Alanine (GCC); peut être utilisé avec yBCD1 FL (1-366) ou avec les fragments; pas possible de faire la mutagenèse sur les mutants C17S + C20S
A411	GGACTCTTG GCT TTGAAGTCC	20	Oligo 3' de mutation de la tyrosine 15 (TAC) de l'ORF d'yBcd1p en Alanine (GCC); peut être utilisé avec yBCD1 FL (1-366) ou avec les fragments; pas possible de faire la mutagenèse sur les mutants C17S + C20S
A412	CCCGGATCCCGATG AACAAGATTATATTTGTAAGG	37	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRPH1 (706-765) correspondant à un ZnF, avec site BamHI .
A413	CTCGATATATACTCCTTAGGTGAAATACACGGTATTTTC	39	Oligo 3' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de yRPH1 (706-765) (ZnRph1_BCD1_R) A utiliser avec oligo precedent (oligo 5' deZnF de yRph1p) = PCR ZnF yRPH1 (706-765) Tm=50°C, taille PCR=215 nt
A414	GAAAAACCGGTGATTTTCA CTAAGGAGTATATATCGAG	39	Oligo 5' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de yRPH1 (706-765) (ZnRph1_BCD1_F) A utiliser avec oligo 7740 (oligo 3' de Bcd1p) = PCR Bcd1(46-366) Tm=56°C, taille PCR=1000 nt
A415	CCCGGATCCCGATG CTAATTACGACATGCTCTATTG	38	Oligo 5' de clonage de l'ORF yVPS71 (240-280) correspondant à un ZnF, avec site BamHI .
A416	CTCGATATATACTCCTTAGGCTCTATTTCGACCTAGTTTC	41	Oligo 3' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de yVPS71 (240-280) (ZnVPS71_BCD1_R) A utiliser avec oligo precedent (oligo 5' deZnF de yVPS71p) = PCR ZnF yVPS71 (240-280) Tm=56°C, taille PCR=158 nt
A417	GAAACTAGGTGCAGAAATAGAC CTAAGGAGTATATATCGAG	41	Oligo 5' de clonage pour protéine hybride BCD1(46-366) avec le Zn finger de yVPS71 (240-280) (ZnVPS71_BCD1_F) A utiliser avec oligo 7740 (oligo 3' de Bcd1p) = PCR Bcd1(46-366) Tm=56°C, taille PCR=1000 nt
A418	CCCGAGATCTCGATG AAGGCGCTAGTTGAAG	31	Oligo 5' de clonage de l'ORF yVPS71 avec site BglII (yVPS71-F)
A419	ACCGGTGACGACT CTATTCTGCACCTAG	30	Oligo 3' de clonage de l'ORF yVPS71 avec site Sall (yVPS71-R)
A434	GTGGTAATGACCTGAACACAGACTTTGAAAAGTGCG	37	Oligo 5' de deletion des aa 162-179 dans l'ORF de yRtt106p ou yRtt106Mp. Doit etre utilisé avec oligo 3' de clonage de yRtt106p (7950 Sall) ou yRtt106Mp 5 (8236 Sall)
A435	CGCACTTTTCAAAGCTGTGTTCAAGGTCATTACCAC	37	Oligo 3' de deletion des aa 162-179 dans l'ORF de yRtt106p ou yRtt106Mp. Doit etre utilisé avec oligo 5' de clonage de yRtt106p (8130 BglII) ou yRtt106Mp (8688 BamHI)
A436	GAAACAGAAGTGCAATTG AAACAATATGATGCTAAAC	38	Oligo 5' de deletion des aa 331-346 dans l'ORF de yPOB3p. Doit etre utilisé avec oligo 3' de clonage de yPOB3p (9555 Sall)
A437	GTTTTAGCATCATATTGTTT CAATTGCACCTTCTGTTC	38	Oligo 3' de deletion des aa 331-346 dans l'ORF de yPOB3p. Doit etre utilisé avec oligo 5' de clonage de yPOB3p (9554 BamHI)
A438	CTACCCCTTTCTGTCTTA ATGACCTTGAACAAAGAAAAAC	40	POB3M-delta318-RTT106-158_F - Oligo pour clonage d'une protéine hybride POB3M delta 318-367 / RTT106 158-199; Premier dans une serie de 4 oligos. A utiliser avec oligo 3' POB3M-delta367-RTT106-199_R sur matrice RTT106
A439	GTTTTCTTTGTTCAAGGTCATT AGACACAAGAAAGGGGTAG	40	2. POB3M-delta318-RTT106-158_R - Oligo pour clonage d'une protéine hybride POB3M delta 318-367 / RTT106 158-199; Deuxieme dans une serie de 4 oligos. A utiliser avec oligo 5' 9554 sur matrice POB3
A440	CCATTTTGACGGGTTTTAAA AGAGTCATTGTTCTGG	37	3. POB3M-delta367-RTT106-199_F - Oligo pour clonage d'une protéine hybride POB3M delta 318-367 / RTT106 158-199; Troisieme dans une serie de 4 oligos. A utiliser avec oligo 3' 9555 sur matrice POB3
A441	CCAGGAACAATGACTCTTTTAAACCCGTC AAATGG	37	4. POB3M-delta367-RTT106-199_R - Oligo pour clonage d'une protéine hybride POB3M delta 318-367 / RTT106 158-199; Quatrieme dans une serie de 4 oligos. A utiliser avec oligo 5' POB3M-delta318-RTT106-158_F sur matrice RTT106
A442	CTTGCTTACAATTTCA GAAA GAAACACACTAA ACCAG	39	1. POB3M-delta323-RTT106-163_F - Oligo pour clonage d'une protéine hybride POB3M delta 323-352 / RTT106 163-181; Premier dans une serie de 4 oligos. A utiliser avec oligo 3' POB3M-delta352-RTT106-181_R sur matrice RTT106
A443	CTGGTTAGTGTGTTTTCTTCTG AAATTGTAAGACAAG	39	2. POB3M-delta323-RTT106-163_R - Oligo pour clonage d'une protéine hybride POB3M delta 323-352 / RTT106 163-181; Deuxieme dans une serie de 4 oligos. A utiliser avec oligo 5' 9554 sur matrice POB3
A444	GATTCCAATGTAACAGAC ACTCATATAGTTTTAAGTCAT	39	3. POB3M-delta352-RTT106-181_F - Oligo pour clonage d'une protéine hybride POB3M delta 323-352 / RTT106 163-181; Troisieme dans une serie de 4 oligos. A utiliser avec oligo 3' 9555 sur matrice POB3
A445	ATGACTTAAACTATATGAGTGTCTGT TACATTGGAATC	39	4. POB3M-delta352-RTT106-181_R - Oligo pour clonage d'une protéine hybride POB3M delta 323-352 / RTT106 163-181; Quatrieme dans une serie de 4 oligos. A utiliser avec oligo 5' POB3M-delta323-RTT106-163_F sur matrice RTT106
A446	5' - GAAAGAGAAGAAAGAAAGAAAGTCCAAGAAAGAGAAGAAAGAG AAGAAACGGATCCCCGGGTAAATTA - 3'	69	insertion 3HA en 3' du gène NOP58 de levure - oligo 5' Plasmide de depart: pFA6a-3HA-kanMX6, pFA6a-3HA-TRP1, pFA6a-3HA-HIS3MX6
A447	5' - GGGAACGCGAGGGGTCACTAATTATTAATGTAATGTCATCC GAATTCGAGCTCGTTTAAAC - 3'	70	insertion 3HA en 3' du gène NOP58 de levure - oligo 3' Plasmide de depart: pFA6a-3HA-kanMX6, pFA6a-3HA-TRP1, pFA6a-3HA-HIS3MX6
A448	GGGTACTGAAATCACTC	17	Oligo direct sequencage yNOP58
A449	GTAAGCGCAATTCGAC	18	Oligo reverse sequencage yNOP58
A450	5' - GGATGCCAAAGGTCAACAAGATTTAGAACTCCGCAAAATTA TTTGCAGATCCCCGGGTAAATTA - 3'	69	insertion 3HA en 3' du gène RVB1 de levure - oligo 5' Plasmide de depart: pFA6a-3HA-kanMX6, pFA6a-3HA-TRP1, pFA6a-3HA-HIS3MX6
A451	5' - GCGTAATATTTATTTTATTTATGAAATGTGCTTTAGGCTTTCTTC ACTGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC - 3'	70	insertion 3HA en 3' du gène RVB1 de levure - oligo 3' Plasmide de depart: pFA6a-3HA-kanMX6, pFA6a-3HA-TRP1, pFA6a-3HA-HIS3MX6
A452	GCGAGTTGGCAGATCTG	17	Oligo intern de sequencage pour yRVB1 (yRVB1-Fseq)
A453	AAATCGTGCAAGGTAAC	17	Oligo intern de sequencage pour yRVB1 (yRVB1-Rseq)
A454	5' - AAATATCCATTGCTAAATCAGCAGACCCGTATGCCATGGATACTA CGGAACGGATCCCCGGGTAAATTA - 3'	70	insertion 3HA en 3' du gène RVB2 de levure - oligo 5' Plasmide de depart: pFA6a-3HA-kanMX6, pFA6a-3HA-TRP1, pFA6a-3HA-HIS3MX6
A455	5' - TATTTATACATATATTTGATGCAATTTCTGCCTTAAAGTACAAA ATGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC - 3'	70	insertion 3HA en 3' du gène RVB2 de levure - oligo 3' Plasmide de depart: pFA6a-3HA-kanMX6, pFA6a-3HA-TRP1, pFA6a-3HA-HIS3MX6
A456	CATGGGTGCTGATACC	16	Oligo intern de sequencage pour yRVB2 (yRVB2-Fseq)
A457	CACCGTGTGAACAC	15	Oligo intern de sequencage pour yRVB2 (yRVB2-Rseq)
A507	GAGTTCAAA GCC AAGTGTC	20	Oligo 5' de mutation de la tyrosine 15 (TAC) de l'ORF d'yBcd1p en Alanine (GCC); peut être utilisé avec yBCD1 FL (1-366) ou avec les fragments; pas possible de faire la mutagenèse sur les mutants C17S + C20S; Differe de l'oligo A410 par le fait qu'il n'apporte pas la mutation C17S
A508	GGACACTTG GCT TTGAAGTCC	20	Oligo 3' de mutation de la tyrosine 15 (TAC) de l'ORF d'yBcd1p en Alanine (GCC); peut être utilisé avec yBCD1 FL (1-366) ou avec les fragments; pas

No	Séquence de 5' vers 3'	nt	Usage
			possible de faire la mutagenèse sur les mutants C17S + C20S; Diffère de l'oligo A411 par le fait qu'il n'apporte pas la mutation C17S
A565	CCCGAGATCTCGATG GCCATGTCAAG GTGTGAG	33	Oligo 5' avec site BglII ATG pour créer un fragment correspondant au hBCD1 (aa 216 – 470). A utiliser avec oligo 3' A059 Sall
A566	GCGGAAACTGGCCATG GCGGTGTTGTGTGGTG	32	Oligo 5' pour créer une construction hybride, avec rajout en N-terminal de yBCD1 le domaine 1-216 de hBCD1 (domaine en plus par rapport au BCD1 de S.cerevisiae) A utiliser avec oligo 3' 4470 (Sall)
A567	CACCACACAACACCGC CATGGCCAGTTCCGC	32	Oligo 3' pour créer une construction hybride, avec rajout en N-terminal de yBCD1 le domaine 1-216 de hBCD1 (domaine en plus par rapport au BCD1 de S.cerevisiae) A utiliser avec oligo 5' A058 (BglII)
A944	5' – TAAAAGATCTGAATG GCTTACCACATACGATGTTCCAG – 3'	38	Oligo 5' avec site BglII ATG pour insertion tag HA en 5' des ORF's clonées dans p413TEF. A utiliser avec oligo 3' BamHI; L'insertion du tag HA se fait dans le site BamHI du MCS du vecteur;
A945	5' – CATCGGATCCC AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGG – 3'	39	Oligo 3' avec site BamHI pour insertion tag HA en 5' des ORF's clonées dans p413TEF. A utiliser avec oligo 5' BglII; L'insertion du tag HA se fait dans le site BamHI du MCS du vecteur;
B003	ACCGGTGCACT CATATATCGTATCTTCTCTTC	32	Oligo 3' de clonage de l'ORF BCD1 (1-115) avec site Sall STOP
B219	ACCGGTGCACTCA CCGCTTGTCTTCAATC	30	Oligo 3' de clonage de l'ORF BCD1 (1-96) avec site Sall STOP
B305	CCCGGGATCCCGATG GAGCAACATCTCAAATC	32	Oligo 5' de clonage de l'ORF yCAC1 (1-606) avec site BamHI (CAC1-F)
B306	ACCGGTGCACTTCA AAAGACGGGGTTGG	28	Oligo 3' de clonage de l'ORF yCAC1 (1-606) avec site Sall STOP (CAC1-R)
B307	GAAAAATAGATGATGAATTAAGTGAACA	27	Oligo 5' de séquençage + qPCR yCAC1 (868-->STOP) (SeqCAC1-F)
B308	AAGATTGGAGCTCATCGTCTG	21	Oligo 3' de séquençage + qPCR yCAC1 (ATG-->991) (SeqCAC1-R)
B309	CCCGGGATCCCGATG TCACTGAATGACTTCC	31	Oligo 5' de clonage de l'ORF yRTT109 (1-436) avec site BamHI (RTT109-F)
B310	ACCGGTGCACTCA AGTTTTAGGCAAGGC	28	Oligo 3' de clonage de l'ORF yRTT109 (1-436) avec site Sall STOP (RTT109-R)
B311	TGCATCCAGTACCTCTTCC	20	Oligo 5' de séquençage + qPCR yRTT109 (604-->STOP) (SeqRTT109-F)
B312	CGCCCGGTATCCTTAATTTT	20	Oligo 3' de séquençage + qPCR yRTT109 (ATG-->719) (SeqRTT109-R)
B313	CCCGGGATCCCGATG TCAATGTTTCACTGTTAG	34	Oligo 5' de clonage de l'ORF yASF1 (1-279) avec site BamHI (ASF1-F)
B314	ACCGGTGCACTTAA TCGTTGAACGTGCCG	30	Oligo 3' de clonage de l'ORF yASF1 (1-279) avec site Sall STOP (ASF1-R)
B315	GCAAGAATTATTATGCTTTCGCAAAATTTTCGATATAAGTTATT TTTGAAATTCGAGCTCGTTTAAAC	71	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène NOP58 de levure - oligo 5' Plasmide de départ: pFA6-kanMX6-PGAL1-3HA, pFA6-TRP1-PGAL1-3HA, pFA6-HIS3MX6-PGAL1-3HA
B316	GCTTTTAAAGAGCATAACAGCTGAAGTTTCAGTTAAACGTAA GC CATGCACTGAGCAGCGTAATCTG	71	insertion P GAL1::3HA en 5' du gèneNOP58 de levure - oligo 3' Plasmide de départ: pFA6-kanMX6-PGAL1-3HA, pFA6-TRP1-PGAL1-3HA, pFA6-HIS3MX6-PGAL1-3HA
B317	TAATGATAGAAAAAACTAGGAATTCCTGAATTCATATGCATGGA AGAAAGAAATTCGAGCTCGTTTAAAC	71	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène PIH1 de levure - oligo 5' Plasmide de départ: pFA6-kanMX6-PGAL1-3HA, pFA6-TRP1-PGAL1-3HA, pFA6-HIS3MX6-PGAL1-3HA
B318	TCCTCGTTTCTATGACGTTGCTTAATTGGTCTCAATAAGAAATCG GC CATGCACTGAGCAGCGTAATCTG	71	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène PIH1 de levure - oligo 3' Plasmide de départ: pFA6-kanMX6-PGAL1-3HA, pFA6-TRP1-PGAL1-3HA, pFA6-HIS3MX6-PGAL1-3HA
B319	AAACGAGAGAAAGAAGTTCAAGTTAGTTGAAGCCAGCAATACTAC TTTCTCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	71	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène RVB2 de levure - oligo 5' Plasmide de départ: pFA6-kanMX6-PGAL1-3HA, pFA6-TRP1-PGAL1-3HA, pFA6-HIS3MX6-PGAL1-3HA
B320	AACGACTTTAAATCTGATGTTTCATTTGGATCACTAGTTTGAATC GA CATGCACTGAGCAGCGTAATCTG	71	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène RVB2 de levure - oligo 3' Plasmide de départ: pFA6-kanMX6-PGAL1-3HA, pFA6-TRP1-PGAL1-3HA, pFA6-HIS3MX6-PGAL1-3HA
B321	TGTAACACCTGGTCTGTACCGTAAATATTCAAATAAGCATCAAT TCAAA GAAATTCGAGCTCGTTTAAAC	71	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène RRP9 de levure - oligo 5' Plasmide de départ: pFA6-kanMX6-PGAL1-3HA, pFA6-TRP1-PGAL1-3HA, pFA6-HIS3MX6-PGAL1-3HA
B322	ACTTCTCCTTTGGATCTTTTCTCTTTTCTGTTGGGTAAACATCTG A CATGCACTGAGCAGCGTAATCTG	71	insertion P GAL1::3HA en 5' du gène RRP9 de levure - oligo 3' Plasmide de départ: pFA6-kanMX6-PGAL1-3HA, pFA6-TRP1-PGAL1-3HA, pFA6-HIS3MX6-PGAL1-3HA
B323	AGCGAATGGTGCATGTACAAAAGATGGATGCTAGAATGAAGAAC AAGCGGG GCTCGACGAGTCCCGGG	68	insertion TAP tag en 3' du gène BCD1 de levure - oligo 5' pour BCD1 1-96; Remplace marker HIS par TRP
B324	GGGACAAAACGATGGACCTATTTGTATGGAGCGTGGAGTGGATT CTATG TGTCGACGAGTCCCGGG	68	insertion TAP tag en 3' du gène BCD1 de levure - oligo 5' pour BCD1 1-168; Remplace marker HIS par TRP
B325	ACAGCGACGATGACTACAATCCGGGCTTATCCATGGATTTCCTC ACTGCA GGTCGACGAGTCCCGGG	68	insertion TAP tag en 3' du gène BCD1 de levure - oligo 5' pour BCD1 1-366; Remplace marker HIS par TRP
B326	CGTATAGATAGATAGTCTAAATAGTAATCTTCAACCTTATGTATCT CGGC GAAATTCGAGCTCGTTTAAAC	70	insertion TAP tag en 3' du gène BCD1 de levure - oligo 3' pour amplifier TRP
B327	GGTCACCCGCGCCAGC GTACAATCTTGATCCGGAG	34	insertion TAP tag en 3' du gène BCD1 de levure - oligo 5' pour amplifier marker TRP
B328	CTCCGGATCAAGATTGTACGCTGGCCGGGTGACC	34	insertion TAP tag en 3' du gène BCD1 de levure - oligo 3' pour amplifier le TAP tag

Tableau 14 : Les principaux oligonucléotides utilisés au cours de la thèse.

1.4. Les milieux de culture

Les différents milieux de culture sont autoclavés à 121°C, sous 1 bar de pression, pendant 20 minutes. Pour la préparation des milieux solides, de l'agar est additionné de 20 g/L avant le passage à l'autoclave.

1.4.1. Cultures de bactéries

Milieu LB (Luria Bertani): peptone pancréatique animale (5 g/L); peptone tryptique de caséine (5 g/L); extrait de levure (5 g/L); NaCl (10 g/L). Le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH 10 N. Les antibiotiques sont ajoutés après la stérilisation, à une concentration finale de 100 µg/mL pour l'ampicilline et 50 µg/mL pour la kanamycine.

1.4.2. Cultures de levures

Milieu riche YPG : extrait de levure (10 g/L) ; bactopectone (20 g/L) ; galactose (2 g/L).

Milieu riche YPD : extrait de levure (10 g/L) ; bactopectone (20 g/L) ; glucose (2 g/L).

Milieu sélectif YNB (Yeast Nitrogen Base) : Base azotée de levure sans acide aminé (10 g/L); galactose ou glucose (20 g/L); mélange d'acides aminés (20 g/L de chaque acide aminé).

Les antibiotiques sont ajoutés après l'étape de stérilisation, à une concentration finale de 200 µg/mL pour la généticine (G418), 60 µg/mL pour la nourseothricine et 50 µg/mL pour la doxycycline. Le 3-aminotriazol, utilisé pour les expériences de double-hybride, est ajouté selon une gamme de concentration variant de 0,2 mM à 50 mM, en fonction des applications.

1.5. Les tampons et solutions d'usage courant

TE : Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 ; EDTA 1 mM.

TBE : Tris borate 89 mM, pH 8,3 ; EDTA 2 mM.

PBS : Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,3; NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM.

Tampon D : HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9 ; KCl 150 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; EDTA 0,2 mM.

Tampon SSPE 20X : Na₂HPO₄ 150 mM, pH 7,4 ; NaCl 3 M; EDTA 25 mM Tampon

SSC 20X : Citrate de sodium 340 mM, pH 7,2 ; NaCl 150 mM

Tampon MOPS 10X : MOPS 200 mM ; Acétate de sodium 50mM ; EDTA 10 mM

Tampon de migration SDS-PAGE : Glycine 14,25 g/L ; Tris 3 g/L ; SDS 1 g/L.

Réactif de Denhardt's 100X : Ficoll 20 g/L ; Polyvinylpyrrolidone 20 g/L ; BSA 20 g/L

Solution de polyacrylamide dénaturante : Acrylamide/Bisacrylamide (23,75/1,25) 25 % (p/v) ; TBE 1X ; urée 8 M.

Solution de polyacrylamide native : Acrylamide/Bisacrylamide (38/2) 40 % (p/v) ; TBE 1X.

Bleu de dépôt pour gel SDS-PAGE : Tris-HCl 80 mM pH 6.8 ; SDS 3%; DTT 100 mM ; Glycérol 10%; Bleu de bromophénol 0.1%.

Bleu de formamide : EDTA 20 mM ; bleu de bromophénol 0,05 %; bleu de xylène cyanol 0,05 % dans de la formamide désionisée.

Bleu natif pour dépôt sur gel d'agarose : EDTA 5 mM ; SDS 0,4 % ; glycérol 5 % ; bleu de bromophénol 0,2 %.

Solution de coloration pour gel SDS-PAGE : Ethanol 20% ; Acide Acétique 10% ; 2 g/L Bleu de Coomassie R250.

Solution de décoloration de gel SDS-PAGE : Ethanol 20% ; Acide Acétique 10%.

1.6. Les anticorps et les sérums

Les sérums et anticorps suivants ont été employés pour les analyses par Western-blot :

- **anti-Trm4p** : Sérum de lapin (aimablement fourni par I. Motorine). Utilisé à une dilution de 1/5000^{eme}.
- **anti-Pma1p** : Sérum de lapin (aimablement fourni par B. André). Utilisé à une dilution de 1/10000^{eme}.
- **anti-GFP** : Anticorps monoclonal produit chez le lapin (SIGMA). Utilisé à une dilution de 1/4000^{eme}.
- **anti-flag** : Anticorps monoclonal produit chez la souris (SIGMA). Utilisé à une dilution de 1/600^{eme}.
- **anti-HA** : Anticorps monoclonal produit chez le lapin (SIGMA). Utilisé à une dilution de 1/1000^{eme}.

2. Méthodes

2.1. Techniques de génie génétique

2.1.1. Clonages

Les fragments d'ADN d'intérêts sont amplifiés par PCR en utilisant l'ADN polymérase Phusion® (Finnzymes) ou Pfu® et un couple d'oligonucléotides amorces apportant, respectivement en 5' et en 3', des sites de restriction compatibles avec le vecteur de destination. 2 µg d'ADN double-brin obtenus sont digérés par double-restriction enzymatique, dans les conditions décrites par le fournisseur (MBI-Fermentas). Les produits de digestion sont purifiés sur colonnes NucleoSpin®, dont la limite d'exclusion permet d'éliminer les produits de clivage provenant des deux extrémités du fragment d'ADN. Le vecteur de destination est préparé de la même façon et subit une étape supplémentaire de déphosphorylation de ses extrémités 5' par action de la phosphatase alcaline SAP (MBI Fermentas). La ligature par la T4-DNA ligase (MBI-Fermentas) est ensuite réalisée à partir de 50 ng de vecteur et d'un excès molaire de 3 fois de fragment. Après transformation de cellules *E. coli* DH5α et sélection des clones recombinants sur milieu sélectif, les plasmides sont amplifiés par mini-préparation et analysés par séquençage.

2.1.2. Mutagenèse dirigée par PCR

L'approche de mutagenèse dirigée par PCR a été utilisée en utilisant l'ADN polymérase Phusion® (Finnzymes). La réaction est réalisée dans un volume total de 50 µL, en présence de 0,02 unité d'enzyme Phusion® dans son tampon, de 0,2 µM de chaque dNTP (MBI Fermentas), de 250 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 T_m des amorces et de la taille du plasmide. Après 30 cycles réactionnels, 10 μ L de mélange réactionnel sont traités par l'endonucléase *DpnI* (MBI Fermentas) dans les conditions recommandées par le fournisseur. Après transformation de cellules *E. coli* DH5 α et sélection des clones recombinants sur milieu sélectif, les plasmides sont amplifiés par mini-préparation et analysés par séquençage.

2.2. Techniques de manipulation des levures

2.2.1. Transformation de cellules de levures compétentes

La préparation de cellules de levure compétentes et leur transformation est réalisée à partir de 30 mL de cellules cultivées à 30°C, en phase exponentielle de croissance. Arrivé à une absorbance de 0,8 unités A_{600nm}/mL , les cellules sont lavées dans 15 ml d'eau stérile, avant d'être reprises dans 500 μ L de tampon (Acétate de lithium 0,1 M; TE). Pour chaque transformation, un volume de 50 μ L de suspension cellulaire est incubé 30 min à 30°C, en présence de 1 à 2 μ g d'ADN, de 4,5 μ g d'ADN de sperme de saumon dénaturé (15 min à 100°C) et de 300 μ L de tampon (PEG 4000 40%; Acétate de lithium 0,1 M; TE). Les cellules sont ensuite incubées 15 min à 42°C, avant d'être lavées dans 1 mL d'eau stérile, puis étalées sur milieu sélectif solide et incubées à 30°C pendant plusieurs jours.

2.2.2. Modification génétique des souches de levure

Certaines souches de levure ont été modifiées génétiquement, dans le but d'invalider certains gènes ou de modifier leur profil de résistance aux antibiotiques. Les levures ont été transformées avec 1 à 2 μ g d'ADNdb linéaire, obtenus par PCR, et permettant la modification d'un locus spécifique par recombinaison homologue. A l'issue de la transformation, les cellules ont été incubées 24 h à 30°C, sur milieu YPD ou YPG solide, puis répliquées, à l'aide d'un velours, sur le milieu sélectif approprié. Les clones positifs ont fait l'objet d'un génotypage par extraction de l'ADNg et analyse ciblée par PCR.

Dans le cas de l'invalidation d'un gène, le fragment d'ADN utilisé pour la recombinaison est obtenu par PCR à partir des plasmides pFA6a-KanMX6 ou pFA6a-HISMX6 porteur de la cassette de résistance Kan-MX6 ou HisMX6. Dans le cas de modification des ORF afin d'apporter le promoteur Gal1 et l'étiquette 3HA en 5' du gène ciblé, le fragment PCR a été obtenu à partir des plasmides pFA6a-Gal1-3HA-KanMX6 ou pFA6a-Gal1-3HA-HISMX6. Après amplification, les fragments obtenus sont purifiés sur colonnes NucleoSpin® et dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm.

2.2.3. Isolement de nouvelles souches de levure par sporulation et dissection de tétrades

Dans le but de générer des cellules de levures invalidées pour deux gènes d'intérêt, nous avons utilisé une approche de sélection par sporulation et dissection de tétrades. Pour cela, nous avons utilisé les souches de levure BY4741 (*Mat a*) et BY4742 (*Mat α*) dont un seul gène est invalidé. Ces souches ont été croisées deux à deux sur milieu riche YPD, à une température de 30°C. Les cellules diploïdes ont été ensuite sélectionnées sur milieu dépourvu de Méthionine et Lysine, puis repiquées deux nouvelles fois sur milieu riche YPD. Les cellules ont été ensuite placées dans des conditions de carence, qui conduisent une faible proportion de cellules (environ 5 à 20%) à entrer en méiose. Chez *S. cerevisiae*, ce processus se matérialise par un phénomène de sporulation, conduisant à la production de 4 spores haploïdes, maintenues sous la forme d'une tétrade, appelée « asque ». Pour cela, une colonie de cellule a été incubée dans 2 mL de milieu de sporulation (Acétate de potassium 1% ; Acétate de zinc 0,005% ; Uracile 2 µg/mL ; Histidine 4 µg/mL ; Leucine 12 µg/mL), sur roue, pendant 5 jours à 25°C, suivis de 3 jours à 30°C. Ensuite, la dissection des tétrades impose de réaliser une digestion partielle de la paroi des asques, en utilisant la zymolyase, une enzyme qui hydrolyse les liaisons β-1,3- glucane des protéines glycosylées de la paroi. Afin de réaliser cette digestion ménagée 150 µL de cellules ont été lavées à l'eau stérile, puis reprises dans un volume de 150 µL de Sorbitol 1 M, additionné de zymolyase à une concentration finale de 0,25 mg/mL. Le mélange a été incubé à 33°C, pendant une durée de 15 min. La réaction a été arrêtée par ajout lent de 250 µL d'eau stérile glacée. La dissection des tétrades a été réalisée à l'aide d'un micromanipulateur (Singer). 50 µL de cellules ont été déposés sur le quart d'une boîte de milieu riche YPD et les ascospores provenant d'une même tétrade ont été positionnées au niveau de coordonnées précises, indiquées par l'appareil. Après dissection de 10 à 15 tétrades, les boîtes ont été incubées plusieurs jours à 30°C et le profil de croissance de chaque lignée cellulaire a été analysé. Ces dernières ont fait l'objet d'un génotypage, par extraction de l'ADN génomique et analyse ciblée par PCR.

Nouvelles souches construites pendant la thèse:

- <i>RSA1</i> -TAP x Δ <i>HIT1</i>	- Δ <i>RSA1</i> x Δ <i>RTT106</i>
- <i>BCD1</i> -TAP x Δ <i>RTT106</i>	- <i>BCD1</i> -TAP x Gal-3HA- <i>RTT106</i>
- <i>BCD1</i> -TAP x Δ <i>PIH1</i>	- <i>RTT106</i> -TAP x Gal-3HA- <i>BCD1</i>
- <i>NOP58</i> -TAP x Δ <i>RSA1</i>	- BY4741 x Gal-3HA- <i>BCD1</i>
- <i>RTT106</i> -TAP x Δ <i>PIH1</i>	

2.2.4. Utilisation de systèmes génétiques permettant de réprimer l'expression de gènes essentiels à la viabilité cellulaire

Certaines protéines d'intérêt, comme Bcd1, sont essentielles à la viabilité cellulaire. A défaut de pouvoir utiliser des cellules de levure invalidées pour les gènes codant ces protéines, nous avons donc recours à des souches permettant d'induire une répression transitoire de leur expression. Le système utilisé a été le système Tet Off, dans lequel le gène d'intérêt est placé sous contrôle de l'opérateur Tet, dont l'effet activateur nécessite la fixation de la protéine tTA, qui est réprimée en présence de Doxycycline (Peng *et al.*, 2003). La répression est ainsi réalisée par ajout de Doxycycline à 50 µg/mL dans le milieu de culture. Les cultures en milieu non permissif sont ensemencées à une concentration cellulaire faible ($A_{600nm}/mL < 0,05$), afin d'assurer la production d'un maximum de biomasse dans les conditions de répression. De plus, ces systèmes sont utilisés pour évaluer la fonctionnalité de fragments ou de variants protéiques, exprimés de façon ectopique à partir d'un vecteur d'expression approprié.

2.2.6. Technique de double-hybride

La technique de double-hybride (Y2H) permet de montrer l'association de deux protéines dans des cellules de levure. Elle repose sur l'expression par la levure de deux protéines de fusion. La première protéine chimérique, codée par le plasmide pGBKT7 est composée du domaine de fixation à l'ADN de l'activateur transcriptionnel Gal4 (Gal4-BD) et de la protéine appât. La seconde, codée par le plasmide pACT2, est composée du domaine d'activation de la transcription de l'activateur Gal4 (Gal4-AD) et de la protéine proie. L'interaction entre les deux partenaires permet la reconstitution de l'activateur transcriptionnel Gal4 et induit la transcription d'un gène rapporteur placé sous contrôle de l'opérateur *GAL1*, qui constitue l'élément de réponse à l'activateur Gal4. La souche Y187 (Mat α) est transformée par le plasmide pGBKT7 (*TRP1*) qui code la protéine "appât" et la souche Y190 ou CG1945 (Mat *a*) est transformée par le plasmide pACT2 (*LEU2*) qui code la protéine "proie". Pour le gène rapporteur *HIS3*, le niveau d'expression dépend de la force d'interaction entre les deux partenaires d'intérêt. Ces interactions sont donc révélées sur un milieu sans histidine (Trp-/Leu-/His-), enrichi en 3-AT (3-aminotriazole) (Sigma), un inhibiteur spécifique de la voie de biosynthèse de l'Histidine, qui permet d'évaluer l'intensité de l'interaction étudiée. L'ensemble des phases d'incubation se déroulent à une température de 30°C.

2.3. Techniques d'extraction de matériel biologique

2.3.1. Préparation des extraits cellulaires

Dans la majorité des cas les extraits cellulaires ont été préparés par action mécanique de billes de verre (Sigma). Pour une quantité de cellules équivalente à 30 unités A_{600nm} , la lyse des parois est réalisée dans 300 μ L de tampon (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 ; KCl 150 mM ; $MgCl_2$ 5 mM; TRITON-X100 0,05% ; Antiprotéases 1x (Roche)), en présence de 300 μ L de billes de verre. Après 3 fois 1 min d'agitation au vortex, interrompues par 2 min d'incubation dans la glace, le lysat est clarifié par deux centrifugations successives, pendant 5 min à 4000g. En cas de stockage, les extraits sont incubés quelques secondes dans de l'azote liquide, puis placés à -80°C.

2.3.2. Extraction des ARN totaux

Pour l'extraction d'ARN totaux, une quantité de cellules équivalente à 10 unités d'absorbance à 600 nm sont reprises dans 200 μ L de tampon d'extraction (Tris/HCl 50 mM, pH7,5 ; NaCl 100 mM ; EDTA 10 mM), additionnés de 300 μ L de billes de verre (Sigma). Les échantillons sont agités à l'aide d'un vortex pendant 3 fois 1 min, interrompues par 2 min d'incubation dans la glace, puis 200 μ L de tampon d'extraction, 50 μ L de SDS 10% et 400 μ L d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) sont ajoutés au lysat. L'échantillon est à nouveau agité à l'aide d'un vortex pendant 1 min, puis incubé 10 min à 65°C. Après centrifugation à 20000g, la phase aqueuse est récupérée et soumise à une seconde étape d'extraction dans 1 volume de mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). Les ARN sont ensuite isolés par précipitation alcoolique en présence de 300 mM de NaCl, puis repris dans 50 μ L d'eau ultra-pure et dosé par mesure de l'absorbance à 600 nm.

2.4. Techniques de détection à partir d'échantillons biologiques

2.4.1. Technique de Western-blot

La technique de Western-blot a été utilisée afin d'évaluer le taux de certaines protéines à partir d'extraits cellulaires. Les différents extraits sont dosés par la technique de Bradford, afin de normaliser la quantité de chaque échantillon à utiliser. Une quantité d'extrait, équivalent à 10 µL de l'échantillon le moins concentré, est ainsi fractionnée sur gel SDS-PAGE. Après migration, le transfert sur membrane de Nitrocellulose (Biorad) est réalisé dans un appareil Mini Trans-Blot (Biorad), pendant 1 h à 100 V, dans un tampon (Tris 3 g/L ; Glycine 14,4 g/L ; éthanol 20%). La membrane est ensuite bloquée par incubation sous agitation, pendant 1 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C, dans un tampon de pré-hybridation (PBS/Tween-20 0,1% ; lait 5%). L'hybridation de l'anticorps primaire est réalisée sous agitation, pendant 1 h à température ambiante, dans le tampon d'hybridation (PBS/Tween-20 0,1%). La membrane est ensuite lavée 3 fois 15 min, puis incubée sous agitation, pendant 45 min avec l'anticorps secondaire approprié, couplé à la peroxydase (Invitrogen). Après deux lavages de 15 min dans le tampon d'hybridation, suivis de deux lavages de 5 min dans du tampon PBS, les protéines d'intérêt sont détectées par chemiluminescence à l'aide du kit ECL+ (GE Healthcare), suivie d'une révélation (système Phusion).

2.4.2 Technique de Northern-blot

2.4.2.1. Pour la détection des snoARN

Pour la détection des snoARN, 10 µg d'ARN totaux sont dénaturés 2 min à 96°C dans du bleu de formamide, puis fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant 6% (acrylamide/bisacrylamide (38:2) ; urée 8 M ; TBE 0,5X). Après la migration, les ARN sont transférés sur une membrane de Nylon (ZetaProbe, Biorad), à l'aide du système de transfert Trans Blot SD SemiDry Transfer Cell (Biorad). Le transfert est réalisé dans du tampon TBE 0,5X, pendant 30 min. Les ARN sont fixés de façon covalente à la membrane par pontage photochimique aux UV, pendant 5 min. La membrane est 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 ; Réactif de Denhardt 5X ; SDS 0,5%). A l'issue de cette étape, les sondes radiomarquées au ³²P, au niveau de leur extrémité 5', grâce à la T4-PNK (MBI Fermentas), sont ajoutées dans le tube à hybridation. L'hybridation se poursuit pendant 12 h à 37°C, puis la membrane est lavée plusieurs fois dans du tampon de lavage (SSC 6X) préchauffé à 42°C. La révélation des signaux radioactifs est réalisée à l'aide d'un appareil de détection Typhoon (GE Healthcare), après exposition sur un écran amplificateur.

2.4.2.2 Pour la détection des ARNr

Pour la détection des ARNr et de leurs précurseurs, 5 µg d'ARN totaux sont dénaturés 1 h à 60°C, dans du tampon MOPS, additionné de 50% de DMSO et de 1 M de Glyoxal désionisé. Un volume de bleu de formamide est ajouté à l'issue de cette étape, et les ARN sont déposés sur gel d'agarose 1,2%, préparé dans du tampon MOPS (= l'agarose est fondu dans de l'eau et le MOPS est ajouté lorsque la température retombe à 55°C). La migration est réalisée à 30 V pendant au moins 12 h, dans du tampon MOPS. Le gel est ensuite lavé 10 min dans de l'eau ultra-pure, puis le transfert est réalisé sur membrane de Nylon Hybond+ (Amersham), à l'aide d'un système de pompe à vide, à une pression de 50 mbar. Le gel doit être imbibé de tampon pendant toute la durée du transfert. Il doit dans un premier temps être recouvert de NaOH à 75 mM pendant 20 min, afin d'hydrolyser partiellement les ARN et de faciliter leur transfert. Dans un second temps, le gel est recouvert pendant 2 périodes de 15 min de tampon (Tris/HCl 0,5 mM ; NaCl 1,5 M), puis pendant 10 min de tampon SSC 10X. Le transfert se poursuit pendant 2h30 à 3 h avec un apport régulier de tampon SSC 10X. Après le transfert, la membrane est traitée pendant 5 min aux UV, avant d'être pré-hybridée, puis hybridée avec les sondes d'intérêt, comme décrit dans la section précédente.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Partie I – La protéine Hit1

Des études menées au laboratoire ont permis de mettre à jour le rôle de la protéine Hit1 dans le processus de biogenèse des snoRNP à boîtes C/D (Rothé *et al.*, 2014b). Ce facteur est requis pour assurer la stabilité des snoARN *in vivo*. Des expériences d'immunosélection effectuées à partir d'un extrait cellulaire exprimant la protéine étiquetée Hit1-TAP ont montré l'association de cette protéine avec les précurseurs du snoARN U3. Son rôle fonctionnel dans la biogenèse des snoRNP C/D est lié à celui du facteur Rsa1p, puisque ces deux protéines sont fortement associées *in vivo* et Hit1p contrôle le taux de Rsa1p. L'interaction entre ces deux partenaires avait été initialement observée lors d'un crible d'interaction à grande échelle par test double-hybride (Ito *et al.*, 2001) et a ensuite été confirmée *in vitro* au laboratoire par une approche de co-purification de protéines co-exprimées chez *E. coli* (Rothé *et al.*, 2014b). De plus, par une approche de protéolyse ménagée, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes, R. Back, M. Quinternet, X. Manival et J.M. Saliou ont réussi à isoler un complexe entre les fragments Rsa1p₃₁₇₋₃₅₂ et Hit1p₇₀₋₁₆₄. Afin d'obtenir plus d'informations sur la protéine Hit1, nous avons cloné ses différents domaines et testé leur fonctionnalité *in vivo*. J'ai pris en charge ce travail lors de mon arrivée au laboratoire, sous l'encadrement de B. Rothé.

1 Les éléments importants pour la fonction de Hit1p

Sur la base de la conservation de séquences avec la protéine humaine TRIP3 (ZNHIT3), du profil de prédiction de structuration (**Figure 40A**) et des résultats de protéolyse ménagée, nous avons défini plusieurs fragments de la protéine Hit1 (**Figure 40B**) qui a été segmentée en trois domaines (Hit1p₁₋₄₃, Hit1p₄₃₋₆₉ et Hit1p₇₀₋₁₆₄). Diverses combinaisons de ces segments ont été clonés (Hit1p₁₋₄₃, Hit1p₁₋₆₉, Hit1p₄₄₋₁₆₄, Hit1p₇₀₋₁₆₄ et Hit1p₄₄₋₆₉) dans le vecteur d'expression chez *S. cerevisiae* p413TEF et leur capacité de restauration du défaut de croissance dans une souche $\Delta HIT1$, en particulier à 37°C, température pour laquelle le défaut de croissance est plus marqué, a été testé (**Figure 40C**).

1.1 Recherche du domaine minimal fonctionnel de Hit1p

En comparaison avec la protéine entière de 164 acides aminés, le fragment Hit1p₇₀₋₁₆₄ est suffisant pour rétablir une croissance normale des cellules à 30°C et à 37°C (Figure 1C, ligne 6). Ce fragment conservait l'interaction avec le fragment Rsa1p₃₁₇₋₃₅₂. De façon intéressante, ce résultat révèle donc une corrélation entre la fonctionnalité de la protéine et sa capacité à interagir avec Rsa1p. De façon plus surprenante, il indique que le domaine à doigt de zinc, qui fait l'objet d'une forte conservation, n'est pas requis pour la fonction de la protéine dans ces conditions.

Nous pouvons observer une légère réduction de croissance de la souche $\Delta HIT1$ lorsque sont exprimés des fragments de Hit1p ne portant pas le troisième domaine (i.e. 70-164), c.à.d. les fragments Hit1p₁₋₄₃ et Hit1p₁₋₆₉. L'effet est observable à 30°C et à 37°C. Cela pourrait être dû à un effet dominant négatif de ces fragments (**Figure 48C**, ligne 1 VS lignes 3 et 4).

1.1.1 Influence des domaines de Hit1p sur les taux de la protéine Rsa1

Dans l'absence de la protéine Hit1, le taux de protéine Rsa1 diminue (travail réalisé au laboratoire par B. Rothé). Nous avons voulu vérifier si la capacité de complémentation des divers fragments de Hit1p était corrélée avec un taux élevé de Rsa1p. Ne disposant pas d'anticorps spécifique dirigés contre la protéine Rsa1, il a été nécessaire de construire une souche invalidée pour l'ORF de Hit1p ($\Delta HIT1$) et dans laquelle la protéine Rsa1 était étiquetée.

1.1.1.1 Construction de la souche Rsa1p-TAP x $\Delta HIT1$

La souche Rsa1-TAP x $\Delta HIT1$ a été sélectionnée suite à l'obtention de diploïdes par le croisement entre une souche *RSA1-TAP (Mat a)* et la souche *BY4741 $\Delta HIT1$ (Mat α)* suivi de la dissection des tétrades obtenues après sporulation des diploïdes à l'issue d'une méiose comme détaillé dans la partie Matériel et Méthodes (**Figure 41**)

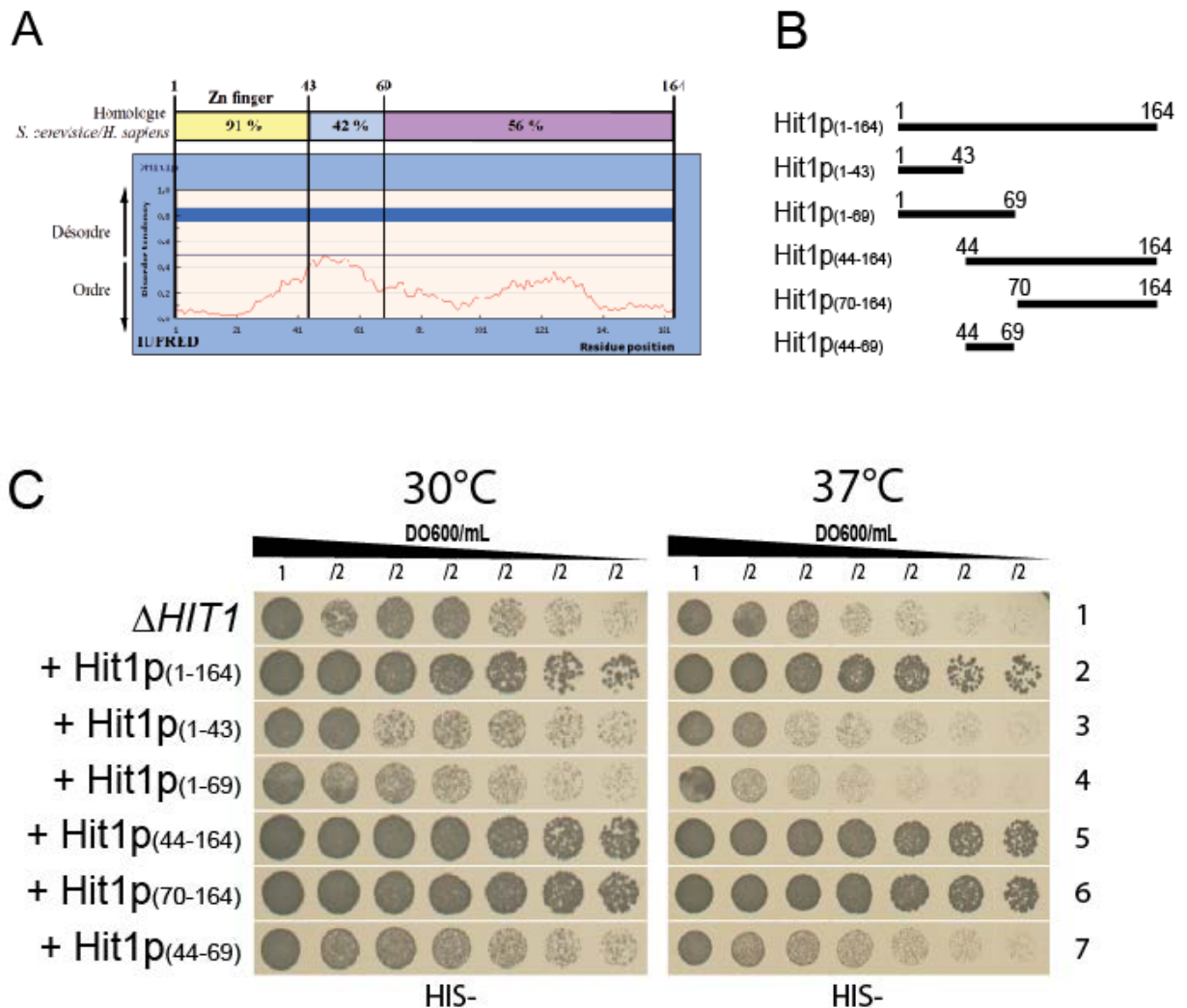


Figure 40 : Analyse fonctionnelle des domaines de la protéine Hit1. Le domaine C-terminal est le fragment minimal fonctionnel *in vivo*. (A) Représentation schématique de la protéine Hit1 et de ses différents domaines. Les limites des domaines ont été définies en prenant en compte l'homologie de séquence avec la protéine humaine ZNHIT3 et la prédiction de structuration IUPRED (Dosztanyi et al., 2005). Le pourcentage de similitude (i.e. % de résidus similaires et identiques) entre la protéine de levure et la protéine humaine est indiqué pour chaque fragment homologue. (B) Représentation schématique des fragments utilisés pour l'analyse fonctionnelle de la protéine Hit1. (C) Test de fonctionnalité des différents fragments de la protéine Hit1. Chaque fragment est exprimé à partir du vecteur d'expression p413TEF dans la souche de levure $\Delta HIT1$. La croissance des cellules a été évaluée sur milieu sélectif à 30 et 37°C, par dépôts de gouttes issues de dilutions en cascade (facteur: 1/2) à partir d'une suspension de cellules à 1 unité A_{600nm}/mL .

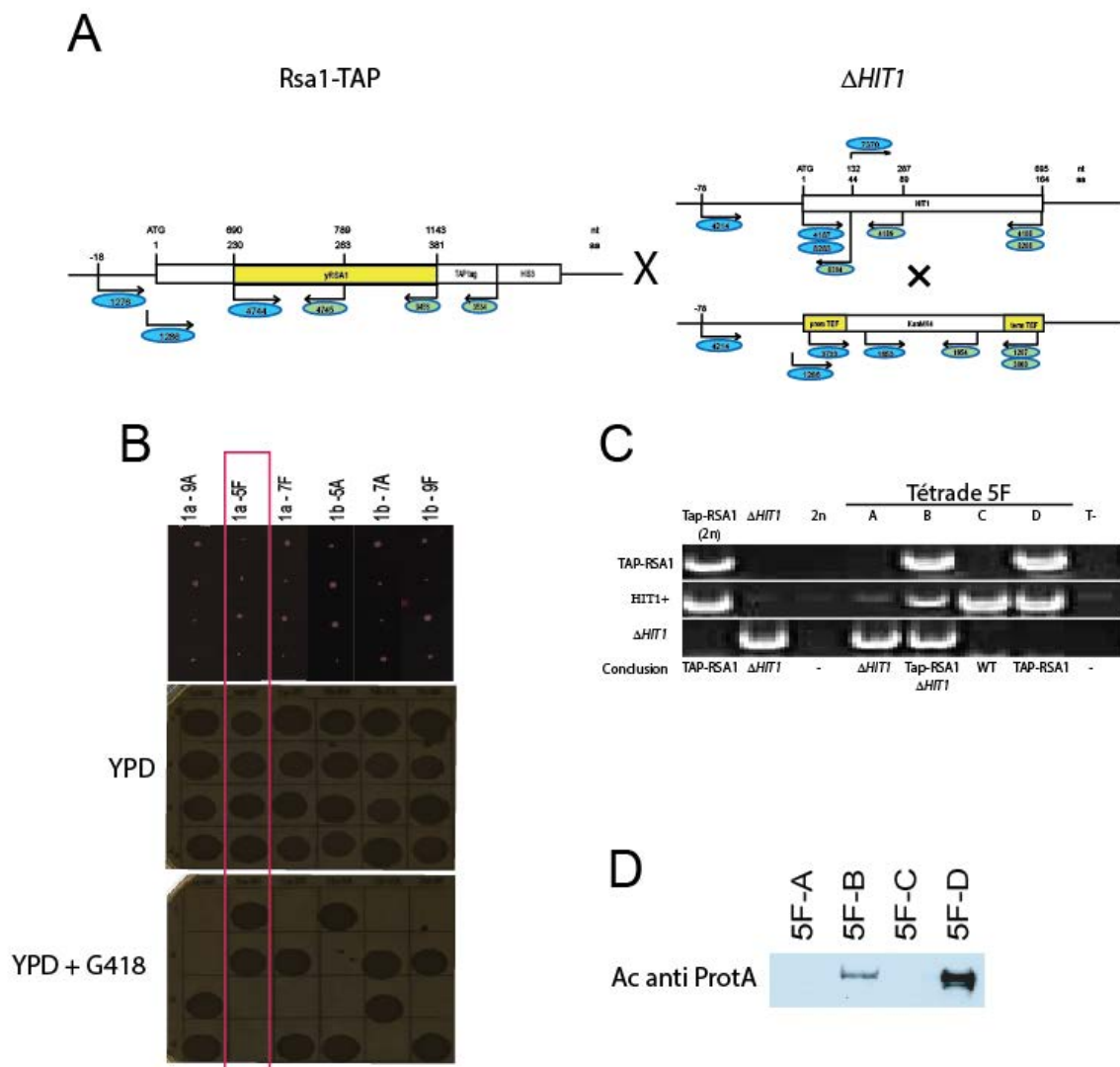


Figure 41 : Construction de la souche *RSA1*-TAP x $\Delta HIT1$. (A) Représentation schématique des loci *RSA1* et $\Delta HIT1$ dans les souches *RSA1*-TAP (*HIS3*) et $\Delta HIT1$ (kanMX4). Les numéros en ellipses bleues correspondent aux oligonucléotides en orientation directe, ceux en ellipses vertes aux oligonucléotides en orientation reverse. En haut de chaque schéma sont notés le numéro des acides aminés et des nucléotides correspondants. L'obtention de la souche $\Delta HIT1$ résulte d'une recombinaison homologue avec un fragment d'ADN portant l'unité transcriptionnelle bordée par le promoteur et le terminateur TEF, exprimant la kanamycine (B) Tétrade analysée après dissection. Analyse par test de croissance sur milieu YPD et milieu YPD contenant l'antibiotique généticine G418. Dans cet exemple la tétrade 5F a été retenue. (C) Vérification par PCR du génotype pour les spores de la tétrade 5F. (D) Vérification par western-blot de l'expression de la protéine Rsa1-TAP pour les quatre spores de la tétrade 5F. La spore 5b est celle correspondant au génotype attendu *RSA1*-TAP, $\Delta HIT1$.

Le vecteur p413TEF, utilisé pour la complémentation avec les fragments de Hit1p a comme marqueur d'auxotrophie le gène *HIS3*, ce qui n'est pas compatible avec les souches comportant une étiquette TAP disponibles au laboratoire qui sont également prototrophes pour l'histidine. Pour cette raison, nous avons utilisé le vecteur pACT2 (*LEU2*) pour l'expression des divers fragments de Hit1p dans la nouvelle souche créée (TAP-*RSA1xΔHIT1*). Ce vecteur conduit à l'expression d'une protéine de fusion avec le domaine Gal4 AD et a l'avantage d'apporter l'épitope HA dans la partie 5' des divers fragments de Hit1p testés.

Le taux de Rsa1p a été évalué en utilisant la technique de western-blot (**Figure 42**). Afin de visualiser la protéine Rsa1-TAP, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre l'étiquette TAP (α -PAP – peroxidase-antiperoxidase complex). Pour visualiser les différents fragments de Gal4-AD-HA-Hit1p nous avons utilisé des anticorps α -HA. Nous avons utilisé la protéine AspRS (aspartyl-tARN synthétase) comme référence interne. La souche *RSA1-TAP* a été utilisée comme référence du taux de protéine Rsa1.

Les résultats corroborent les données obtenues précédemment. On constate en effet : i) une diminution du taux de la protéine Rsa1 en absence de la protéine Hit1 dans la souche *RSA1-TAPxΔHIT1* (**Figure 42** piste 2), par rapport à une souche *RSA1-TAP* (**Figure 42** piste 1) ; ii) une restauration des taux de Rsa1p en présence de Hit1p (**Figure 42** piste 3). Ces analyses permettent également d'évaluer le taux de la protéine Rsa1 en présence des différents fragments de Hit1p testés (**Figure 42** pistes 4-8). On observe que les taux de Rsa1p sont restaurés à des niveaux comparables avec ceux obtenus dans la souche TAP-*RSA1*, mais seulement en présence des domaines de Hit1p qui complémentent le défaut de croissance dans la souche Δ *HIT1*, (**Figure 42** pistes 6 et 7) c'est-à-dire la région 70-164 de Hit1p. Les fragments non-fonctionnels en complémentation (Hit1p₁₋₄₃, Hit1p₁₋₆₉ et Hit1p₄₄₋₆₉) conduisent à des taux de TAP-Rsa1p comparable à ceux d'une souche invalidée pour le gène *HIT1* (**Figure 42** pistes 4, 5 et 8).

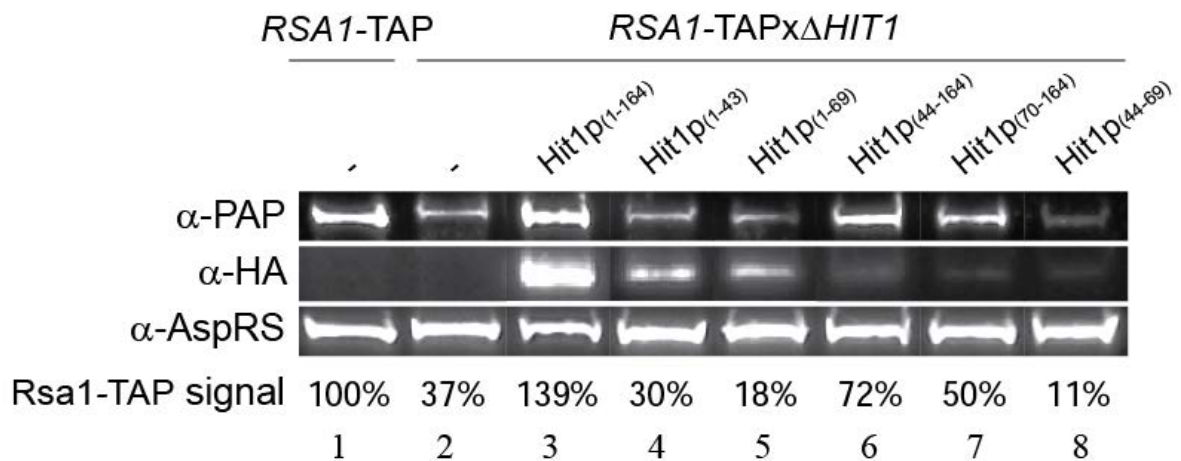


Figure 42: Evaluation par western-blot du taux de protéine Rsa1-TAP lorsque divers domaines de la protéine Hit1 sont exprimés dans une souche *RSA1-TAP x ΔHIT1*. La protéine Hit1 a été exprimée à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD) et détectée par des anticorps α-HA dirigés contre l'épitope HA fusionné à l'extrémité N-terminale de Hit1p. La protéine AspRS (aspartyl-tARN synthétase), révélée par les anticorps anti-AspRS (α-AspRS) a été utilisée comme témoin interne. L'intensité de la bande de la protéine Rsa1-TAP révélée par les anticorps α-PAP, a été normalisée par rapport au signal présent dans la souche *RSA1-TAP* (100%). Ces expériences ont été réalisées à partir de cellules cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance ($A_{600nm/mL} = 1$).

1.1.1.2 Etude fonctionnelle du domaine à doigt de zinc de Hit1p et Bcd1p

Vu l'homologie importante qui existe entre le doigt à zinc (ZnF) de Hit1p et le ZnF de Bcd1p nous avons souhaité tester l'effet produit par le remplacement du doigt de zinc de Hit1p par celui de Bcd1p (**Figure 43A**). Le résultat montre que la protéine chimère Hit1₍₄₄₋₁₆₄₎ZF_{Bcd1(1-43)} est parfaitement fonctionnelle car elle restaure une croissance normale des cellules à 30°C et à 37°C. (**Figure 43B**). Ce résultat est cohérent avec l'observation que le domaine ZF de Hit1p n'est pas essentiel pour la complémentation du défaut de croissance de la souche $\Delta HIT1$. Par contre, le niveau d'expression de la protéine Hit1₍₄₄₋₁₆₄₎ZF_{Bcd1(1-43)} est réduit par rapport à la protéine Hit1_{WT} (**Figure 43C**).

Un article décrivant ces résultats et présentant les données structurales du domaine en doigt de zinc de Bcd1p et Hit1p a été publié dans la revue *J. Mol. Biol.* *"Functional and Structural Insights of the Zinc-Finger HIT protein family members Involved in Box C/D snoRNP Biogenesis."* (co-1^{er} auteur), Bragantini, Tiotiu et al., *J. Mol. Biol.*, 2016, Jun 5;428(11):2488-506. doi: 10.1016/j.jmb.2016.04.028. Epub 2016 Apr 30. PMID: 27139642. (Bragantini et al., 2016) (**Article en Annexe 2**).

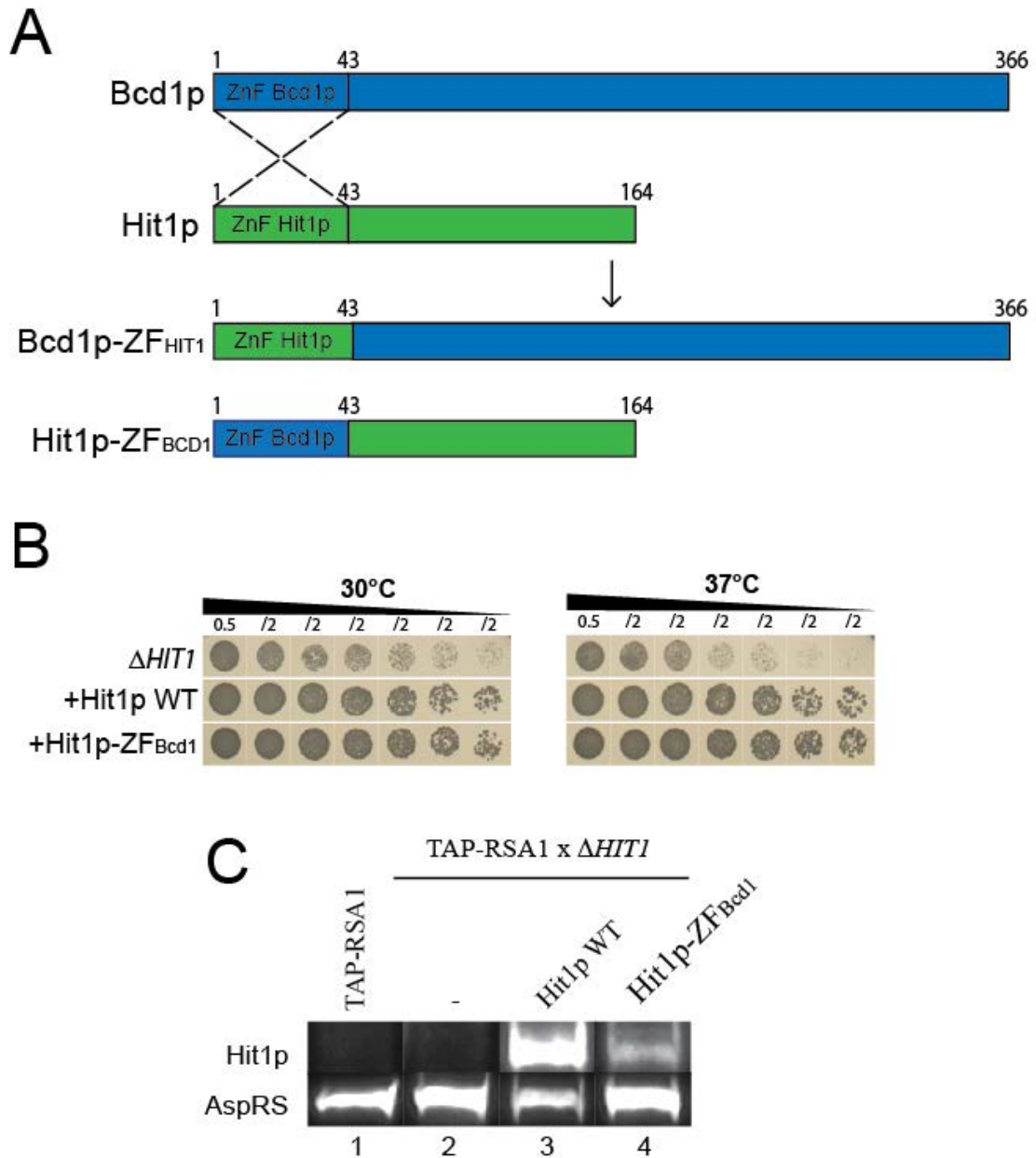


Figure 43 : Remplacement du domaine ZF de Hit1p₁₋₄₃ par le domaine ZF de Bcd1p₁₋₄₃. (A) Schéma représentant la construction des protéines chimères Hit1p_{(44-164)ZF_{Bcd1(1-43)}} et Bcd1p_{(44-366)ZF_{Hit1(1-43)}}. (B) Test de croissance sur milieu sélectif Leu⁻ de la souche $\Delta HIT1$ exprimant la protéine chimère Hit1p_{(44-164)ZF_{Bcd1(1-43)}}. La protéine chimère restaure la croissance de manière équivalente à la protéine Hit1 sauvage à 30°C et à 37°C. Les protéines ont été exprimées à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD). (C) Evaluation par western-blot du taux des protéines Hit1 et Hit1_{(44-164)ZF_{Bcd1(1-43)}} dans une souche *RSA1-TAP* x $\Delta HIT1$. Les anticorps α -HA et α -AspRS ont été utilisés pour révéler respectivement les protéines Hit1 et AspRS. La souche *RSA1-TAP* a été utilisée comme témoin négatif. Ces expériences ont été réalisées à partir de cellules cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance ($A_{600nm/mL} = 0,8$). Les dépôts en gouttes proviennent de dilutions en cascade (facteur $1/2$), la première étant ajustée à absorbance $A_{600nm/mL}$ de 0,5.

2 Identification les déterminants requis pour l'interaction entre Rsa1p et Hit1p

2.1 Conséquences d'une perte de l'interaction Rsa1p-Hit1p *in vivo* : effet sur la croissance des cellules et sur le taux de Rsa1p

La structure 3D d'un complexe Rsa1p₃₁₇₋₃₅₂-Hit1p₇₀₋₁₆₄ qui avait été isolé par protéolyse ménagée a été étudiée par spectroscopie RMN et une structure 3D de ce complexe a été établie par le groupe de X. Manival. Les acides aminés de Hit1p et de Rsa1p impliqués dans cette interaction (**Figure 44B**) ont été substitués par d'autres résidus (**Figure 45A**) et l'effet sur la croissance des cellules et sur le taux de Rsa1p *in vivo* a été analysé (**Figure 45** et **Figure 46**).

2.1.1 Effet des mutations de Hit1p

Les protéines Hit1 variantes L102R, L155E, T97K+K99L, L102R+L155E, K127D+V131K, K127D+V131K+L102R+L155E, Δ IT112G-N122G (délétion des acides aminés 113-121 et remplacement T112G et N122G) (**Figure 45A**) ont été exprimées dans une souche dont le gène *HIT1* est invalidé (souche Δ *HIT1*).

L'analyse par western-blot du taux d'expression de la protéine Rsa1 en présence des différents variants de la protéine Hit1 (**Figure 45C**) révèle un niveau d'expression différent qui est corrélé avec les résultats obtenus lors du test de croissance (**Figure 45B**). Il y a cependant deux exceptions dans le cas des variants Hit1p_(L102R) et Hit1p_(T97E, K99L) qui conduisent à un défaut de croissance alors que le niveau de la protéine Rsa1-TAP est comparable à celui d'une souche sauvage ou d'une souche complémentée avec la protéine de pleine taille Hit1₁₋₁₆₄.

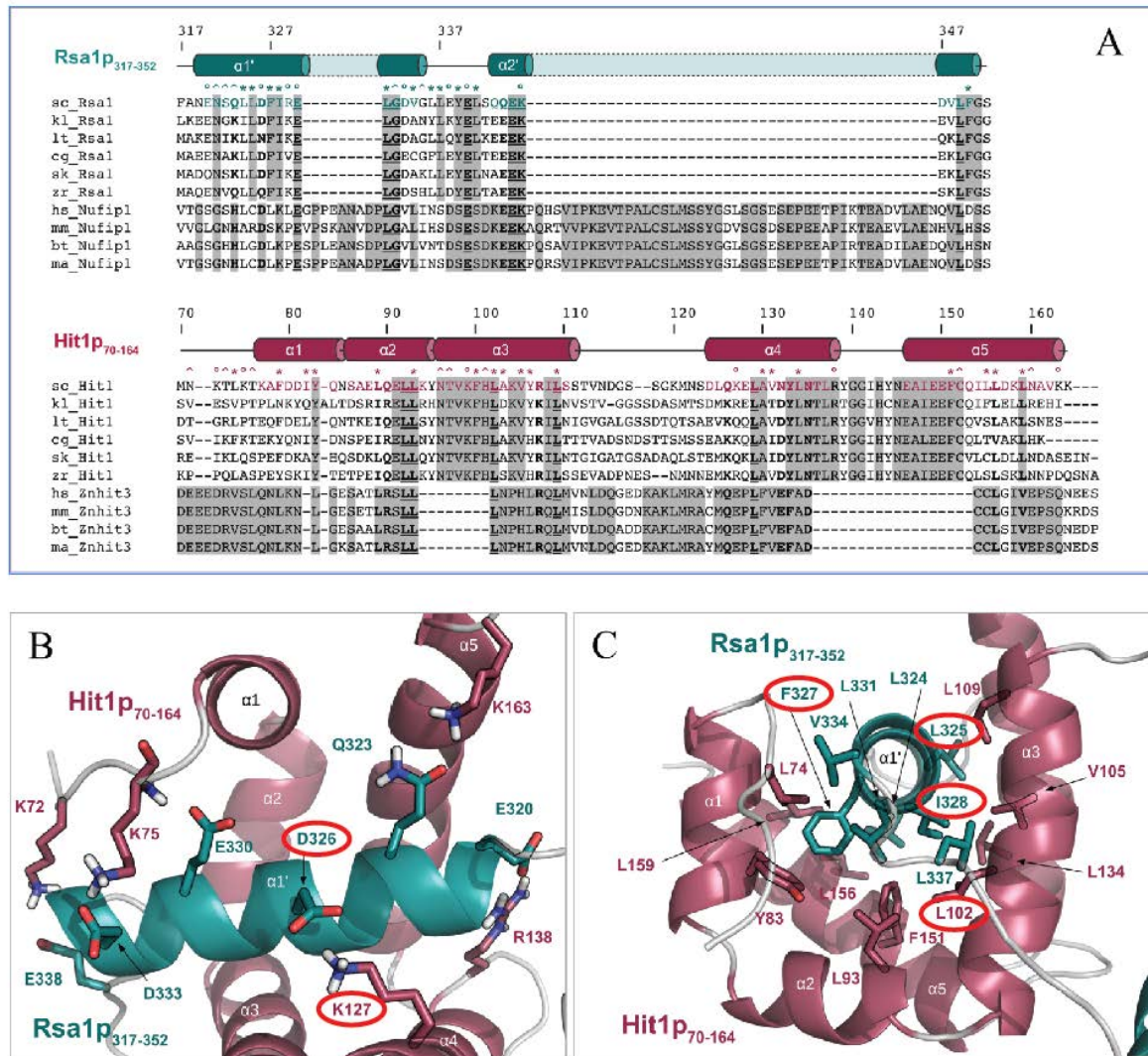


Figure 44: Structure de l'interface d'interaction entre Rsa1p₃₁₇₋₃₅₂ et Hit1p₇₀₋₁₆₄. (A) Alignement des séquences des protéines Rsa1/NUFIP1 et Hit1/ZNHIT3 présentes chez *Saccharomyces cerevisiae* (sc), *Kluyveromyces lactis* (kl), *Lachanea thermotolerans* (lt), *Candida glabrata* (cg), *Saccharomyces (Lachanea) kluyveri* (sk), *Zygosaccharomyces rouxii* (zr), *Homo sapiens* (hs), *Mus musculus* (mm), *Bos taurus* (bt) et *Macaca mulata* (ma). L'alignement a été réalisé avec CLUSTALW. Les résidus conservés entre les différentes espèces sont colorés en gris. Les résidus avec des propriétés similaires sont indiqués en gras. Les structures secondaires issues de la structure 3D sont montrées au-dessus de la séquence (cylindres pour les hélices et lignes pour les boucles). Les résidus localisés à l'interface d'interaction sont montrés par des cercles (charges), étoiles (hydrophobes) ou flèches (neutres). (B) et (C) Représentation des certaines interactions polaires et hydrophobes. Les acides aminés qui ont été substitués dans nos expériences sont entourés par des cercles rouges.

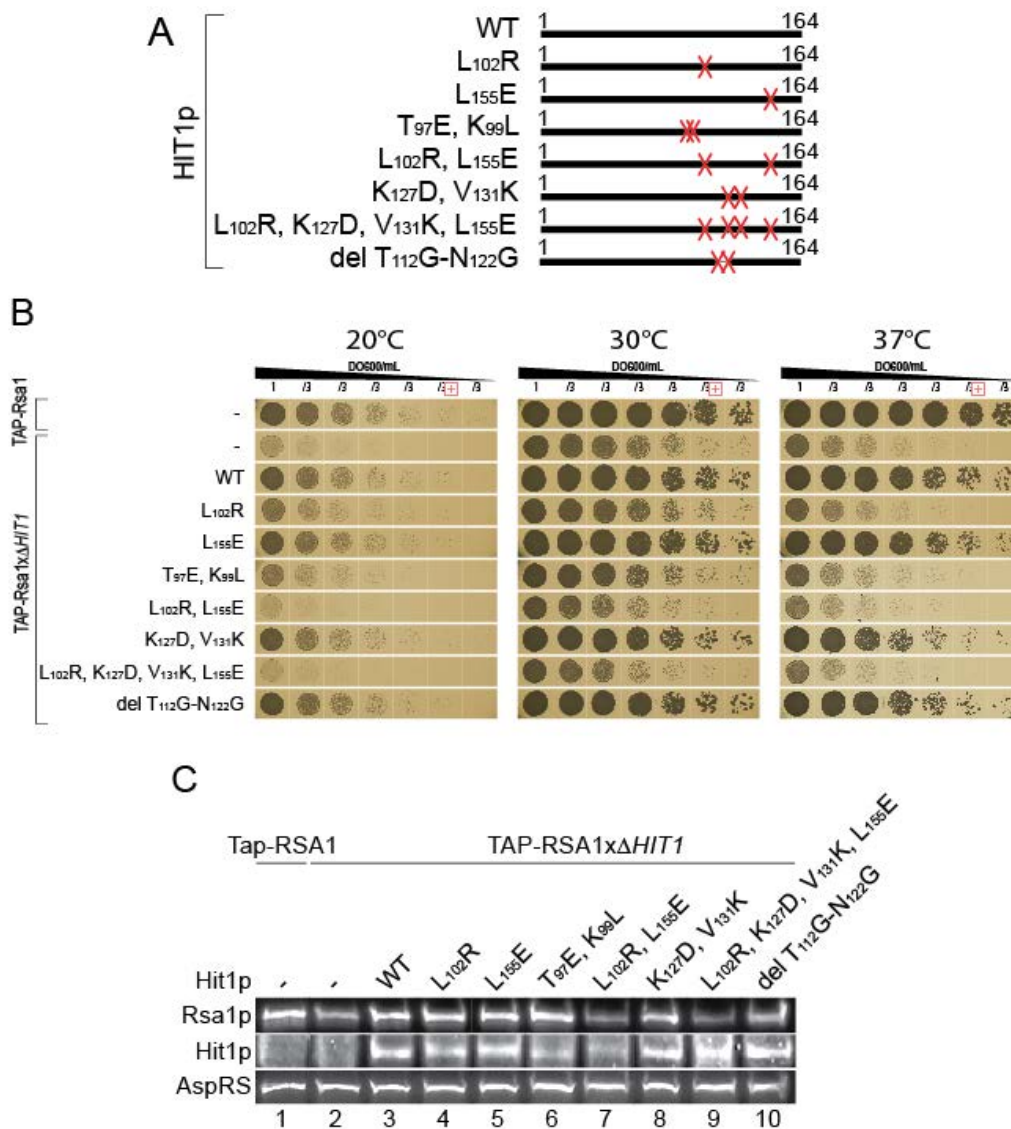


Figure 45 : Effet des mutations de Hit1p sur la croissance cellulaire et sur le taux de la protéine Rsa1. Mutations réalisées afin de déstabiliser l'interaction entre les protéines Rsa1 et Hit1. **(A)** Représentation schématique des mutations réalisées dans la protéine Hit1. Les croix rouges représentent la position relative des acides aminés dans la protéine. Le mutant delT112G-N122G contient une délétion des acides aminés 113-121 et le remplacement de la thréonine 112 en glycine, ainsi que le remplacement de l'asparagine 112 en glycine. **(B)** Test de complémentation des protéines variantes Hit1 dans une souche *RSA1-TAPxΔHIT1*. La croissance des cellules a été réalisée à 20°C, 30°C et 37°C sur milieu YPD. Les protéines ont été exprimées à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD). La souche *RSA1-TAP* a été utilisée comme témoin négatif. Ces expériences ont été réalisées à partir de cellules cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance ($A_{600nm/mL} = 0,8$). Les gouttes ont été réalisées à partir des dilutions en cascade (facteur $1/3$), la première étant ajustée à une densité optique $A_{600nm/mL}$ de 0,5. **(C)** Evaluation par western blot du taux de la protéine Rsa1 en présence de différentes mutations réalisées dans Hit1p. Les analyses ont été effectuées comme décrit dans la **Figure 43**.

2.1.2 Effet des mutations de Rsa1p

Pour compléter les résultats précédents, nous avons testé l'effet de mutations dans la protéine Rsa1. Une souche invalidée pour l'ORF de *RSA1* (Δ *RSA1*) a été transfectée par chacun des plasmides exprimant les variants de Rsa1p: L325G+D326A, F327E+I328D, L325G+D326A+F327E+I328D (**Figure 46A**).

Les résultats montrent que les mutations F327E+I328D conduisent à une croissance ralentie des cellules, probablement due à la diminution des taux de Rsa1p, causée par une perte d'interaction entre Rsa1p et Hit1p. (**Figure 46B**). Cependant les trois protéines variantes, incluant L325G+D326A qui permet la croissance, ne sont pas détectées par western blot contrairement à la protéine Rsa1 de type sauvage (**Figure 46C**). Il est difficile de conclure sans ambiguïté quand à un effet dû à la perte d'interaction entre Rsa1p et Hit1p ou à une perte de la stabilité de Rsa1p liée à ces mutations sans perturbation de l'interaction avec Hit1p.

Ces résultats font partie des données d'un article publié dans la revue *Nucleic Acids Research* "Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction." (auteur 5^{ème} position) Nucleic Acids Res. 2014;42(16):10731-47. doi: 10.1093/nar/gku612. Epub 2014 Aug 28. (Rothé et al., 2014b) (Article en Annexe 1).

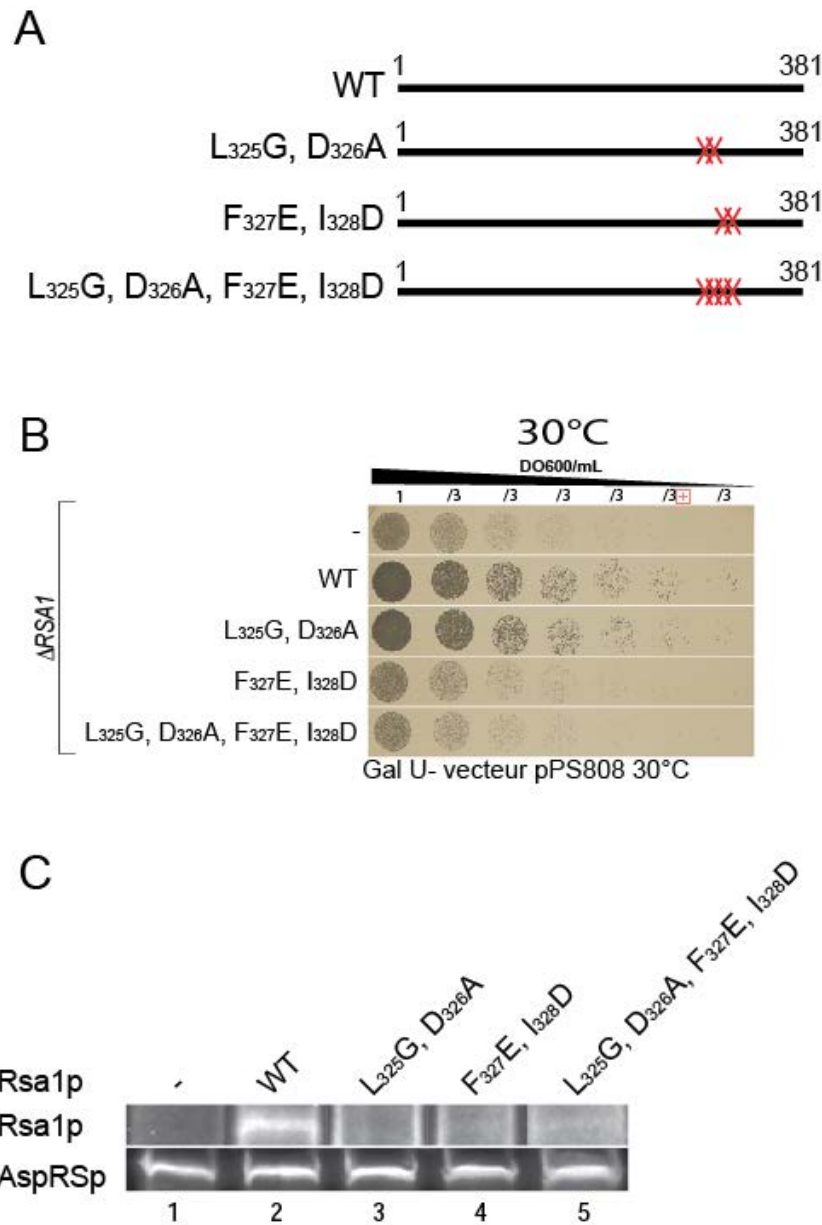


Figure 46 : Effet des mutations de Rsa1p sur la croissance cellulaire et sur le taux de la protéine Rsa1. (A) Représentation schématique des mutations réalisées dans la protéine Rsa1. Les croix rouges représentent la position relative des acides aminés dans la protéine. **(B)** Test de complémentation des protéines variantes Rsa1 dans une souche Δ RSA1. La croissance des cellules a été réalisée à 30°C sur milieu sélectif ura⁻. Les protéines ont été exprimées à partir du vecteur pPS808(URA3). La souche Δ RSA1 transformée avec le vecteur non recombinant a été utilisée comme témoin négatif. Ces expériences ont été réalisées à partir de cellules cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance ($A_{600nm/mL} = 0,8$) selon la même procédure qu'en Figure 45B. **(C)** Evaluation par western blot du taux de la protéine Rsa1 en présence de différentes mutations. La protéine Rsa1 est fusionnée avec la protéine GFP. Des anticorps anti-GFP ont été utilisés afin de détecter la protéine. La protéine AspRS a été utilisée comme témoin interne. Ces expériences ont été réalisées à partir de cellules cultivées en phase exponentielle de croissance ($A_{600nm/mL}=0.8$).

2.2 Recherche de nouveaux partenaires d'interaction de Hit1p en relation avec la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D

Actuellement, les seules protéines partenaires connues de Hit1p sont Rsa1p et Snu13p, dont le rôle dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D est bien établi. Comme nous l'avons décrit, ces trois partenaires forment un complexe hétérotrimérique qui participe aux étapes précoces de la biogenèse de ces particules (Rothé *et al.*, 2014b). Par contre, la chronologie des événements lors du mécanisme est encore mal connue.

Afin de tenter d'éclaircir le rôle de Hit1p dans l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D, ou plus généralement dans d'autres fonctions cellulaires, nous avons recherché de nouveaux partenaires protéiques. Nous avons ainsi testé l'interaction de Hit1p avec plusieurs protéines candidates par la technique de double hybride. Les protéines testées ont été choisies en se basant sur des données de la littérature, comme des bases des données disponibles rassemblant des données d'analyses protéomiques à haut débit. Nous avons retrouvé un nouveau partenaire potentiel, la protéine Ahc2. Cette protéine appartient au complexe ADA (histone acetyltransferase complex). Elle interagit en double hybride avec Hit1p avec une force d'interaction plus faible par comparaison avec l'interaction existante entre Hit1p et Rsa1p. En effet, l'interaction n'est plus visible à partir des concentrations de 3-AT de 5 mM après 48 h de croissance (**Figure 47A**) et à partir des concentrations de 3-AT de 20 mM après 96 h de croissance à 30°C (**Figure 47B**). Les analyses n'ont pas été plus poussées lors de ce travail de thèse. D'autres techniques pourront être mises en œuvre confirmer ou infirmer l'existence de cette interaction *in vitro* et *in vivo*. Si une interaction directe de Hit1p avec Ahc2p était confirmée, son rôle dans la biogenèse des snoRNP pourra être étudié en détail.

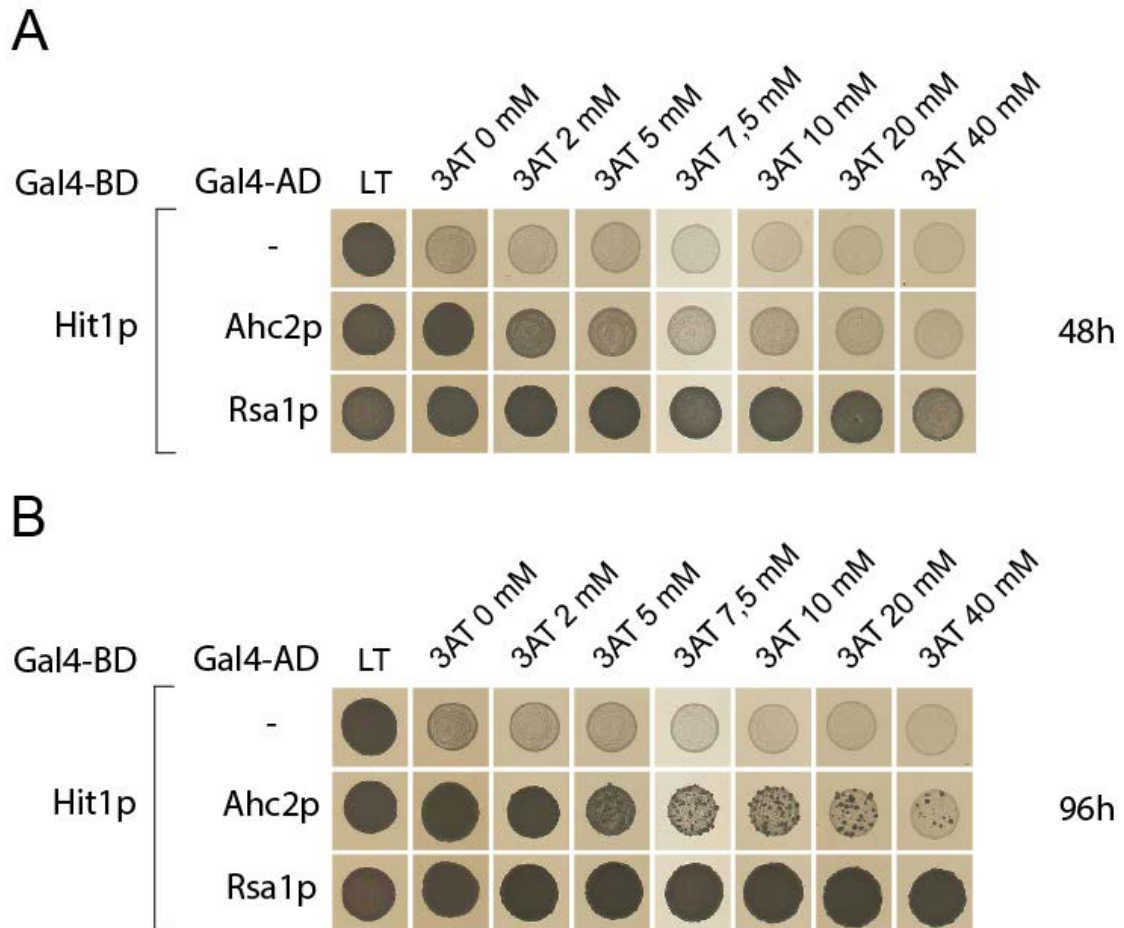


Figure 47 : Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* la protéine Ahc2 interagit avec la protéine Hit1 dans un test en double hybride. Test effectué entre la protéine Hit1 fusionnée au domaine Gal4-BD (pGBKT7) et la protéine Ahc2 fusionnée au domaine Gal4-AD (pACT2). Les tests d'interaction ont été réalisés par croisement des souches CG1945 (pACT2) et Y187 (pGBKT7), et étalement sur milieu sélectif sans histidine, en présence d'une gamme de concentration croissante en 3-aminotriazol. **(A)** Résultat obtenu après 48h de croissance à 30°C **(B)** Résultat obtenu après 96h de croissance à 30°C.

Partie II – La protéine Bcd1

La protéine Bcd1 se situe au centre des travaux menés pendant la thèse. Comme décrit dans la partie « Introduction », elle a été identifiée comme un facteur dont la réduction du taux d'expression conduit à une baisse spécifique du taux des snoARN à boîtes C/D (**Chapitre 3.3.1.4.1, Figure 26, page 116**) (Hiley *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2003).

Bcd1p est essentielle à la croissance cellulaire. L'épuisement de la quantité de cette protéine est possible dans la souche de *S. cerevisiae* *tetO₇::BCD1* où l'ORF *BCD1* est sous le control d'un promoteur régulé par la fixation de la protéine tTA sur les répétitions de l'opérateur *tetO*. Les cellules n'expriment plus Bcd1p quand elles sont cultivées en milieu contenant de la doxycycline (Peng *et al.*, 2003).

1 Les éléments importants pour la fonctionnalité de Bcd1p

Afin de mieux comprendre l'organisation de Bcd1p, nous avons commencé par cloner différents fragments de la protéine et évalué leur contribution à la croissance des cellules.

Dans un premier temps, nous avons suivi la même stratégie que celle décrite pour l'étude de Hit1p. Ainsi, des fragments de Bcd1p ont été définis en se basant sur l'homologie de séquences avec l'homologue humain, la protéine ZNHIT6, ainsi qu'au profil de prédiction de structuration déterminé par le software IUPRED (**Figure 48A**) (Dosztanyi *et al.*, 2005). Pour le choix des bornes afin de séparer la protéine en plusieurs fragments, la structure secondaire prédite de la protéine a été aussi prise en compte, afin d'éviter la fragmentation des éléments structurellement importants dans le repliement des protéines tronquées (données non montrées).

L'alignement de séquences montre que seulement la partie C-terminale (acides aminés 216-470) de la protéine humaine est homologue à la protéine de levure. L'homologie la plus importante est retrouvée avec la partie N-terminale de Bcd1p contenant un double doigt de zinc (acides aminés 1-45: 40%) mais elle est importante également dans les régions Bcd1p₆₂₋₁₆₈ (22%) et Bcd1p₂₆₀₋₃₀₅ (31%). Nous avons défini 11 fragments représentant diverses combinaisons entre les bornes N-terminale et C-terminale définies précédemment (**Figure 48B**). Ces fragments ont été clonés dans le vecteur d'expression p413TEF et les vecteurs recombinants ont été utilisés pour transfecter des cellules de la souche *tetO₇::BCD1* (Hiley *et al.*, 2005) (Peng *et al.*, 2003). Les tests de croissance ont été réalisés en présence et en absence de doxycycline (**Figure 50**).

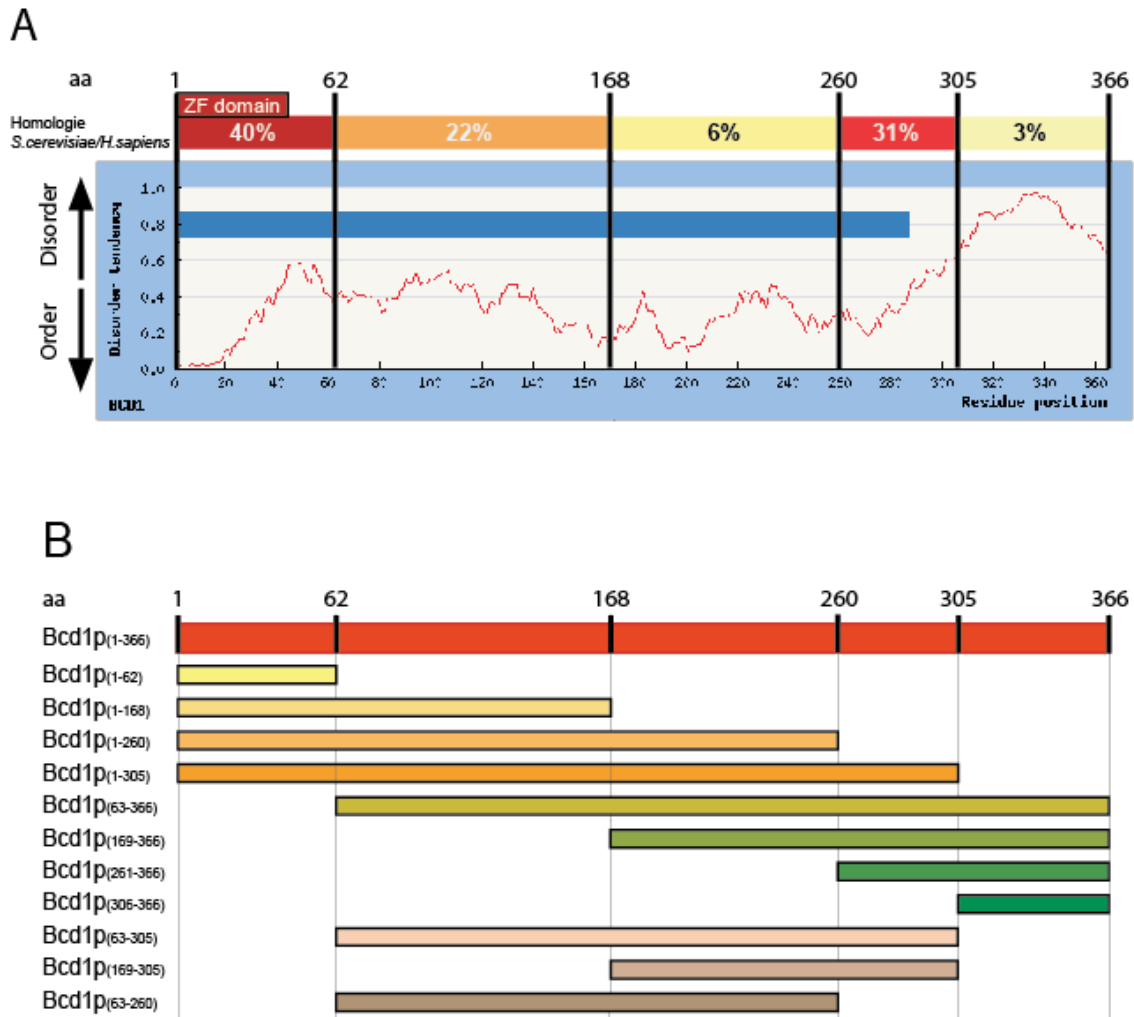


Figure 48 : Représentation schématique des différents domaines de Bcd1p. (A) Les bornes des différents domaines ont été définies sur la base de l'homologie de séquence avec la région (216- 470) de la protéine humaine ZNHIT6 (l'homologue de Bcd1p) et du profil de prédiction de structuration IUPRED (Dosztanyi *et al.*, 2005). Le % de similitude (i.e. % de résidus similaires et identiques) entre la protéine de levure et la protéine humaine est indiqué pour chaque fragment homologue. La position du domaine contenant le double doigt de zinc est indiquée. **(B)** Représentation schématique des divers fragments testés afin de déterminer le domaine minimal fonctionnel de Bcd1p. La position des acides aminés situés aux bornes des fragments est indiquée au-dessus de la protéine entière.

1.1 Recherche du domaine minimal fonctionnel

Dans les levures *tetO₇::BCD1*, l'expression du gène codant Bcd1p est sous le contrôle d'un promoteur *TetOff*, qui est répressible en présence de tétracycline/doxycycline (Hiley *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2003). Afin de tester la fonctionnalité du système, nous avons réalisé un test de croissance sur boîte de Pétri. Les cellules ont été cultivées en milieu liquide en présence ou absence de doxycycline pendant 7 h ou 30 h, puis des gouttes issues de différentes dilutions des cultures ont été déposées sur milieu YPD. La croissance a été évaluée après 48 h de d'incubation à 30°C. Le résultat montre qu'en présence de doxycycline la croissance est abolie dans les deux conditions de temps testées (**Figure 49**).

La capacité des fragments à compléter l'épuisement de la quantité de protéine Bcd1 endogène, a été évaluée par un test de croissance du même type, en gouttes sur boîte de Pétri (**Figure 50B**). Dans les conditions utilisées, seules les souches exprimant les fragments Bcd1p₁₋₁₆₈, Bcd1p₁₋₂₆₀ et Bcd1p₁₋₃₀₅ ont permis la croissance des cellules. De plus, ces fragments restaurent la croissance à un niveau comparable à celui d'une souche où Bcd1p de pleine taille est exprimée soit à partir du génome ou à partir du vecteur d'expression p413TEF.

Ces résultats montrent que, parmi les fragments testés, le fragment N-terminal Bcd1p₁₋₁₆₈, qui contient le domaine en doigt de zinc (ZnF) (acides aminés 1 à 45) représente le domaine minimal fonctionnel de la protéine. Les autres fragments qui ne contiennent pas ce domaine (Bcd1p₆₃₋₃₆₆, Bcd1p₁₆₉₋₃₆₆, Bcd1p₂₆₀₋₃₆₆, Bcd1p₃₀₅₋₃₆₆, Bcd1p₂₆₀₋₃₀₅, Bcd1p₁₆₉₋₃₀₅) ne sont pas fonctionnels, ce qui indique un possible rôle du domaine ZnF dans la fonctionnalité de la protéine. Cependant étant donné que le fragment Bcd1p₁₋₆₂, qui est le fragment N-terminal le plus court testé n'est pas fonctionnel, le doigt de zinc n'est pas suffisant à lui seul pour assurer la fonctionnalité de Bcd1p et d'autres éléments sont requis, qui se trouvent dans le fragment 63-168.

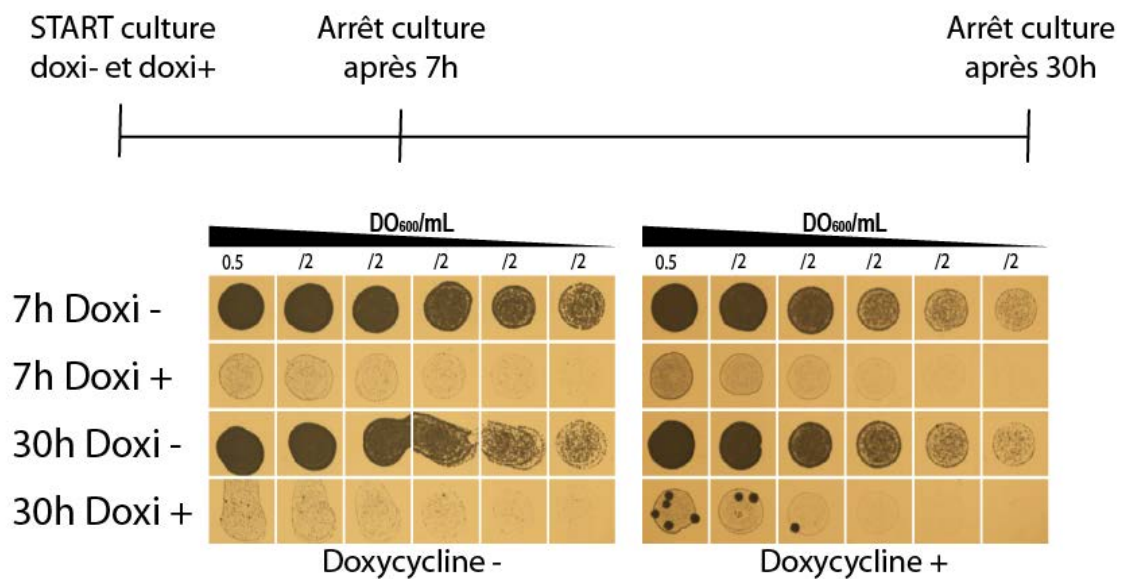


Figure 49 : La croissance d'une souche *tetO₇::BCD1* est abolie en présence de doxycycline. Les cellules ont été cultivées en milieu liquide en présence (50 µg/mL) ou absence de doxycycline pendant 7 h ou 30 h. Des gouttes d'une suspension de cellules à une absorbance de départ de 0,5 A_{600nm}/mL puis issues de dilutions en cascade (facteur 1/2) ont été déposées sur milieu YPD. La croissance a été évaluée après 48 h d'incubation à 30°C. « Doxycycline+ » et « Doxycycline- » montre la présence ou l'absence de la doxycycline dans le milieu de culture.

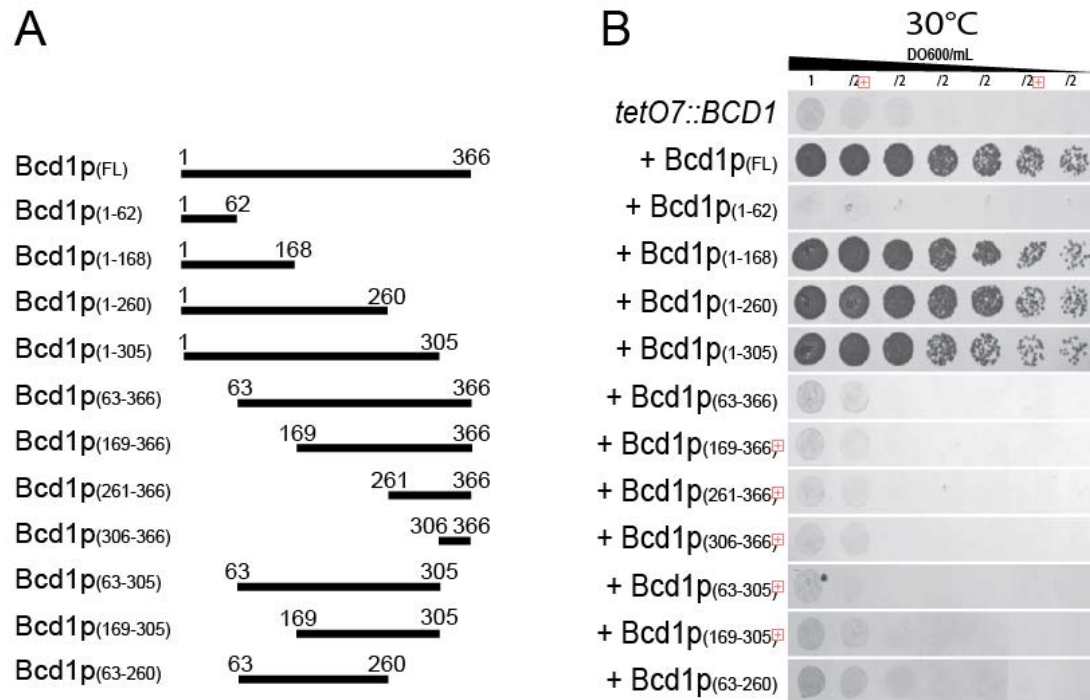


Figure 50 : Le fragment Bcd1p₁₋₁₆₈ est fonctionnel chez *S. cerevisiae*. (A) Représentation schématique des fragments utilisés pour la recherche du domaine minimal fonctionnel de Bcd1p. **(B)** Test de complémentation de la souche *tetO₇::BCD1* avec les divers domaines de Bcd1p. Chaque fragment est exprimé à partir du vecteur d'expression p413 (*HIS3*) dans la souche de levure *tetO₇::BCD1* (R1158), permettant de réprimer l'expression de Bcd1p en présence de doxycycline (Peng *et al.*, 2003). La croissance des cellules a été évaluée à 30°C, sur milieu sélectif (*his*⁻) et en présence de 50 µg/mL de doxycycline, par dilution en cascade (facteur : 1/2) à partir d'une suspension de cellules à 0,5 unités *A*_{600nm}/mL. Avant étalement, les cellules ont été cultivées à 30°C, pendant 2 jours, en milieu liquide sélectif et en présence de 50 µg/mL de doxycycline. La souche transformée par le vecteur p413TEF non recombinant a été utilisée comme témoin négatif de croissance (*tetO₇::BCD1*).

De manière intéressante, un alignement entre les séquences primaires de Bcd1p pleine taille (Bcd1p_{FL}) et ZNHIT6p₂₁₆₋₄₇₀ conduit à identifier une seule portion d'homologie (29% d'identité et 42% de résidus positifs) entre les séquences du fragment Bcd1p₅₋₁₆₄ et le fragment ZNHIT6p₂₂₀₋₃₄₉ (**Figure 51**). Ce domaine est donc le plus conservé entre la protéine humaine et celle de levure, ce qui soutient l'hypothèse d'un rôle fonctionnel important.

1.2 Le fragment Bcd1p₍₁₋₉₆₎

Dans un deuxième temps, afin d'affiner les limites du domaine minimal fonctionnel nous avons restreint les limites du fragment Bcd1p₁₋₁₆₈: deux nouvelles bornes ont été définies, au niveau des acides aminés I115 (Bcd1p₁₋₁₁₅) et R96 (Bcd1p₁₋₉₆), en prenant en compte la structure secondaire prédite de la protéine.

Le test de complémentation montre que les deux nouveaux fragments testés sont fonctionnels dans la souche *tetO₇::BCD1* à 30°C (**Figure 52 A et B**) et révèle que le fragment Bcd1p₍₁₋₉₆₎ est suffisant pour la fonction essentielle de Bcd1p dans les conditions de croissance testées. Etant donné que le fragment Bcd1p₁₋₆₂ n'est pas fonctionnel (**Figure 50B**), une conclusion qui pouvait être formulée à ce stade de l'étude, était que des éléments importants pour la fonction de Bcd1p se situent dans la région s'étendant entre les acides aminés 63 à 96.

Afin d'évaluer de manière plus fine la vitesse de croissance des cellules exprimant les deux nouveaux fragments, un test de croissance en milieu liquide a été réalisé. On observe que pendant les 29 premières heures de croissance les trois cultures suivent le même profil de croissance (Bcd1p_{FL}, Bcd1p₍₁₋₉₆₎ et Bcd1p₍₁₋₁₁₅₎) par rapport à une souche dans laquelle l'absence de Bcd1p endogène n'est pas complétement (**Figure 53**).

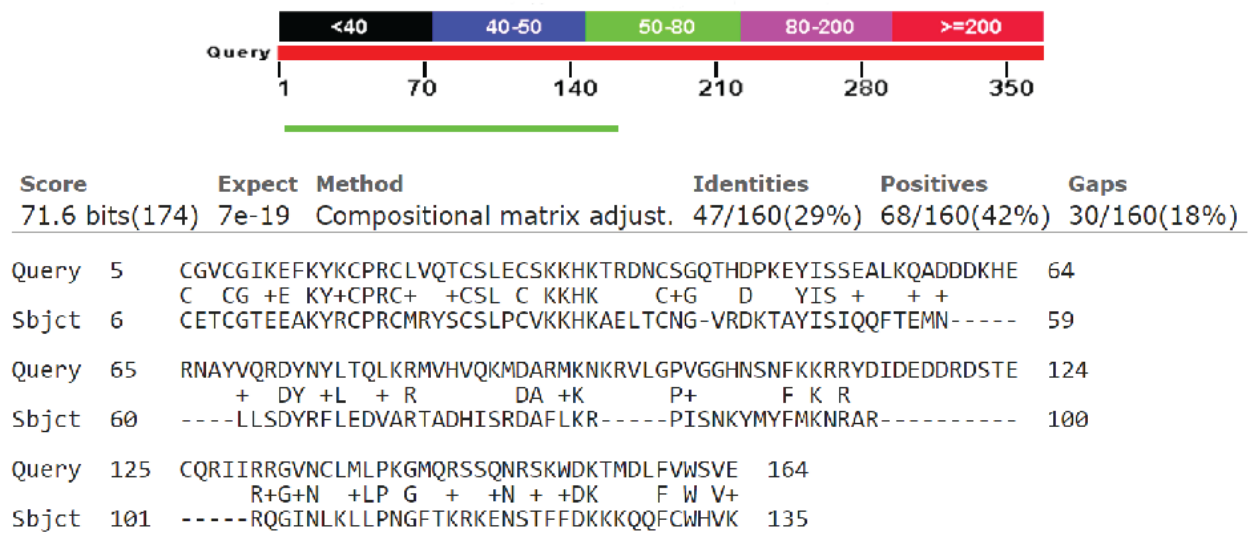


Figure 51 : Alignement de séquences entre Bcd1p₁₋₃₆₆ et ZNHIT6p₂₂₀₋₄₇₀. L'alignement a été réalisé avec NCBI Blast Proteins (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); « Query » représente la séquence en acides aminés de la protéine Bcd1 de *S. cerevisiae* obtenue de Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) « Sbjct » représente la séquence en acides aminés de la protéine ZNHIT6₂₁₆₋₄₇₀ obtenue de l'Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>). L'alignement a été réalisé en utilisant les paramètres par défaut du logiciel.

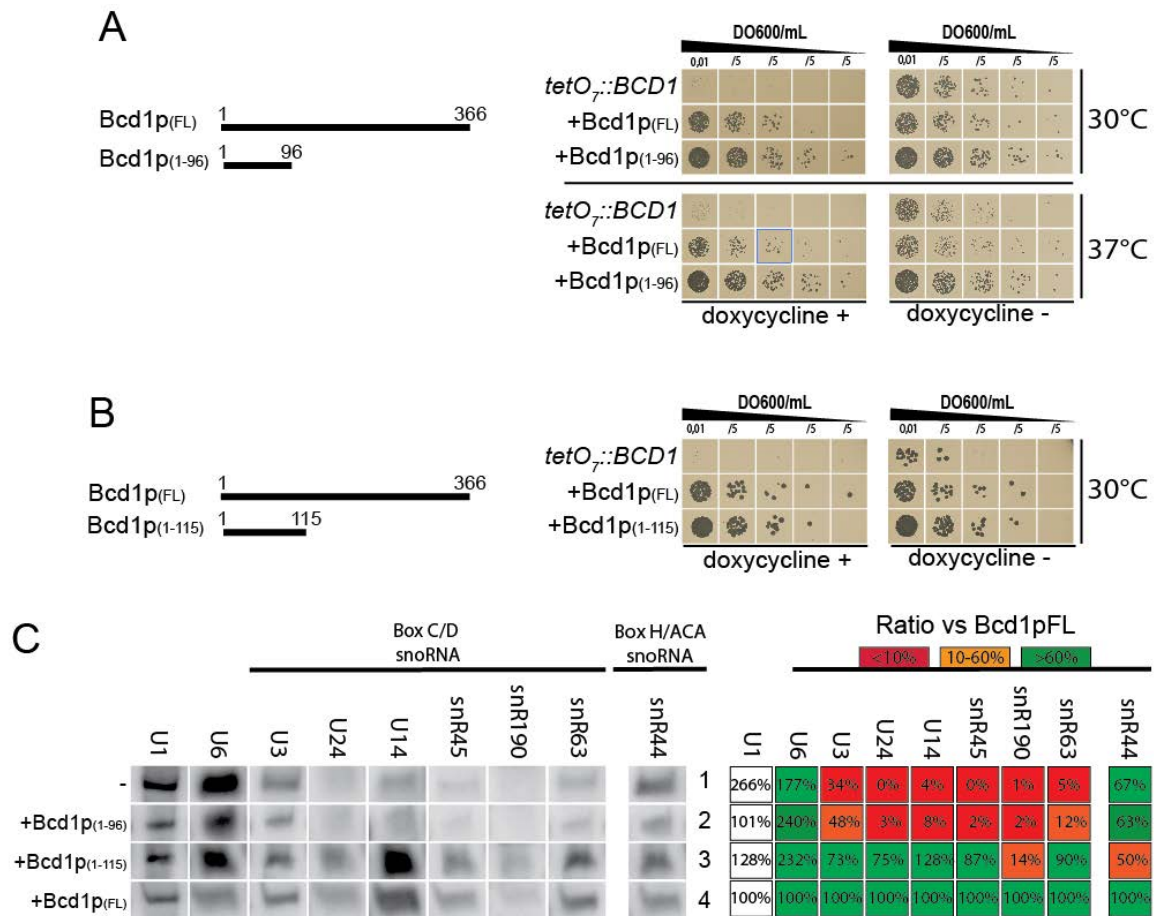


Figure 52 : Le fragment Bcd1p₁₋₉₆ est le fragment minimal fonctionnel de Bcd1p chez *S. cerevisiae*. Test de complémentation de la souche *tetO₇::BCD1* avec les fragments Bcd1p₁₋₉₆ et Bcd1p₁₋₁₁₅. Les fragments ont été exprimés à partir du vecteur d'expression p413-HA-TEF(*HIS3*) dans la souche de levure *tetO₇::BCD1* (R1158), permettant de réprimer l'expression de Bcd1p en présence de doxycycline (Peng *et al.*, 2003). La croissance des cellules a été évaluée à 30°C, sur milieu sélectif (*his*⁻) et en présence de 50 µg/mL de doxycycline, par dilution en cascade (facteur : 1/5) à partir d'une suspension de cellules à 0,01 unités A_{600nm}/mL. Les cellules ont été prélevées directement à partir des boîtes de Pétri et dispersées dans 1 mL d'eau stérile avant l'étalement. La souche transformée par le vecteur p413-HA non recombinant a été utilisée comme témoin négatif de croissance (*tetO₇::BCD1*). La souche exprimant Bcd1p de pleine taille (Bcd1p_{FL}) a été utilisée comme référence de croissance normale. Une représentation schématique des domaines testés est montrée à gauche. Les panneaux situés à droite montrent la croissance en absence de doxycycline. **(A)** Pour le fragment Bcd1p₁₋₉₆, le test a été réalisé à 30°C et 37°C. **(B)** Pour le fragment Bcd1p₁₋₁₁₅, le test a été réalisé à 30°C. **(C)** Analyse par Northern-blot du taux des snoARN à boîtes C/D dans la souche de levure *tetO₇::BCD1* en présence des fragments Bcd1p₍₁₋₁₁₅₎ et Bcd1p₍₁₋₉₆₎ de Bcd1p (et en présence de doxycycline). L'effet lié à la présence des divers fragments de Bcd1p sur les taux de snoARN a été comparé à l'effet observé après l'appauvrissement de Bcd1p dans la souche *tetO₇::BCD1*. Le snARN U1 a été utilisé comme témoin interne. La figure a été créée par sélection des bandes obtenues à la même exposition de la membrane de Northern blot. La radioactivité de chaque bande a été quantifiée. Le pourcentage de chaque snoRNA dans les différents extraits des ARN totaux a été calculé par la radioactivité dans chaque bande par rapport à la radioactivité de la bande correspondant au snRNA U1. Le pourcentage de chaque ARN relative par rapport à la souche sauvage est présenté à droite.

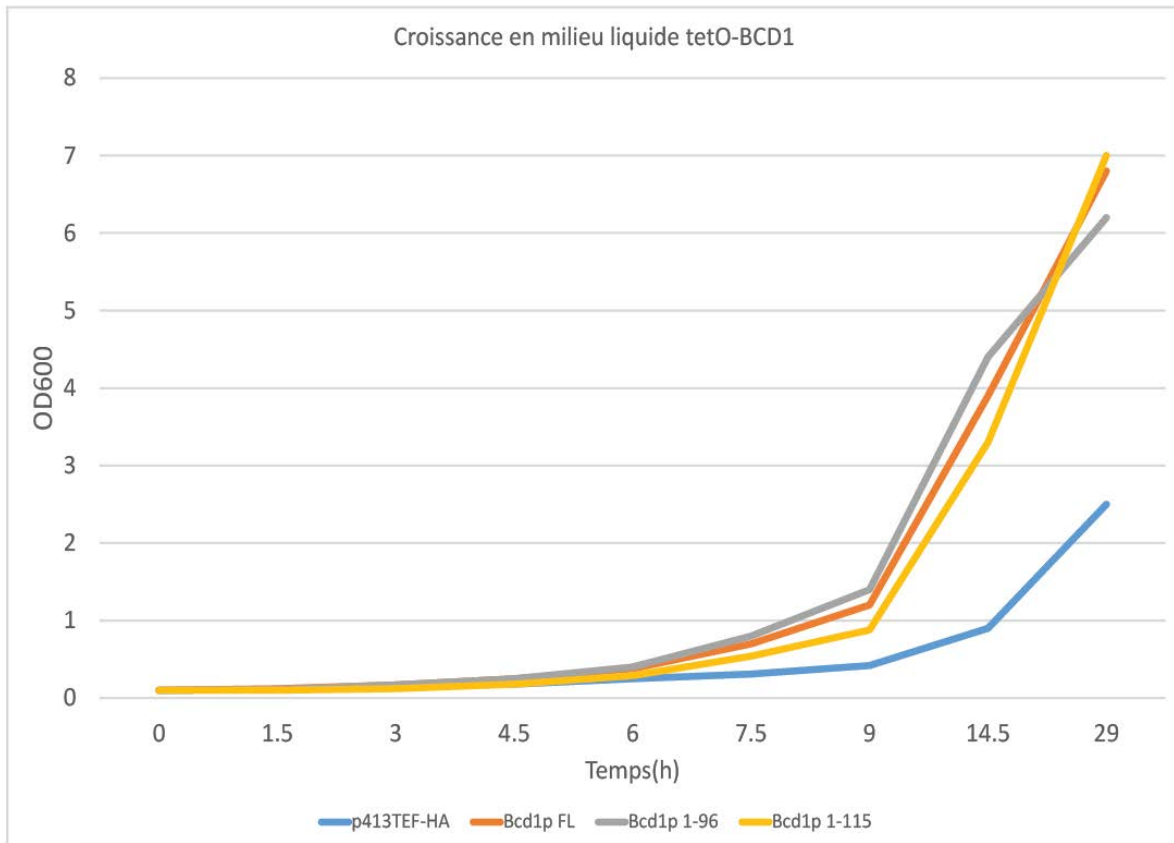


Figure 53 : Test de croissance en milieu liquide à 30°C pour la souche *tetO₇::BCD1* complétée avec une protéine Bcd1p_{FL} et les deux nouveaux variants, Bcd1p₍₁₋₉₆₎ et Bcd1p₍₁₋₁₁₅₎, par rapport à une souche exprimant le vecteur vide p413TEF-HA.

A partir de ces données, nous avons effectué une recherche parmi les protéines de levure ou humaines présentant le(s) même(s) motif(s) que celui(ceux) retrouvé(s) dans les fragments

Bcd1p₍₆₃₋₉₆₎ (63-HEARNYVQRDYNLTQLKRMVHVQKMDARMKNKR-96)

ZNHIT6₍₂₇₂₋₃₀₈₎ (272-MNLLSDYRFLEDVARTADHISRDAFLKRPISNKYMYF-308).

Un alignement des séquences entre la protéine Bcd1 et son homologue humain ZNHIT6p montre une conservation relative entre les fragments Bcd1p₆₃₋₉₆ et ZNHIT6p₂₇₂₋₃₀₈ (**Figure 54A**).

A noter que le fragment ZNHIT6₂₇₇₋₃₀₅ est codé par un seul exon, ce qui pouvait suggérer un module fonctionnel distinct, ayant gardé son rôle au cours de l'évolution. (**Figure 54B**).

1.3 Le domaine Bcd1p₍₁₋₄₅₎

Le domaine 1-45, organisé en un double doigt de zinc, est important pour la fonction de Bcd1p, car en son absence le fragment 46-168 ne restaure pas le défaut de croissance à 30°C ou à 37°C (**Figure 55**). Par contre, la protéine Bcd1 tronquée du doigt de zinc (Bcd1p₄₆₋₃₆₆) est fonctionnelle à 30°C, mais pas à 37°C. Cela suggère: **(i)** que le doigt de zinc est important pour la fonctionnalité de la protéine en conditions de stress comme une croissance à température élevée mais **(ii)** que des éléments importants pour la fonctionnalité de Bcd1p sont également présents dans la région 46-62, étant donné que le fragment Bcd1p₁₋₆₂ n'est pas fonctionnel à 30°C (**Figure 50**).

A

yBcd1p(1-366)	MAVLCGVCGIKEFKYKCPRLVQTCSECSKKHKTRDNCSSGQTHDPKEYISSEALKQADD	60
hZNHIT6(216-470)	AMSRCECTCGTEEAKYRCPRCMRYSCSLPCVKKHKAELTCNGVRDK-TAYISIQQFTE---	56
	* *	
yBcd1p(1-366)	DKHERNAYVQRDYNLTQLKRMVHVQKMDARMKNKRVLGPVGGHNSNFKKRRYDIDEDDR	120
hZNHIT6(216-470)	-----MNLSDYRFLLEDVARTADHISRDAF-----LKRPISNKYMYF-----	93
	: * * * * * : : * : : : * * : * * : : * * : : *	
yBcd1p(1-366)	DSTECQRIIRRGVNCMLPKGMQRSSQNRSKWDKTMDLFVWSVEWILCPMQEKGEKKELF	180
hZNHIT6(216-470)	---MKNRARRQGINKLLPNGFTKRKENSTFFDKKKQFCWHVKLQFPQSQAEYIEKRVF	150
	: * * * * * : * * * * * : * * : * * : * * * * * : * * : * * :	
yBcd1p(1-366)	KHVSHRIKETDFLVQGMGKNVQKCCFEYRLAGTSSCIEGEDGSETKEERTQILQKSGLK	240
hZNHIT6(216-470)	DDKTINEILKPYIDPEKSDPVIRQLKA-----YIRSQTGVQIL-MKIEYMQQNLVR	201
	-- : * : : : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *	
yBcd1p(1-366)	FYTKTFPYNTTHIMDSKKLVELAIHEKCIPELLKNTTVIEFPTIFVAMTEADLPEGYEVL	300
hZNHIT6(216-470)	YY-ELDPY-----KSLDNLNRNKVIIIEYPTLHVVLKGSNN--DMKVL	240
	: * : * * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * :	
yBcd1p(1-366)	HQEPRLPHTSTLNKFIDNAREEEDAEEEDSQPTEEPVQKETQDASDSDSDSDDDYNPLGS	360
hZNHIT6(216-470)	HQVKSESTK-----NVGNEN-----	255
	* * : : : * * :	
yBcd1p(1-366)	MDFLTA*	366
hZNHIT6(216-470)	-----	255

B

1 MEFAAENEGKSGGGLHSAEGVRLSPEPGREGVRDLAGAEFFGGGEEGTGLTGIKEIGDG
 61 EEGSGQRPEEIPMDLTVVKQEIIDWPGTEGRLAGQWVEQEVEDRPEVKDENAGVLEVKQE
 121 TDSSLVVEAKVGEPEVKKEEKVKEEVMDWSEVKEEKDNLEIKQEEKFVGQCIKEELMHGE
 181 CVKEEKDFLKKEIVDDTKVKEEPPINHPVGCKRKLAMSRCETCGTEEAKYRCPRCMRYSC
 241 SLPCVKKHKAELTCNGVRDKTAYISIQQFTEMNLLSDYRFLLEDVARTADHISRDAFLKRP
 301 ISNKYMYFMKNRARRQGINLKLPLNGFTKRKENSTFFDKKKQFCWHVKLQFPQSQAEYI
 361 EKRVPDDKTINEILKPYIDPEKSDPVIRQLKAYIRSQTGVQILMKIEYMQQNLVRYEL
 421 DPYKSLDNLNRNKVIIIEYPTLHVVLKGSNNDMKVLHQVKSESTKNVGNEN

Figure 54 : (A) Alignement de séquence entre la protéine Bcd1₁₋₃₆₆ et la protéine humaine ZNHIT6₂₁₆₋₄₇₀. L'alignement a été réalisé par ClustalW Multiple Alignment (version online). **(B) Représentation de la séquence en acides aminés de la protéine humaine ZNHIT6.** Les acides aminés codés par la juxtaposition de deux exons adjacents sont colorés en rouge. Les différents exons sont représentés en couleurs noire ou bleue. Le domaine 277-305 de ZNHIT6, qui est codé par l'exon 4 est coloré en vert.

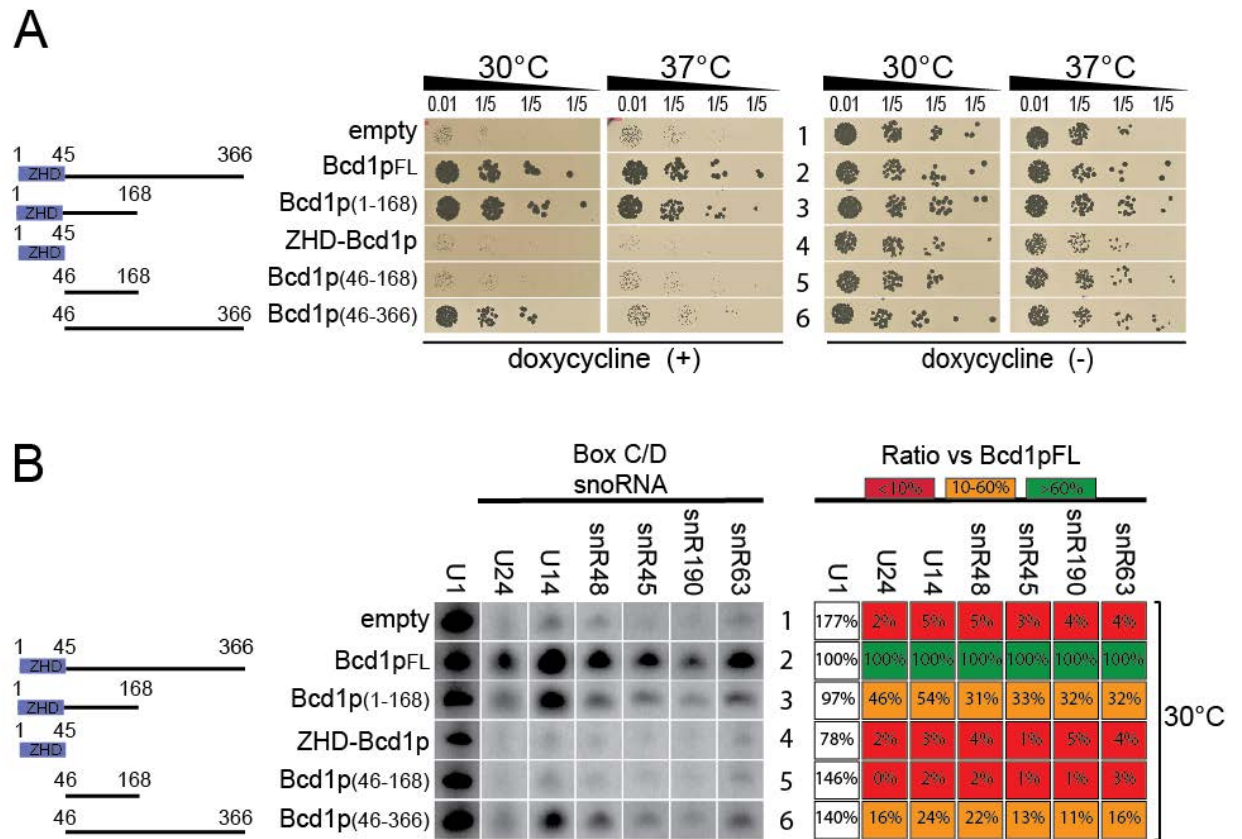


Figure 55 : Le domaine à doigt de zinc de Bcd1p est requis pour une croissance cellulaire à 37°C. Les fragments ont été exprimés à partir du vecteur d'expression p413-HA-TEF(*HIS3*) dans la souche de levure *tetO7::BCD1* (R1158), permettant de réprimer l'expression de Bcd1p en présence de doxycycline (Peng *et al.*, 2003). La croissance des cellules a été évaluée après 72 h à 30°C et 37°C sur milieu sélectif (*his*-) et en présence de 50 µg/mL de doxycycline, par dilution en cascade (facteur : 1/5) à partir d'une suspension de cellules à 0,01 unités A_{600nm}/mL . La souche transformée par le vecteur p413-HA-TEF non recombinant a été utilisée comme témoin négatif de croissance (*tetO7::BCD1*). La souche exprimant Bcd1p de pleine taille Bcd1p_{FL} a été utilisée comme référence de croissance normale. Une représentation schématique des domaines testés est montrée à gauche. Les panneaux situés le plus à droite montrent la croissance en absence de doxycycline. **(B)** Analyse par Northern-blot du taux des snoARN à boîtes C/D dans la souche de levure *tetO7::BCD1* en présence des divers fragments de Bcd1p (et en présence de doxycycline). Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules cultivées en mêmes conditions que dans le panneau **(A)**. L'effet lié à la présence des divers fragments de Bcd1p sur les taux de snoRNA a été comparé à l'effet observé après l'appauvrissement de Bcd1p dans la souche *tetO7::BCD1*. Le snRNA U1 a été utilisé comme témoin interne.

1.4 L'influence des différents domaines de Bcd1p sur le taux de snoARN à boîtes C/D

En plus des tests de croissance, nous avons estimé par Northern-blot les taux de snoARN C/D présents dans les cellules *tetO7::BCD1* exprimant les différents fragments de Bcd1p (**Figure 54 et 55**). Il s'agissait de vérifier si l'effet sur la croissance était accompagné d'une variation de la quantité de snoARN. Le rôle essentiel de Bcd1p dans la croissance cellulaire peut reposer sur son implication dans la biogenèse des snoRNP C/D d'où la chute spécifique des niveaux de snoARN C/D sans que ceux des autres types de snoARN (snoARN à boîtes H/ACA) soient modifiés (Hiley *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2003), mais aussi sur sa contribution à d'autres processus fondamentaux de la cellule.

Les fragments testés qui ne complètent pas l'absence de Bcd1p endogène (Bcd1p₁₋₆₂ et Bcd1p₁₆₉₋₃₆₆) ne restaurent pas des taux normaux de 4 snoARN à boîtes C/D testés; par contre, la complémentation avec le fragment Bcd1p₁₋₁₆₈, qui restaure la croissance cellulaire en absence de la protéine Bcd1 endogène, conduit à des taux de snoARN à boîtes C/D comparables à ceux d'une souche complémentée par la protéine Bcd1 de pleine taille. Cela suggère fortement que le fragment minimum fonctionnel est suffisant pour restaurer des niveaux de snoARN à boîtes C/D, et que le rôle essentiel de Bcd1p dans la levure est lié à son rôle dans la biogenèse des snoARN à boîtes C/D (**Figure 55A**).

Comme attendu les taux des snoARN à boîtes H/ACA ne sont pas touchés (**Figure 54B**). De manière surprenante, une protéine Bcd1 pour laquelle le doigt à zinc seul est enlevé (Bcd1p₄₄₋₃₆₆) restaure la croissance cellulaire, et en même temps les taux de snoARN à boîtes C/D à 30°C (**Figure 54B**). Le ZnF pouvait être impliqué dans le maintien de la stabilité de la protéine, le recrutement de partenaires spécifiques ou la protection contre la dégradation en conditions de stress thermique. Un rôle du doigt de zinc pouvait être envisagé en lien avec le complexe R2TP-HSP82, vu les liens de ce complexe avec le processus de maturation des snoARN à boîtes C/D.

Le fragment Bcd1p₁₋₉₆ est fonctionnel mais les taux de snoARN à boîtes C/D sont comparable à ceux d'une souche *tetO7::BCD1* non-complémentée en présence de doxycycline (**Figure 52B**). Cela représentait un résultat inattendu en prenant en considération les précédents, car le fragment Bcd1p₁₋₁₆₈ restaure les taux de snoARN à boîtes C/D à un niveau comparable à une souche exprimant la protéine endogène sauvage (**Figure 56**). Cela pouvait indiquer que la fonction essentielle de Bcd1p n'est pas liée à son rôle dans la biogenèse des snoARN. De même, les acides aminés impliqués dans la fonction essentielle de la protéine doivent se situer dans le domaine 63-96 (le fragment 1-62 ne

restaure pas la croissance), ou plus largement dans le domaine Bcd1p₄₆₋₉₆ (le fragment Bcd1p₄₆₋₃₆₆ restaure aussi la croissance à 30°C mais pas à 37°C). L'expression du fragment Bcd1p₁₋₁₁₅ par contre, conduit à des taux de snoARN comparables à ceux observés lors d'une complémentation par la protéine de pleine taille Bcd1p_{FL}, mais les niveaux d'expression des snoARN U14 et U6 sont beaucoup augmentés par rapport à ceux présents dans une souche complémentée avec la protéine entière (**Figure 52C**).

1.5 Cartographie par test en double hybride des régions d'interaction de Bcd1p avec les protéines Pih1 et Rrp9

Les protéines Pih1 et Rrp9 ont été identifiées comme étant des partenaires d'interaction pour Bcd1p (Rothé, 2013). Afin d'essayer d'identifier plus précisément les domaines de Bcd1p qui participent à ces interactions, nous avons réalisé des tests de double hybride (Y2H) (**Figure 57**), en utilisant les fragments de la protéine Bcd1 déjà analysés dans les tests de complémentation (**Figure 50**) et les protéines entières Pih1 et Rrp9. La protéine Rsa1 a été choisie comme témoin négatif, car elle ne se retrouve pas parmi les partenaires connus interagissant avec Bcd1p.

Le résultat montre que seule Bcd1p de pleine taille lorsqu'elle est fusionnée avec le domaine Gal4-BD interagit avec Rrp9p ou Pih1p (**Figure 57A**, panneau en bas à gauche).

Quand les diverses formes de Bcd1p sont fusionnées avec le domaine d'activation Gal4-AD, une interaction peut être détectée entre le fragment Bcd1p₁₆₉₋₃₆₆ et la protéine Pih1_{FL} (**Figure 57B**).

On peut aussi remarquer une absence marquée de croissance quand le fragment Bcd1p₁₋₆₂ est exprimé. Cet effet est observé dans les tests avec Pih1p et Rrp9p (**Figure 57B et 57C**) et pourrait correspondre à un effet toxique sur la croissance cellulaire.

Compte tenu de ce résultat et que nous disposions de constructions génétiques exprimant des fragments de Pih1 (Pih1p₁₋₁₄₈, Pih1p₁₋₂₁₁, Pih1p₁₋₂₅₂ et Pih1p₁₋₃₄₄) fusionnés à Gal4-AD, nous avons réalisé de tests Y2H supplémentaires avec la protéine Bcd1 de pleine taille (FL) et ses fragments Bcd1p₁₋₁₆₈ et Bcd1p₁₆₉₋₃₆₆. Bcd1p_{FL} interagit avec les quatre fragments de Pih1p testés (**Figure 58A**). Le fragment Bcd1p₁₆₉₋₃₆₆ apparait interagir uniquement avec la protéine Pih1p de pleine taille (**Figure 58C**).

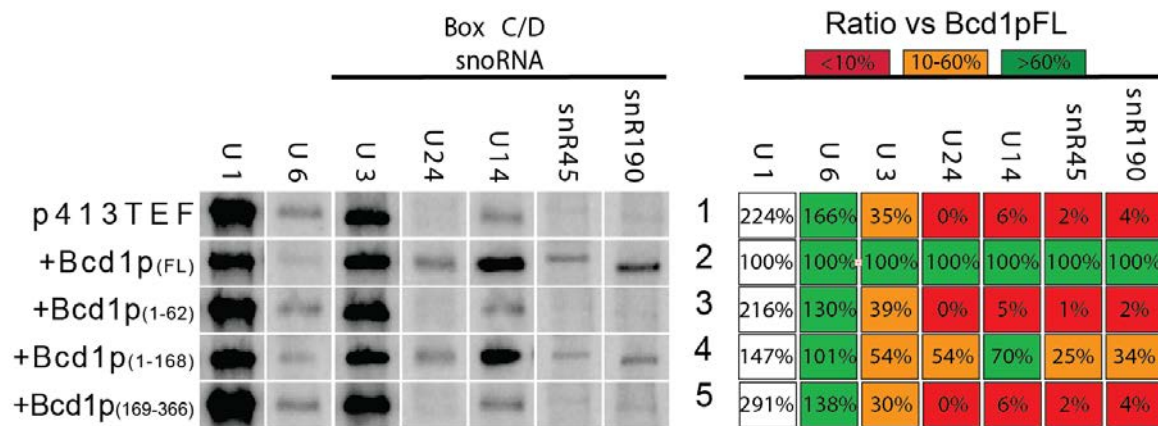


Figure 56 : Analyse par Northern-blot du taux des snoARN à boîtes C/D dans la souche de levure *tetO₇::BCD1* en présence des fragments Bcd1p₁₋₆₂, Bcd1p₁₋₁₆₈, Bcd1p₁₆₉₋₃₆₆ (et en présence de doxycycline). L'effet lié à la présence des divers fragments de Bcd1p sur les taux de snoARN a été comparé à l'effet observé après l'appauvrissement de Bcd1p dans la souche *tetO₇::BCD1*.. Le snARN U1 a été utilisé comme témoin et référence interne. La figure et les quantifications ont été réalisées comme décrit dans la **Figure 52**.

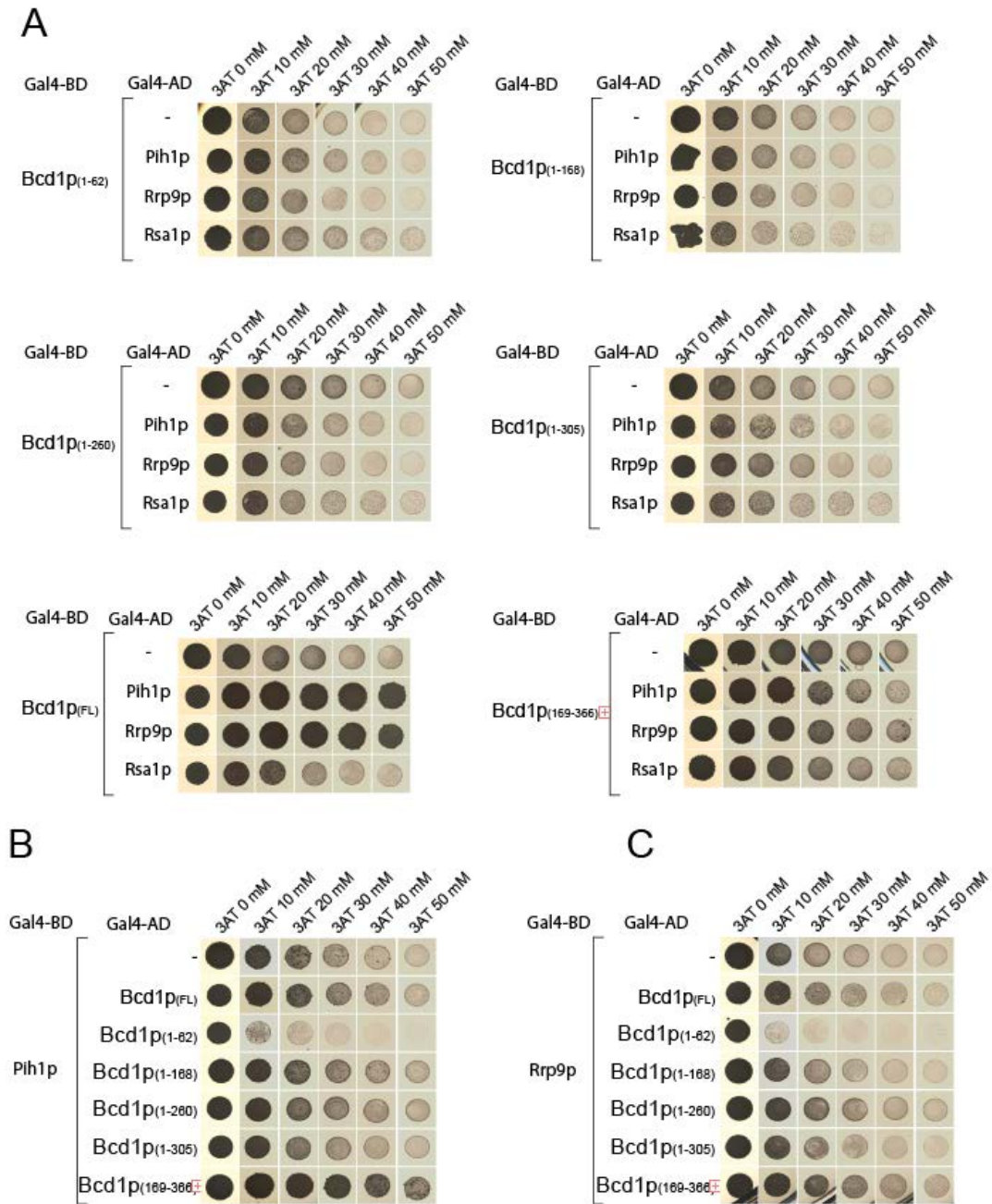


Figure 57 : La protéine Bcd1 de pleine taille interagit en double hybride avec les protéines PiH1 et Rrp9. (A) Test d'interaction par double-hybride entre Bcd1p et plusieurs de ses fragments fusionnés au domaine Gal4-BD (pGBKT7), et les protéines PiH1 et Rrp9 fusionnées au domaine Gal4-AD (pACT2). (B et C) Test d'interaction par double-hybride entre Bcd1p et plusieurs de ses fragments fusionnés au domaine Gal4-AD (pACT2) et PiH1p (B) et Rrp9p (C), fusionnées au domaine Gal4-BD (pGBKT7). Les tests d'interaction ont été réalisés par croisement des souches Y190 (pACT2) et Y187 (pGBKT7), et étalement sur milieu sélectif sans histidine, en présence d'une gamme de concentration croissante en 3-aminotriazol (3AT). La lecture des résultats a été faite après 72 h de croissance à 30°C.

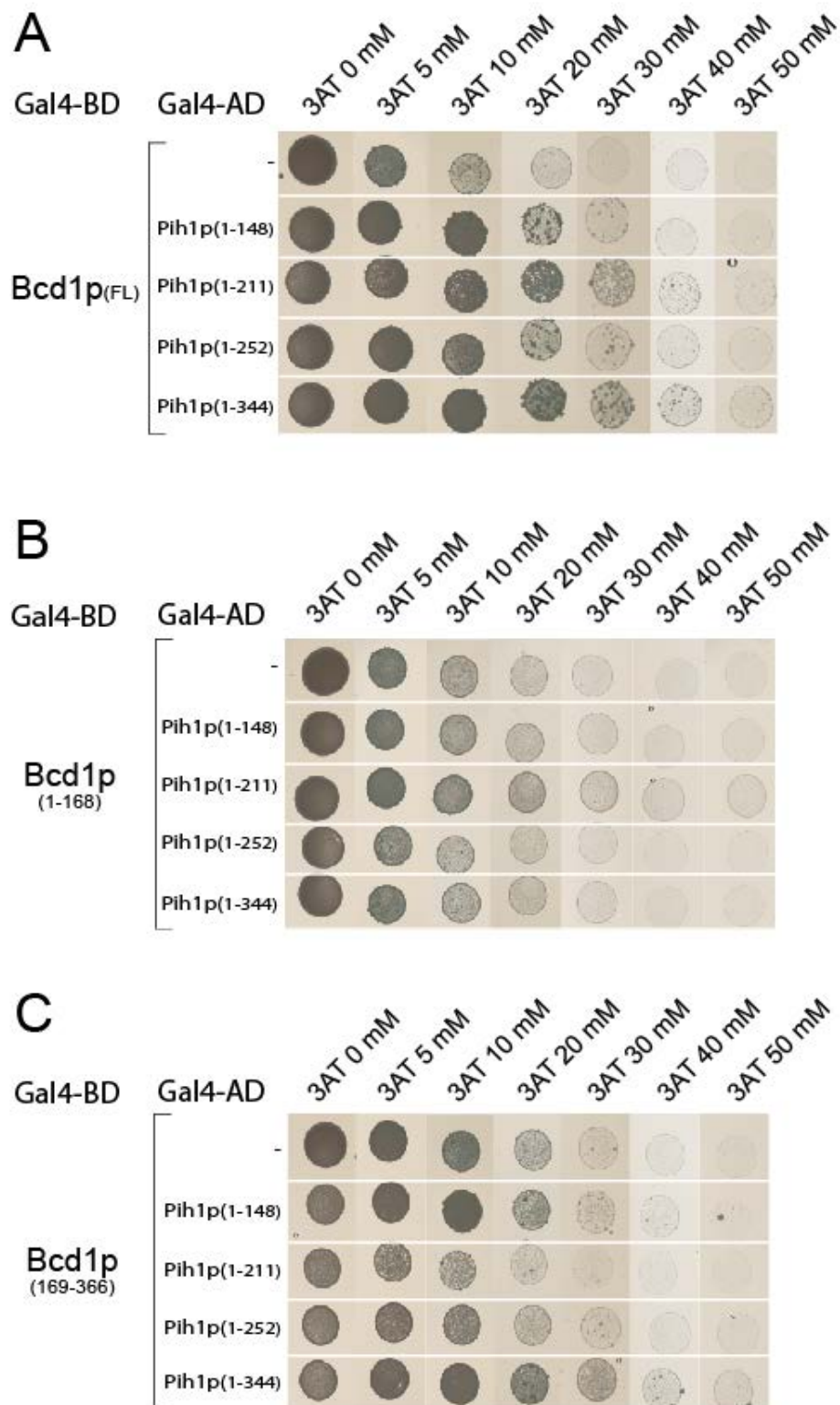


Figure 58 : Recherche de domaines spécifiques d'interaction entre Bcd1p et Pih1p par Y2H. La protéine de pleine taille Bcd1p_{FL} (A), les fragments Bcd1p₁₋₁₆₈ (B) et Bcd1p₁₆₉₋₃₆₆ (C) ont été exprimés à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD) et les domaines de Pih1p à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD). Les tests d'interaction ont été réalisés comme décrit en **Figure 65**.

2 Etude fonctionnel du double doigt de zinc de Bcd1p.

Le domaine en doigt de zinc (ZnF) est classiquement décrit comme un domaine d'interaction avec l'ADN, mais il peut avoir une multitude d'autres fonctions, comme des interactions avec des partenaires protéiques, avec des lipides, avec des molécules d'ARN ou avec des hétéroduplex ADN/ARN (Hall, 2005; Matthews and Sunde, 2002).

La protéine Bcd1 présente, dans sa région N-terminale, un domaine ZnF conservé dans la protéine humaine et avec une homologie de séquence importante à celui retrouvé dans la protéine Hit1/TRIP3(ZNHIT3) (Rothé *et al.*, 2014b). Les expériences antérieures comme celles décrites dans les **Figures 50 et 55** ont montré le caractère important de ce domaine pour la fonction essentielle de la protéine. Une analyse plus détaillée de ce motif a donc été réalisée en utilisant la technique de mutagenèse dirigée.

2.1 Mutations du double doigt de zinc de Bcd1p

Nous avons remplacé des résidus Cystéine participant à la formation des deux ZnF par des résidus Sérine, de manière à ce que soit le premier doigt, soit le deuxième, soit les deux soient détruits. Les mutations réalisées se situent au niveau des Cystéines 5 et 8 (participant à la coordination d'un premier atome de Zn^{2+}), 17 et 20 (participant à la coordination d'un deuxième atome de Zn^{2+}) ou les Cystéines 5, 8, 17 et 20 (afin d'empêcher la formation des deux motifs ZnF en même temps). De plus, la Tyrosine 15 a été remplacée par un résidu Alanine, en prenant en considération le fait que cet acide aminé est très conservé parmi les membres de la famille de protéines contenant le motif ZnF de type ZF HIT.

Toutes ces mutations ont été réalisées dans la protéine Bcd1 (aminoacides 1 à 366) ou dans le fragment plus court fonctionnel (aminoacides 1 à 168). Pour la protéine entière, 4 variants ont été produits: Bcd1p(C₅S+C₈S), Bcd1p(C₁₇S+C₂₀S), Bcd1p(C₅S+C₈S+C₁₇S+C₂₀S) et Bcd1p(Y₁₅A). Pour le fragment Bcd1p₁₋₁₆₈ les mêmes mutations ont été réalisées: Bcd1p₁₋₁₆₈(C₅S+C₈S), Bcd1p₁₋₁₆₈(C₁₇S+C₂₀S), Bcd1p₁₋₁₆₈(C₅S+C₈S+C₁₇S+C₂₀S) et Bcd1p₁₋₁₆₈(Y₁₅A). (**Figure 59**).

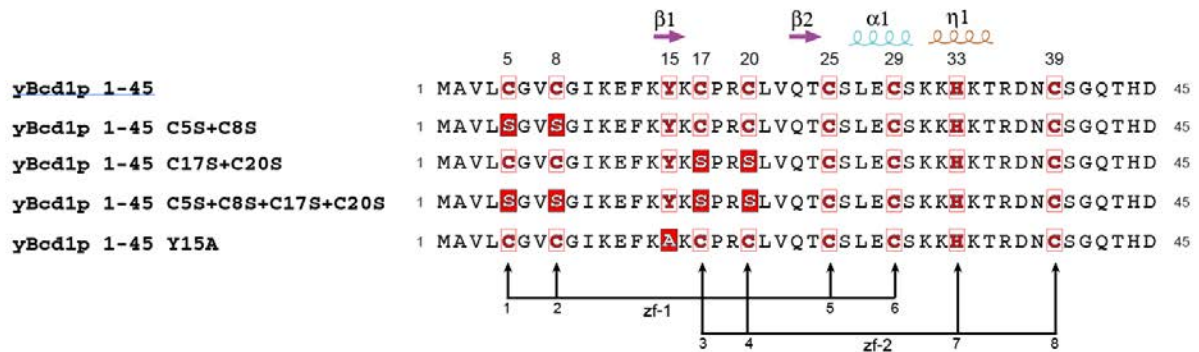


Figure 59 : Représentation des mutations réalisées dans le domaine en doigt de zinc de Bcd1p. Le domaine Bcd1p₁₋₄₅ est représenté. β1 et β2 indiquent des brins β, α1 une hélice α et η1 une hélice 310. Les résidus mutés sont représentés en couleur blanc sur fond rouge. Les résidus Cystéine et Histidine participant à la formation des deux doigts de zinc zf-1 et zf-2 sont montrés avec des flèches verticales.

2.1.1 Test de croissance

Nous avons testé l'effet de ces modifications dans la souche *tetO₇::BCD1* à 30°C et 37°C (**Figure 60**). Dans la protéine entière, ces mutations ne montrent pas de défaut de croissance par rapport à une souche cultivée en absence de doxycycline (**Figure 60A**, lignes 3-6). Par contre, à 37°C, la complémentation par les variants de la protéine pour lesquels le deuxième doigt de zinc a été détruit est moins efficace (**Figure 60A**, lignes 4 & 5).

Aucun des variants du ZnF lorsqu'il est porté par le fragment Bcd1p₁₋₁₆₈ ne restaurent la croissance des cellules (**Figure 61A**), ni les taux de snoRNA à boîtes C/D (**Figure 61B**), quel que soit la température.

2.1.2 Taux de snoARN

L'analyse des taux de snoARN dans les cellules complémentées avec les divers variants du ZnF de Bcd1p, montre que seule la mutation Y₁₅A restaure des taux normaux de snoARN à boîtes C/D, à un niveau comparable à celui présent dans une souche complémentée avec la protéine sauvage. L'inactivation du premier ZnF dans la protéine entière, en concordance avec le test de complémentation sur boîte de Pétri, ne restaure pas des taux de snoARN à boîtes C/D comparables à l'expression de la protéine de type sauvage (**Figure 60B et 61B**).

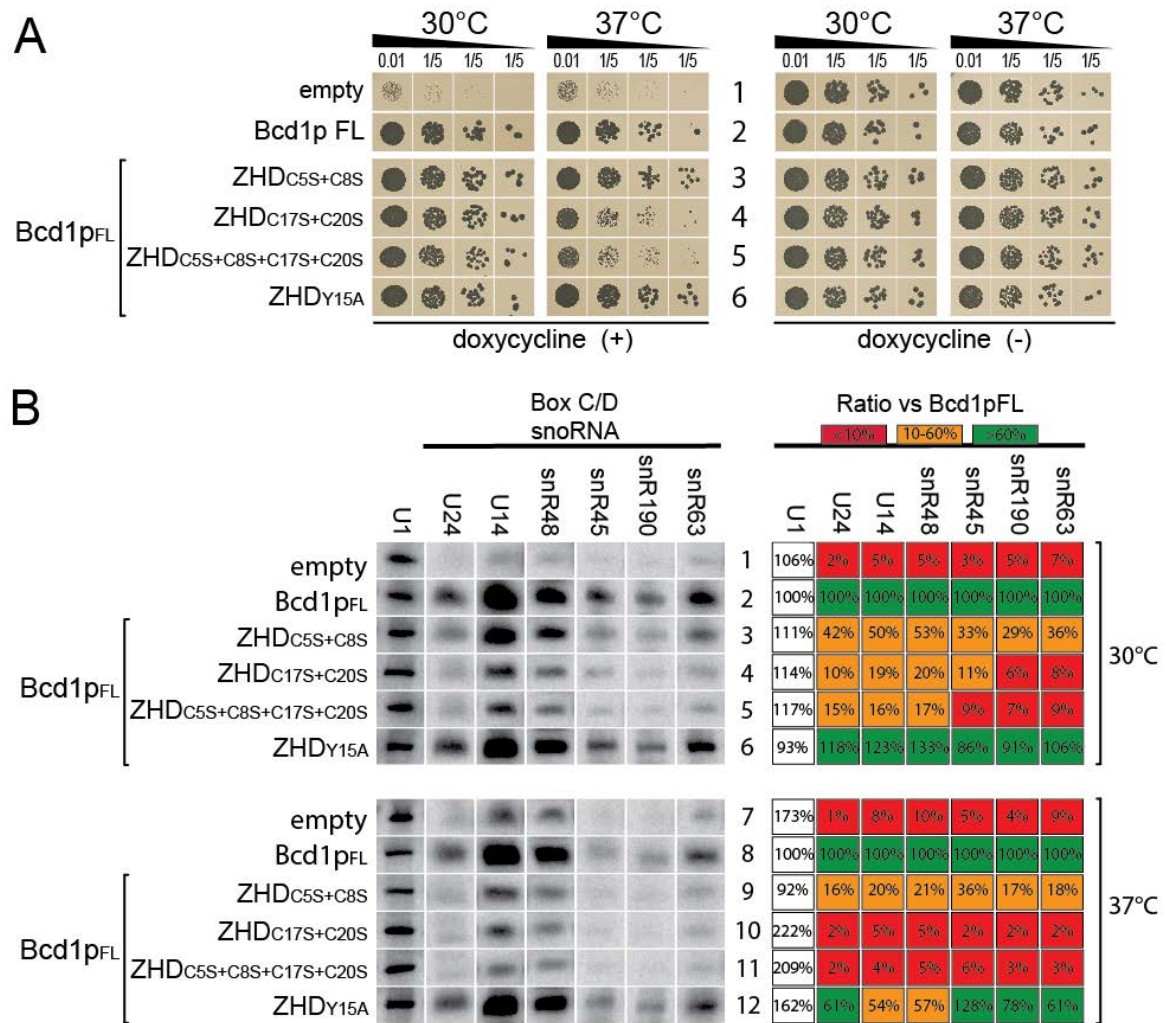
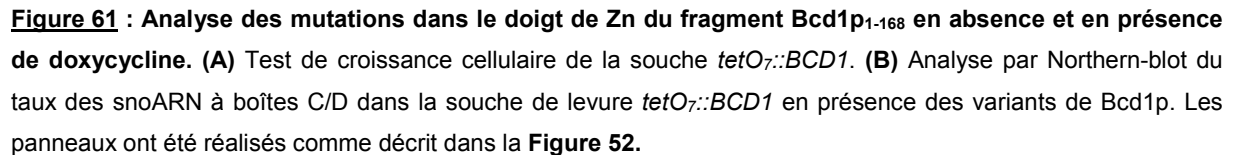


Figure 60 : Test de croissance cellulaire de la souche *tetO₇::BCD1* en présence des divers mutants de Bcd1p en absence et en présence de doxycycline. Les fragments ont été exprimés à partir du vecteur d'expression p413TEF (*HIS3*) dans la souche de levure *tetO₇::BCD1* (R1158) permettant de réprimer l'expression de Bcd1p en présence de doxycycline. La croissance des cellules a été évaluée sur milieu sélectif (*his*-), par dilution en cascade (facteur: 1/5) à partir d'une suspension de cellules à 0,01 unités A_{600nm}/mL comme décrit précédemment (**Figure 52**). **(B)** Analyse par Northern-blot des taux des snoARN à boîtes C/D dans la souche de levure *tetO₇::BCD1* en présence des variants de Bcd1p mutés au niveau du domaine ZnF. Les expériences ont été réalisées comme décrit en **Figure 55**. Le snoRNA U1 a été utilisé comme témoin interne.



2.2 Remplacement du ZnF de Bcd1p par d'autres doigts de zinc

Vu la conservation importante entre les séquences ZnF de Bcd1p et Hit1p, ainsi que l'implication des deux protéines dans la biogenèse des snoARN à boîtes C/D, nous nous sommes posé la question si une redondance fonctionnelle pouvait exister pour ce domaine. Afin de tester cette hypothèse, nous avons construit des protéines chimériques, en remplaçant le ZnF de Bcd1p (acides aminés 1 à 45) avec le ZnF de Hit1p (acides aminés 1 à 46). Dans un premier temps, les bornes choisies afin de limiter les domaines portant le ZnF ont été, pour les deux protéines Bcd1 et Hit1, les acides aminés 1 à 43. Ces données provenaient de données d'alignement des séquences et de prédictions de structures secondaires. Dans un deuxième temps, ces bornes ont été étendues car nous avons pris en compte des données structurales issues des expériences de RMN réalisées au laboratoire par le groupe de X. Manival.

Chez la levure il existe seulement trois membres, les protéines Hit1, Bcd1 et Vps71, qui partageant le même domaine structural dans la famille des protéines à ZnF de type HIT (**Figure 62**). Le troisième membre n'a pas fait l'objet d'une recherche d'un rôle possible lié à la biogenèse de snoRNP à boîtes C/D. L'homologie entre le ZnF de Vps71p et celui de Bcd1p (30% d'identité) est moins importante que celle retrouvée entre les ZnF de Bcd1p et Hit1p (57% d'identité). Nous avons ainsi inclus dans nos expériences un variant de Bcd1p pour lequel le ZnF de Bcd1p a été remplacé par celui de la protéine Vps71. Les limites du ZnF de cette dernière protéine ont été choisies en se basant sur des domaines identifiés lors des alignements des séquences. Une différence à noter par rapport aux deux autres protéines de la famille est la position occupée par le domaine à ZnF dans la région C-terminale de Vps71p, tandis qu'il se situe dans la région N-terminale des protéines Bcd1 et Hit1.

Dans le même temps, afin de tester si le ZnF participe par un rôle structural dans le repliement des protéines, nous avons inclus deux autres protéines chimères dans nos expériences. Pour la première, le domaine ZnF de Bcd1p est remplacé par un domaine à double ZnF faisant partie d'une autre famille (domaine de type C2H2 provenant de la protéine Rph1). La deuxième est une protéine chimérique entre Bcd1p (acides aminés 46 à 366) et un domaine portant un ZnF de type simple doigt de zinc provenant de la protéine de levure Swi5.

Nous avons testé l'effet de ces protéines hybrides sur la croissance des cellules et sur le taux de snoARN à boîtes C/D dans une souche *tetO₇::BCD1*.

2.2.1 Test de croissance

Des tests de complémentation ont été réalisés à 30°C et 37°C.

A 30°C, le remplacement du ZnF de Bcd1p par celui de Hit1p, Vps71p et Swi5p conduit à une croissance des cellules à un taux comparable à une souche dans laquelle Bcd1p sauvage est exprimée. Par contre, le remplacement du double ZnF de Bcd1p par un double ZnF d'une autre famille ne restaure que partiellement la croissance. Cela serait en faveur de l'hypothèse selon laquelle le ZnF de Bcd1p a un rôle simplement structural, pour l'architecture 3D de la protéine pendant la traduction.

A 37°C, seul l'hybride Bcd1p₄₆₋₃₆₆ZFHit1p₁₋₄₆ permet la complémentation du défaut de croissance (**Figure 63B**). Ce résultat est en faveur d'un rôle fonctionnel commun entre les deux domaines homologues des deux protéines étudiées. La forte homologie des séquences existant entre les deux domaines ZnF est possiblement due à une implication des deux protéines dans une même voie métabolique. Même si l'implication des deux membres de cette famille dans d'autres processus cellulaires est envisagée, ce résultat met du poids sur l'hypothèse d'un rôle fonctionnel des deux protéines dans la biogenèse des snoARN à boîtes C/D.

Dans le cas de Hit1p, la substitution avec le ZnF de Bcd1p ne modifie pas la croissance. Cet effet était prévisible, car le ZnF de Hit1p n'est pas essentiel pour une croissance normale des cellules.

2.2.2 Les taux des snoARN

Les niveaux de snoARN à boîtes C/D exprimés dans les cellules dans lesquelles les diverses formes chimériques de Bcd1p sont exprimées en présence de doxycycline sont en concordance avec les résultats du test de croissance et en accord avec une implication potentielle du ZnF de Bcd1p dans la biogenèse des snoRNP. Les variants qui ne permettent pas de compléter l'absence de la protéine endogène à 30°C restaurent le taux de snoARN à boîtes C/D, mais à des taux différents (**Figure 63C**). Ces niveaux sont comparables à ceux d'une souche dans laquelle est exprimée Bcd1p portant une substitution de son ZnF par celui de Hit1p.

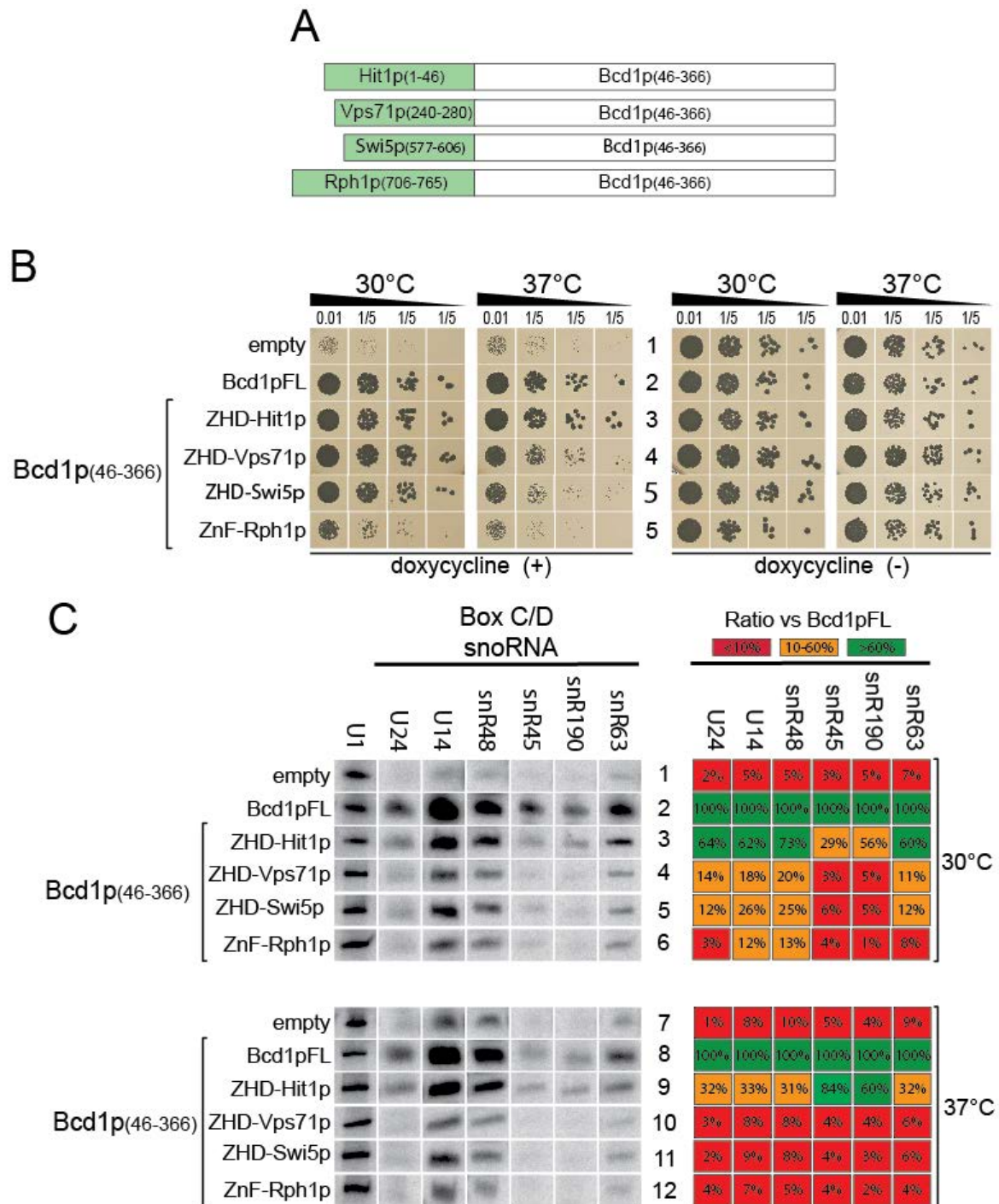


Figure 63 : Analyse des effets induits par le remplacement du doigt de Zn de Bcd1p de *S. cerevisiae* par d'autres motifs de la même famille. (A) Représentation schématique des divers constructions utilisées. (B) Test de croissance cellulaire de la souche *tetO₇::BCD1* exprimant les diverses protéines chimériques de Bcd1p en absence et en présence de doxycycline. (C) Analyse par Northern-blot du taux des snoARN à boîtes C/D dans la souche de levure *tetO₇::BCD1* en présence des protéines chimériques. Les expériences et les panneaux ont été réalisées comme décrit en **Figure 60**.

2.3 Complémentation dans une souche *tetO₇::BCD1* avec l'homologue humain de Bcd1p, la protéine ZNHIT6

L'alignement de séquences montre que seule la partie C-terminale (acides aminés 216-470) de la protéine humaine est homologue à la protéine de levure. L'homologie la plus importante est retrouvée dans le domaine à doigt de zinc (acides aminés 1-45: 40%) et dans les régions Bcd1p₆₂₋₁₆₈ (22%) et Bcd1p₂₆₀₋₃₀₅ (31%) (**Figures 48 et 51**).

Nous avons observé que la protéine humaine ZNHIT6 ne permet pas la complémentation du défaut d'expression de Bcd1p de la souche *tetO₇::BCD1* en présence de doxycycline à 30°C et à 37°C. Au regard de Bcd1p, ZNHIT6 possède un domaine additionnel de 216 acides aminés à l'extrémité N-terminale. Au sein de la protéine ZNHIT6, la séquence correspondant à la protéine de levure débute à l'acide aminé 220. De manière intéressante, tout le domaine ZNHIT6₁₋₂₁₈ est codé au niveau génomique par un seul exon, tandis que le domaine ZNHIT6₂₁₉₋₄₇₀ est codé par 9 autres exons. Cela indiquerait une possible acquisition par la protéine humaine d'un nouveau domaine fonctionnel qui est fusionné avec la protéine ancestrale afin de former un seul hybride. Chez *S. cerevisiae* il n'y a pas d'homologue protéique identifié à l'heure actuelle pour ce domaine supplémentaire de ZNHIT6. Nous avons formulé l'hypothèse que ce domaine additionnel pouvait expliquer l'absence de complémentation de la croissance chez *S. cerevisiae*. Ainsi un variant de ZNHIT6 a été produit pour lequel le domaine 1-216 a été supprimé. Le fait d'enlever le domaine 1-216 de ZNHIT6 (variant ZNHIT6₂₁₆₋₄₇₀) ne permet toujours pas la complémentation mais surtout conduit à un effet dominant négatif se traduisant par une croissance très ralentie des cellules exprimant la protéine Bcd1 endogène (**Figure 64**).

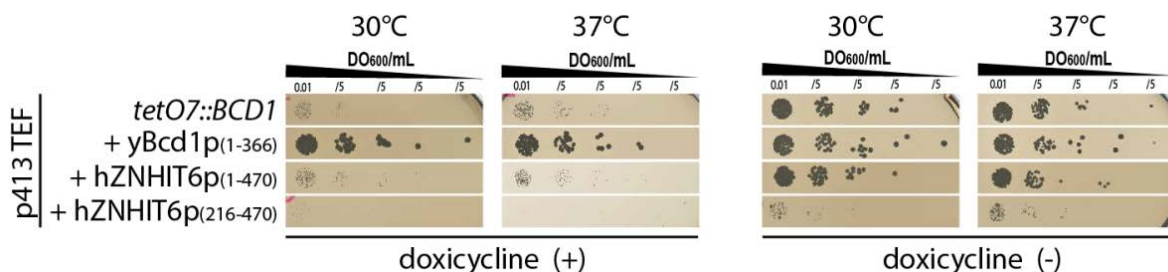


Figure 64 : Test de complémentation de la souche *tetO₇::BCD1* par la protéine humaine ZNHIT6 et par le domaine ZNHIT6₍₂₁₆₋₄₇₀₎ qui présente une homologie avec la protéine Bcd1 de levure. Les expériences ont été réalisées comme décrit précédemment (**Figure 60**).

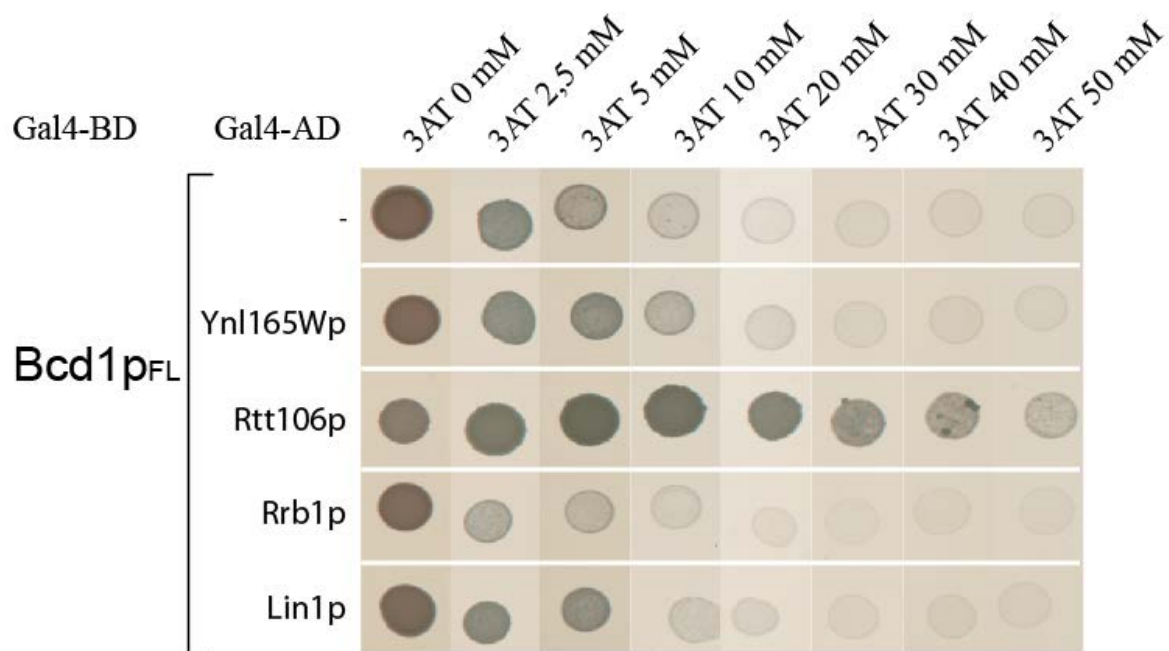


Figure 65 : Recherche de nouveaux partenaires d'interaction de Bcd1p par Y2H. Bcd1p a été exprimée à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD) et les autres protéines candidates à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD). Les tests d'interaction ont été réalisés par croisement des souches Y190 (pACT2) et Y187 (pGBKT7), et étalement sur milieu sélectif sans histidine, en présence d'une gamme de concentration croissante en 3-aminotriazol. La lecture des résultats a été faite après 72 h de croissance à 30°C.

3 Recherche des nouveaux partenaires d'interaction de Bcd1p par double hybride

En se basant sur des données de la littérature sur de possibles partenaires d'interaction de Bcd1p, plusieurs protéines candidates ont été testées par test d'interaction avec Bcd1p en double hybride (Y2H): Lin1p, Rrb1p, Ynl165wp, Rtt106p, Ahc2p, She2p, Sua7p, Taf9p, Tfb4p, Mot3p, Msa2p. Ces tests ont permis d'identifier une interaction entre Bcd1p et Rtt106p (**Figure 65** et résultats non montrés).

La force de l'interaction Y2H entre Bcd1p et Rtt106p apparaît élevée avec une croissance possible jusqu'à une concentration en 3AT de 40 mM et du même ordre que les interactions déjà caractérisées au laboratoire qui ont conduit à des études structurales poussées (Snu13p-Rsa1p; Rsa1p-Hi1p). J'ai débuté une étude plus approfondie sur cette interaction et les données sont présentées dans la **Partie III des Résultats**.

3.1 Surexpression des divers fragments de Bcd1p dans des souches invalidées pour divers protéines connues ou candidates pour être impliquées dans la biogenèse des snoRNP (souches $\Delta RSA1$, $\Delta PIH1$, $\Delta RTT106$, $\Delta YNL165W$)

Nous avons cherché à vérifier si une surexpression de Bcd1p entière ou de ses divers fragments pouvait influencer la croissance cellulaire dans des souches invalidées pour gènes codant des protéines dont le rôle dans la biogenèse étaient bien établi ($\Delta RSA1$, $\Delta PIH1$), ou codant de nouveaux candidats potentiels ($\Delta RTT106$, $\Delta YNL165W$). Les résultats montrent une croissance normale des cellules surexprimant Bcd1p de pleine taille (FL) ou ses divers fragments dans la plupart des souches testées. A noter une exception: la surexpression de Bcd1p_{FL} dans une souche $\Delta PIH1$ conduit à un retard sur la croissance cellulaire, indiquant un possible effet dominant négatif, mais pas quand le domaine en doigt de Zn ou son complément (Bcd1p₆₃₋₃₆₆) sont absents (**Figure 66**).

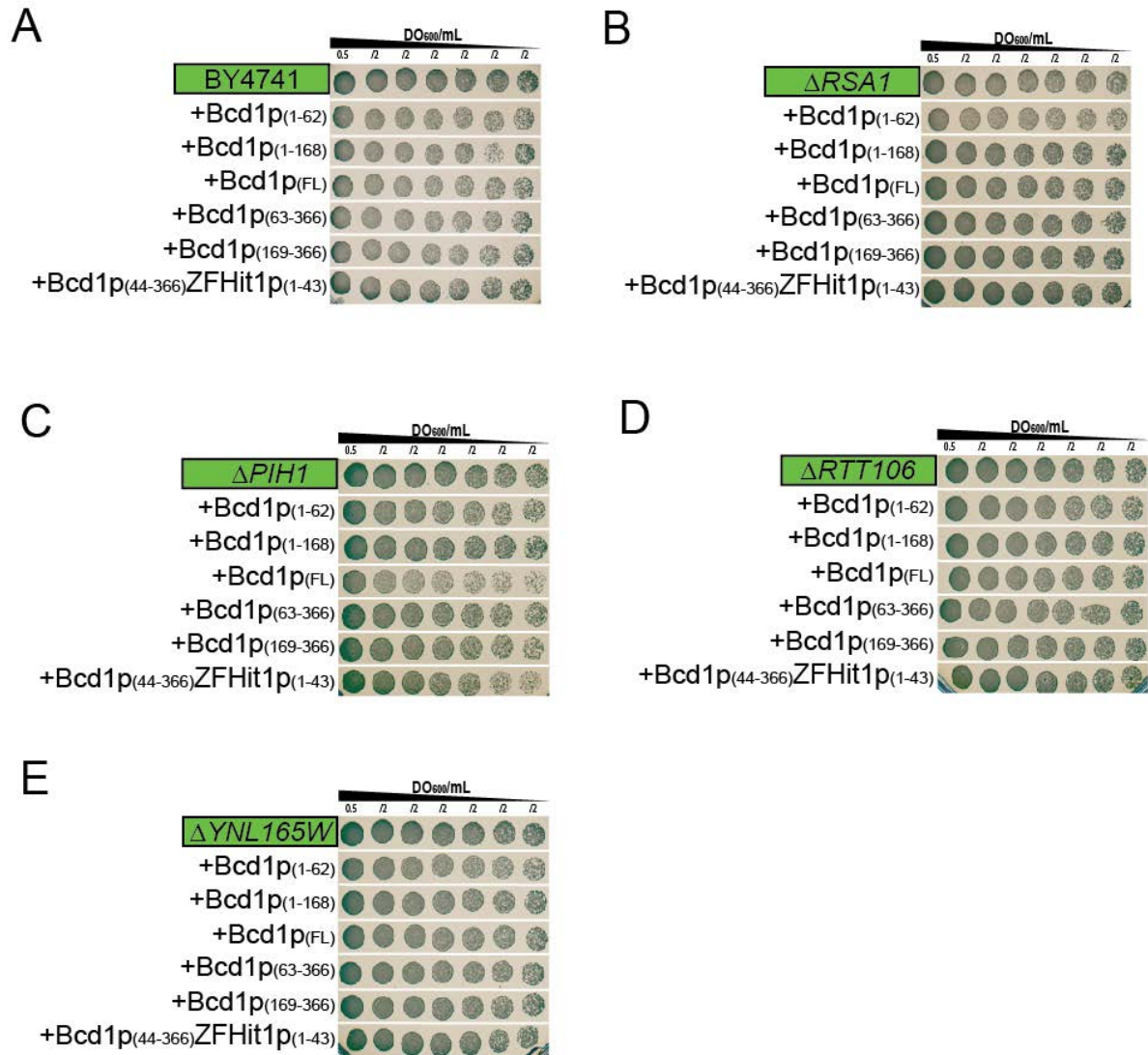


Figure 66 : Test de croissance de diverses souches invalidées pour les séquences codant des protéines impliquées ou candidates dans l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D et exprimant divers fragments de Bcd1p. Les protéines ont été exprimées à partir du vecteur d'expression p413TEF (HIS3) dans les souches de levure Δ RSA1 (**B**), Δ PIH1 (**C**), Δ RTT106 (**D**), et Δ YNL165W (**E**). (**A**) Surexpression des fragments de Bcd1p dans la souche de type sauvage BY4741. La croissance des cellules a été évaluée à 30°C sur milieu YPD, par dilution en cascade (facteur : 1/2) à partir d'une suspension de cellules à 0,5 unités A600nm/mL. La première dilution a été ajustée à partir des cultures de cellules en phase stationnaire de croissance.

Partie III – La protéine Rtt106

1 Analyse structurale de l'interaction Bcd1p - Rtt106p

Au début de la thèse, les protéines Pih1, Rrp9 et Rvb2 étaient les seuls partenaires protéiques d'interaction connus de Bcd1p. Après avoir réalisé des recherches dans des bases de données informatiques, alimentées par des expériences de protéomique à grande échelle, j'ai identifié une interaction potentielle entre Bcd1p et la chaperonne d'histone Rtt106p. La nouvelle interaction a pu être détectée par test double hybride (Y2H) (**Figure 67**), ce qui ouvrait une piste nouvelle d'investigation sur les mécanismes d'assemblage des particules snoRNP à boîtes C/D.

1.1 Co-expression chez *E.coli*

Une interaction entre deux protéines observée par Y2H chez la levure peut correspondre à une interaction indirecte entre les deux partenaires, qui peut être médiée par un composant endogène de la levure. Au laboratoire, le groupe de X. Manival a réalisé de tests de co-expression de Bcd1p et Rtt106p chez *E.coli*. L'une des protéines contient une étiquette HISx6 qui permet d'être retenue sur colonne de Ni et de permettre une co-purification de son partenaire d'interaction. Les données de ces expériences démontrent la formation d'un complexe hétérodimérique Bcd1p-Rtt106p entre les deux protéines dans ce système d'expression hétérologue.

1.2 Recherche des domaines spécifiques d'interaction entre Bcd1p et Rtt106p

Comme décrit dans la partie Introduction (**Chapitre 4.5**, page 188), la protéine Rtt106 est une chaperonne d'histones qui porte deux domaines PH (Pleckstrin Homology). Les domaines PH sont classés en sept sous-groupes qui adoptent chacun la même conformation mais qui ne montrent pas de similarité de séquences (Marchler-Bauer et al., 2005; Marchler-Bauer and Bryant, 2004; VanDemark *et al.*, 2006). L'un de ce sous-groupe rassemble des protéines impliquées dans la liaison aux lipides inositol et dans la liaison membranaire (Jacobs et al., 1999; Lemmon, 2004). D'autres sous-groupes correspondent à des protéines qui s'associent à des ligands spécifiques, d'une grande diversité, qui incluent des lipides, des

peptides contenant la phosphotyrosine, la polyproline et d'autres peptides ou protéines (Jacobs *et al.*, 1999; Lemmon, 2004). La présence de ce domaine dans les protéines Pob3 et Spt16 suggère une fonction d'interaction potentielle mais la nature des ligands reste inconnue (Yu *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2004; VanDemark *et al.*, 2006).

Afin d'obtenir plus d'information concernant l'interaction entre Bcd1p et Rtt106p, nous avons réalisé des tests de Y2H entre des fragments de Bcd1p et Rtt106p.

1.2.1 Test de l'interaction entre Rtt106p et le domaine fonctionnel de Bcd1p₁₋₁₆₈ et le domaine Bcd1p₁₆₉₋₃₆₆.

Nous avons testé l'interaction entre Rtt106p et chacun des fragments 1-168 et 169-366 de Bcd1p. Aucun de ces deux domaines n'interagit avec Rtt106p en double hybride (**Figure 67**).

1.2.2 Test d'interaction entre Bcd1p et les domaines PH de Rtt106p, Pob3p et Spt16p

Deux fragments de Rtt106p contenant les deux domaines PH ont été fusionnés au domaine Gal4AD pour tester leur interaction en Y2H avec Bcd1p : le fragment Rtt106PHp, qui contient les aminoacides 65-301 et le fragment Rtt106Mp, contenant les aminoacides 65-320. Ces deux fragments ont été choisis en se basant sur des données de la littérature (Su *et al.*, 2012), car ils ont été employés par d'autres équipes dans des analyses fonctionnelles de Rtt106p dans d'autres processus cellulaires comme l'interaction de Rtt106p avec l'histone H3. Comme décrit dans la partie Introduction (cf. **Chapitre 4.4.1**, page 178), deux autres chaperonnes d'histones, Pob3p et Spt16p, appartenant au complexe de remodelage de la chromatine FACT, contiennent des double domaines PH. Ainsi, deux fragments de ces protéines contenant les deux domaines PH - Pob3Mp (aminoacides 220-477) et Spt16Mp (aminoacides 675-958) ont été testés en Y2H avec Bcd1p, afin de déterminer si l'interaction de Bcd1p est restreinte à Rtt106p ou si Bcd1p interagit de manière plus large avec d'autres partenaires contenant le même domaine PH. Le choix des fragments avec les deux domaines PH de Pob3p et Spt16p a été effectué en suivant la même stratégie que pour Rtt106p. Les bornes des fragments Pob3Mp₍₂₂₀₋₄₇₇₎ et Spt16Mp₍₆₇₅₋₉₅₈₎ ont été choisis d'après les études déjà réalisées, ou des données de protéolyse ménagée qui ont fourni des informations relatives à l'organisation en domaines fonctionnels des deux protéines (O'Donnell *et al.*, 2004) (cf. **Chapitre 4.4.1**).

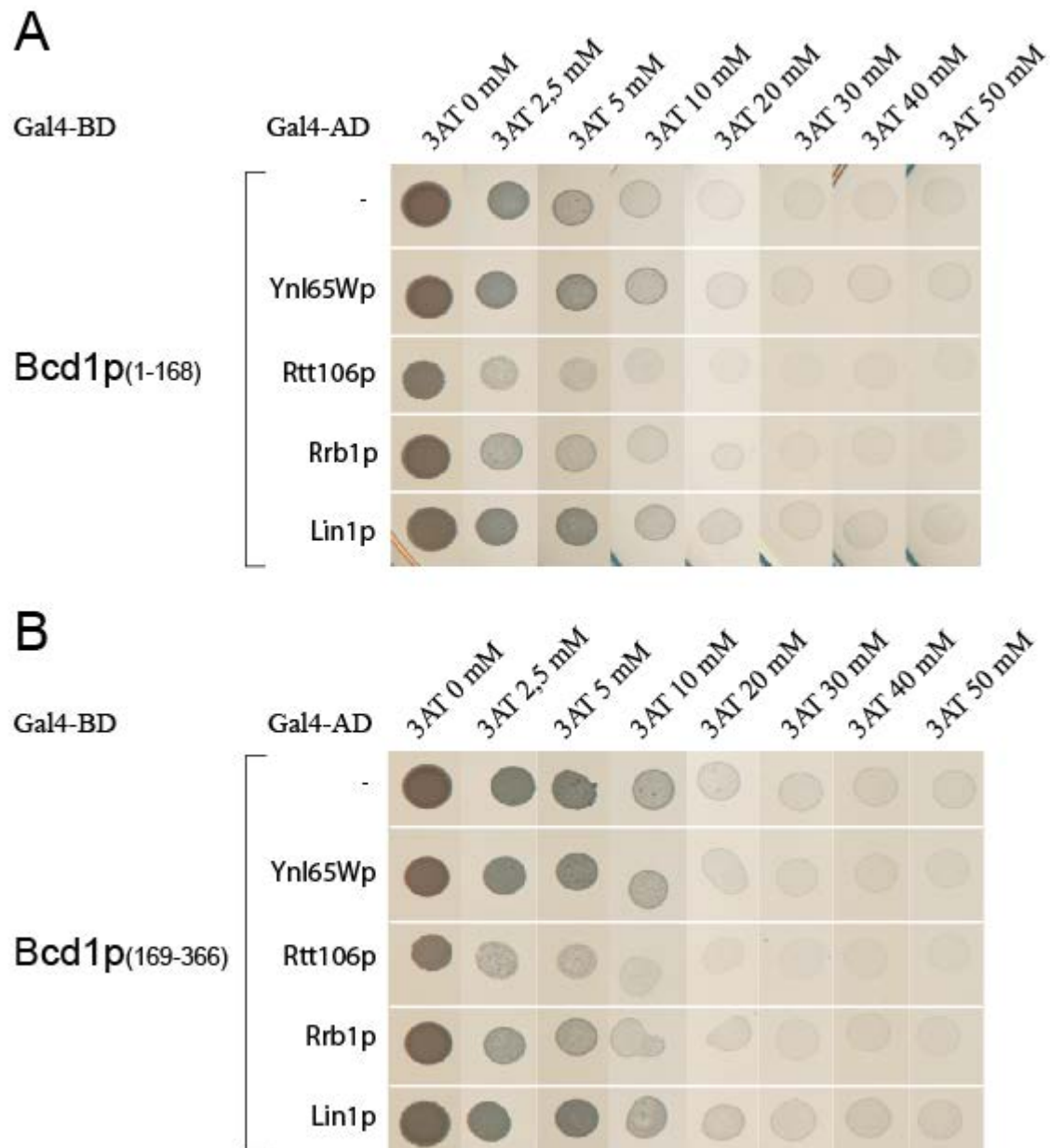


Figure 67 : Recherche des domaines spécifiques d'interaction entre Bcd1p et Rtt106p par test d'interaction en double hybride. Test entre les fragments Bcdp11-168 (A) et Bcdp1169-366 (B) avec 4 partenaires potentiels. Bcd1p et ses fragments ont été exprimés à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD) et les autres protéines candidates à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD). Les tests d'interaction ont été réalisés par croisement des souches Y190 (pACT2) et Y187 (pGBKT7), et étalement sur milieu sélectif sans histidine, en présence d'une gamme de concentration croissante en 3-aminotriazol. La lecture des résultats a été faite après 72 h de croissance à 30°C.

Les domaines PH de Pob3p sont situés dans les régions 248-367 et 383-474 (O'Donnell *et al.*, 2004; VanDemark *et al.*, 2006) (cf. **Chapitre 4.4.1, Figure 33**), tandis que ceux de la protéine Spt16 sont situés dans la région 675-959 (Kemble *et al.*, 2013) (cf. **Chapitre 4.4.1, Figure 32**).

Nos analyses montrent que Bcd1p interagit spécifiquement avec les deux domaines PH de Rtt106p, mais pas avec ceux de Pob3Mp ou Spt16Mp. Lorsque toute la séquence de Rtt106p est fusionnée au domaine Gal4-AD, elle montre l'interaction la plus forte avec Bcd1p fusionnée au domaine Gal4-BD (**Figure 68B**) car la croissance des diploïdes est observée jusqu'à une concentration en 3-AT de 40 mM, tandis que l'interaction Bcd1p est moins forte avec les deux fragments portant seulement les domaines PH de Rtt106p: la croissance s'arrête à partir d'une concentration de 3-AT de 10 mM. Ce résultat pouvait signifier (i) que la conformation des protéines tronquées dans le cas des deux fragments de Rtt106p est altérée, (ii) que d'autres éléments structuraux existent dans les domaines de Rtt106p non inclus dans ces fragments; notamment le domaine N-terminal qui pourrait jouer un rôle important dans l'interaction entre les deux partenaires, car il représente le domaine de dimérisation de Rtt106p (Su *et al.*, 2012), ce qui signifie que l'interaction entre Bcd1p et Rtt106p pouvait être favorisée avec des dimères de Rtt106p.

Cependant, la différence de croissance n'est pas observée lorsque les domaines Gal4 sont inversés : le fragment Rtt106Mp montre une interaction de force équivalente à la protéine de pleine taille avec une croissance jusqu'à une concentration en 3-AT de 10 mM, et même de force plus élevée pour le fragment Rtt106PHp (croissance jusqu'à 30 mM en 3-AT). Par contre, l'interaction Y2H n'est pas observée pour les fragments de Pob3p et Spt16p lorsqu'il sont fusionnés à Gal4-BD (**Figure 68C**). Pour Spt16Mp, une fuite d'expression du gène rapporteur *HIS3* est observée en absence d'expression de la protéine Gal4-AD-Bcd1 (témoin négatif).

Ces données indiquaient que l'interaction entre Bcd1p et Rtt106p s'appuie sur des éléments structuraux spécifiques présents uniquement dans les domaines PH de Rtt106p.

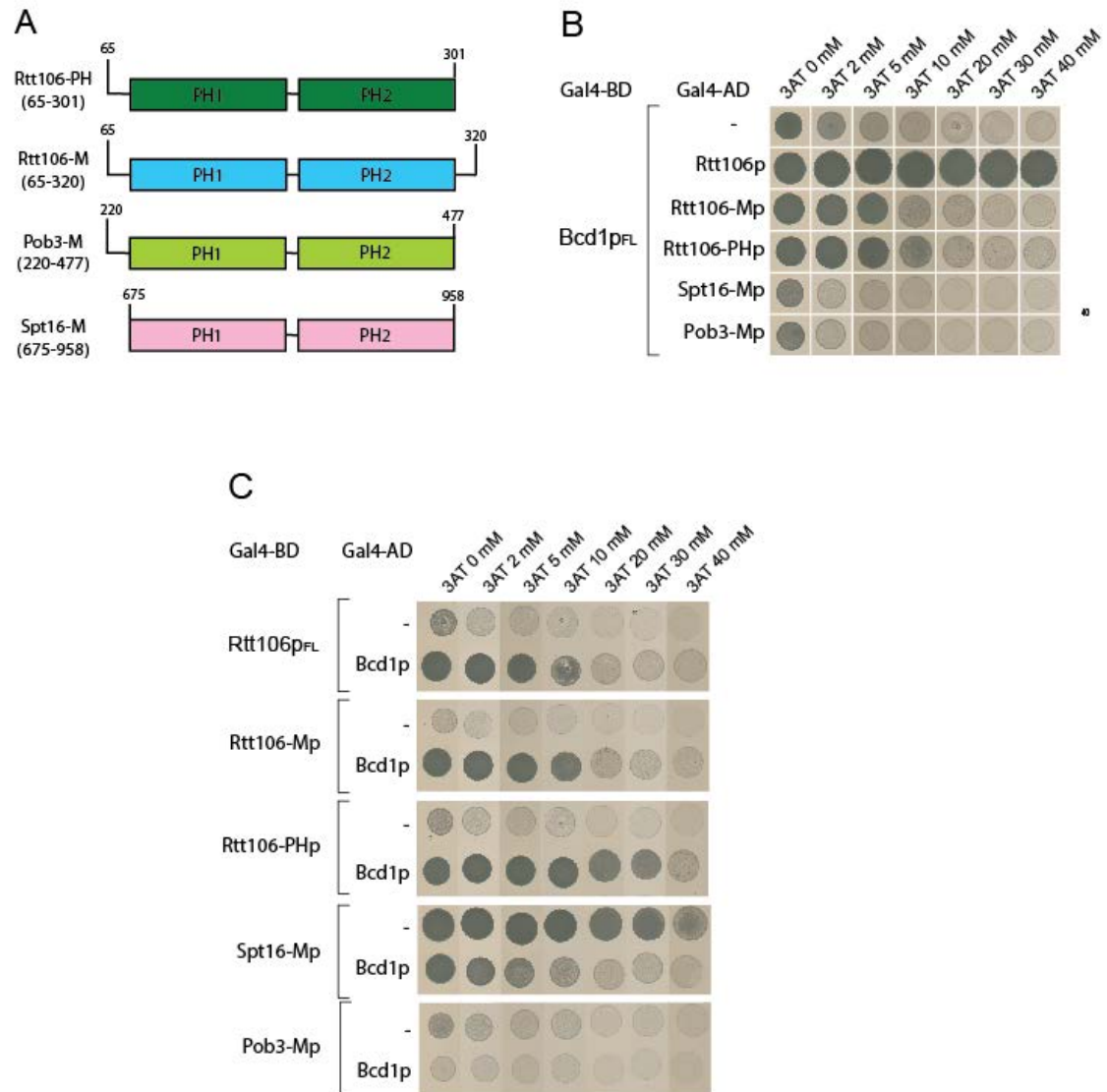


Figure 68 : Recherche d'une interaction par double hybride entre Bcd1p et Rtt106Mp/PHp, et Pob3Mp et Spt16Mp. (A) Représentation schématique des fragments contenant les doubles domaines PH des protéines Rtt106, Pob3 et Spt16. **(B)** Test de double hybride. Bcd1p a été exprimée à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD) et les fragments Rtt106p, Rtt106Mp, Rtt106PHp, Pob3Mp et Spt16Mp à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD). **(C)** Test de double hybride. Bcd1p a été exprimée à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD) et les fragments de Rtt106p, Pob3p et Spt16Mp à partir du vecteur. pGBKT7 (Gal4-BD). Les tests d'interaction ont été réalisés par croisement des souches CG1945 (pACT2) et Y187 (pGBKT7) transformées par chacun des vecteurs, et étalement sur milieu sélectif sans histidine, en présence d'une gamme de concentration croissante en 3-aminotriazol. La lecture des résultats a été faite après 72 h de croissance à 30°C.

1.2.3 Le remplacement du doigt de zinc de Bcd1p par celui de Hit1p ne modifie pas l'interaction avec les domaines PH de Rtt106p

Le ZnF de Bcd1p étant un motif connu comme potentiellement impliqué dans les interactions entre protéines (Garton et al., 2015), celui-ci pouvait contribuer à l'interaction de Bcd1p avec Rtt106p. Vu la grande conservation de la séquence primaire entre le ZnF de Bcd1p et celui de Hit1p, ainsi que la conservation des structures tridimensionnelles, établies par RMN au laboratoire, entre les domaines de ces deux protéines, nous avons testé si le remplacement du ZnF de Bcd1p avec celui de Hit1p pouvait avoir un effet sur la capacité de Bcd1p à interagir en Y2H avec Rtt106p. Hit1p n'interagit pas avec Rtt106p en Y2H, donc si l'interaction entre Bcd1p et Rtt106p s'appuyait uniquement sur le motif ZnF de Bcd1p, les éléments différents de séquence par rapport à Hit1p pouvaient fournir des repères importants concernant la spécificité de cette interaction. Ceci n'excluait pas que des régions supplémentaires d'interaction puissent exister dans le domaine Bcd1p₄₆₋₃₆₆.

Dans les conditions testées, l'interaction entre la protéine hybride Bcd1₍₄₆₋₃₆₆₎ZFHit1₍₁₋₄₅₎ et les divers fragments contenant des doubles domaines PH suivent un modèle de croissance identique que celui retrouvé dans le cas de Bcd1pFL. L'interaction entre la protéine hybride et Rtt106p n'est pas affectée, l'interaction avec le double domaine PH de Rtt106p est comparable à l'interaction de Bcd1p de type sauvage, et elle n'interagit pas avec les autres doubles domaines PH de Pob3p et Spt16p (**Figure 69**). Ces observations indiquaient que le domaine ZnF de Bcd1p n'est pas impliqué dans l'interaction avec Rtt106p.

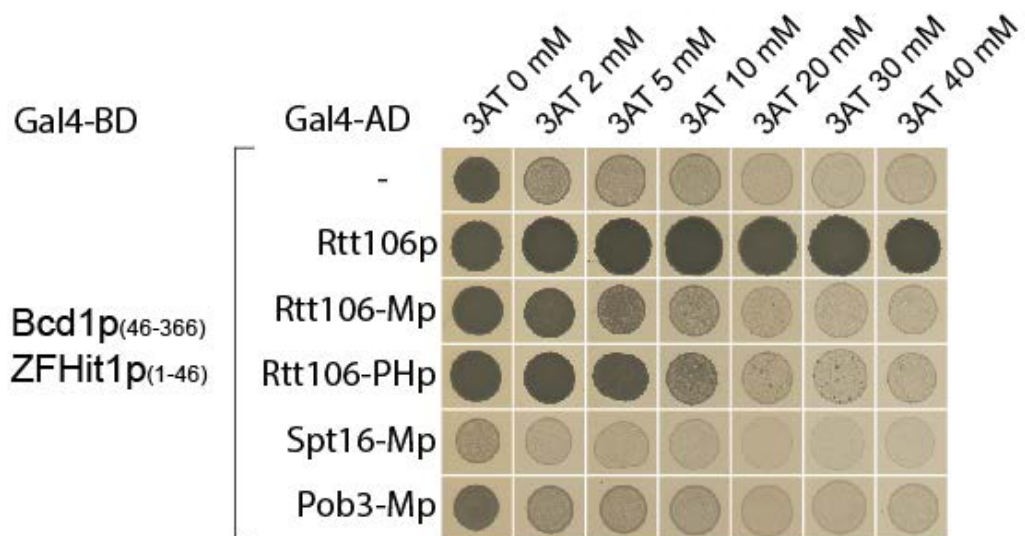


Figure 69 : Recherche d'une interaction par test double hybride entre Bcd1p₄₆₋₃₆₆ZFHit1p₁₋₄₆ et Rtt106Mp, Rtt106PHp, Pob3Mp et Spt16Mp. Les fragments de Bcd1p ont été exprimés à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD) et les protéines Rtt106p, Rtt106Mp, Rtt106PHp, Pob3Mp et Spt16Mp à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD). Les conditions des tests sont identiques à celles de la **Figure 68**.

1.2.4 Recherche de régions spécifiques d'interaction présentes dans le double domaine PH de Rtt106p et potentiellement impliquées dans l'interaction avec Bcd1p

Nos résultats montraient donc que le double domaine PH de Rtt106p est impliqué dans l'interaction avec Bcd1p. La force de l'interaction est néanmoins diminuée par rapport à une protéine Rtt106 entière ce qui indique le fait que d'autres éléments structuraux présents dans les parties N-terminale ou C-terminale de Rtt106p pouvaient participer à cette interaction. Notamment, la présence d'un domaine de dimérisation dans la région N-terminale soutient l'hypothèse selon laquelle l'interaction entre Bcd1p est plus forte avec des dimères de Rtt106p qu'avec des protéines individuelles.

Des acides aminés potentiellement impliqués dans l'interaction Bcd1p-Rtt106p peuvent être recherché en superposant la structure des domaines PH de Rtt106p avec la structure des domaines PH des autres protéines contenant le même motif mais qui n'interagissent pas avec Bcd1p. En effet, les structures 3D des fragments contenant le double domaine PH des protéines Pob3M et Spt16M ont été résolues (Kemble *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2012; VanDemark *et al.*, 2006)(Pob3p PDB No 2GCJ. Spt16p PDB No 4IOY). Une superposition entre la structure du fragment Rtt106p₆₈₋₃₁₅ et celle de Pob3Mp₂₂₀₋₄₇₈ (Su *et al.*, 2012) montre une différence importante entre la surface de Rtt106p et celle de Pob3p. L'hélice $\alpha 2$ de Rtt106p (aa 162-181) et l'hélice $\alpha 2$ de Pob3p sont orientées différemment l'une par rapport à l'autre (**Figure 70**). Cette hélice représente une surface potentielle d'interaction avec Bcd1p. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons générés des variants de Rtt106p, Rtt106Mp et Pob3M qui ont été testés pour leur interaction avec Bcd1p.

- **Mutation 1** : **Rtt106p**_(Δ162-179). La séquence codant les acides aminés 162 à 179 de Rtt106p a été éliminée. Ce variant a été créé afin de tester l'effet de la délétion de l'hélice supposée être impliquée dans l'interaction avec Bcd1p. Le résultat attendu était une perte d'interaction avec Bcd1p en raison d'une perte de la surface d'interaction dans Rtt106p (**Figure 70A**).
- **Mutation 2** : **Rtt106Mp**_(Δ162-179). Comme dans le mutant précédent, une délétion de la séquence codant les acides aminés 162 à 179 de Rtt106Mp₆₅₋₃₂₀ a été effectuée. Le variant obtenu permettait de tester le même effet que pour la protéine entière (**Figure 70A**).
- **Mutation 3** : **Pob3Mp**_(Δ331-346). La séquence codant les acides aminés 331 à 346 de Pob3Mp a été éliminée. Ce variant a été créé afin de tester l'effet d'une perte de ce domaine dans Pob3Mp. La position différente occupée par ce domaine pouvait jouer un rôle négatif, en modifiant l'exposition de certains acides aminés potentiellement impliqués dans la formation d'une surface d'interaction avec Bcd1p (**Figure 70B**).
- **Mutation 4** : **Pob3Mp**_(Δ318-367) / **Rtt106p**₍₁₅₈₋₁₉₉₎. La séquence codant les acides aminés 318-367 de Pob3Mp a été remplacée par la séquence codant les aminoacides 158-199 de Rtt106p. Si l'hélice $\alpha 2$ de Rtt106p est importante pour l'interaction avec Bcd1p, le remplacement de l'hélice $\alpha 2$ de Pob3Mp avec celle de Rtt106p pouvait restaurer une interaction avec Bcd1p. Cette hypothèse est uniquement valable si l'hélice $\alpha 2$ de Rtt106p est suffisante pour établir une interaction avec Bcd1p (**Figure 70C**).
- **Mutation 5** : **Pob3Mp**_(Δ323-352) / **Rtt106p**₍₁₆₃₋₁₈₁₎. La séquence codant les acides aminés 323-352 de Pob3Mp a été remplacée par la séquence codant les aminoacides 163-181 de Rtt106p. Cet hybride a été construit en suivant la même stratégie avec le précédent, la différence qui existe entre les deux est représentée par le choix des limites des domaines remplacés, qui ont été restreintes pour les deux protéines (**Figure 70D**).

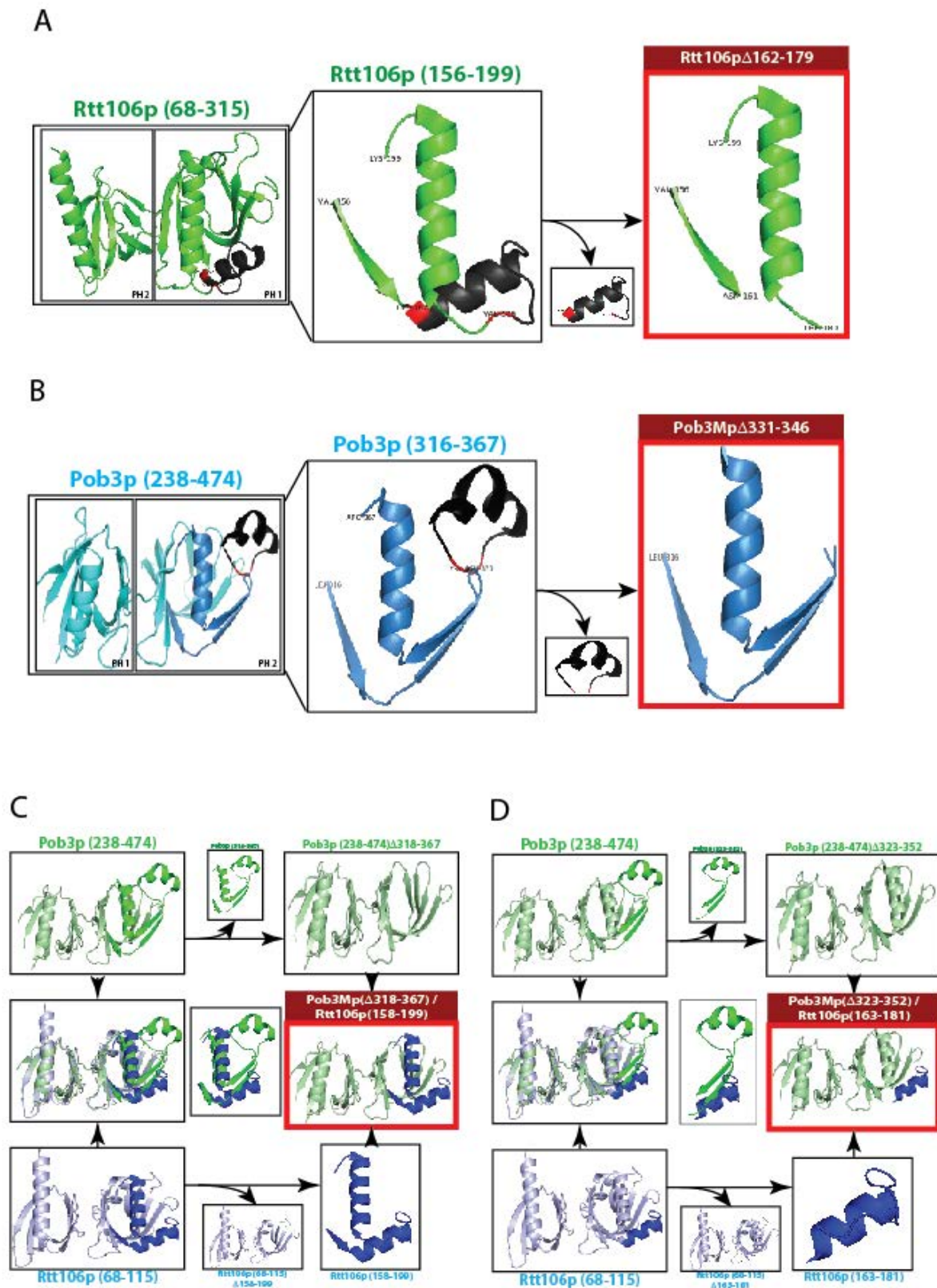
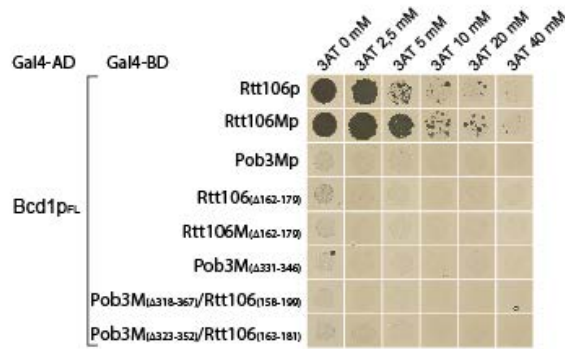


Figure 70 : Représentation des variants de Rtt106p, Rtt106Mp et Pob3Mp. Les codes PDB sont les suivants : 2GCJ pour Pob3p (VanDemark *et al.*, 2006) et 3TVV pour Rtt106p (Su *et al.*, 2012).

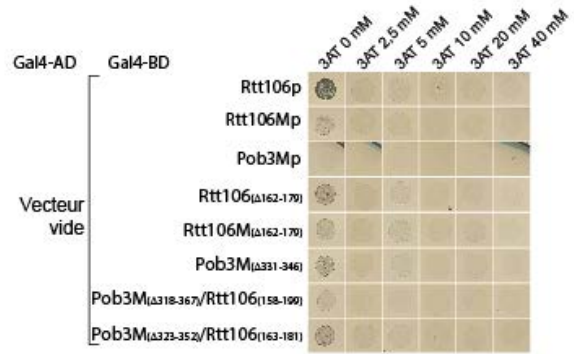
Les effets des mutations ont été testés en Y2H. Les expériences ont été réalisées avec Bcd1p fusionnée au domaine activateur de la protéine Gal4 (Gal4-AD, vecteur pACT2) et chacune des protéines variantes fusionnées avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4-BD, vecteur pGBK-T7) (**Figure 71A**), ou dans le sens inverse, la protéine Bcd1 fusionnée au domaine Gal4-BD et les protéines variantes fusionnées au domaine d'activation Gal4-AD (**Figure 71B**).

Aucune des constructions testées ne restaure l'interaction avec Bcd1p. Par contre, la protéine Rtt106 et ses deux domaines PH (Rtt106Mp), qui ont été testés en tant que témoins positifs, interagissent avec Bcd1p jusqu'à une concentration en 3-AT d'environ 5 mM. Ce résultat indique que la région 162-179 de Rtt106p est nécessaire pour l'interaction avec Bcd1p. Cependant elle ne semble pas suffisante. En effet sa présence dans la structure de Pob3p (variant Pob3Mp_(Δ323-352)/Rtt106p₍₁₆₃₋₁₈₁₎) ne conduit pas à la formation d'une interaction.

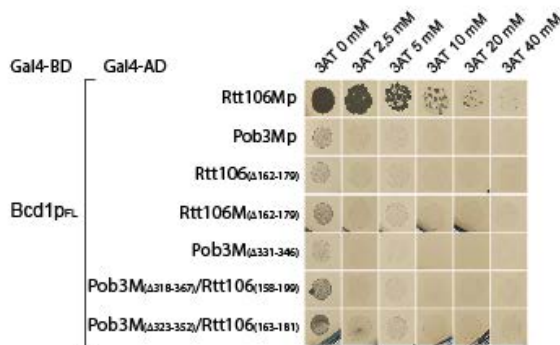
A



B



C



D

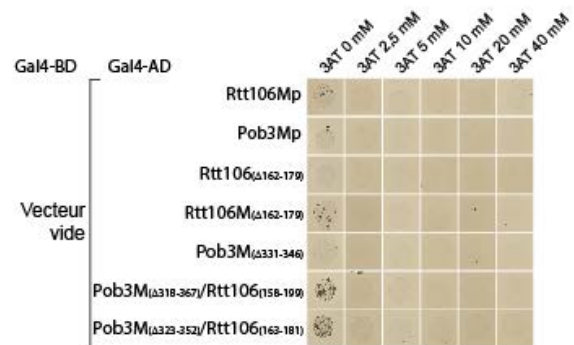


Figure 71 : Recherche d'une interaction par double hybride entre Bcd1p et les variants de Rtt106p et Pob3M et les protéines hybrides Pob3M-Rtt106M. Bcd1p a été exprimée à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD) dans les panneaux (A et B) et à partir de pGBKT7 (Gal4-BD) dans les panneaux (C et D), et les protéines variantes issues de Rtt106p et Pob3p à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD) dans les panneaux (A et B) et à partir de pACT2 (Gal4-AD) dans les panneaux (C et D). Les conditions des tests sont identiques à celles de la Figure 68.

2 Recherche de l'interaction *in vivo* entre Bcd1p et Rtt106p par co-immunoprécipitation.

Des expériences de coexpression chez *E. coli* ont confirmé la présence d'une interaction directe entre Bcd1p et Rtt106p. Ces données étaient encourageantes, et complétaient les résultats obtenus en double hybride. Benoît Bragantini a ensuite produit et purifié chacune des protéines sous forme recombinantes chez *E. coli* et étudié leur interaction en utilisant la technique de microcalorimétrie (ITC).

Nous avons cherché à détecter par co-immunoprécipitation (co-IP) l'interaction entre Bcd1p et Rtt106p dans les cellules de levure. Nous avons construit les souches de *S. cerevisiae* RTT106-TAP x Gal-3HA-BCD1 et BCD1-TAP x Gal-3HA-RTT106 dans lesquelles chacune des deux protéines d'intérêt sont exprimées soit fusionnées à une étiquette TAP, soit une étiquette formée de 3 répétitions de l'épitope HA (3HA). De plus, l'expression de la protéine portant l'étiquette 3HA a été placée sous le contrôle du promoteur Gal, qui permet la répression de l'expression de cette protéine en présence de glucose (cf. **Matériel et méthodes**). Ces expériences ont été réalisées en utilisant les deux protéines comme proie ou comme appât. Un traitement par formaldéhyde a été utilisé dans certaines expériences afin de stabiliser une éventuelle interaction entre les deux partenaires.

Dans la **Figure 72A** la protéine Bcd1 contenant l'étiquette 3HA a été utilisée comme appât, et l'identification de la protéine RTT106 a été faite en utilisant des anticorps dirigés contre l'étiquette TAP fusionnée à l'extrémité C-terminale de la protéine. Les deux protéines peuvent être visualisées dans l'input (piste 1). Elles sont absentes dans la piste 2 (IP-, la protéine appât n'est pas immunosélectionnée sur les billes magnétiques car des anticorps anti-HA n'ont pas été rajoutés à la réaction), et dans la piste 4 (souche témoin utilisée *RTT106-TAP*, la protéine Bcd1 endogène n'est pas fusionnée à une étiquette 3HA). Dans la piste 3 on détecte bien l'appât (3HA-BCD1), mais pas la protéine proie (RTT106).

Dans la **Figure 72B** le test a été réalisé dans le sens inverse par rapport à la **Figure 72A** : Rtt106p a été utilisée comme appât et Bcd1p comme proie. Les extraits cellulaires ont été traités (droite) ou non (gauche) avec formaldéhyde 1.3% afin de stabiliser une éventuelle interaction labile entre les deux partenaires. En plus, des cellules en phase stationnaire (bas) ou exponentielle (haut) de croissance ont été analysées. A chaque fois, deux échantillons ont été traités et analysés. Comme dans la **Figure 72A**, la protéine proie (Rtt106p) n'est pas détectée par cette technique dans aucune des conditions testées.

Ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction directe entre les deux partenaires *in vivo* (**Figure 72**). Les raisons peuvent être multiples :

- (i) les deux protéines interagissent à un moment spécifique du cycle cellulaire. Ainsi quand les cellules sont cultivées de manière asynchrone, la quantité des protéines interagissant n'est pas suffisante pour être visualisée par l'approche de co-IP. Pour vérifier cette hypothèse il serait nécessaire de réaliser des cultures dans des conditions permettant de synchroniser les cellules au même stade du cycle cellulaire.
- (ii) le rôle fonctionnel de cette interaction n'étant pas encore identifié, il est possible que les deux partenaires interagissent dans un compartiment cellulaire restreint ce qui réduit la quantité de complexes formés; la protéine Rtt106 réalise des fonctions bien connues, il est possible que son rôle dans des fonctions cellulaires impliquant Bcd1p soit un rôle mineur, mettant en jeu de faibles quantités de protéine.
- (iii) les deux protéines interagissent très transitoirement dans les cellules, conduisant à un taux très faible de complexe.
- (iv) les deux protéines n'interagissent pas *in vivo*. Dans ce cas l'interaction identifiée représenterait un artefact sans rôle fonctionnel chez *S. cerevisiae*.

Nous envisageons d'autres approches pour vérifier l'existence de cette interaction *in vivo*:

- (i) la surexpression des deux protéines dans des cellules de levure par des vecteurs d'expression de type p413 TEF ou GPD. Cependant, cette méthode ne respecte pas les conditions physiologiques de l'interaction, mais un résultat positif pourrait appuyer l'hypothèse de la possibilité de cette interaction *in vivo*.
- (ii) utilisation de la méthode de duo-link, dont la sensibilité est bien plus importante par rapport aux expériences d'immunoprécipitation. Par cette méthode, deux anticorps primaires provenant d'espèces différentes, l'un contre la première protéine et l'autre contre la deuxième sont utilisés. L'anticorps secondaire est attaché à un oligonucléotide d'ADN. Lorsque les deux anticorps secondaires sont très proches, les brins d'ADN peuvent interagir par le biais d'une addition ultérieure de deux autres oligonucléotides d'ADN afin de former des ADN circulaires, qui sont amplifiés par une polymérase et ensuite les copies amplifiées sont visualisées avec des sondes spécifiques.

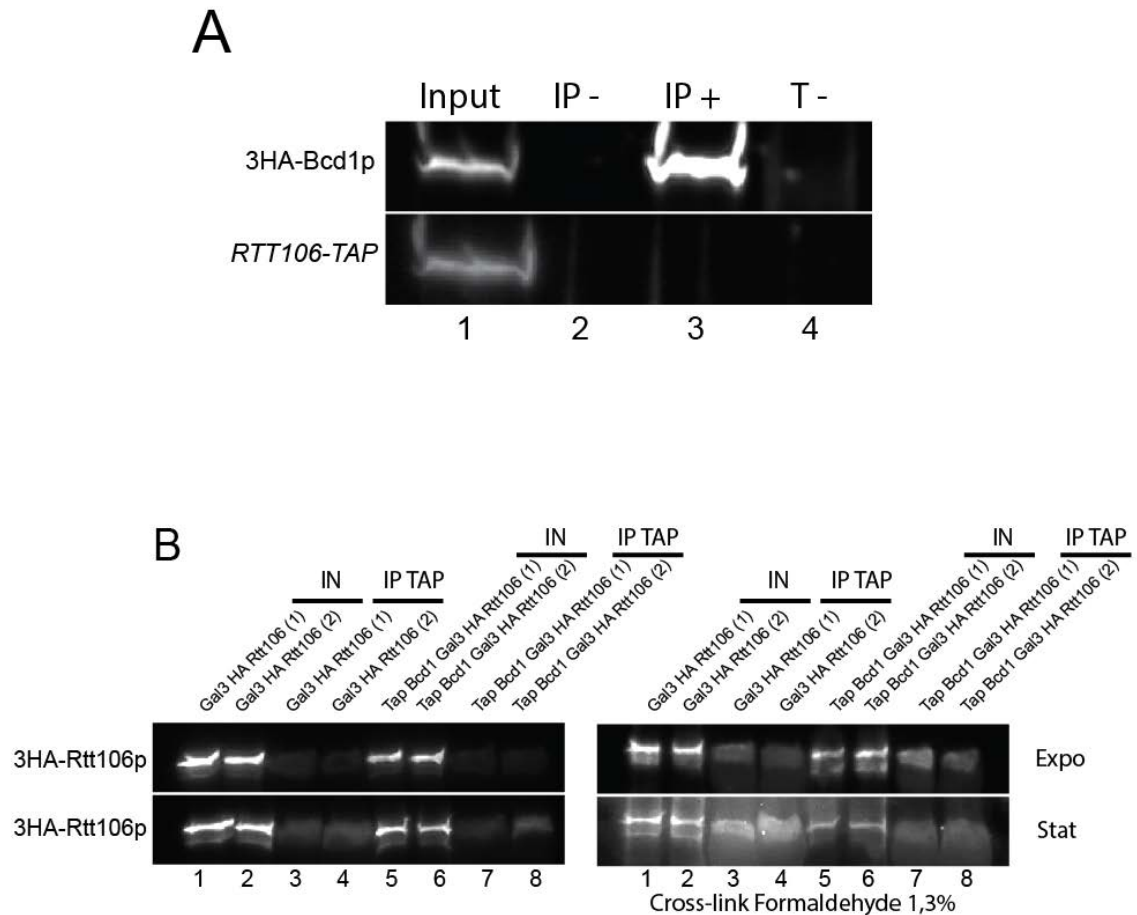


Figure 72 : Tests de co-immunoprécipitation de Rtt106p et Bcd1p. (A) Souche Gal-3HA-Bcd1xTAP-RTT106. **(B)** Souche Gal-3HA-Rtt106xTAP-BCD1. L'immunosélection a été réalisée sur des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-HA (A) ou des billes IgG Sépharade (B), dans du tampon contenant 150 mM NaCl. Les protéines co-sélectionnées ont été analysées par Western-blot. Une souche n'exprimant pas la protéine HA-Bcd1 **(A)** ou Bcd1-TAP **(B)** a été utilisée en témoin. **(B)** Expériences réalisées par H. Marty. Droite: les cellules ont été traitées par crosslink au formaldéhyde 1,3% avant l'extraction des protéines totales. Gauche: Pas de traitement. Les cellules ont été récoltées en phase exponentielle de croissance (1 unité $A_{600nm/mL}$), ou stationnaire (>4 unités $A_{600nm/mL}$)

3 Etude du rôle de Rtt106p dans la biogenèse des snoRNP

La première question qui s'est posée après l'identification de Rtt106p comme partenaire potentiel de Bcd1p était de savoir si cette interaction jouait un rôle dans le processus de biogenèse des snoRNP, et en particulier dans celle des snoRNP à boîtes C/D. L'identification d'un nouvel acteur dans ce processus pouvait accélérer la compréhension des étapes de maturation de ces particules.

3.1 L'absence d'expression de Rtt106p n'a pas d'effet visible sur le taux des snoARN chez *S.cerevisiae*

Nous avons analysé par Northern blot le taux d'une série de snoARN à boîtes C/D dans une souche $\Delta RTT106$ invalidée pour l'ORF *RTT106*, en utilisant des cellules en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Les snoARN à boîtes C/D testés ne semblent pas significativement affectés dans la souche $\Delta RTT106$. On note toutefois de façon reproductible une augmentation des taux des snoARN U14 et U24 (effet visible seulement en phase exponentielle de culture lorsque les cultures sont arrêtées à une densité optique $A_{600nm} = 1$) mais également du taux du snRNA U6. Cependant, il est également observé une augmentation du taux de ces ARN non codant dans les souches $\Delta LIN1$ et $\Delta YNL165W$ (**Figure 73**).

3.2 La surexpression de Rtt106Mp, mais pas celle de Rtt106p apparaît avoir un impact sur le taux de certains snoARN

Afin de compléter l'étude de l'effet observé sur les taux de snoARN U14 dans la souche $\Delta RTT106$ nous avons surexprimé la protéine Rtt106 et le fragment contenant le double motif PH (Rtt106M), à partir du vecteur p413TEF, dans une souche sauvage BY4741 et dans une souche $\Delta PIH1$. Le choix de la souche $\Delta PIH1$ a été fait en se basant sur l'observation d'un défaut sévère de croissance de cette souche quand elle est transformée par le vecteur p413 contenant l'ORF *RTT106*, qui pouvait montrer un possible effet synergique sur la croissance cellulaire et en conséquence un possible effet sur l'expression des snoARN.

L'analyse par Northern blot des ARN extrait des cellules surexprimant les protéines montre une augmentation du taux des snoARN snR190, snR45 et U14 lorsque la protéine Rtt106M est surexprimée dans la souche sauvage, augmentation qui n'est pas observée dans le cas d'une surexpression de la protéine entière (**Figure 74**). La surexpression ne conduit pas de tels effets dans la souche $\Delta PIH1$.

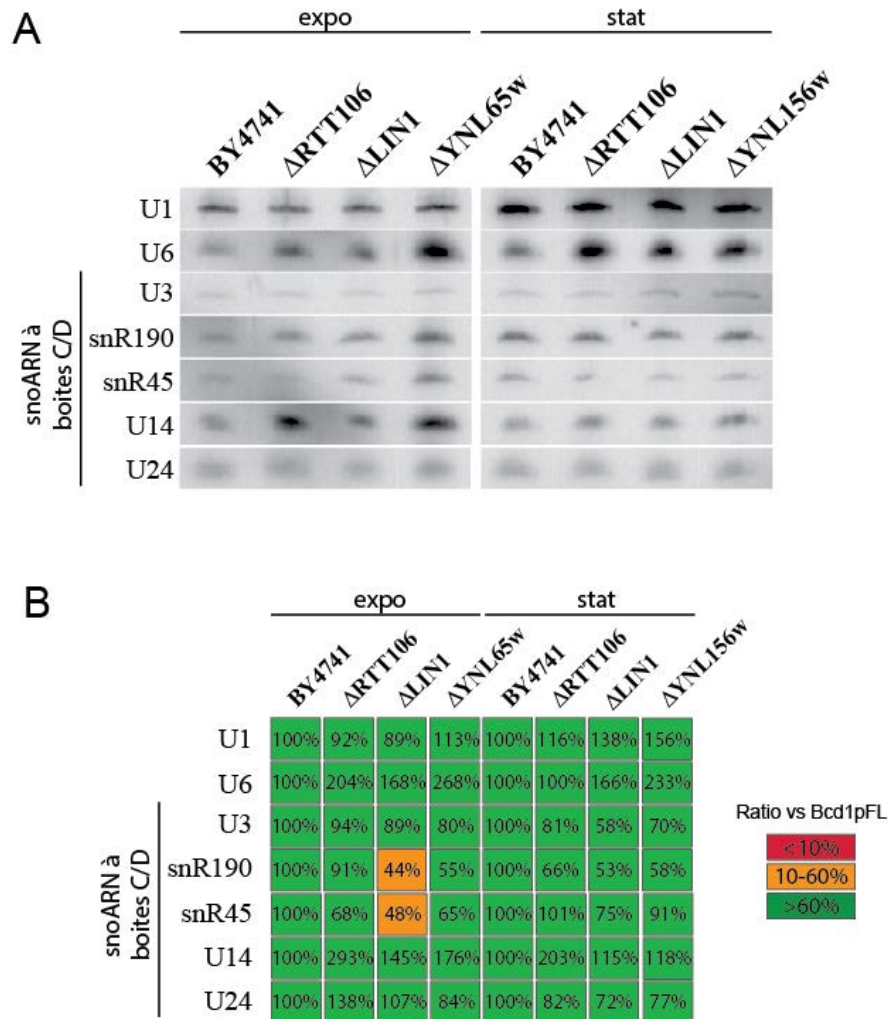


Figure 73 : Analyse du taux des snoARN à boîtes C/D par Northern-blot dans diverses souches de levure invalidées pour les gènes codant des protéines candidates pour l'interaction avec Bcd1p. (A) Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules cultivées en milieu riche et récoltées en phase exponentielle de croissance (1 unité $A_{600nm/mL}$) (panneau de gauche) ou en phase stationnaire de croissance (>4 unités $A_{600nm/mL}$) (panneau de droite). Les conditions du Northern blot sont décrites en Matériel et Méthodes. L'effet lié à l'absence de diverses protéines sur les taux de snoARN a été comparé à l'effet observé dans une souche sauvage BY4741. Le snARN U1 a été utilisé comme contrôle interne. **(B)** Quantification des signaux obtenus en (A). Le ratio entre le snRNA U1 dans la souche sauvage et les autres souches a été calculé. Pour les autres ARN, le ratio a été calculé par rapport à la souche sauvage et a été ajusté en fonction du taux de snRNA U1 dans la souche sauvage en phase exponentielle ou stationnaire de croissance.

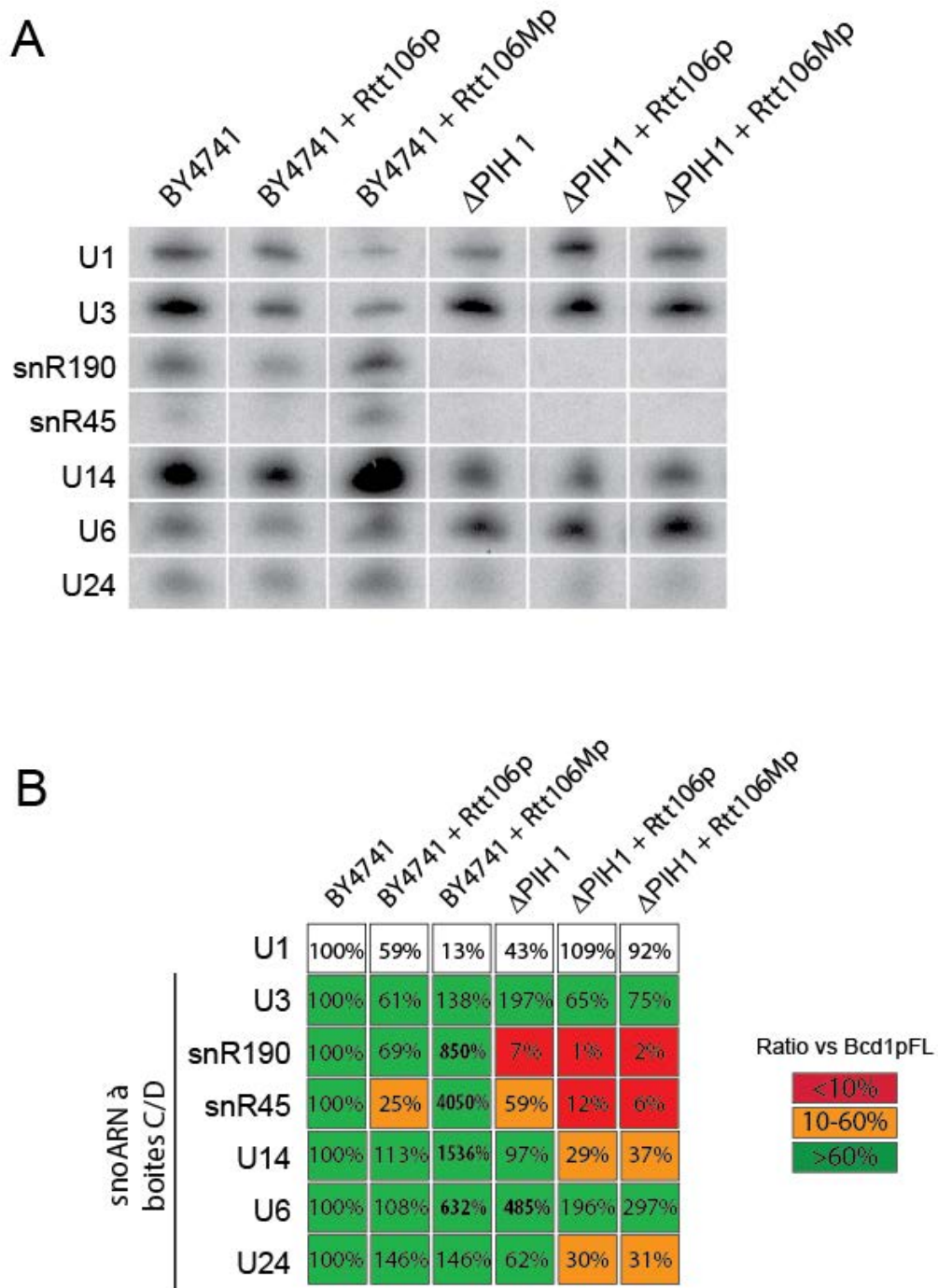


Figure 74 : Analyse du taux des snoARN à boîtes C/D par Northern-blot dans des souches surexprimant la protéine de pleine taille Rtt106p ou le fragment Rtt106Mp. Les protéines ont été exprimées à partir du vecteur p413TEF (*HIS3*). Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules cultivées en milieu riche YPD et récoltées en phase exponentielle de croissance, à 1 unité A_{600nm}/mL . L'effet lié à la présence des divers fragments de Bcd1p sur les taux de snoRNA a été comparé à l'effet observé dans une souche sauvage BY4741 et dans la souche $\Delta PIH1$ non transformée. Le snoARN U1 a été utilisé comme contrôle interne.

3.3 La double délétion des gènes codant Bcd1p et Rtt106p a un effet cumulatif sur la croissance cellulaire dans une souche $\Delta RTT106$ x Gal-3HA-BCD1

La croissance cellulaire n'est pas affectée par la délétion de l'ORF *RTT106*. Mais compte tenu de l'interaction observée avec la protéine Bcd1, nous avons recherché un possible effet dans le cas où les deux protéines sont absentes dans la cellule. Afin de réaliser cette expérience, nous avons construit par la méthode de recombinaison homologue (Longtine et al., 1998), la souche $\Delta RTT106$ x Gal-3HA-BCD1 invalidée pour l'ORF *RTT106* dans laquelle le promoteur endogène de la protéine Bcd1 a été remplacé par un promoteur inductible par le galactose (promoteur Gal). De plus, la protéine Bcd1 est produite sous une forme fusionnée avec une triple étiquette HA (étiquette 3HA).

La croissance cellulaire est ralentie sur un milieu contenant du glucose (protéine Bcd1 non exprimée) dans le cas de la souche $\Delta RTT106$ x Gal-3HA-BCD1 par rapport aux souches parentales $\Delta RTT106$ et Gal-3HA-BCD1 dans des conditions de croissance à trois températures différentes (20°C, 30°C et 37°C) (**Figure 75**). Le défaut de croissance cumulatif quand les deux protéines sont absentes suggère une possible implication de Rtt106p dans les mêmes processus cellulaires que Bcd1p ou inversement. La croissance cellulaire sur un milieu solide contenant du galactose (présence de Bcd1p) ne montre pas des différences entre les trois souches testées. Il s'agit d'un résultat important car il représente un argument supplémentaire en faveur d'un lien fonctionnel entre Bcd1p et Rtt106p.

3.4 Recherche d'une interaction entre Rtt106p et Pih1p ou Rrp9p par double hybride

Nous avons la connaissance que Bcd1p s'associe avec la protéine Rrp9 spécifique de la snoRNP U3 et la protéine Pih1 du complexe R2TP. Nous avons testé l'interaction par Y2H de ces partenaires identifiés de Bcd1p avec la nouvelle protéine candidate Rtt106p. Les résultats ne montrent pas d'interaction entre Rtt106p et ces deux protéines (**Figure 76**).

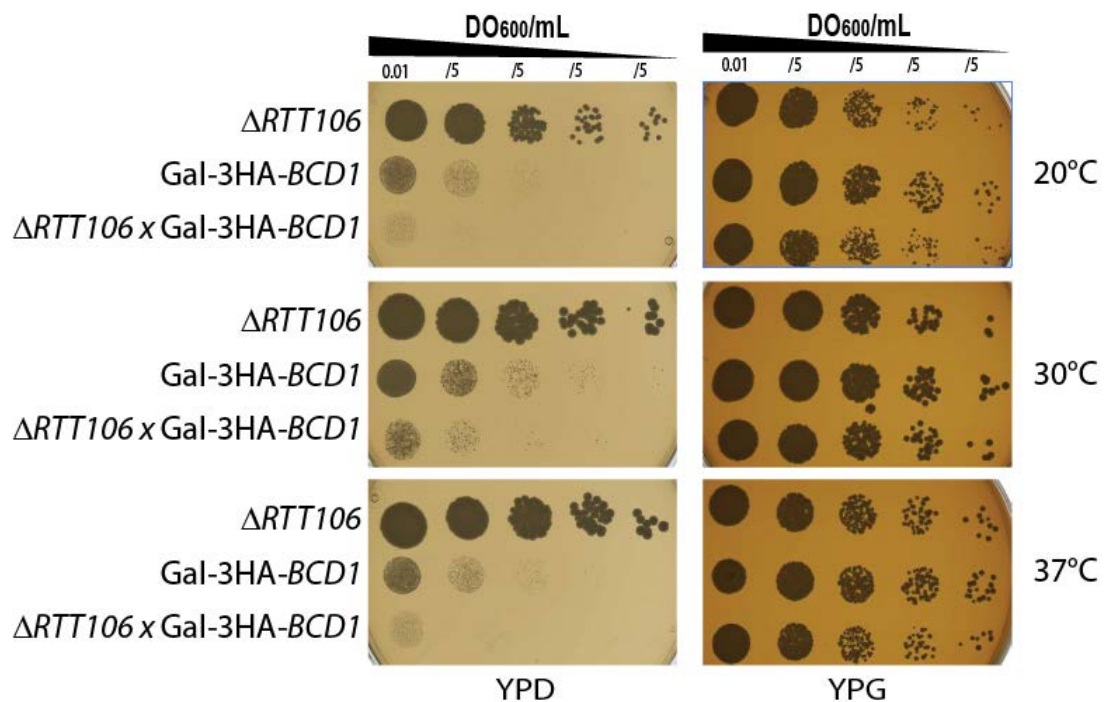


Figure 75 : Test de croissance cellulaire de la souche $\Delta RTT106 \times Gal-3HA-BCD1$. La croissance a été évaluée sur milieu riche contenant du glucose (YPD) qui inhibe l'expression de la protéine Bcd1. Le test a été réalisé par dilution en cascade (facteur : 1/5) à partir d'une suspension de cellules à 0,01 unités A_{600nm}/mL . Les cellules ont été prélevées directement à partir des boîtes de Pétri et dispersées dans 1 mL d'eau stérile avant l'étalement. Les panneaux situés à droite montrent la croissance sur milieu riche contenant du galactose (YPG) qui permet l'expression de la protéine Bcd1. La croissance a été évaluée après 72 h d'incubation à 20°C, 30°C et 37°C.

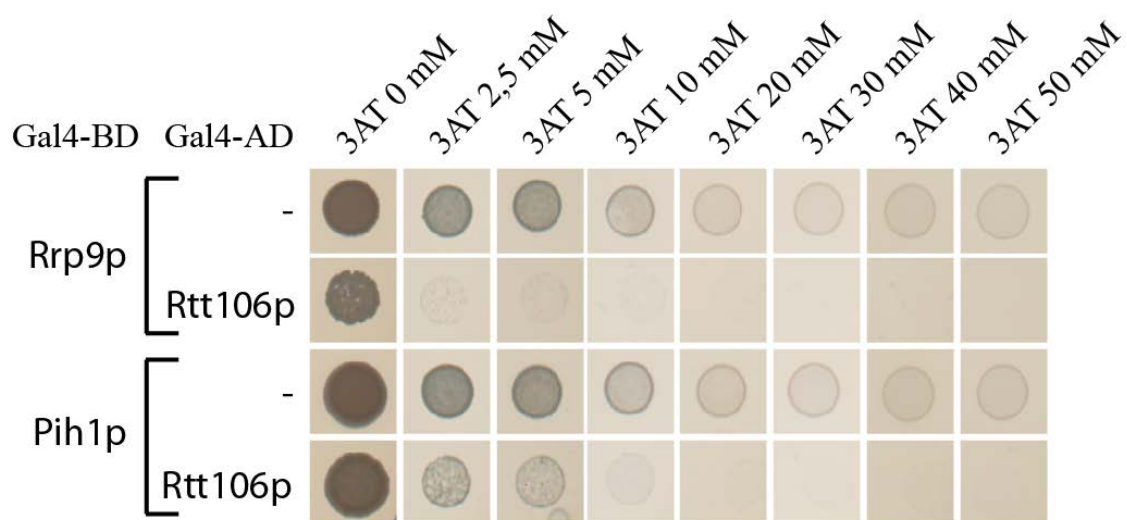


Figure 76 : Recherche d'une interaction par double hybride entre Rtt106p et Rrp9p ou Pih1p. Rtt106p a été exprimée à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD) et les protéines Rrp9p et Pih1p à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD). Les conditions des tests sont identiques à celles de la Figure 68.

3.5 Test de l'interaction entre Bcd1p, Rtt106p et Rrp9p dans une souche invalidée pour *PIH1*

Pour aller au bout de l'analyse d'un lien fonctionnel possible entre Rtt106p et la machinerie d'assemblage des snoRNP C/D, nous avons également testé l'interaction entre Bcd1p et Rtt106p ou Rrp9p dans une souche invalidée pour l'ORF *PIH1*. Les expériences de Y2H ont été réalisées en utilisant deux souches Y187 Δ *PIH1* et Y190 Δ *PIH1* adaptées pour réaliser des tests Y2H et génétiquement modifiées par B. Rothé.

En absence de Pih1p, Bcd1p interagit toujours en Y2H avec ses deux partenaires (Figure 77).

3.6 Vérification d'un lien génétique entre *RTT106* et les gènes codant d'autres facteurs impliqués dans la biogenèse de snoRNP

Un crible GIM (Genetic Interaction Mapping) effectué par B. Rothé en collaboration avec C. Saveanu (Institut Pasteur, Paris) à partir d'une souche de levure Δ *RSA1* avait permis d'identifier que la délétion supplémentaire de l'ORF *RTT106* conduisait à une croissance plus rapide des cellules (Rothé, 2012). Pour vérifier à nouveau cet effet épistatique et l'étudier, il était nécessaire de disposer d'une souche isolée et invalidée pour les deux ORF. En effet le crible GIM ne conduisait pas à l'isolement de souches mais à l'identification des souches présentes dans un mélange par hybridation sur puces.

Dans une première approche, une souche Δ *RTT106* x Δ *RSA1* a été isolée à partir de diploïdes obtenus après croisement de la souche BY4742 Δ *RSA1* (*Mat* α , KanMX4 = gène de résistance à la kanamycine) avec la souche BY4741 Δ *RTT106* (*Mat* *a*, KanMX4) puis dissection des tétrades. Le fond génétique de cette souche doublement invalidée n'est donc pas le même que celui obtenu à l'issue du crible GIM pour lequel la souche Δ *RSA1* (*Mat* α , NatMX4 = gène de résistance à la nourseothricine) a été croisée avec une population de souches portant des ORF invalidées par l'insertion de la cassette KanMX4 ou des souches baptisées *DAmP* (*Decrease Abundance by mRNA Perturbation*) pour lesquelles l'expression des gènes étaient diminuée par la substitution de leur séquence 3' UTR par la cassette KanMX4 (Rothé, 2012). Ainsi, les diploïdes formés portaient les deux marqueurs NatMX4 et KanMX4.

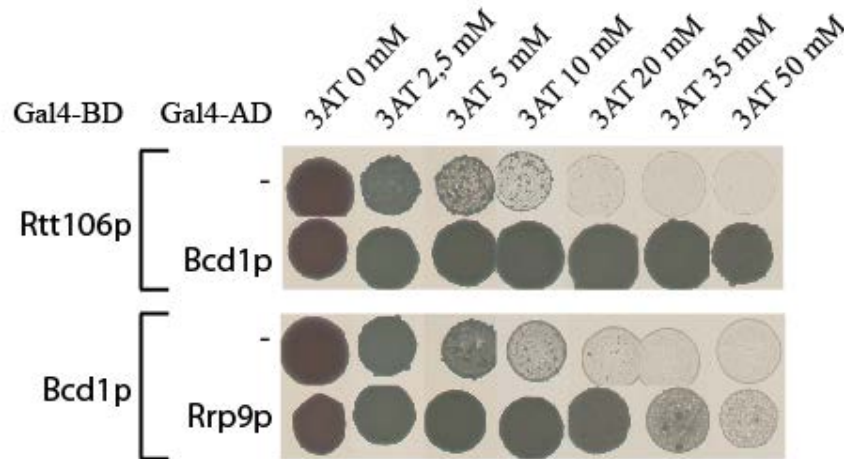


Figure 77 : Test de l'interaction par double hybride entre Bcd1p et Rrp9p ou Rtt106p en absence de Pih1p.

Bcd1p a été exprimée à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD) pour tester l'interaction avec Rtt106p et à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD) pour tester l'interaction avec Rrp9p. Rtt106p a été exprimée à partir du vecteur pGBKT7 (Gal4-BD) et Rrp9p à partir du vecteur pACT2 (Gal4-AD). Les tests d'interaction ont été réalisés par croisement des souches Y190 Δ PIH1 (pACT2) et Y187 Δ PIH1 (pGBKT7). Les conditions des tests sont identiques à celles de la **Figure 69**.

La **Figure 78** montre les résultats d'un test représentatif de croissance sur milieu riche YPD de cellules issues de chacune des 4 spores obtenues après ségrégation méiotique et dissection d'une tétrade. Les cellules de type sauvage (BY4741), parentales BY4741 Δ RSA1 et BY4741 Δ RTT106, et doublement invalidées Δ RSA1x Δ RTT106 ont été identifiées par un génotypage par PCR. L'effet des deux délétions (Δ RTT106 et Δ RSA1) dans la souche construite au laboratoire, est bien cumulatif mais contrairement aux données du crible GIM, la croissance est réduite et non pas stimulée.

Le crible GIM étudie la croissance de différents diploïdes dans un environnement compétitif, où plusieurs souches différentes cohabitent, et ce par une sélection basée sur la double résistance de diploïdes à la nourseothricine et à la kanamycine. Les résultats obtenus lors de la thèse de B. Rothé suggéraient que les cellules doublement invalidées Δ RSA1x Δ RTT106(*KanMX4-NatMX4*) bénéficient d'un avantage par rapport aux autres présentes dans le même milieu de culture. Nos données suggèrent que cet effet n'est pas observé en absence de compétition ou en absence de sélection par les deux antibiotiques. Pour trancher entre ces possibilités, cette expérience devrait être effectuée dans une souche identique à celle utilisée pour le crible génétique, nécessitant de construire une souche Δ RTT106x Δ RSA1 par croisement d'une souche Δ RSA1(*NatMX4*) portant la résistance à la nourseothricine avec une souche Δ RTT106(*KanMX4*).

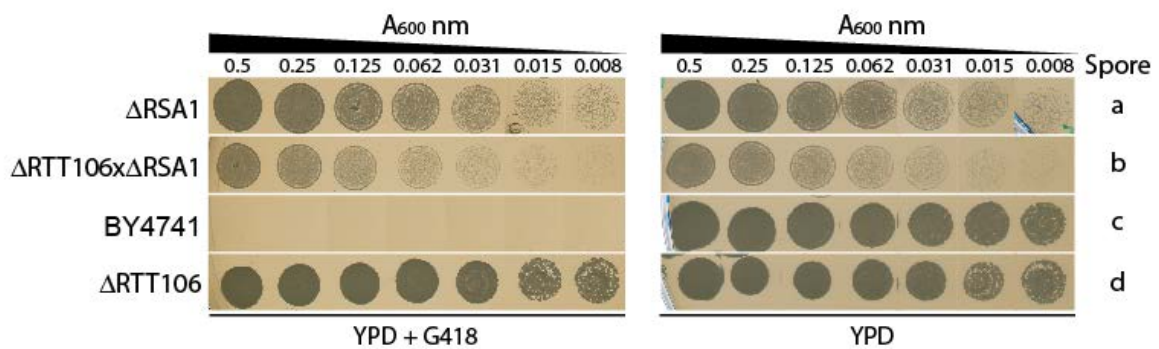


Figure 78 : Test de croissance des cellules issues des spores obtenues d'une tétrade générée après sporulation de diploïdes obtenus par croisement des souches BY4742ΔRSA1 et BY4741ΔRTT106. La croissance des souches a été évaluée sur milieu riche contenant du glucose (YPD) et la généticine G418. Le test a été réalisé par dilution en cascade (facteur : 1/5) à partir d'une suspension de cellules à 0,5 unités A_{600nm}/mL. Les cellules ont été prélevées à partir d'une préculture en phase stationnaire de croissance. Le panneau situé à droite montre la croissance sur milieu riche YPD sans antibiotique. La croissance a été évaluée après 72 h à 30°C.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Identification de Hit1p comme nouveau facteur d'assemblage des snoRNP. Au cours de ce travail, nous avons mené des études fonctionnelles visant à mieux caractériser l'interaction entre Hit1p et Rsa1p, qui agit en tant que protéine plateforme pour des interactions avec le complexe d'assemblage Hsp90-R2TP des snoRNP et avec les protéines composant les snoRNP. La formation d'un complexe Rsa1p-Hit1p avait été identifiée lors d'une analyse protéomique réalisée en collaboration avec l'équipe de S. Cianferani (LSMBO, UMR 7178 CNRS Université de Strasbourg) (Rothé, 2012). Ce complexe a ensuite pu être purifié au laboratoire à partir de la co-expression chez *E. coli* des deux protéines et la structure 3D en solution du complexe a été résolue par RMN. Pour réaliser des études fonctionnelles de l'interaction Rsa1p-Hit1p, nous avons cloné plusieurs fragments de Hit1p et nous avons évalué leur capacité à restaurer la croissance lorsqu'ils sont exprimés dans une souche invalidée pour le gène *HIT1* codant cette protéine. Par rapport à la protéine entière, le fragment Hit1p₍₇₀₋₁₆₄₎ représente le fragment minimal que nous avons trouvé interagissant avec Rsa1p et capable de rétablir une croissance cellulaire normale à 30°C et 37°C. Ces observations indiquaient que le domaine en doigt de zinc présent à l'extrémité N-terminale de la protéine n'est pas essentiel pour la fonction de Hit1p dans les conditions testées, ce qui est surprenant, vu la forte conservation qui existe entre le domaine de la protéine de levure et celui de la protéine humaine.

Nous avons mutés des résidus apparaissant sur la structure 3D à l'interface d'interaction entre Rsa1p et Hit1p. La capacité de ces variants de Hit1p à compléter le défaut de croissance de la souche $\Delta HIT1$ a été testée, et les taux de la protéine Rsa1 ont été évalués par western blot. Une corrélation a été observée entre les fragments capables de restaurer une croissance cellulaire normale et un taux de protéine Rsa1 au même niveau que celui présent dans une souche de type sauvage. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'un effet protecteur de Hit1p sur la stabilité de Rsa1p (**Article Rothé et al. 2014, Annexe 1**).

La protéine Rsa1 a été identifiée comme substrat potentiel de l'ubiquitine ligase Rsp5p (Gupta et al., 2007). L'examen de la séquence primaire de Rsa1p fait apparaître un des motifs prédits de reconnaissance par Rsp5p, le motif « PY » (séquence aa PPNY). Une hypothèse pourrait être que le rôle stabilisateur exercé par Hit1p sur Rsa1p résulterait d'une inhibition de l'activité d'ubiquitylation qui dirige Rsa1p dans la voie de dégradation par le protéasome. Dans l'objectif de tester cette hypothèse, nous avons construit un vecteur d'expression chez la levure (constructions p416-HA-RSA1-WT) exprimant Rsa1p à partir d'un promoteur Gal inducible (GalS) et la protéine Rsa1p fusionnée à l'épitope HA. De plus, nous avons réalisé deux versions variantes de p416-HA-RSA1 conduisant à l'expression de Rsa1p portant une mutation dans le motif P₉₅P₉₆N₉₇Y₉₈ présumé interagir avec Rsp5p: soit la

délétion totale du motif (p416-HA-RSA1-delPPNY) ou soit la mutation des deux aminoacides (p416-HA-RSA1-PANA). D. Rotin (Toronto, Canada) nous a fourni une souche exprimant une version thermosensible de la protéine Rsp5 (mutant *rsp5-1*) (Gupta et al., 2007) permettant à 37°C une expression réduite de Rsp5-1p endogène. Cette souche permettrait d'effectuer un test d'ubiquitylation *in vivo* de Rsa1p. Ainsi, après culture des cellules de type sauvage et mutantes *rsp5-1* transformées par les plasmides p416-HA-RSA1 WT et ses variants à une température restrictive (37°C) afin de réduire les taux endogènes de Rsp5p, une immunoprecipitation de HA-Rsa1p pourra être réalisée suivie d'une recherche par western blot de la présence d'ubiquitine. Ce test permettrait de vérifier si la protéine Rsa1 est ubiquitylée dans les cellules sauvages (WT) et si le taux d'ubiquitylation est réduit en présence des mutations du site PPNY. Ces expériences restent à être réalisées. Néanmoins, des résultats préliminaires de tests de croissance sur milieu riche YPG montrent que les mutations réalisées dans le motif « PY » de Rsa1p ne modifient pas de façon significative la croissance cellulaire par rapport à une protéine Rsa1 de type sauvage. Ainsi, l'expression de Rsa1p dans une souche Δ RSA1 conduit à un phénotype de croissance identique à la souche sauvage BY4741, ce résultat était attendu car Hit1p endogène est proposée stabiliser Rsa1p (**Figure 79** lignes 1 et 4). L'expression des formes variantes de Rsa1p ne modifie pas cette croissance (**Figure 79** lignes 4, 5 et 6). Dans la souche Δ RSA1/ Δ HIT1 n'exprimant plus Hit1p, l'expression ectopique de Rsa1p ne permet plus une croissance élevée (**Figure 79** ligne 7). En présence des variants de Rsa1p proposés inhiber l'ubiquitylation, on observe une croissance très légèrement plus élevée mais qui ne nous apparaît pas être significative (**Figure 79** pistes 8 et 9). L'absence de lien entre Hit1p et ubiquitylation de Rsa1p reste à être confirmée par le test d'ubiquitylation *in vivo* décrit ci-dessus.

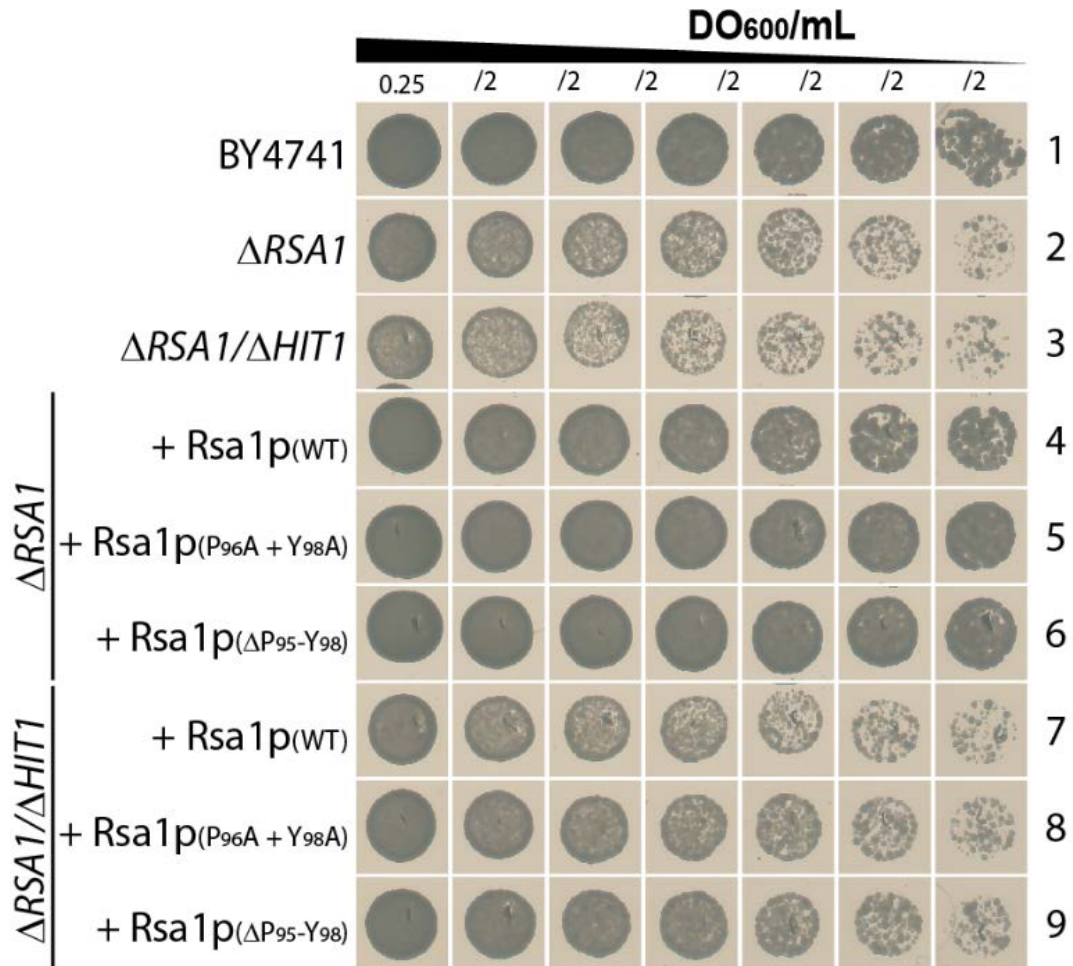


Figure 79 : Test de croissance de la souche Δ RSA1 x Δ HIT1 exprimant de façon ectopique des variants de la protéine Rsa1p. La croissance des souches a été évaluée sur milieu sélectif YPG en absence d'uracile (ura⁻). Le test a été réalisé par dilution en cascade (facteur : 1/2) à partir d'une suspension de cellules à 0,25 unités A_{600nm}/mL. Les cellules ont été prélevées à partir d'une préculture en phase de croissance stationnaire. Les divers variants Rsa1p ont été exprimés à partir du vecteur p416GalS (URA3). La croissance a été évaluée après 72 h à 30°C.

Au cours de la thèse, une analyse par tests Y2H de protéines candidates susceptibles interagir avec Hit1p a identifié un nouveau partenaire potentiel, la protéine Ahc2 (**Figure 47**). Cette protéine représente une sous-unité d'un module du complexe Histone acétyltransférase SAGA/ADA. Ce complexe contient 5 modules: (1) le module SA_TAF, composé de toutes les protéines TAF faisant partie du complexe SAGA (Taf6p, Taf5p, Taf12p, Taf9p et Taf10p), (2) le module SA_SPT, contenant toutes les protéines SPT faisant partie du complexe SAGA (Spt7p, Spt8p, Spt3p et Spt20p), Tra1p et Ada1p, (3) le module DUB, contenant Ubp8p, Sgf73p, Sgf11p and Sus1p, (4) le module HAT, contenant Gcn5p, Ada3p et Ada2p et Sgf29p et (5) le module ADA, composé des protéines Ahc1 et Ahc2. Si cette interaction est confirmée, elle représente une piste intéressante pour approfondir les fonctions cellulaires de la protéine Hit1, et en particulier son rôle dans la biogenèse des snoRNP en lien avec la structure de la chromatine (Lee et al., 2011b).

Avancées sur la structure et la fonction de Bcd1p. Par une approche similaire à celle utilisée pour Hit1p, nous avons cherché à identifier les domaines nécessaires à la fonctionnalité de Bcd1p, en utilisant une souche dans laquelle la protéine Bcd1 est placée sous expression conditionnelle. Contrairement à Hit1p, pour laquelle le domaine en doigt de zinc n'est pas nécessaire pour la fonctionnalité de la protéine, dans le cas de Bcd1p, il est apparu nécessaire mais pas suffisant pour la croissance cellulaire. Vu l'importante homologie de séquence entre les domaines en doigt de zinc de Hit1p et Bcd1p, nous avons réalisé des protéines hybrides par échange de leur domaine en doigt de zinc respectif, et nous avons testé l'effet de cet échange sur la croissance des cellules et sur le taux de snoARN. Les résultats montrent que les deux protéines hybrides sont fonctionnelles chez *S. cerevisiae* et que les taux de snoARN à boîtes C/D sont restaurés en présence de la protéine hybride Bcd1 portant le doigt de zinc de Hit1p (ZnHit1/Bcd1p) (**Figure 63**).

Nous avons identifié le domaine Bcd1p₁₋₉₆ comme étant suffisant pour compenser l'absence de la protéine endogène à 30°C et 37°C (**Figure 52**). De manière intéressante, ce fragment ne semble pas restaurer des taux normaux de snoARN à boîtes C/D, en comparaison avec une souche sauvage. L'expression d'un fragment plus long, Bcd1p₁₋₁₁₅, conduit à des taux de snoARN à boîtes C/D comparables à ceux d'une souche sauvage, avec également le niveau du snoARN U14 augmenté par rapport à une souche sauvage. Vu que le fragment Bcd1₁₋₆₂ ne restaure pas la croissance cellulaire dans une souche exprimant faiblement la protéine endogène Bcd1, des éléments importants pour la fonction de Bcd1p dans le processus d'assemblage des snoRNP à boîtes CD pourraient être présents dans la région 62-96 et également dans la région 96-115.

Concernant le domaine en doigt de zinc de Bcd1p, il s'est avéré être essentiel pour la croissance cellulaire à 37°C, mais de manière intéressante, à 30°C il n'est pas requis pour la fonction de Bcd1p. Les taux de snoARN à boîtes C/D sont en revanche affectés, car ceux-ci sont moins abondants que dans une souche sauvage, le profil ressemble à celui présent dans une souche exprimant le fragment fonctionnel Bcd1p₁₋₁₆₈. Ce résultat indique un possible rôle de ce domaine dans des conditions de stress cellulaire. Vu l'implication du complexe R2TP dans l'assemblage de particules snoRNP à boîtes C/D ainsi que celui de la chaperonne Hsp90 dans ce processus, un lien entre ce domaine et le processus de maturation des snoRNP à boîtes C/D peut être envisagé. Une autre hypothèse est plausible : il est possible que le doigt de zinc de Bcd1p participe à d'autres fonctions cellulaires exercées par Bcd1p.

Des expériences complémentaires visant à déterminer l'importance de chacun des deux domaines en doigt de zinc dans la fonctionnalité de la protéine ont été réalisées (**Article Bragantini, Tiotiu et al. 2016, Annexe 2**). Il s'avère que le deuxième domaine est plus important pour une croissance normale à 37°C, car des mutations ayant comme objectif

de détruire ce motif conduisent à une croissance ralentie à cette température. Cet effet n'est pas décelable à 30°C. Par contre, les taux de snoARN à boîtes C/D sont réduits dans les cellules cultivées à 30°C par rapport à une souche exprimant la protéine entière non-mutée. Il est possible que le doigt de zinc soit important pour la croissance dans des conditions de stress; la destruction de ce motif ne perturbe pas la croissance à 30°C mais conduit à des taux de snoARN à boîtes C/D réduits. Ceci est un autre argument en faveur d'un rôle potentiel de Bcd1p et du doigt de zinc dans un autre mécanisme cellulaire essentiel, autre que la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D.

Une autre observation intéressante est l'effet dominant négatif du domaine à doigt de zinc. En effet, la croissance cellulaire est légèrement ralentie quand des fragments contenant la région N-terminale de la protéine (Bcd1p₁₋₄₅, Bcd1p₁₋₆₂) sont exprimés dans les cellules. Cet effet est reproductible et il a été observé dans plusieurs expériences. Même si le défaut de croissance est faible, il serait le témoin d'un rôle fonctionnel de ce domaine, et non un rôle simplement structural favorisant le repliement de la protéine.

Le remplacement du double doigt de zinc de Bcd1p par d'autres doigts de zinc provenant d'autres protéines contenant ce domaine montre des phénotypes différents et inattendus. Ainsi, le remplacement par celui de Hit1p restaure complètement la croissance cellulaire et les taux de snoARN à boîtes C/D. La croissance cellulaire est restaurée à 30°C mais pas à 37°C et les taux de snoARN à boîtes C/D sont réduits par rapport à une souche sauvage en présence d'une protéine Bcd1 chimérique contenant le doigt de zinc de la protéine Vps71, le troisième membre présentant le même type de doigt de zinc chez la levure. Le même effet est observé lorsque Bcd1p endogène est remplacée par une protéine hybride contenant un domaine en doigt de zinc simple (l'un des doigts de zinc présents dans la protéine Swi5). Le remplacement du double doigt de zinc par celui de la protéine Rph1, qui fait partie d'une autre famille, ne restaure ni une croissance cellulaire normale à 30°C ou à 37°C ni des taux normaux de snoARN à boîtes C/D.

Concernant l'interaction de Bcd1p avec des partenaires protéiques connus (Pih1p et Rrp9p), nos résultats ont montré que la protéine entière est nécessaire pour ces tests d'interaction en double hybride (**Figures 58 et 59**).

Afin de progresser dans la compréhension du mécanisme d'action de Bcd1p, des études ont porté sur la recherche de nouveaux partenaires protéiques d'interaction. Dans ce cadre, j'ai identifié un nouveau partenaire potentiel, une protéine chaperonne d'histones, la protéine Rtt106, qui forme un complexe stable avec Bcd1p *in vitro*.

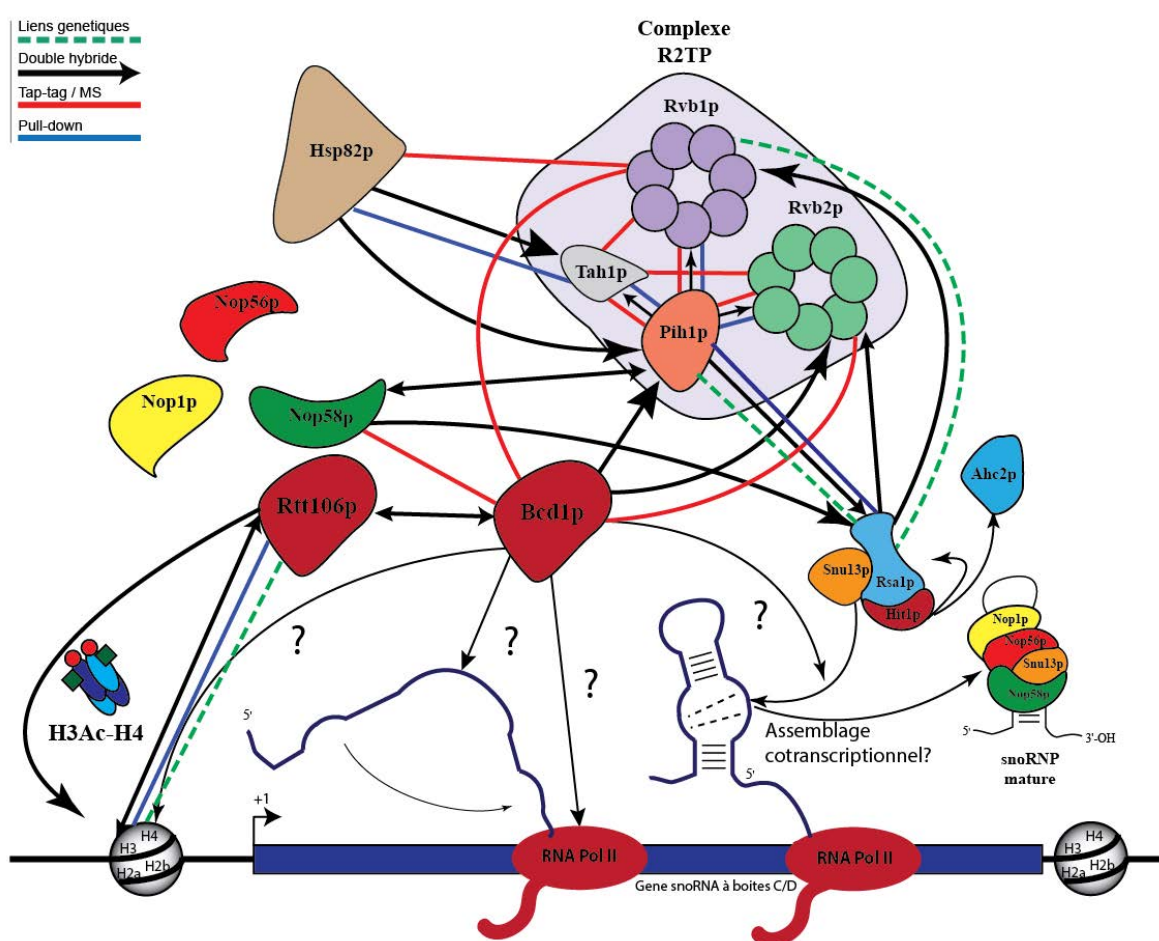
Rtt106p un nouveau partenaire d'interaction de Bcd1p. Rtt106p est impliquée dans la structuration de la chromatine. Elle reconnaît spécifiquement les histones H3 nouvellement synthétisées et acétylées au niveau de la lysine 56 et participe à l'intégration des complexes H3K56ac-H4 dans les nucléosomes pendant la réplication de l'ADN (Su et al., 2012). La reconnaissance des histones acétylées est réalisée par son double domaine PH. L'identification de Bcd1p comme partenaire de Rtt106p ouvre de nouvelles perspectives dont un rôle potentiel dans le mécanisme d'assemblage des snoRNP à boîtes C/D. La croissance d'une souche ne produisant pas Rtt106p (souche Δ RTT106, invalidée pour l'ORF de Rtt106p) n'est pas affectée et les taux de snoARN à boîtes C/D, excepté U14 dont le taux est augmenté, sont au même niveau que dans une souche sauvage. Ces données montrent que le rôle que pourrait jouer Rtt106p dans ce processus n'est pas essentiel. Cependant, un rôle possible dans la biogenèse de snoRNP reste à être exploré, car une souche qui surexprime le fragment Rtt106Mp (mais pas dans le cas de la surexpression de la protéine entière) montre une surexpression des snoARN U14, snR190 et snR45 (**Figure 74**). A noter que dans le fragment Rtt106M, le domaine de dimérisation situé dans la région N-terminale est absent. Il reste à définir si cet effet est lié à une participation directe de Rtt106p dans le processus d'assemblage des snoARN ou indirect, via son rôle dans le métabolisme des histones.

L'interaction observée entre Bcd1p et Rtt106p est spécifique, car Bcd1p n'interagit pas en double hybride avec d'autres protéines, comme Pob3 et Spt16, présentant le même motif PH (**Figure 69**). Cette spécificité nous a amené à comparer les structures 3D de Rtt106p et Pob3p. Nous avons ainsi identifié une orientation différente des hélices $\alpha 2$ de Rtt106p de Pob3p. La suppression de l'hélice $\alpha 2$ dans Rtt106p conduit à une perte de l'interaction avec Bcd1p en double hybride. D'autres déterminants de cette interaction restent cependant à être identifiés.

Les expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) n'ont pas permis de démontrer l'existence d'une interaction entre Bcd1p et Rtt106p *in vivo* alors que celle-ci est très forte *in vitro*. Comme nous l'avons déjà évoqué il est possible que cette interaction soit très transitoire et le nombre de complexes formés très faible. Une autre possibilité est que les conditions expérimentales des coIP n'étaient pas optimales pour détecter ce type de complexe en particulier s'il est formé au niveau de la chromatine. Il est peut-être nécessaire d'inclure une étape supplémentaire d'enrichissement de la fraction chromatiniennne dans le protocole de co-IP.

Un autre élément d'information pouvant lier fonctionnellement Rtt106p et Bcd1p pouvait être apporté par le phénotype de la souche portant une double délétion des gènes codant ces protéines et qui avait été identifiée lors d'un crible GIM (Genetic Interaction Mapping) réalisé durant la thèse de B Rothé par l'équipe de C. Saveanu (Institut Pasteur, Paris). Ce type d'approche permet d'obtenir des données quantitatives concernant l'effet dû à un cumul de plusieurs délétions (Lee *et al.*, 2011b). Elle consiste à croiser une souche haploïde d'intérêt portant une simple délétion (*MAT α* , NatMX4 = gène de résistance à la nourseothricine) avec une population de souches haploïdes mutantes (KO ou DAMP) (*MAT α* , KanMX4= gène de résistance à la kanamycine). Les levures diploïdes obtenues sont sélectionnées sur milieux sélectifs et placées en conditions de sporulation, puis les souches haploïdes doublement mutées sont sélectionnées par leur double résistance à la nourseothricine et à la kanamycine. Les cellules sont cultivées en milieu liquide jusqu'aux 18ièmes doublements de la population, afin de générer un effet de compétition entre les différentes souches. A la suite, une analyse par PCR et une hybridation sur puce à ADN est réalisée. La même démarche est réalisée en croisant la population de levures mutantes avec une souche portant une délétion pour un gène de référence. L'intensité des signaux mesurés pour chaque loci peut être comparée entre la population d'un double mutant et celle de référence. Les résultats sont exprimés en $\log_2(Q/R)$: Q représente l'intensité de signal obtenu pour la population d'intérêt et R représente celle mesurée pour la population de référence. Ce paramètre permet d'évaluer le *fitness* de chaque souche (= valeur sélective correspondant à la capacité d'une cellule à générer des descendants viables et fertiles). On peut alors estimer l'impact de chaque double délétion sur la capacité d'adaptation des cellules. Si la valeur est < 0 , le double mutant est sous-représenté par rapport au double mutant de référence ($Q < R$), et l'effet délétère des deux mutations est cumulatif. Si la valeur de $\log_2(Q/R)$ est > 0 , il y a un enrichissement du double mutant d'intérêt ($Q > R$), donc l'effet des deux délétions est épistatique. Alors, soit l'effet délétère de l'une des mutations est supprimé ou compensé par la seconde mutation, soit la double mutation est dénuée d'effet cumulatif car les produits des deux gènes d'intérêt interviennent dans la même voie métabolique. La validation de ces résultats nécessite une répétition de l'expérience avec différents mutants haploïdes de référence, afin de s'assurer de leur neutralité par rapport au processus étudié.

En analysant les données disponibles issues d'une telle approche en utilisant la souche $\Delta RSA1$, nous avons observé que la délétion du gène *RTT106* conduit à un effet épistatique avec une valeur $\log_2(Q/R)$ de +2.1. Afin de disposer d'une souche doublement invalidée nous avons entrepris une approche par dissection de tétrades, en croissant les deux souches $\Delta RTT106$ et $\Delta RSA1$. De façon surprenante, la nouvelle souche ne montre pas le même effet que celui identifié par l'approche de GIM (**Figure 43**). Dans notre cas, l'effet



Page 298

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abel, Y., Clerget, G., Bourguignon-Igel, V., Salone, V., and Rederstorff, M. (2014). [Beyond usual functions of snoRNAs]. *Medecine sciences : M/S* 30, 297-302.

Abou Elela, S., and Ares, M., Jr. (1998). Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *The EMBO journal* 17, 3738-3746.

Adam, S., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2013). Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA. *Cell* 155, 94-106.

Adam, S., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2014). How to restore chromatin structure and function in response to DNA damage--let the chaperones play: delivered on 9 July 2013 at the 38th FEBS Congress in St Petersburg, Russia. *The FEBS journal* 281, 2315-2323.

Adkins, M.W., Howar, S.R., and Tyler, J.K. (2004). Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Molecular cell* 14, 657-666.

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular cell* 9, 1191-1200.

Ai, L.S., Lin, C.H., Hsieh, M., and Li, C. (1999). Arginine methylation of a glycine and arginine rich peptide derived from sequences of human FMRP and fibrillarin. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China Part B, Life sciences* 23, 175-180.

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. *Nature structural biology* 10, 256-263.

Ali, M.M., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C., and Pearl, L.H. (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440, 1013-1017.

Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *The EMBO journal* 18, 5399-5410.

Alvarez, F., Munoz, F., Schilcher, P., Imhof, A., Almouzni, G., and Loyola, A. (2011). Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *The Journal of biological chemistry* 286, 17714-17721.

Alvira, S., Cuellar, J., Rohl, A., Yamamoto, S., Itoh, H., Alfonso, C., Rivas, G., Buchner, J., and Valpuesta, J.M. (2014). Structural characterization of the substrate transfer mechanism in Hsp70/Hsp90 folding machinery mediated by Hop. *Nature communications* 5, 5484.

Amaral, P.P., Dinger, M.E., Mercer, T.R., and Mattick, J.S. (2008). The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* 319, 1787-1789.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.

Anderlid, B.M., Lundin, J., Malmgren, H., Lehtihet, M., and Nordgren, A. (2014). Small mosaic deletion encompassing the snoRNAs and SNURF-SNRPN results in an atypical Prader-Willi syndrome phenotype. *American journal of medical genetics Part A* 164A, 425-431.

Anderson, H.E., Kagansky, A., Wardle, J., Rappsilber, J., Allshire, R.C., and Whitehall, S.K. (2010). Silencing mediated by the *Schizosaccharomyces pombe* HIRA complex is dependent upon the Hpc2-like protein, Hip4. *PloS one* 5, e13488.

Andrews, A.J., Chen, X., Zevin, A., Stargell, L.A., and Luger, K. (2010). The histone chaperone Nap1 promotes nucleosome assembly by eliminating nonnucleosomal histone DNA interactions. *Molecular cell* 37, 834-842.

Andrews, F.H., Shanle, E.K., Strahl, B.D., and Kutateladze, T.G. (2016). The essential role of acetylsine binding by the YEATS domain in transcriptional regulation. *Transcription* 7, 14-20.

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.

Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Gottschling, D.E. (1991). Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66, 1279-1287.

Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M.J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., *et al.* (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442, 203-207.

Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K., and Hannon, G.J. (2007). Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 316, 744-747.

Arita, T., Ichikawa, D., Konishi, H., Komatsu, S., Shiozaki, A., Shoda, K., Kawaguchi, T., Hirajima, S., Nagata, H., Kubota, T., *et al.* (2013). Circulating long

non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer research* 33, 3185-3193.

Ashe, A., Sapetschnig, A., Weick, E.M., Mitchell, J., Bagijn, M.P., Cording, A.C., Doebley, A.L., Goldstein, L.D., Lehrbach, N.J., Le Pen, J., *et al.* (2012). piRNAs can trigger a multigenerational epigenetic memory in the germline of *C. elegans*. *Cell* 150, 88-99.

Atzorn, V., Fragapane, P., and Kiss, T. (2004). U17/snr30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production. *Molecular and cellular biology* 24, 1769-1778.

Avner, P., and Heard, E. (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nature reviews Genetics* 2, 59-67.

B

Bachellerie, J.P., Cavaille, J., and Huttenhofer, A. (2002). The expanding snoRNA world. *Biochimie* 84, 775-790.

Back, R., Dominguez, C., Rothé, B., Bobo, C., Beaufils, C., Morera, S., Meyer, P., Charpentier, B., Branlant, C., Allain, F.H., *et al.* (2013). High-resolution structural analysis shows how Tah1 tethers Hsp90 to the R2TP complex. *Structure* 21, 1834-1847.

Backstrom, S., Elfving, N., Nilsson, R., Wingsle, G., and Bjorklund, S. (2007). Purification of a plant mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit. *Molecular cell* 26, 717-729.

Baker, D.L., Youssef, O.A., Chastkofsky, M.I., Dy, D.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2005). RNA-guided RNA modification: functional organization of the archaeal H/ACA RNP. *Genes & development* 19, 1238-1248.

Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10037-10041.

Balaji, S., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2009). HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Molecular bioSystems* 5, 269-275.

Ballarino, M., Morlando, M., Pagano, F., Fatica, A., and Bozzoni, I. (2005). The cotranscriptional assembly of snoRNPs controls the biosynthesis of H/ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 25, 5396-5403.

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 Å resolution. *Science* 289, 905-920.

Bankaitis, V.A., Malehorn, D.E., Emr, S.D., and Greene, R. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *The Journal of cell biology* 108, 1271-1281.

Banumathy, G., Somaiah, N., Zhang, R., Tang, Y., Hoffmann, J., Andrade, M., Ceulemans, H., Schultz, D., Marmorstein, R., and Adams, P.D. (2009). Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Molecular and cellular biology* 29, 758-770.

Baraniskin, A., Nopel-Dunnebacke, S., Ahrens, M., Jensen, S.G., Zollner, H., Maghnouj, A., Wos, A., Mayerle, J., Munding, J., Kost, D., *et al.* (2013). Circulating U2 small nuclear RNA fragments as a novel diagnostic biomarker for pancreatic and colorectal adenocarcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 132, E48-57.

Bardoni, B., Schenck, A., and Mandel, J.L. (1999). A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein. *Human molecular genetics* 8, 2557-2566.

Barman, H.K., Takami, Y., Ono, T., Nishijima, H., Sanematsu, F., Shibahara, K., and Nakayama, T. (2006). Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells. *Biochemical and biophysical research communications* 345, 1547-1557.

Barrick, J.E., Corbino, K.A., Winkler, W.C., Nahvi, A., Mandal, M., Collins, J., Lee, M., Roth, A., Sudarsan, N., Jona, I., *et al.* (2004). New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6421-6426.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.

Baserga, S.J., Yang, X.D., and Steitz, J.A. (1991). An intact Box C sequence in the U3 snRNA is required for binding of fibrillarin, the protein common to the major family of nucleolar snRNPs. *The EMBO journal* 10, 2645-2651.

Batey, R.T. (2012). Structure and mechanism of purine-binding riboswitches. *Quarterly reviews of biophysics* 45, 345-381.

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.

Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O., Usseglio, F., Rothbacher, U., Aragnol, D., Kemler, R., and Pradel, J. (2000). Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *The EMBO journal* 19, 6121-6130.

Bax, R., Vos, H.R., Raue, H.A., and Vos, J.C. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Sof1p associates with 35S Pre-rRNA independent from U3 snoRNA and Rps5p. *Eukaryotic cell* 5, 427-434.

- Bazeley, P.S., Shepelev, V., Talebizadeh, Z., Butler, M.G., Fedorova, L., Filatov, V., and Fedorov, A. (2008). snoTARGET shows that human orphan snoRNA targets locate close to alternative splice junctions. *Gene* 408, 172-179.
- Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Rehwinkel, J., Hilgers, V., and Izaurralde, E. (2007). A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal* 26, 1591-1601.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 301, 1090-1093.
- Belotserkovskaya, R., Saunders, A., Lis, J.T., and Reinberg, D. (2004). Transcription through chromatin: understanding a complex FACT. *Biochimica et biophysica acta* 1677, 87-99.
- 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.
- Beltrame, M., and Tollervey, D. (1992). Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. *The EMBO journal* 11, 1531-1542.
- Beltrame, M., and Tollervey, D. (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. *The EMBO journal* 14, 4350-4356.
- Benbahouche Nel, H., Iliopoulos, I., Torok, I., Marhold, J., Henri, J., Kajava, A.V., Farkas, R., Kempf, T., Schnolzer, M., Meyer, P., *et al.* (2014). *Drosophila* Spag is the homolog of RNA polymerase II-associated protein 3 (RPAP3) and recruits the heat shock proteins 70 and 90 (Hsp70 and Hsp90) during the assembly of cellular machineries. *The Journal of biological chemistry* 289, 6236-6247.
- Benetatos, L., Vartholomatos, G., and Hatzimichael, E. (2011). MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 773-779.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., *et al.* (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics* 37, 766-770.
- Berger, C.M., Gaume, X., and Bouvet, P. (2015). The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie* 113, 78-85.
- Berges, T., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E.C. (1994). Synthetic lethality with fibrillarin identifies NOP77p, a nucleolar protein required for pre-rRNA processing and modification. *The EMBO journal* 13, 3136-3148.
- Bernstein, J., and Toth, E.A. (2012). Yeast nuclear RNA processing. *World journal of biological chemistry* 3, 7-26.
- Bernstein, K.A., Gallagher, J.E., Mitchell, B.M., Granneman, S., and Baserga, S.J. (2004). The small subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryotic cell* 3, 1619-1626.
- Billi, A.C., Freeberg, M.A., and Kim, J.K. (2012). piRNAs and siRNAs collaborate in *Caenorhabditis elegans* genome defense. *Genome biology* 13, 164.
- Biswas, D., Dutta-Biswas, R., Mitra, D., Shibata, Y., Strahl, B.D., Formosa, T., and Stillman, D.J. (2006). Opposing roles for Set2 and yFACT in regulating TBP binding at promoters. *The EMBO journal* 25, 4479-4489.
- Bittel, D.C., and Butler, M.G. (2005). Prader-Willi syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert reviews in molecular medicine* 7, 1-20.
- Bittel, D.C., Kibiryeva, N., Talebizadeh, Z., and Butler, M.G. (2003). Microarray analysis of gene/transcript expression in Prader-Willi syndrome: deletion versus UPD. *Journal of medical genetics* 40, 568-574.
- 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. *The Journal of cell biology* 207, 463-480.
- Bleichert, F., and Baserga, S.J. (2010). Dissecting the role of conserved box C/D sRNA sequences in di-sRNP assembly and function. *Nucleic Acids Res* 38, 8295-8305.
- Bleichert, F., Gagnon, K.T., Brown, B.A., 2nd, Maxwell, E.S., Leschziner, A.E., Unger, V.M., and Baserga, S.J. (2009). A dimeric structure for archaeal box C/D small ribonucleoproteins. *Science* 325, 1384-1387.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9464-9469.
- Boamah, E.K., Kotova, E., Garabedian, M., Jamnik, M., and Tulin, A.V. (2012). Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in *Drosophila* nucleoli. *PLoS genetics* 8, e1002442.
- 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. *Molecular cell* 36, 583-592.
- Boon, K.L., Pearson, M.D., and Kos, M. (2015). Self-association of Trimethylguanosine Synthase Tgs1 is required for efficient snRNA/snoRNA trimethylation and pre-rRNA processing. *Scientific reports* 5, 11282.
- Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J., and Lindquist, S. (1989). hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and cellular biology* 9, 3919-3930.
- Borovjagin, A.V., and Gerbi, S.A. (2000). The spacing between functional Cis-elements of U3 snoRNA is

- critical for rRNA processing. *Journal of molecular biology* 300, 57-74.
- 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.
- Bortolin-Cavaille, M.L., and Cavaille, J. (2012). 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* 40, 6800-6807.
- Bose, S., Weikl, T., Bugl, H., and Buchner, J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* 274, 1715-1717.
- Boulon, S. (2005). Trafic et biogenèse des petits ARNs nucléolaires à boîtes C/D. . Thèse.
- Boulon, S., Bertrand, E., and Pradet-Balade, B. (2012). HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression. *RNA biology* 9, 148-154.
- Boulon, S., Marmier-Gourrier, N., Pradet-Balade, B., Wurth, L., Verheggen, C., Jady, 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. *The Journal of cell biology* 180, 579-595.
- Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M.C., Ahmad, Y., Neel, H., *et al.* (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like co-chaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Molecular cell* 39, 912-924.
- Boulon, S., Verheggen, C., Jady, B.E., Girard, C., Pescia, C., Paul, C., Ospina, J.K., Kiss, T., Matera, A.G., Bordonne, R., *et al.* (2004). PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Molecular cell* 16, 777-787.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765-775.
- Bower-Phipps, K.R., Taylor, D.W., Wang, H.W., and Baserga, S.J. (2012). The box C/D sRNP dimeric architecture is conserved across domain Archaea. *Rna* 18, 1527-1540.
- Bragantini, B., Tiotiu, D., Rothé, B., Saliou, J.M., Marty, H., Cianferani, S., Charpentier, B., Quinternet, M., and Manival, X. (2016). Functional and Structural Insights of the Zinc-Finger HIT protein family members Involved in Box C/D snoRNP Biogenesis. *Journal of molecular biology* 428, 2488-2506.
- Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L., and Gruber, J. (2011). Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Res* 39, 675-686.
- Brandis, K.A., Gale, S., Jinn, S., Langmade, S.J., Dudley-Rucker, N., Jiang, H., Sidhu, R., Ren, A., Goldberg, A., Schaffer, J.E., *et al.* (2013). Box C/D small nucleolar RNA (snoRNA) U60 regulates intracellular cholesterol trafficking. *The Journal of biological chemistry* 288, 35703-35713.
- Bratkovic, T., and Rogelj, B. (2014). The many faces of small nucleolar RNAs. *Biochimica et biophysica acta* 1839, 438-443.
- Braun, R.E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature genetics* 28, 10-12.
- Breaker, R.R. (2011). Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Molecular cell* 43, 867-879.
- Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089-1103.
- Brewster, N.K., Johnston, G.C., and Singer, R.A. (1998). Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pob3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and chromatin repression. *The Journal of biological chemistry* 273, 21972-21979.
- Brewster, N.K., Johnston, G.C., and Singer, R.A. (2001). A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription. *Molecular and cellular biology* 21, 3491-3502.
- Briand, J.F., Navarro, F., Gadal, O., and Thuriaux, P. (2001). Cross talk between tRNA and rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 21, 189-195.
- Brown, D.T., Wellman, S.E., and Sittman, D.B. (1985). Changes in the levels of three different classes of histone mRNA during murine erythroleukemia cell differentiation. *Molecular and cellular biology* 5, 2879-2886.
- Brown, J.W., Echeverria, M., and Qu, L.H. (2003). Plant snoRNAs: functional evolution and new modes of gene expression. *Trends in plant science* 8, 42-49.
- Brown, J.W., Marshall, D.F., and Echeverria, M. (2008). Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends in plant science* 13, 335-342.
- Brule, F., Gregoire, A., Segault, V., Mougin, A., and Branlant, C. (1995). Secondary structure conservation of the U3 small nucleolar RNA introns in *Saccharomyces*. *C R Acad Sci III* 318, 1197-1206.
- Budde, B.S., Namavar, Y., Barth, P.G., Poll-The, B.T., Nurnberg, G., Becker, C., van Ruissen, F., Weterman, M.A., Fluiter, K., te Beek, E.T., *et al.* (2008). tRNA splicing endonuclease mutations cause pontocerebellar hypoplasia. *Nature genetics* 40, 1113-1118.
- Buiting, K. (2010). Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 154C, 365-376.
- Burge, C.B., Padgett, R.A., and Sharp, P.A. (1998). Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Molecular cell* 2, 773-785.

- Burgess, R.J., and Zhang, Z. (2013). Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nature structural & molecular biology* 20, 14-22.
- Burns, C.M., Chu, H., Rueter, S.M., Hutchinson, L.K., Canton, H., Sanders-Bush, E., and Emeson, R.B. (1997). Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 387, 303-308.
- Busch, H., Reddy, R., Rothblum, L., and Choi, Y.C. (1982). SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing. *Annual review of biochemistry* 51, 617-654.
- Butler, M.G. (2011). Prader-Willi Syndrome: Obesity due to Genomic Imprinting. *Current genomics* 12, 204-215.
- Butler, M.G., Fischer, W., Kibiryeve, N., and Bittel, D.C. (2008). Array comparative genomic hybridization (aCGH) analysis in Prader-Willi syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 146A, 854-860.
- C**
- Vabart, P., Chew, H.K., and Murphy, S. (2004). BRCA1 cooperates with NUFIP and P-TEFb to activate transcription by RNA polymerase II. *Oncogene* 23, 5316-5329.
- Cabili, M.N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., and Rinn, J.L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes & development* 25, 1915-1927.
- 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. *The EMBO journal* 21, 3816-3828.
- Cai, Y., Jin, J., Gottschalk, A.J., Yao, T., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (2006). Purification and assay of the human INO80 and SRCAP chromatin remodeling complexes. *Methods* 40, 312-317.
- Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., and Ciocca, D.R. (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in biochemical sciences* 31, 164-172.
- Caldwell, K.A., and Handel, M.A. (1991). Protamine transcript sharing among postmeiotic spermatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 2407-2411.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., *et al.* (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.
- Carroll, K.L., Ghirlando, R., Ames, J.M., and Corden, J.L. (2007). Interaction of yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3 with RNA polymerase II terminator elements. *Rna* 13, 361-373.
- Carroll, K.L., Pradhan, D.A., Granek, J.A., Clarke, N.D., and Corden, J.L. (2004). Identification of cis elements directing termination of yeast nonpolyadenylated snoRNA transcripts. *Molecular and cellular biology* 24, 6241-6252.
- Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., *et al.* (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123, 581-592.
- Cassidy, S.B., and Driscoll, D.J. (2009). Prader-Willi syndrome. *European journal of human genetics* : EJHG 17, 3-13.
- Cassidy, S.B., Schwartz, S., Miller, J.L., and Driscoll, D.J. (2012). Prader-Willi syndrome. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 14, 10-26.
- Catala, M., Tremblay, M., Samson, E., Conconi, A., and Abou Elela, S. (2008). Deletion of Rnt1p alters the proportion of open versus closed rRNA gene repeats in yeast. *Molecular and cellular biology* 28, 619-629.
- Caudron-Herger, M., Muller-Ott, K., Mallm, J.P., Marth, C., Schmidt, U., Fejes-Toth, K., and Rippe, K. (2011). Coding RNAs with a non-coding function: maintenance of open chromatin structure. *Nucleus* 2, 410-424.
- Cavaille, J. (2004). [MicroRNA are everywhere]. *Medecine sciences : M/S* 20, 399-401.
- Cavaille, J., Buiting, K., Kieffmann, M., Lalande, M., Brannan, C.I., Horsthemke, B., Bachellerie, J.P., Brosius, J., and Huttenhofer, A. (2000). Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14311-14316.
- Cavaille, J., Hadjiolov, A.A., and Bachellerie, J.P. (1996a). Processing of mammalian rRNA precursors at the 3' end of 18S rRNA. Identification of cis-acting signals suggests the involvement of U13 small nucleolar RNA. *European journal of biochemistry / FEBS* 242, 206-213.
- Cavaille, J., Nicoloso, M., and Bachellerie, J.P. (1996b). Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* 383, 732-735.
- Cavaille, J., Seitz, H., Paulsen, M., Ferguson-Smith, A.C., and Bachellerie, J.P. (2002). Identification of tandemly-repeated C/D snoRNA genes at the imprinted human 14q32 domain reminiscent of those at the Prader-Willi/Angelman syndrome region. *Human molecular genetics* 11, 1527-1538.
- Celic, I., Masumoto, H., Griffith, W.P., Meluh, P., Cotter, R.J., Boeke, J.D., and Verreault, A. (2006). The sirtuins hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation. *Current biology : CB* 16, 1280-1289.
- 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. *Biomolecular NMR assignments* 9, 99-102.
- Chai, J.H., Locke, D.P., Grealley, J.M., Knoll, J.H., Ohta, T., Dunai, J., Yavor, A., Eichler, E.E., and Nicholls, R.D. (2003). Identification of four highly

- conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *American journal of human genetics* 73, 898-925.
- Chambers, A.L., and Downs, J.A. (2012). The RSC and INO80 chromatin-remodeling complexes in DNA double-strand break repair. *Progress in molecular biology and translational science* 110, 229-261.
- Chan, K.C., Jiang, P., Zheng, Y.W., Liao, G.J., Sun, H., Wong, J., Siu, S.S., Chan, W.C., Chan, S.L., Chan, A.T., *et al.* (2013). Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clinical chemistry* 59, 211-224.
- Chanfreau, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998a). Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *Journal of molecular biology* 284, 975-988.
- Chanfreau, G., Rotondo, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998b). Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *The EMBO journal* 17, 3726-3737.
- Chang, L.S., Lin, S.K., and Wu, P.F. (1998). Differentially expressed snoRNAs in *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait). *Biochemical and biophysical research communications* 245, 397-402.
- Chang, L.S., Lin, S.Y., Lieu, A.S., and Wu, T.L. (2002). Differential expression of human 5S snoRNA genes. *Biochemical and biophysical research communications* 299, 196-200.
- Charette, J.M., and Gray, M.W. (2009). U3 snoRNA genes are multi-copy and frequently linked to U5 snRNA genes in *Euglena gracilis*. *BMC Genomics* 10, 528.
- Charpentier, B., Muller, S., and Branlant, C. (2005). Reconstitution of archaeal H/ACA small ribonucleoprotein complexes active in pseudouridylation. *Nucleic Acids Res* 33, 3133-3144.
- Charron, C., Manival, X., Clery, A., Senty-Segault, 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. *Journal of molecular biology* 342, 757-773.
- Chen, C.C., Carson, J.J., Feser, J., Tamburini, B., Zabaronick, S., Linger, J., and Tyler, J.K. (2008a). Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair. *Cell* 134, 231-243.
- Chen, C.L., Chen, C.J., Vallon, O., Huang, Z.P., Zhou, H., and Qu, L.H. (2008b). Genomewide analysis of box C/D and box H/ACA snoRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals an extensive organization into intronic gene clusters. *Genetics* 179, 21-30.
- Chen, C.L., Perasso, R., Qu, L.H., and Amar, L. (2007). Exploration of pairing constraints identifies a 9 base-pair core within box C/D snoRNA-rRNA duplexes. *Journal of molecular biology* 369, 771-783.
- Chen, K., and Rajewsky, N. (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature reviews Genetics* 8, 93-103.
- Chen, M., Rockel, T., Steinweger, G., Hemmerich, P., Risch, J., and von Mikecz, A. (2002). Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. *Molecular biology of the cell* 13, 3576-3587.
- Chen, M., and von Mikecz, A. (2000). Specific inhibition of rRNA transcription and dynamic relocation of fibrillarin induced by mercury. *Experimental cell research* 259, 225-238.
- Chen, S., Blank, M.F., Iyer, A., Huang, B., Wang, L., Grummt, I., and Voit, R. (2016). SIRT7-dependent deacetylation of the U3-55k protein controls pre-rRNA processing. *Nature communications* 7, 10734.
- Chen, S., Rufiange, A., Huang, H., Rajashankar, K.R., Nourani, A., and Patel, D.J. (2015). Structure-function studies of histone H3/H4 tetramer maintenance during transcription by chaperone Spt2. *Genes & development* 29, 1326-1340.
- Chen, Y.Z., Bennett, C.L., Huynh, H.M., Blair, I.P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M.L., Rabin, B.A., *et al.* (2004). DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *American journal of human genetics* 74, 1128-1135.
- Cheng, J., Deng, H., Xiao, B., Zhou, H., Zhou, F., Shen, Z., and Guo, J. (2012). piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer letters* 315, 12-17.
- Cheng, J., Guo, J.M., Xiao, B.X., Miao, Y., Jiang, Z., Zhou, H., and Li, Q.N. (2011). piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 412, 1621-1625.
- Cheung, K.L., Huen, J., Kakiyama, Y., Houry, W.A., and Ortega, J. (2010). Alternative oligomeric states of the yeast Rvb1/Rvb2 complex induced by histidine tags. *Journal of molecular biology* 404, 478-492.
- Cheung, V., Chua, G., Batada, N.N., Landry, C.R., Michnick, S.W., Hughes, T.R., and Winston, F. (2008). Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS biology* 6, e277.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: the exosome. *Biochimica et biophysica acta* 1829, 552-560.
- Choi, E.J., Cho, B.J., Lee, D.J., Hwang, Y.H., Chun, S.H., Kim, H.H., and Kim, I.A. (2014). Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases. *BMC cancer* 14, 17.

- Choi, J., Heo, K., and An, W. (2009). Cooperative action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z exchange catalyzed by acetylation of nucleosomal H2A. *Nucleic Acids Res* 37, 5993-6007.
- Christensen, M.E., Beyer, A.L., Walker, B., and Lestourgeon, W.M. (1977). Identification of NG, NG-dimethylarginine in a nuclear protein from the lower eukaryote *Physarum polycephalum* homologous to the major proteins of mammalian 40S ribonucleoprotein particles. *Biochemical and biophysical research communications* 74, 621-629.
- Cichocki, F., Lenvik, T., Sharma, N., Yun, G., Anderson, S.K., and Miller, J.S. (2010). Cutting edge: KIR antisense transcripts are processed into a 28-base PIWI-like RNA in human NK cells. *Journal of immunology* 185, 2009-2012.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry* 78, 273-304.
- Clark-Adams, C.D., Norris, D., Osley, M.A., Fassler, J.S., and Winston, F. (1988). Changes in histone gene dosage alter transcription in yeast. *Genes & development* 2, 150-159.
- Clery, A., Senty-Segault, V., Leclerc, F., Raue, 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 Snr13p-Rp9p protein pair. *Molecular and cellular biology* 27, 1191-1206.
- Cloutier, P., Al-Khoury, R., Lavalley-Adam, M., Faubert, D., Jiang, H., Poitras, C., Bouchard, A., Forget, D., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2009). High-resolution mapping of the protein interaction network for the human transcription machinery and affinity purification of RNA polymerase II-associated complexes. *Methods* 48, 381-386.
- Cloutier, P., and Coulombe, B. (2010). New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 88, 211-221.
- Cockell, M., Palladino, F., Laroche, T., Kyrion, G., Liu, C., Lustig, A.J., and Gasser, S.M. (1995). The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: evidence for a multicomponent complex required for yeast telomeric silencing. *The Journal of cell biology* 129, 909-924.
- Cockell, M.M., Perrod, S., and Gasser, S.M. (2000). Analysis of Sir2p domains required for rDNA and telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 1069-1083.
- Cohen, E., Avrahami, D., Frid, K., Canello, T., Levy Lahad, E., Zeligson, S., Perlberg, S., Chapman, J., Cohen, O.S., Kahana, E., *et al.* (2013). Snord 3A: a molecular marker and modulator of prion disease progression. *PloS one* 8, e54433.
- 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.
- Consortium, E.P. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74.
- Consortium, E.P., Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., *et al.* (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799-816.
- Costello, J.L., Stead, J.A., Feigenbutz, M., Jones, R.M., and Mitchell, P. (2011). The C-terminal region of the exosome-associated protein Rps47 is specifically required for box C/D small nucleolar RNA 3'-maturation. *The Journal of biological chemistry* 286, 4535-4543.
- Costelloe, T., and Lowndes, N.F. (2010). Chromatin assembly and signalling the end of DNA repair requires acetylation of histone H3 on lysine 56. *Sub-cellular biochemistry* 50, 43-54.
- Cowling, V.H. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *The Biochemical journal* 425, 295-302.
- Cox, M.B., and Johnson, J.L. (2011). The role of p23, Hop, immunophilins, and other co-chaperones in regulating Hsp90 function. *Methods in molecular biology* 787, 45-66.
- Cozza, G., Pinna, L.A., and Moro, S. (2013). Kinase CK2 inhibition: an update. *Current medicinal chemistry* 20, 671-693.
- Cramer, P., Armache, K.J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G.E., Dengl, S., Geiger, S.R., Jasiak, A.J., *et al.* (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annual review of biophysics* 37, 337-352.
- Crick, F.H. (1958). On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 12, 138-163.
- Croce, C.M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews Genetics* 10, 704-714.
- Cromie, M.J., Shi, Y., Latifi, T., and Groisman, E.A. (2006). An RNA sensor for intracellular Mg(2+). *Cell* 125, 71-84.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics* 79, 129-168.
- D**
- D'Arcy, S., Martin, K.W., Panchenko, T., Chen, X., Bergeron, S., Stargell, L.A., Black, B.E., and Luger, K. (2013). Chaperone Nap1 shields histone surfaces used in a nucleosome and can put H2A-H2B in an unconventional tetrameric form. *Molecular cell* 51, 662-677.
- da Rocha, S.T., Edwards, C.A., Ito, M., Ogata, T., and Ferguson-Smith, A.C. (2008). Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain. *Trends in genetics* : TIG 24, 306-316.

- Dahlin, J.L., Chen, X., Walters, M.A., and Zhang, Z. (2015). Histone-modifying enzymes, histone modifications and histone chaperones in nucleosome assembly: Lessons learned from Rtt109 histone acetyltransferases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 50, 31-53.
- Danin-Kreiselman, M., Lee, C.Y., and Chanfreau, G. (2003). RNase III-mediated degradation of unspliced pre-mRNAs and lariat introns. *Molecular cell* 11, 1279-1289.
- Dann, C.E., 3rd, Wakeman, C.A., Sieling, C.L., Baker, S.C., Irnov, I., and Winkler, W.C. (2007). Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell* 130, 878-892.
- Darzacq, X., Jady, 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. *The EMBO journal* 21, 2746-2756.
- Darzacq, X., and Kiss, T. (2000). Processing of intron-encoded box C/D small nucleolar RNAs lacking a 5',3'-terminal stem structure. *Molecular and cellular biology* 20, 4522-4531.
- Das, C., Lucia, M.S., Hansen, K.C., and Tyler, J.K. (2009). CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 459, 113-117.
- Das, C., and Tyler, J.K. (2013). Histone exchange and histone modifications during transcription and aging. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 332-342.
- Davis, C.A., and Ares, M., Jr. (2006). Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3262-3267.
- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E., and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nature structural & molecular biology* 14, 997-1007.
- De Rubeis, S., and Bagni, C. (2010). Fragile X mental retardation protein control of neuronal mRNA metabolism: Insights into mRNA stability. *Molecular and cellular neurosciences* 43, 43-50.
- de Smith, A.J., Purmann, C., Walters, R.G., Ellis, R.J., Holder, S.E., Van Haelst, M.M., Brady, A.F., Fairbrother, U.L., Dattani, M., Keogh, J.M., *et al.* (2009). A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Human molecular genetics* 18, 3257-3265.
- Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences* 27, 344-351.
- Deeney, J.T., Belkina, A.C., Shiriha, O.S., Corkey, B.E., and Denis, G.V. (2016). BET Bromodomain Proteins Brd2, Brd3 and Brd4 Selectively Regulate Metabolic Pathways in the Pancreatic beta-Cell. *PLoS one* 11, e0151329.
- Delprato, A., Al Kadri, Y., Perebaskine, 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.
- Deng, W., Zhu, X., Skogerbo, G., Zhao, Y., Fu, Z., Wang, Y., He, H., Cai, L., Sun, H., Liu, C., *et al.* (2006). Organization of the *Caenorhabditis elegans* small non-coding transcriptome: genomic features, biogenesis, and expression. *Genome research* 16, 20-29.
- Dennehey, B.K., Noone, S., Liu, W.H., Smith, L., Churchill, M.E., and Tyler, J.K. (2013). The C terminus of the histone chaperone Asf1 cross-links to histone H3 in yeast and promotes interaction with histones H3 and H4. *Molecular and cellular biology* 33, 605-621.
- Dennis, P.P., Tripp, V., Lui, L., Lowe, T., and Randau, L. (2015). C/D box sRNA-guided 2'-O-methylation patterns of archaeal rRNA molecules. *BMC Genomics* 16, 632.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., and Gygi, S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10762-10767.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., *et al.* (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research* 22, 1775-1789.
- Deschamps-Francoeur, G., Garneau, D., Dupuis-Sandoval, F., Roy, A., Frappier, M., Catala, M., Couture, S., Barbe-Marcoux, M., Abou-Elela, S., and Scott, M.S. (2014). Identification of discrete classes of small nucleolar RNA featuring different ends and RNA binding protein dependency. *Nucleic Acids Res* 42, 10073-10085.
- Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (2005). GCN2 whets the appetite for amino acids. *Molecular cell* 18, 141-142.
- 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. *Molecular and cellular biology* 22, 7053-7065.
- Dezwaan, D.C., and Freeman, B.C. (2008). HSP90: the Rosetta stone for cellular protein dynamics? *Cell cycle* 7, 1006-1012.
- Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M., and Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in genetics* : TIG 23, 614-622.
- Dieci, G., Preti, M., and Montanini, B. (2009). Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics* 94, 83-88.
- Dimova, D., Nackerdien, Z., Furgeson, S., Eguchi, S., and Osley, M.A. (1999). A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Molecular cell* 4, 75-83.
- Ding, F., Li, H.H., Zhang, S., Solomon, N.M., Camper, S.A., Cohen, P., and Francke, U. (2008). SnoRNA

- Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. *PloS one* 3, e1709.
- Ding, F., Prints, Y., Dhar, M.S., Johnson, D.K., Garnacho-Montero, C., Nicholls, R.D., and Francke, U. (2005). Lack of Pwcr1/MBII-85 snoRNA is critical for neonatal lethality in Prader-Willi syndrome mouse models. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 16, 424-431.
- Doe, C.M., Relkovic, D., Garfield, A.S., Dalley, J.W., Theobald, D.E., Humby, T., Wilkinson, L.S., and Isles, A.R. (2009). Loss of the imprinted snoRNA mbii-52 leads to increased 5htr2c pre-RNA editing and altered 5HT2CR-mediated behaviour. *Human molecular genetics* 18, 2140-2148.
- Dollard, C., Ricupero-Hovasse, S.L., Natsoulis, G., Boeke, J.D., and Winston, F. (1994). SPT10 and SPT21 are required for transcription of particular histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 14, 5223-5228.
- Donalies, U.E., and Stahl, U. (2001). Phase-specific gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, using maltose as carbon source under oxygen-limiting conditions. *Current genetics* 39, 150-155.
- Dong, H., Zou, M., Bhatia, A., Jayaprakash, P., Hofman, F., Ying, Q., Chen, M., Woodley, D.T., and Li, W. (2016). Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Use Secreted Heat Shock Protein-90alpha (Hsp90alpha) to Survive a Hostile Hypoxic Environment. *Scientific reports* 6, 20605.
- Dong, S., Han, J., Chen, H., Liu, T., Huen, M.S., Yang, Y., Guo, C., and Huang, J. (2014). The human SRCAP chromatin remodeling complex promotes DNA-end resection. *Current biology : CB* 24, 2097-2110.
- Dong, X.Y., Guo, P., Boyd, J., Sun, X., Li, Q., Zhou, W., and Dong, J.T. (2009). Implication of snoRNA U50 in human breast cancer. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 36, 447-454.
- Dong, X.Y., Rodriguez, C., Guo, P., Sun, X., Talbot, J.T., Zhou, W., Petros, J., Li, Q., Vessella, R.L., Kibel, A.S., *et al.* (2008). SnoRNA U50 is a candidate tumor-suppressor gene at 6q14.3 with a mutation associated with clinically significant prostate cancer. *Human molecular genetics* 17, 1031-1042.
- Donsante, A., Miller, D.G., Li, Y., Vogler, C., Brunt, E.M., Russell, D.W., and Sands, M.S. (2007). AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317, 477.
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* 21, 3433-3434.
- Doyen, C.M., Moshkin, Y.M., Chalkley, G.E., Bezstarosti, K., Demmers, J.A., Rathke, C., Renkawitz-Pohl, R., and Verrijzer, C.P. (2013). Subunits of the histone chaperone CAF1 also mediate assembly of protamine-based chromatin. *Cell reports* 4, 59-65.
- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., *et al.* (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-970.
- Driscoll, R., Hudson, A., and Jackson, S.P. (2007). Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science* 315, 649-652.
- Drogaris, P., Villeneuve, V., Pomies, C., Lee, E.H., Bourdeau, V., Bonneil, E., Ferbeyre, G., Verreault, A., and Thibault, P. (2012). Histone deacetylase inhibitors globally enhance h3/h4 tail acetylation without affecting h3 lysine 56 acetylation. *Scientific reports* 2, 220.
- Dube, J.C., Wang, X.Q., and Dostie, J. (2016). Spatial Organization of Epigenomes. *Current molecular biology reports* 2, 1-9.
- Ducat, D., Kawaguchi, S., Liu, H., Yates, J.R., 3rd, and Zheng, Y. (2008). Regulation of microtubule assembly and organization in mitosis by the AAA+ ATPase Pontin. *Molecular biology of the cell* 19, 3097-3110.
- Duker, A.L., Ballif, B.C., Bawle, E.V., Person, R.E., Mahadevan, S., Alliman, S., Thompson, R., Traylor, R., Bejjani, B.A., Shaffer, L.G., *et al.* (2010). Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* 18, 1196-1201.
- 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.
- Dunoyer, P. (2009). [The battle of Silence : action and inhibition of RNA silencing during plant/virus interactions]. *Medecine sciences : M/S* 25, 505-511.
- Dupuis-Sandoval, F., Poirier, M., and Scott, M.S. (2015). The emerging landscape of small nucleolar RNAs in cell biology. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 6, 381-397.

E

- Echtenkamp, F.J., and Freeman, B.C. (2012). Expanding the cellular molecular chaperone network through the ubiquitous cochaperones. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 668-673.
- Echtenkamp, F.J., Zelin, E., Oxelmark, E., Woo, J.I., Andrews, B.J., Garabedian, M., and Freeman, B.C. (2011). Global functional map of the p23 molecular chaperone reveals an extensive cellular network. *Molecular cell* 43, 229-241.
- Eckert, K., Saliou, J.M., Monlezun, L., Vigouroux, A., Atmane, N., Caillat, C., Quevillon-Cheruel, S., Madona, K., Nicaise, M., Lazereg, S., *et al.* (2010). The Pih1-Tah1 cochaperone complex inhibits Hsp90 molecular chaperone ATPase activity. *The Journal of biological chemistry* 285, 31304-31312.
- Eirin-Lopez, J.M., Frehlick, L.J., and Ausio, J. (2006). Protamines, in the footsteps of linker histone

- evolution. *The Journal of biological chemistry* 281, 1-4.
- Ejlassi-Lassalette, A., Mocquard, E., Arnaud, M.C., and Thiriet, C. (2011). H4 replication-dependent diacetylation and Hat1 promote S-phase chromatin assembly in vivo. *Molecular biology of the cell* 22, 245-255.
- Elela, S.A., Igel, H., and Ares, M., Jr. (1996). RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85, 115-124.
- Elkaim, J., Castroviejo, M., Bennani, D., Taouji, S., Allain, N., Laguerre, M., Rosenbaum, J., Dessolin, J., and Lestienne, P. (2012). First identification of small-molecule inhibitors of Pontin by combining virtual screening and enzymatic assay. *The Biochemical journal* 443, 549-559.
- Ellwanger, D.C., Buttner, F.A., Mewes, H.W., and Stumpflen, V. (2011). The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics* 27, 1346-1350.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Molecular cell* 32, 519-528.
- English, C.M., Adkins, M.W., Carson, J.J., Churchill, M.E., and Tyler, J.K. (2006). Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* 127, 495-508.
- 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.
- Eriksson, P.R., Ganguli, D., and Clark, D.J. (2011). Spt10 and Swi4 control the timing of histone H2A/H2B gene activation in budding yeast. *Molecular and cellular biology* 31, 557-572.
- Erkina, T.Y., and Erkin, A. (2015). ASF1 and the SWI/SNF complex interact functionally during nucleosome displacement, while FACT is required for nucleosome reassembly at yeast heat shock gene promoters during sustained stress. *Cell stress & chaperones* 20, 355-369.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews Genetics* 12, 861-874.
- ## F
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry* 79, 351-379.
- Faghihi, M.A., Modarresi, F., Khalil, A.M., Wood, D.E., Sahagan, B.G., Morgan, T.E., Finch, C.E., St Laurent, G., 3rd, Kenny, P.J., and Wahlestedt, C. (2008). Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nature medicine* 14, 723-730.
- Falaleeva, M., Pages, A., Matuszek, Z., Hidmi, S., Agranat-Tamir, L., Korotkov, K., Nevo, Y., Eyra, E., Sperling, R., and Stamm, S. (2016). Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E1625-1634.
- Falaleeva, M., and Stamm, S. (2013). Processing of snoRNAs as a new source of regulatory non-coding RNAs: snoRNA fragments form a new class of functional RNAs. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35, 46-54.
- Fan, C.Y., Lee, S., and Cyr, D.M. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell stress & chaperones* 8, 309-316.
- Fan, H.F., Liu, Z.N., Chow, S.Y., Lu, Y.H., and Li, H. (2015). Histone chaperone-mediated nucleosome assembly process. *PloS one* 10, e0115007.
- Fatemi, S.H., and Folsom, T.D. (2011). The role of fragile X mental retardation protein in major mental disorders. *Neuropharmacology* 60, 1221-1226.
- Fatemi, S.H., Kneeland, R.E., Liesch, S.B., and Folsom, T.D. (2010). Fragile X mental retardation protein levels are decreased in major psychiatric disorders. *Schizophrenia research* 124, 246-247.
- Fatica, A., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2002). Naf1 p is a box H/ACA snoRNP assembly factor. *Rna* 8, 1502-1514.
- Fatica, A., Morlando, M., and Bozzoni, I. (2000). Yeast snoRNA accumulation relies on a cleavage-dependent/polyadenylation-independent 3'-processing apparatus. *The EMBO journal* 19, 6218-6229.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2003). Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Molecular and cellular biology* 23, 1798-1807.
- Fazly, A., Li, Q., Hu, Q., Mer, G., Horazdovsky, B., and Zhang, Z. (2012). Histone chaperone Rtt106 promotes nucleosome formation using (H3-H4)₂ tetramers. *The Journal of biological chemistry* 287, 10753-10760.
- Feder, M., Pas, J., Wyrwicz, L.S., and Bujnicki, J.M. (2003). Molecular phylogenetics of the RrmJ/fibrillarin superfamily of ribose 2'-O-methyltransferases. *Gene* 302, 129-138.
- Feigenbutz, M., Garland, W., Turner, M., and Mitchell, P. (2013). The exosome cofactor Rrp47 is critical for the stability and normal expression of its associated exoribonuclease Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* 8, e80752.
- Fernandez-Pevida, A., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2015). Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 6, 191-209.
- Ferreira, M.E., Flaherty, K., and Prochasson, P. (2011). The *Saccharomyces cerevisiae* histone chaperone Rtt106 mediates the cell cycle recruitment of SWI/SNF and RSC to the HIR-dependent histone genes. *PloS one* 6, e21113.
- Filipowicz, W., Pelczar, P., Pogacic, V., and Dragon, F. (1999). Structure and biogenesis of small nucleolar RNAs acting as guides for ribosomal RNA modification. *Acta biochimica Polonica* 46, 377-389.

- Filipowicz, W., and Pogacic, V. (2002). Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Current opinion in cell biology* 14, 319-327.
- Fillingham, J., Kainth, P., Lambert, J.P., van Bakel, H., Tsui, K., Pena-Castillo, L., Nislow, C., Figeys, D., Hughes, T.R., Greenblatt, J., *et al.* (2009). Two-color cell array screen reveals interdependent roles for histone chaperones and a chromatin boundary regulator in histone gene repression. *Molecular cell* 35, 340-351.
- Fischer, U., Englbrecht, C., and Chari, A. (2011). Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 2, 718-731.
- Fischer, U., Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1997). The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90, 1023-1029.
- Flynn, J.M., Mishra, P., and Bolon, D.N. (2015). Mechanistic Asymmetry in Hsp90 Dimers. *Journal of molecular biology* 427, 2904-2911.
- Forget, D., Lacombe, A.A., Cloutier, P., Al-Khoury, R., Bouchard, A., Lavalley-Adam, M., Faubert, D., Jeronimo, C., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2010). The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPAP4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 9, 2827-2839.
- Formosa, T. (2008). FACT and the reorganized nucleosome. *Molecular bioSystems* 4, 1085-1093.
- Formosa, T. (2012). The role of FACT in making and breaking nucleosomes. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 247-255.
- Formosa, T., Eriksson, P., Wittmeyer, J., Ginn, J., Yu, Y., and Stillman, D.J. (2001). Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN. *The EMBO journal* 20, 3506-3517.
- Formosa, T., Ruone, S., Adams, M.D., Olsen, A.E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A.R., Kaufman, P.D., and Stillman, D.J. (2002). Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics* 162, 1557-1571.
- Fournier, R., Brule, F., Segault, 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.
- Franke, J., Gehlen, J., and Ehrenhofer-Murray, A.E. (2008). Hypermethylation of yeast telomerase RNA by the snRNA and snoRNA methyltransferase Tgs1. *Journal of cell science* 121, 3553-3560.
- Franklin, S.G., and Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* 266, 273-275.
- Friedman, R.C., and Burge, C.B. (2014). MicroRNA target finding by comparative genomics. *Methods in molecular biology* 1097, 457-476.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19, 92-105.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.
- Fruman, D.A., and Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery* 13, 140-156.
- Fuchs, S.M., Laribee, R.N., and Strahl, B.D. (2009). Protein modifications in transcription elongation. *Biochimica et biophysica acta* 1789, 26-36.
- ## G
- Gagne, J.P., Pic, E., Isabelle, M., Krietsch, J., Ethier, C., Paquet, E., Kelly, I., Boutin, M., Moon, K.M., Foster, L.J., *et al.* (2012). Quantitative proteomics profiling of the poly(ADP-ribose)-related response to genotoxic stress. *Nucleic Acids Res* 40, 7788-7805.
- Gaillard, P.H., Martini, E.M., Kaufman, P.D., Stillman, B., Moustacchi, E., and Almouzni, G. (1996). Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* 86, 887-896.
- Galardi, S., Fatica, A., Bachi, A., Scaloni, A., Presutti, C., and Bozzoni, I. (2002). Purified box C/D snoRNPs are able to reproduce site-specific 2'-O-methylation of target RNA in vitro. *Molecular and cellular biology* 22, 6663-6668.
- Gallagher, J.E., 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 & development* 18, 2506-2517.
- Gallagher, R.C., Pils, B., Albalwi, M., and Francke, U. (2002). Evidence for the role of PWCR1/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *American journal of human genetics* 71, 669-678.
- Gallant, P. (2007). Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends in cell biology* 17, 187-192.
- 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 & development* 11, 941-956.
- Ganot, P., Jady, 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. *Molecular and cellular biology* 19, 6906-6917.
- Gao, L., Ma, J., Mannoor, K., Guarnera, M.A., Shetty, A., Zhan, M., Xing, L., Stass, S.A., and Jiang, F. (2015). Genome-wide small nucleolar RNA expression analysis of lung cancer by next-generation deep sequencing. *International journal of cancer Journal international du cancer* 136, E623-629.

- Garland, W., Feigenbutz, M., Turner, M., and Mitchell, P. (2013). Rrp47 functions in RNA surveillance and stable RNA processing when divorced from the exoribonuclease and exosome-binding domains of Rrp6. *Rna* 19, 1659-1668.
- Garst, A.D., and Batey, R.T. (2009). A switch in time: detailing the life of a riboswitch. *Biochimica et biophysica acta* 1789, 584-591.
- Gartner, W., Rossbacher, J., Zierhut, B., Daneva, T., Base, W., Weissel, M., Waldhausl, W., Pasternack, M.S., and Wagner, L. (2003). The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. *Cell motility and the cytoskeleton* 56, 79-93.
- Garton, M., Najafabadi, H.S., Schmitges, F.W., Radovani, E., Hughes, T.R., and Kim, P.M. (2015). A structural approach reveals how neighbouring C2H2 zinc fingers influence DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.*
- Gaspin, C., Cavaille, J., Erauso, G., and Bachellerie, J.P. (2000). Archaeal homologs of eukaryotic methylation guide small nucleolar RNAs: lessons from the *Pyrococcus* genomes. *Journal of molecular biology* 297, 895-906.
- Gautier, T., Berges, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (1997). Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Molecular and cellular biology* 17, 7088-7098.
- Gee, H.E., Buffa, F.M., Camps, C., Ramachandran, A., Leek, R., Taylor, M., Patil, M., Sheldon, H., Betts, G., Homer, J., *et al.* (2011). The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *British journal of cancer* 104, 1168-1177.
- Geerlings, T.H., Vos, J.C., and Raue, 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.
- Gehrke, S., Imai, Y., Sokol, N., and Lu, B. (2010). Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* 466, 637-641.
- Gentili, C., Castor, D., Kaden, S., Lauterbach, D., Gysi, M., Steigemann, P., Gerlich, D.W., Jiricny, J., and Ferrari, S. (2015). Chromosome Missegregation Associated with RUVBL1 Deficiency. *PloS one* 10, e0133576.
- Georgescu, R., Langston, L., and O'Donnell, M. (2015). A proposal: Evolution of PCNA's role as a marker of newly replicated DNA. *DNA repair* 29, 4-15.
- Gerczei, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15301-15306.
- Gerczei, 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. *Journal of molecular biology* 390, 991-1006.
- Germond, J.E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellark, M., and Chambon, P. (1975). Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 1843-1847.
- Ghalei, H., Hsiao, H.H., Urlaub, H., Wahl, M.C., and Watkins, N.J. (2010). A novel Nop5-sRNA interaction that is required for efficient archaeal box C/D sRNP formation. *Rna* 16, 2341-2348.
- Ginisty, H., Amalric, F., and Bouvet, P. (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *The EMBO journal* 17, 1476-1486.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *Journal of cell science* 112 (Pt 6), 761-772.
- Giorgi, C., Fatica, A., Nagel, R., and Bozzoni, I. (2001). Release of U18 snoRNA from its host intron requires interaction of Nop1p with the Rnt1p endonuclease. *The EMBO journal* 20, 6856-6865.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., and Carmell, M.A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442, 199-202.
- Gkikopoulos, T., Havas, K.M., Dewar, H., and Owen-Hughes, T. (2009). SWI/SNF and Asf1p cooperate to displace histones during induction of the *saccharomyces cerevisiae* HO promoter. *Molecular and cellular biology* 29, 4057-4066.
- Glatt-Deeley, H., Bancescu, D.L., and Lalande, M. (2010). Prader-Willi syndrome, Snord115, and Htr2c editing. *Neurogenetics* 11, 143-144.
- Gonatopoulos-Pournatzis, T., and Cowling, V.H. (2014). Cap-binding complex (CBC). *The Biochemical journal* 457, 231-242.
- Gonzales, F.A., Zanchin, N.I., 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. *Journal of molecular biology* 346, 437-455.
- Gorynia, S., Bandejas, T.M., Pinho, F.G., McVey, C.E., Vornheim, C., Round, A., Svergun, D.I., Donner, P., Matias, P.M., and Carrondo, M.A. (2011). Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine - the RuvBL1/RuvBL2 complex. *Journal of structural biology* 176, 279-291.
- Gottlieb, S., and Esposito, R.E. (1989). A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* 56, 771-776.
- Gottschalk, A., Neubauer, G., Banroques, J., Mann, M., Luhrmann, R., and Fabrizio, P. (1999). Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-sRNP. *The EMBO journal* 18, 4535-4548.
- Gradolatto, A., Smart, S.K., Byrum, S., Blair, L.P., Rogers, R.S., Kolar, E.A., Lavender, H., Larson, S.K., Aitchison, J.D., Taverna, S.D., *et al.* (2009). A

- noncanonical bromodomain in the AAA ATPase protein Yta7 directs chromosomal positioning and barrier chromatin activity. *Molecular and cellular biology* 29, 4604-4611.
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, 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. *Molecular cell* 10, 105-115.
- Granneman, S., Gallagher, J.E., Vogelzangs, J., Horstman, W., van Venrooij, W.J., Baserga, S.J., and Pruijn, G.J. (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., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9613-9618.
- Granneman, S., Pruijn, G.J., 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. *The Journal of biological chemistry* 277, 48490-48500.
- Granneman, S., Vogelzangs, J., Luhrmann, R., van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J., and Watkins, N.J. (2004). Role of pre-rRNA base pairing and 80S complex formation in subnucleolar localization of the U3 snoRNP. *Molecular and cellular biology* 24, 8600-8610.
- Green, E.M., Antczak, A.J., Bailey, A.O., Franco, A.A., Wu, K.J., Yates, J.R., 3rd, and Kaufman, P.D. (2005). Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Current biology : CB* 15, 2044-2049.
- Gribun, A., Cheung, K.L., Huen, J., Ortega, J., and Houry, W.A. (2008). Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *Journal of molecular biology* 376, 1320-1333.
- Grigoletto, A., Lestienne, P., and Rosenbaum, J. (2011). The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1815, 147-157.
- Grigoletto, A., Neaud, V., Allain-Courtois, N., Lestienne, P., and Rosenbaum, J. (2013). The ATPase activity of reptin is required for its effects on tumor cell growth and viability in hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer research : MCR* 11, 133-139.
- Grimm, C., Chari, A., Pelz, J.P., Kuper, J., Kisker, C., Diederichs, K., Stark, H., Schindelin, H., and Fischer, U. (2013). Structural basis of assembly chaperone-mediated snRNP formation. *Molecular cell* 49, 692-703.
- Grivna, S.T., Beyret, E., Wang, Z., and Lin, H. (2006). A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes & development* 20, 1709-1714.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128, 721-733.
- Grozdanov, P.N., Roy, S., Kittur, N., and Meier, U.T. (2009). SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *Rna* 15, 1188-1197.
- Grzechnik, P., and Kufel, J. (2008). Polyadenylation linked to transcription termination directs the processing of snoRNA precursors in yeast. *Molecular cell* 32, 247-258.
- Gstir, R., Schaffner, S., Scheideler, M., Misslinger, M., Griebel, M., Daschil, N., Humpel, C., Obermair, G.J., Schmuckermair, C., Striessnig, J., *et al.* (2014). Generation of a neuro-specific microarray reveals novel differentially expressed noncoding RNAs in mouse models for neurodegenerative diseases. *Rna* 20, 1929-1943.
- Gudipati, R.K., Xu, Z., Lebreton, A., Seraphin, B., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., and Libri, D. (2012). Extensive degradation of RNA precursors by the exosome in wild-type cells. *Molecular cell* 48, 409-421.
- Guendel, I., Meltzer, B.W., Baer, A., Dever, S.M., Valerie, K., Guo, J., Wu, Y., and Kehn-Hall, K. (2015). BRCA1 functions as a novel transcriptional cofactor in HIV-1 infection. *Virology journal* 12, 40.
- Guenther, B., Onrust, R., Sali, A., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of E. coli DNA polymerase III. *Cell* 91, 335-345.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Guerra, B., Iwabuchi, K., and Issinger, O.G. (2014). Protein kinase CK2 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of DNA double-strand break induced by radiomimetic drugs. *Cancer letters* 345, 115-123.
- Guffanti, E., Ferrari, R., Preti, M., Forloni, M., Harismendy, O., Lefebvre, O., and Dieci, G. (2006). A minimal promoter for TFIIC-dependent in vitro transcription of snoRNA and tRNA genes by RNA polymerase III. *The Journal of biological chemistry* 281, 23945-23957.
- Guo, A., Gu, H., Zhou, J., Mulhern, D., Wang, Y., Lee, K.A., Yang, V., Aguiar, M., Kornhauser, J., Jia, X., *et al.* (2014). Immunoaffinity enrichment and mass spectrometry analysis of protein methylation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13, 372-387.
- Gupta, R., Kus, B., Fladd, C., Wasmuth, J., Tonikian, R., Sidhu, S., Krogan, N.J., Parkinson, J., and Rotin, D. (2007). Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Molecular systems biology* 3, 116.
- Guthrie, C., Nashimoto, H., and Nomura, M. (1969). Structure and function of E. coli ribosomes. 8. Cold-

sensitive mutants defective in ribosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 63, 384-391.

Gutierrez-Preciado, A., Henkin, T.M., Grundy, F.J., Yanofsky, C., and Merino, E. (2009). Biochemical features and functional implications of the RNA-based T-box regulatory mechanism. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 73, 36-61.

Gyenis, L., Turowec, J.P., Bretner, M., and Litchfield, D.W. (2013). Chemical proteomics and functional proteomics strategies for protein kinase inhibitor validation and protein kinase substrate identification: applications to protein kinase CK2. *Biochimica et biophysica acta* 1834, 1352-1358.

H

Hainer, S.J., and Martens, J.A. (2016). Regulation of chaperone binding and nucleosome dynamics by key residues within the globular domain of histone H3. *Epigenetics & chromatin* 9, 17.

Haldar, D., and Kamakaka, R.T. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Hst4 functions in DNA damage response by regulating histone H3 K56 acetylation. *Eukaryotic cell* 7, 800-813.

Hall, T.M. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Current opinion in structural biology* 15, 367-373.

Han, J., Zhang, H., Zhang, H., Wang, Z., Zhou, H., and Zhang, Z. (2013). A Cul4 E3 ubiquitin ligase regulates histone hand-off during nucleosome assembly. *Cell* 155, 817-829.

Han, J., Zhou, H., Horazdovsky, B., Zhang, K., Xu, R.M., and Zhang, Z. (2007a). Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science* 315, 653-655.

Han, J., Zhou, H., Li, Z., Xu, R.M., and Zhang, Z. (2007b). The Rtt109-Vps75 histone acetyltransferase complex acetylates non-nucleosomal histone H3. *The Journal of biological chemistry* 282, 14158-14164.

Han, Y., Zhan, Y., Hou, G., and Li, L. (2014). Cyclin-dependent kinase 9 may as a novel target in downregulating the atherosclerosis inflammation (Review). *Biomedical reports* 2, 775-779.

Hanel, M.L., and Wevrick, R. (2001). The role of genomic imprinting in human developmental disorders: lessons from Prader-Willi syndrome. *Clinical genetics* 59, 156-164.

Haramati, S., Chapnik, E., Sztainberg, Y., Eilam, R., Zwang, R., Gershoni, N., McGlinn, E., Heiser, P.W., Wills, A.M., Wirguin, I., *et al.* (2010). miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13111-13116.

Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 70, 789-829.

Hatton, D., and Gray, J.C. (1999). Two MAR DNA-binding proteins of the pea nuclear matrix identify a

new class of DNA-binding proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 18, 417-429.

Hausmann, S., and Shuman, S. (2005). Specificity and mechanism of RNA cap guanine-N2 methyltransferase (Tgs1). *The Journal of biological chemistry* 280, 4021-4024.

Hautbergue, G.M., Hung, M.L., Walsh, M.J., Snijders, A.P., Chang, C.T., Jones, R., Ponting, C.P., Dickman, M.J., and Wilson, S.A. (2009). UIF, a New mRNA export adaptor that works together with REF/ALY, requires FACT for recruitment to mRNA. *Current biology* : CB 19, 1918-1924.

Hazbun, T.R., Malmstrom, L., Anderson, S., Graczyk, B.J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B.A., Aranda, J.D., McDonald, W.H., Chiu, C.H., *et al.* (2003). Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Molecular cell* 12, 1353-1365.

He, X., Chen, X., Zhang, X., Duan, X., Pan, T., Hu, Q., Zhang, Y., Zhong, F., Liu, J., Zhang, H., *et al.* (2015). An Lnc RNA (GAS5)/SnoRNA-derived piRNA induces activation of TRAIL gene by site-specifically recruiting MLL/COMPASS-like complexes. *Nucleic Acids Res* 43, 3712-3725.

Hebert, S.S., Horre, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A.S., Mandemakers, W., Silahtaroglu, A.N., Kauppinen, S., Delacourte, A., and De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6415-6420.

Hebert, S.S., Papadopoulou, A.S., Smith, P., Galas, M.C., Planel, E., Silahtaroglu, A.N., Sergeant, N., Buee, L., and De Strooper, B. (2010). Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human molecular genetics* 19, 3959-3969.

Hedges, J., West, M., and Johnson, A.W. (2005). Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *The EMBO journal* 24, 567-579.

Hegemann, B., Hutchins, J.R., Hudecz, O., Novatchkova, M., Rameseder, J., Sykora, M.M., Liu, S., Mazanek, M., Lenart, P., Heriche, J.K., *et al.* (2011). Systematic phosphorylation analysis of human mitotic protein complexes. *Science signaling* 4, rs12.

Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res* 34, 721-733.

Henikoff, S. (2008). Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nature reviews Genetics* 9, 15-26.

Henras, A.K., Dez, C., and Henry, Y. (2004). RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. *Current opinion in structural biology* 14, 335-343.

Henras, A.K., Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A., and Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic

- ribosome biogenesis. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 65, 2334-2359.
- 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. *The EMBO journal* 13, 2452-2463.
- Heo, K., Kim, H., Choi, S.H., Choi, J., Kim, K., Gu, J., Lieber, M.R., Yang, A.S., and An, W. (2008). FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. *Molecular cell* 30, 86-97.
- Hertel, J., Hofacker, I.L., and Stadler, P.F. (2008). SnoReport: computational identification of snoRNAs with unknown targets. *Bioinformatics* 24, 158-164.
- Higa-Nakamine, S., Suzuki, T., Uechi, T., Chakraborty, A., Nakajima, Y., Nakamura, M., Hirano, N., Suzuki, T., and Kenmochi, N. (2012). Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. *Nucleic Acids Res* 40, 391-398.
- 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.
- Hillgren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T.H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413, 538-542.
- Hirose, T., Ideue, T., Nagai, M., Hagiwara, M., Shu, M.D., and Steitz, J.A. (2006). A spliceosomal intron binding protein, IBP160, links position-dependent assembly of intron-encoded box C/D snoRNP to pre-mRNA splicing. *Molecular cell* 23, 673-684.
- Hirose, T., Shu, M.D., and Steitz, J.A. (2003). Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells. *Molecular cell* 12, 113-123.
- Hirose, T., and Steitz, J.A. (2001). Position within the host intron is critical for efficient processing of box C/D snoRNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12914-12919.
- 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.
- Hoareau-Aveilla, C., Fayet-Lebaron, E., Jady, 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.
- Hodl, M., and Basler, K. (2012). Transcription in the absence of histone H3.2 and H3K4 methylation. *Current biology* : CB 22, 2253-2257.
- Hoek, M., Myers, M.P., and Stillman, B. (2011). An analysis of CAF-1-interacting proteins reveals dynamic and direct interactions with the KU complex and 14-3-3 proteins. *The Journal of biological chemistry* 286, 10876-10887.
- Hoepfner, M.P., and Poole, A.M. (2012). Comparative genomics of eukaryotic small nucleolar RNAs reveals deep evolutionary ancestry amidst ongoing intragenomic mobility. *BMC evolutionary biology* 12, 183.
- Hoepfner, M.P., White, S., Jeffares, D.C., and Poole, A.M. (2009). Evolutionarily stable association of intronic snoRNAs and microRNAs with their host genes. *Genome biology and evolution* 1, 420-428.
- Holzmann, K., Gerner, C., Korosec, T., Poltl, A., Grimm, R., and Sauermann, G. (1998). Identification and characterization of the ubiquitously occurring nuclear matrix protein NMP 238. *Biochemical and biophysical research communications* 252, 39-45.
- Hopper, A.K. (2013). Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 194, 43-67.
- Horejsi, Z., Stach, L., Flower, T.G., Joshi, D., Flynn, H., Skehel, J.M., O'Reilly, N.J., Ogradowicz, R.W., Smerdon, S.J., and Boulton, S.J. (2014). Phosphorylation-dependent PIH1D1 interactions define substrate specificity of the R2TP cochaperone complex. *Cell reports* 7, 19-26.
- Horejsi, Z., Takai, H., Adelman, C.A., Collis, S.J., Flynn, H., Maslen, S., Skehel, J.M., de Lange, T., and Boulton, S.J. (2010). CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Molecular cell* 39, 839-850.
- Horn, D.M., Mason, S.L., and Karbstein, K. (2011). Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production. *The Journal of biological chemistry* 286, 34082-34087.
- Huang, G., Hu, H., Xue, X., Shen, S., Gao, E., Guo, G., Shen, X., and Zhang, X. (2013). Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer. *Clinical & translational oncology* : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 15, 563-568.
- Huang, H., Yu, Z., Zhang, S., Liang, X., Chen, J., Li, C., Ma, J., and Jiao, R. (2010). *Drosophila* CAF-1 regulates HP1-mediated epigenetic silencing and pericentric heterochromatin stability. *Journal of cell science* 123, 2853-2861.
- Huang, L., and Lilley, D.M. (2016). The Kink Turn, a Key Architectural Element in RNA Structure. *Journal of molecular biology* 428, 790-801.
- Huang, S. (2002). Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *The Journal of cell biology* 157, 739-741.
- Huang, S., Zhou, H., Katzmman, D., Hochstrasser, M., Atanasova, E., and Zhang, Z. (2005a). Rtt106p is a histone chaperone involved in heterochromatin-mediated silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13410-13415.

- Huang, S., Zhou, H., Tarara, J., and Zhang, Z. (2007a). A novel role for histone chaperones CAF-1 and Rtt106p in heterochromatin silencing. *The EMBO journal* 26, 2274-2283.
- Huang, Z.P., Chen, C.J., Zhou, H., Li, B.B., and Qu, L.H. (2007b). A combined computational and experimental analysis of two families of snoRNA genes from *Caenorhabditis elegans*, revealing the expression and evolution pattern of snoRNAs in nematodes. *Genomics* 89, 490-501.
- Huang, Z.P., Zhou, H., He, H.L., Chen, C.L., Liang, D., and Qu, L.H. (2005b). Genome-wide analyses of two families of snoRNA genes from *Drosophila melanogaster*, demonstrating the extensive utilization of introns for coding of snoRNAs. *Rna* 11, 1303-1316.
- Huen, J., Kakihara, Y., Ugwu, F., Cheung, K.L., Ortega, J., and Houry, W.A. (2010). Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 88, 29-40.
- Hughes, J.M. (1996). Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA. *Journal of molecular biology* 259, 645-654.
- Hughes, J.M., and Ares, M., Jr. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *The EMBO journal* 10, 4231-4239.
- Hughes, T.R., Marton, M.J., Jones, A.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Armour, C.D., Bennett, H.A., Coffey, E., Dai, H., He, Y.D., et al. (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102, 109-126.
- Huttenhofer, A., Brosius, J., and Bachellerie, J.P. (2002). RNomics: identification and function of small, non-messenger RNAs. *Current opinion in chemical biology* 6, 835-843.
- Hutzinger, R., Feederle, R., Mrazek, J., Schiefermeier, N., Balwierz, P.J., Zavolan, M., Polacek, N., Delecluse, H.J., and Huttenhofer, A. (2009). Expression and processing of a small nucleolar RNA from the Epstein-Barr virus genome. *PLoS pathogens* 5, e1000547.
- I
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463-473.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.
- Imhof, A., and Wolffe, A.P. (1999). Purification and properties of the *Xenopus* Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus. *Biochemistry* 38, 13085-13093.
- Inoue, M., Saeki, M., Egusa, H., Niwa, H., and Kamisaki, Y. (2010). PIH1D1, a subunit of R2TP complex, inhibits doxorubicin-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 403, 340-344.
- Isin, M., Ozgur, E., Cetin, G., Erten, N., Aktan, M., Gezer, U., and Dalay, N. (2014). Investigation of circulating lncRNAs in B-cell neoplasms. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 431, 255-259.
- Isogai, Y., Takada, S., Tjian, R., and Keles, S. (2007). Novel TRF1/BRF target genes revealed by genome-wide analysis of *Drosophila* Pol III transcription. *The EMBO journal* 26, 79-89.
- Ito, T., Bulger, M., Pazin, M.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 90, 145-155.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4569-4574.
- Itsuki, Y., Saeki, M., Nakahara, H., Egusa, H., Irie, Y., Terao, Y., Kawabata, S., Yatani, H., and Kamisaki, Y. (2008). Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains. *FEBS letters* 582, 2365-2370.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W., and Gorlich, D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *The EMBO journal* 16, 6535-6547.
- Izaurralde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C., and Mattaj, I.W. (1995). A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* 376, 709-712.
- Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., and Mattaj, I.W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* 78, 657-668.
- Izumi, N., Yamashita, A., Iwamatsu, A., Kurata, R., Nakamura, H., Saari, B., Hirano, H., Anderson, P., and Ohno, S. (2010). AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Science signaling* 3, ra27.
- Izumi, N., Yamashita, A., and Ohno, S. (2012). Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. *Nucleus* 3, 29-43.
- 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. *Molecular cell* 44, 660-666.

- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078.
- Jacobs, D.M., Lipton, A.S., Isern, N.G., Daughdrill, G.W., Lowry, D.F., Gomes, X., and Wold, M.S. (1999). Human replication protein A: global fold of the N-terminal RPA-70 domain reveals a basic cleft and flexible C-terminal linker. *Journal of biomolecular NMR* **14**, 321-331.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422-1425.
- Jady, B.E., Bertrand, E., and Kiss, T. (2004). Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *The Journal of cell biology* **164**, 647-652.
- Jady, B.E., and Kiss, T. (2001). A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *The EMBO journal* **20**, 541-551.
- Jamai, A., Puglisi, A., and Strubin, M. (2009). Histone chaperone spt16 promotes redeposition of the original h3-h4 histones evicted by elongating RNA polymerase. *Molecular cell* **35**, 377-383.
- Jamonnak, N., Creamer, T.J., Darby, M.M., Schaugency, P., Wheelan, S.J., and Corden, J.L. (2011). Yeast Nrd1, Nab3, and Sen1 transcriptome-wide binding maps suggest multiple roles in post-transcriptional RNA processing. *Rna* **17**, 2011-2025.
- Jasencakova, Z., Scharf, A.N., Ask, K., Corpet, A., Imhof, A., Almouzni, G., and Groth, A. (2010). Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones. *Molecular cell* **37**, 736-743.
- Jawdekar, G.W., and Henry, R.W. (2008). Transcriptional regulation of human small nuclear RNA genes. *Biochimica et biophysica acta* **1779**, 295-305.
- Jeganathan, A., Leong, V., Zhao, L., Huen, J., Nano, N., Houry, W.A., and Ortega, J. (2015). Yeast rvb1 and rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency. *Journal of molecular biology* **427**, 1875-1886.
- Jego, G., Hazoume, A., Seigneure, R., and Garrido, C. (2013). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters* **332**, 275-285.
- Jelinic, P., and Shaw, P. (2007). Loss of imprinting and cancer. *The Journal of pathology* **211**, 261-268.
- Jeng, W., Lee, S., Sung, N., Lee, J., and Tsai, F.T. (2015). Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states. *F1000Research* **4**.
- 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.
- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Therien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., *et al.* (2007). Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Molecular cell* **27**, 262-274.
- Jha, S., and Dutta, A. (2009). RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Molecular cell* **34**, 521-533.
- Jiang, W., Middleton, K., Yoon, H.J., Fouquet, C., and Carbon, J. (1993). An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules. *Molecular and cellular biology* **13**, 4884-4893.
- Jinn, S., Brandis, K.A., Ren, A., Chacko, A., Dudley-Rucker, N., Gale, S.E., Sidhu, R., Fujiwara, H., Jiang, H., Olsen, B.N., *et al.* (2015). snoRNA U17 regulates cellular cholesterol trafficking. *Cell metabolism* **21**, 855-867.
- Johansson, J. (2009). RNA thermosensors in bacterial pathogens. *Contributions to microbiology* **16**, 150-160.
- Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D., and Toft, D.O. (1998). Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *The Journal of biological chemistry* **273**, 3679-3686.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual review of plant biology* **57**, 19-53.
- Jonsson, Z.O., Dhar, S.K., Narlikar, G.J., Auty, R., Wagle, N., Pellman, D., Pratt, R.E., Kingston, R., and Dutta, A. (2001). Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5% of yeast genes. *The Journal of biological chemistry* **276**, 16279-16288.
- Jungmichel, S., Rosenthal, F., Altmeyer, M., Lukas, J., Hottiger, M.O., and Nielsen, M.L. (2013). Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Molecular cell* **52**, 272-285.

K

- Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., and Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae*. *Genes & development* **18**, 1227-1240.
- Kadyrova, L.Y., Rodrigues Blanco, E., and Kadyrov, F.A. (2013). Human CAF-1-dependent nucleosome assembly in a defined system. *Cell cycle* **12**, 3286-3297.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development* **13**, 2570-2580.
- Kagami, M., Sekita, Y., Nishimura, G., Irie, M., Kato, F., Okada, M., Yamamori, S., Kishimoto, H., Nakayama, M., Tanaka, Y., *et al.* (2008). Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nature genetics* **40**, 237-242.

- Kakihara, Y., and Houry, W.A. (2012). The R2TP complex: discovery and functions. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 101-107.
- Kakihara, Y., Makhnevych, T., Zhao, L., Tang, W., and Houry, W.A. (2014). Nutritional status modulates box C/D snoRNP biogenesis by regulated subcellular relocalization of the R2TP complex. *Genome biology* 15, 404.
- Kamano, Y., Saeki, M., Egusa, H., Kakihara, Y., Houry, W.A., Yatani, H., and Kamisaki, Y. (2013). PIH1D1 interacts with mTOR complex 1 and enhances ribosome RNA transcription. *FEBS letters* 587, 3303-3308.
- Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Matsu-ura, T., Makino, Y., Masani, A., Okazaki, K., Morishita, T., and Tamura, T.A. (1999). TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a. *The Journal of biological chemistry* 274, 22437-22444.
- Kanemaki, M., Makino, Y., Yoshida, T., Kishimoto, T., Koga, A., Yamamoto, K., Yamamoto, M., Moncollin, V., Egly, J.M., Muramatsu, M., *et al.* (1997). Molecular cloning of a rat 49-kDa TBP-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the bacterial RuvB. *Biochemical and biophysical research communications* 235, 64-68.
- Kaplan, C.D., Laprade, L., and Winston, F. (2003). Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* 301, 1096-1099.
- Kaplan, T., Liu, C.L., Erkmann, J.A., Holik, J., Grunstein, M., Kaufman, P.D., Friedman, N., and Rando, O.J. (2008). Cell cycle- and chaperone-mediated regulation of H3K56ac incorporation in yeast. *PLoS genetics* 4, e1000270.
- Karagoz, G.E., Duarte, A.M., Akoury, E., Ippel, H., Biernat, J., Moran Luengo, T., Radli, M., Didenko, T., Nordhues, B.A., Veprintsev, D.B., *et al.* (2014). Hsp90-Tau complex reveals molecular basis for specificity in chaperone action. *Cell* 156, 963-974.
- 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.
- Katan-Khaykovich, Y., and Struhl, K. (2011). Splitting of H3-H4 tetramers at transcriptionally active genes undergoing dynamic histone exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 1296-1301.
- Katiyar, P., Ma, Y., Fan, S., Pestell, R.G., Furth, P.A., and Rosen, E.M. (2006). Regulation of progesterone receptor signaling by BRCA1 in mammary cancer. *Nuclear receptor signaling* 4, e006.
- Kaufman, P.D., Kobayashi, R., Kessler, N., and Stillman, B. (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* 81, 1105-1114.
- Kawaji, H., and Hayashizaki, Y. (2008). Exploration of small RNAs. *PLoS genetics* 4, e22.
- Kawaji, H., Nakamura, M., Takahashi, Y., Sandelin, A., Katayama, S., Fukuda, S., Daub, C.O., Kai, C., Kawai, J., Yasuda, J., *et al.* (2008). Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics* 9, 157.
- Kawakami, K., Shafer, B.K., Garfinkel, D.J., Strathern, J.N., and Nakamura, Y. (1992). Ty element-induced temperature-sensitive mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 131, 821-832.
- Keck, K.M., and Pemberton, L.F. (2011). Interaction with the histone chaperone Vps75 promotes nuclear localization and HAT activity of Rtt109 in vivo. *Traffic* 12, 826-839.
- Kehr, S., Bartschat, S., Tafer, H., Stadler, P.F., and Hertel, J. (2014). Matching of Soulmates: coevolution of snoRNAs and their targets. *Molecular biology and evolution* 31, 455-467.
- Keller, D.M., and Lu, H. (2002). p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *The Journal of biological chemistry* 277, 50206-50213.
- Kemble, D.J., Whitby, F.G., Robinson, H., McCullough, L.L., Formosa, T., and Hill, C.P. (2013). Structure of the Spt16 middle domain reveals functional features of the histone chaperone FACT. *The Journal of biological chemistry* 288, 10188-10194.
- Kenseth, J.R., and Coldiron, S.J. (2004). High-throughput characterization and quality control of small-molecule combinatorial libraries. *Current opinion in chemical biology* 8, 418-423.
- Kettenbach, A.N., Schweppe, D.K., Faherty, B.K., Pechenick, D., Pletnev, A.A., and Gerber, S.A. (2011). Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Science signaling* 4, rs5.
- Khajapeer, K.V., and Baskaran, R. (2015). Hsp90 Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia research and treatment* 2015, 757694.
- Khurana, N., and Bhattacharyya, S. (2015). Hsp90, the concertmaster: tuning transcription. *Frontiers in oncology* 5, 100.
- Kim, E.D., and Sung, S. (2012). Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks. *Trends in plant science* 17, 16-21.
- Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., Vanti, W.B., Voronov, S.V., Murchison, E., Hannon, G., and Abeliovich, A. (2007). A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317, 1220-1224.
- Kim, S.G., Hoffman, G.R., Poulogiannis, G., Buel, G.R., Jang, Y.J., Lee, K.W., Kim, B.Y., Erikson, R.L., Cantley, L.C., Choo, A.Y., *et al.* (2013). Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. *Molecular cell* 49, 172-185.
- Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P.R., and Agard, D.A. (2014). Glucocorticoid receptor

- function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* 157, 1685-1697.
- Kishikawa, T., Otsuka, M., Ohno, M., Yoshikawa, T., Takata, A., and Koike, K. (2015). Circulating RNAs as new biomarkers for detecting pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology* 21, 8527-8540.
- Kishore, S., Gruber, A.R., Jedlinski, D.J., Syed, A.P., Jorjani, H., and Zavolan, M. (2013). Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing. *Genome biology* 14, R45.
- Kishore, S., Khanna, A., Zhang, Z., Hui, J., Balwierz, P.J., Stefan, M., Beach, C., Nicholls, R.D., Zavolan, M., and Stamm, S. (2010). The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Human molecular genetics* 19, 1153-1164.
- Kishore, S., and Stamm, S. (2006). The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* 311, 230-232.
- Kiss-Laszlo, 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.
- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., and Kiss, T. (1998). Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *The EMBO journal* 17, 797-807.
- Kiss, T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 145-148.
- Kiss, T., Fayet-Lebaron, E., and Jady, B.E. (2010). Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Molecular cell* 37, 597-606.
- Kiss, T., Fayet, E., Jady, B.E., Richard, P., and Weber, M. (2006). Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71, 407-417.
- Kiss, T., Marshallsay, C., and Filipowicz, W. (1991). Alteration of the RNA polymerase specificity of U3 snRNA genes during evolution and in vitro. *Cell* 65, 517-526.
- Kitao, S., Segref, A., Kast, J., Wilm, M., Mattaj, I.W., and Ohno, M. (2008). A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates U snRNA export from the nucleus. *Molecular and cellular biology* 28, 487-497.
- Kleff, S., Andrusis, E.D., Anderson, C.W., and Sternglanz, R. (1995). Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 270, 24674-24677.
- Klinkert, B., and Narberhaus, F. (2009). Microbial thermosensors. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 66, 2661-2676.
- Knight, B., Kubik, S., Ghosh, B., Bruzzone, M.J., Geertz, M., Martin, V., Denervaud, N., Jacquet, P., Ozkan, B., Rougemont, J., *et al.* (2014). Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes & development* 28, 1695-1709.
- 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. *Molecular and cellular biology* 31, 2404-2412.
- Ko, J.M., Yau, W.L., Chan, P.L., Lung, H.L., Yang, L., Lo, P.H., Tang, J.C., Srivastava, G., Stanbridge, E.J., and Lung, M.L. (2005). Functional evidence of decreased tumorigenicity associated with monochromosome transfer of chromosome 14 in esophageal cancer and the mapping of tumor-suppressive regions to 14q32. *Genes, chromosomes & cancer* 43, 284-293.
- Koh, C.M., Iwata, T., Zheng, Q., Bethel, C., Yegnasubramanian, S., and De Marzo, A.M. (2011). Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget* 2, 669-683.
- Kos, M., and Tollervey, D. (2010). Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Molecular cell* 37, 809-820.
- Kotova, E., Jarnik, M., and Tulin, A.V. (2009). Poly (ADP-ribose) polymerase 1 is required for protein localization to Cajal body. *PLoS genetics* 5, e1000387.
- Krawitz, D.C., Kama, T., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I mutants defective for PCNA binding require Asf1/Hir proteins for silencing. *Molecular and cellular biology* 22, 614-625.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., *et al.* (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics* 37, 495-500.
- Kressler, D., Doere, M., Rojo, M., and Linder, P. (1999). Synthetic lethality with conditional dbp6 alleles identifies rsa1p, a nucleoplasmic protein involved in the assembly of 60S ribosomal subunits. *Molecular and cellular biology* 19, 8633-8645.
- Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et biophysica acta* 1803, 673-683.
- Krogan, N.J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Ryan, O.W., Golshani, A., Johnston, M., *et al.* (2003a). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Molecular cell* 11, 721-729.
- Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., *et al.* (2003b). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 23, 4207-4218.

- Krude, T. (1995). Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) colocalizes with replication foci in HeLa cell nuclei. *Experimental cell research* 220, 304-311.
- Krude, T. (1999). Chromatin assembly during DNA replication in somatic cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 263, 1-5.
- Krude, T. (2002). Chromatin assembly: the kinetochore connection. *Current biology : CB* 12, R256-258.
- Krude, T., and Keller, C. (2001). Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58, 665-672.
- Krude, T., and Knippers, R. (1993). Nucleosome assembly during complementary DNA strand synthesis in extracts from mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 268, 14432-14442.
- Kruszka, K., Barneche, F., Guyot, R., Ailhas, J., Meneau, I., Schiffer, S., Marchfelder, A., and Echeverria, M. (2003). Plant dicistronic tRNA-snoRNA genes: a new mode of expression of the small nucleolar RNAs processed by RNase Z. *The EMBO journal* 22, 621-632.
- Kubicek, K., Cerna, H., Holub, P., Pasulka, J., Hrossova, D., Loehr, F., Hofr, C., Vanacova, S., and Stefl, R. (2012). Serine phosphorylation and proline isomerization in RNAP II CTD control recruitment of Nrd1. *Genes & development* 26, 1891-1896.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 10010-10015.
- Kueng, S., Oppikofer, M., and Gasser, S.M. (2013). SIR proteins and the assembly of silent chromatin in budding yeast. *Annual review of genetics* 47, 275-306.
- 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. *Molecular and cellular biology* 20, 5415-5424.
- Kufel, J., Allmang, C., Verdone, L., Beggs, J., and Tollervey, D. (2003). A complex pathway for 3' processing of the yeast U3 snoRNA. *Nucleic Acids Res* 31, 6788-6797.
- 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.
- Kuhlmann, J.D., Baraniskin, A., Hahn, S.A., Mosel, F., Bredemeier, M., Wimberger, P., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2014). Circulating U2 small nuclear RNA fragments as a novel diagnostic tool for patients with epithelial ovarian cancer. *Clinical chemistry* 60, 206-213.
- Kuhn, J.F., Tran, E.J., and Maxwell, E.S. (2002). Archaeal ribosomal protein L7 is a functional homolog of the eukaryotic 15.5kD/Snu13p snoRNP core protein. *Nucleic Acids Res* 30, 931-941.
- Kulaeva, O.I., Gaykalova, D.A., and Studitsky, V.M. (2007). Transcription through chromatin by RNA polymerase II: histone displacement and exchange. *Mutation research* 618, 116-129.
- Kundu, L.R., Seki, M., Watanabe, N., Murofushi, H., Furukohri, A., Waga, S., Score, A.J., Blow, J.J., Horikoshi, M., Enomoto, T., et al. (2011). Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 1129-1136.
- Kurat, C.F., Lambert, J.P., van Dyk, D., Tsui, K., van Bakel, H., Kaluarachchi, S., Friesen, H., Kainth, P., Nislow, C., Figeys, D., et al. (2011). Restriction of histone gene transcription to S phase by phosphorylation of a chromatin boundary protein. *Genes & development* 25, 2489-2501.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes & development* 16, 2893-2905.
- L**
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713-724.
- Lafon, A., Taranum, S., Pietrocola, F., Dingli, F., Loew, D., Brahma, S., Bartholomew, B., and Papamichos-Chronakis, M. (2015). INO80 Chromatin Remodeler Facilitates Release of RNA Polymerase II from Chromatin for Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation. *Molecular cell* 60, 784-796.
- Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A.L., Desgres, 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. *Journal of molecular biology* 241, 492-497.
- Lafontaine, D.L. (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nature structural & molecular biology* 22, 11-19.
- Lafontaine, D.L., Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M., and Tollervey, D. (1998). The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes & development* 12, 527-537.
- 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. *Molecular and cellular biology* 20, 2650-2659.
- Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 514-520.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB* 12, 735-739.

- Lakomek, K., Stoeckl, G., Tosi, A., Schmailzl, M., and Hopfner, K.P. (2015). Structural basis for dodecameric assembly states and conformational plasticity of the full-length AAA+ ATPases Rvb1 . Rvb2. *Structure* 23, 483-495.
- Lakshminarasimhan, M., Boanca, G., Banks, C.A., Hattem, G.L., Gabriel, A.E., Groppe, B.D., Smoyer, C., Malanowski, K.E., Peak, A., Florens, L., *et al.* (2016). Proteomic and genomic analyses of the Rvb1 and Rvb2 interaction network upon deletion of R2TP complex components. *Molecular & cellular proteomics : MCP*.
- Lamanna, A.C., and Karbstein, K. (2011). An RNA conformational switch regulates pre-18S rRNA cleavage. *Journal of molecular biology* 405, 3-17.
- Lambert, J.P., Fillingham, J., Siahbazi, M., Greenblatt, J., Baetz, K., and Figeys, D. (2010). Defining the budding yeast chromatin-associated interactome. *Molecular systems biology* 6, 448.
- Lamontagne, B., and Abou Elela, S. (2007). Short RNA guides cleavage by eukaryotic RNase III. *PLoS one* 2, e472.
- Lamour, V., Lecluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M.A., and Lipinski, M. (1995). A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region. *Human molecular genetics* 4, 791-799.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lange, T.S., Ezrokhi, M., Borovjagin, A.V., Rivera-Leon, R., North, M.T., and Gerbi, S.A. (1998). Nucleolar localization elements of *Xenopus laevis* U3 small nucleolar RNA. *Molecular biology of the cell* 9, 2973-2985.
- Langkopf, A., Hammarback, J.A., Muller, R., Vallee, R.B., and Garner, C.C. (1992). Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA. *The Journal of biological chemistry* 267, 16561-16566.
- Lanzuolo, C., Ederle, S., Pollice, A., Russo, F., Storlazzi, A., and Pulitzer, J.F. (2001). The HTL1 gene (YCR020W-b) of *Saccharomyces cerevisiae* is necessary for growth at 37 degrees C, and for the conservation of chromosome stability and fertility. *Yeast* 18, 1317-1330.
- Lapinaite, A., Simon, B., Skjaerven, L., Rakwalska-Bange, M., Gabel, F., and Carlomagno, T. (2013). The structure of the box C/D enzyme reveals regulation of RNA methylation. *Nature* 502, 519-523.
- Lavery, L.A., Partridge, J.R., Ramelot, T.A., Elnatan, D., Kennedy, M.A., and Agard, D.A. (2014). Structural asymmetry in the closed state of mitochondrial Hsp90 (TRAP1) supports a two-step ATP hydrolysis mechanism. *Molecular cell* 53, 330-343.
- Leader, D.J., Clark, G.P., Watters, J., Beven, A.F., Shaw, P.J., and Brown, J.W. (1997). Clusters of multiple different small nucleolar RNA genes in plants are expressed as and processed from polycistronic pre-snoRNAs. *The EMBO journal* 16, 5742-5751.
- Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Aboul-Elela, S., and Fourmy, D. (2001). Solution structure of conserved AGNN tetraloops: insights into Rnt1p RNA processing. *The EMBO journal* 20, 7250-7258.
- Lechertier, T., Grob, A., Hernandez-Verdun, D., and Roussel, P. (2009). Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. *Experimental cell research* 315, 928-942.
- Lee, E.J., Banerjee, S., Zhou, H., Jammalamadaka, A., Arcila, M., Manjunath, B.S., and Kosik, K.S. (2011a). Identification of piRNAs in the central nervous system. *Rna* 17, 1090-1099.
- Lee, H.C., Gu, W., Shirayama, M., Youngman, E., Conte, D., Jr., and Mello, C.C. (2012). *C. elegans* piRNAs mediate the genome-wide surveillance of germline transcripts. *Cell* 150, 78-87.
- Lee, K.K., Sardi, M.E., Swanson, S.K., Gilmore, J.M., Torok, M., Grant, P.A., Florens, L., Workman, J.L., and Washburn, M.P. (2011b). Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Molecular systems biology* 7, 503.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, S.B., Ou, D.S., Lee, C.F., and Juan, L.J. (2009). Gene-specific transcriptional activation mediated by the p150 subunit of the chromatin assembly factor 1. *The Journal of biological chemistry* 284, 14040-14049.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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.
- Lee, S.R., Pratt, G.A., Martinez, F.J., Yeo, G.W., and Lykke-Andersen, J. (2015). Target Discrimination in Nonsense-Mediated mRNA Decay Requires Upf1 ATPase Activity. *Molecular cell* 59, 413-425.
- Lees-Miller, S.P. (1996). The DNA-dependent protein kinase, DNA-PK: 10 years and no ends in sight. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 74, 503-512.
- Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., *et al.* (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176.
- Lejeune, E., Bortfeld, M., White, S.A., Pidoux, A.L., Ekwall, K., Allshire, R.C., and Ladurner, A.G. (2007). The chromatin-remodeling factor FACT contributes to centromeric heterochromatin independently of RNAi. *Current biology : CB* 17, 1219-1224.

- 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.
- Lemmens, R., Moore, M.J., Al-Chalabi, A., Brown, R.H., Jr., and Robberecht, W. (2010). RNA metabolism and the pathogenesis of motor neuron diseases. *Trends in neurosciences* 33, 249-258.
- Lemmon, M.A. (2004). Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochemical Society transactions* 32, 707-711.
- Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., and Yaros, M.J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research* 37, 646-650.
- Lestrade, L., and Weber, M.J. (2006). snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 34, D158-162.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2009). SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 37, D229-232.
- Leung, K.N., Vallerio, R.O., DuBose, A.J., Resnick, J.L., and LaSalle, J.M. (2009). Imprinting regulates mammalian snoRNA-encoding chromatin decondensation and neuronal nucleolar size. *Human molecular genetics* 18, 4227-4238.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
- Li, B., Su, T., Ferrari, R., Li, J.Y., and Kurdastani, S.K. (2014). A unique epigenetic signature is associated with active DNA replication loci in human embryonic stem cells. *Epigenetics* 9, 257-267.
- Li, H.D., Zagorski, J., and Fournier, M.J. (1990). Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 10, 1145-1152.
- Li, J., Leung, A.K., Kondo, Y., Oubridge, C., and Nagai, K. (2016a). Re-refinement of the spliceosomal U4 snRNP core-domain structure. *Acta crystallographica Section D, Structural biology* 72, 131-146.
- Li, J., Soroka, J., and Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 624-635.
- Li, L., An, M., Shen, H., Huang, X., Yao, X., Liu, J., Zhu, F., Zhang, S., Chen, S., He, L., *et al.* (2015). The non-Geldanamycin Hsp90 inhibitors enhanced the antifungal activity of fluconazole. *American journal of translational research* 7, 2589-2602.
- Li, Q., Zhou, H., Wurtele, H., Davies, B., Horazdovsky, B., Verreault, A., and Zhang, Z. (2008). Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell* 134, 244-255.
- Li, T., De Clercq, N., Medina, D.A., Garre, E., Sunnerhagen, P., Perez-Ortin, J.E., and Alepuz, P. (2016b). The mRNA cap-binding protein Cbc1 is required for high and timely expression of genes by promoting the accumulation of gene-specific activators at promoters. *Biochimica et biophysica acta* 1859, 405-419.
- Liang, W.Q., and Fournier, M.J. (1995). U14 base-pairs with 18S rRNA: a novel snoRNA interaction required for rRNA processing. *Genes & development* 9, 2433-2443.
- Liang, X.H., Liu, L., and Michaeli, S. (2001). Identification of the first trypanosome H/ACA RNA that guides pseudouridine formation on rRNA. *The Journal of biological chemistry* 276, 40313-40318.
- Liang, X.H., Liu, Q., and Fournier, M.J. (2007). rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Molecular cell* 28, 965-977.
- Liang, X.H., Liu, Q., and Fournier, M.J. (2009). Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *Rna* 15, 1716-1728.
- Liang, X.H., 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.
- Liang, Y.H., Lavoie, M., Comeau, M.A., Abou Elela, S., and Ji, X. (2014). Structure of a eukaryotic RNase III postcleavage complex reveals a double-ruler mechanism for substrate selection. *Molecular cell* 54, 431-444.
- Liao, J., Yu, L., Mei, Y., Guarnera, M., Shen, J., Li, R., Liu, Z., and Jiang, F. (2010). Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Molecular cancer* 9, 198.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development* 17, 991-1008.
- 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.
- Lin, L.J., and Schultz, M.C. (2011). Promoter regulation by distinct mechanisms of functional interplay between lysine acetylase Rtt109 and histone chaperone Asf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 19599-19604.
- Liu, S., Li, P., Dybkov, O., Nottrott, S., Hartmuth, K., Luhrmann, R., Carlomagno, T., and Wahl, M.C. (2007). Binding of the human Prp31 Nop domain to a composite RNA-protein platform in U4 snRNP. *Science* 316, 115-120.
- Liu, W.H., Roemer, S.C., Port, A.M., and Churchill, M.E. (2012). CAF-1-induced oligomerization of

- histones H3/H4 and mutually exclusive interactions with Asf1 guide H3/H4 transitions among histone chaperones and DNA. *Nucleic Acids Res* 40, 11229-11239.
- Liu, Y., Huang, H., Zhou, B.O., Wang, S.S., Hu, Y., Li, X., Liu, J., Zang, J., Niu, L., Wu, J., *et al.* (2010). Structural analysis of Rtt106p reveals a DNA binding role required for heterochromatin silencing. *The Journal of biological chemistry* 285, 4251-4262.
- Lombardi, L.M., Davis, M.D., and Rine, J. (2015). Maintenance of nucleosomal balance in cis by conserved AAA-ATPase Yta7. *Genetics* 199, 105-116.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Lopez-Perrote, A., Munoz-Hernandez, H., Gil, D., and Llorca, O. (2012). Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex. *Nucleic Acids Res* 40, 11086-11099.
- Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurencon, A., Karr, T.L., and Couble, P. (2005). The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* 437, 1386-1390.
- Lorenz, O.R., Freiburger, L., Rutz, D.A., Krause, M., Zierer, B.K., Alvira, S., Cuellar, J., Valpuesta, J.M., Madl, T., Sattler, M., *et al.* (2014). Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein. *Molecular cell* 53, 941-953.
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J.P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S.Y., and Almouzni, G. (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO reports* 10, 769-775.
- Loza-Muller, L., Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L.C., Hozak, P., and Castano, E. (2015). Fibrillarin methylates H2A in RNA polymerase I trans-active promoters in *Brassica oleracea*. *Frontiers in plant science* 6, 976.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Lubben, B., Marshallsay, C., Rottmann, N., and Luhrmann, 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.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Luk, E., Vu, N.D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., *et al.* (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Molecular cell* 25, 357-368.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature cell biology* 13, 1161-1169.
- 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.
- Luo, L.F., Hou, C.C., and Yang, W.X. (2015). Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene*.
- Luo, X., and Kraus, W.L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes & development* 26, 417-432.
- Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D., and Seraphin, B. (1996). Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science* 272, 268-270.

M

- Macario, A.J., and Conway de Macario, E. (2005). Sick chaperones, cellular stress, and disease. *The New England journal of medicine* 353, 1489-1501.
- Machado-Pinilla, R., Liger, D., Leulliot, N., and Meier, U.T. (2012). Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *Rna* 18, 1833-1845.
- Maga, G., Jonsson, Z.O., Stucki, M., Spadari, S., and Hubscher, U. (1999). Dual mode of interaction of DNA polymerase epsilon with proliferating cell nuclear antigen in primer binding and DNA synthesis. *Journal of molecular biology* 285, 259-267.
- Maga, G., Stucki, M., Spadari, S., and Hubscher, U. (2000). DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *Journal of molecular biology* 295, 791-801.
- Makhnevych, T., and Houry, W.A. (2012). The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 674-682.
- Makino, Y., Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Koji, T., and Tamura, T. (1999). A rat RuvB-like protein, TIP49a, is a germ cell-enriched novel DNA helicase. *The Journal of biological chemistry* 274, 15329-15335.
- Malik, R., Lenobel, R., Santamaria, A., Ries, A., Nigg, E.A., and Korner, R. (2009). Quantitative analysis of the human spindle phosphoproteome at distinct mitotic stages. *Journal of proteome research* 8, 4553-4563.
- Malone, C.D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W.R., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2009). Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* 137, 522-535.
- Malone, E.A., Clark, C.D., Chiang, A., and Winston, F. (1991). Mutations in SPT16/CDC68 suppress cis- and trans-acting mutations that affect promoter function in

- Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology 11, 5710-5717.
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C., and Breaker, R.R. (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 113, 577-586.
- Mandal, M., and Breaker, R.R. (2004). Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nature structural & molecular biology* 11, 29-35.
- Mannoor, K., Liao, J., and Jiang, F. (2012). Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1826, 121-128.
- Marcel, V., Ghayad, S.E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.P., Solano-Gonzalez, E., Vendrell, J.A., Hacot, S., Mertani, H.C., Albaret, M.A., *et al.* (2013). p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer cell* 24, 318-330.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Cherukuri, P.F., DeWeese-Scott, C., Geer, L.Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., *et al.* (2005). CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 33, D192-196.
- Marchler-Bauer, A., and Bryant, S.H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32, W327-331.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., *et al.* (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39, D225-229.
- Marciano, G., and Huang, D.T. (2016). Structure of the human histone chaperone FACT Spt16 N-terminal domain. *Acta crystallographica Section F, Structural biology communications* 72, 121-128.
- Marheineke, K., and Krude, T. (1998). Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 changes during the cell division cycle. *The Journal of biological chemistry* 273, 15279-15286.
- Marmier-Gourrier, N., Clery, A., Senty-Segault, 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.
- Marquet, R., Isel, C., Ehresmann, C., and Ehresmann, B. (1995). tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie* 77, 113-124.
- Martens-Uzunova, E.S., Jalava, S.E., Dits, N.F., van Leenders, G.J., Moller, S., Trapman, J., Bangma, C.H., Litman, T., Visakorpi, T., and Jenster, G. (2012). Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene* 31, 978-991.
- Martinez-Balbas, M.A., Tsukiyama, T., Gdula, D., and Wu, C. (1998). Drosophila NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 132-137.
- Martini, E., Roche, D.M., Marheineke, K., Verreault, A., and Almouzni, G. (1998). Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *The Journal of cell biology* 143, 563-575.
- Mason, P.B., and Struhl, K. (2003). The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Molecular and cellular biology* 23, 8323-8333.
- Massenet S, M.A., Branlant C (1998). Posttranscriptional Modifications in the U Small Nuclear RNAs. In *Modification and Editing of RNA* B.R. Grosjean H, ed. (Washington: ASM Press), pp. 201-227.
- Massenet, S., Pellizzoni, L., Paushkin, S., Mattaj, I.W., and Dreyfuss, G. (2002). The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. *Molecular and cellular biology* 22, 6533-6541.
- Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R., and Verreault, A. (2005). A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* 436, 294-298.
- Matera, A.G., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 209-220.
- Matias, P.M., Gorynia, S., Donner, P., and Carrondo, M.A. (2006). Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *The Journal of biological chemistry* 281, 38918-38929.
- Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I.A., van Santen, M.A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., and Vertegaal, A.C. (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Molecular cell* 39, 641-652.
- Matthews, J.M., and Sunde, M. (2002). Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB life* 54, 351-355.
- Mattick, J.S. (2011). The central role of RNA in human development and cognition. *FEBS letters* 585, 1600-1616.
- Mattioli, F., D'Arcy, S., and Luger, K. (2015). The right place at the right time: chaperoning core histone variants. *EMBO reports* 16, 1454-1466.
- Maxwell, E.S., and Fournier, M.J. (1995). The small nucleolar RNAs. *Annual review of biochemistry* 64, 897-934.
- Mayer, P., Harjung, A., Breinig, M., Fischer, L., Ehemann, V., Malz, M., Scherubl, H., Britsch, S., Werner, J., Kern, M.A., *et al.* (2012). Expression and therapeutic relevance of heat-shock protein 90 in pancreatic endocrine tumors. *Endocrine-related cancer* 19, 217-232.
- Mazieres, J., Catherinne, C., Delfour, O., Gouin, S., Rouquette, I., Delisle, M.B., Prevot, G., Escamilla, R., Didier, A., Persing, D.H., *et al.* (2013). Alternative processing of the U2 small nuclear RNA produces a 19-22nt fragment with relevance for the detection of

- non-small cell lung cancer in human serum. *PLoS one* 8, e60134.
- McClellan, A.J., Scott, M.D., and Frydman, J. (2005). Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell* 121, 739-748.
- McCullough, L., Connell, Z., Petersen, C., and Formosa, T. (2015). The Abundant Histone Chaperones Spt6 and FACT Collaborate to Assemble, Inspect, and Maintain Chromatin Structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 201, 1031-1045.
- 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. *Molecular and cellular biology* 27, 6782-6793.
- McKeegan, K.S., Debieux, C.M., and Watkins, N.J. (2009). Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Molecular and cellular biology* 29, 4971-4981.
- McKnight, S.L., and Miller, O.L., Jr. (1977). Electron microscopic analysis of chromatin replication in the cellular blastoderm *Drosophila melanogaster* embryo. *Cell* 12, 795-804.
- Meaux, S., Lavoie, M., Gagnon, J., Abou Elela, S., and van Hoof, A. (2011). Reporter mRNAs cleaved by Rnt1p are exported and degraded in the cytoplasm. *Nucleic Acids Res* 39, 9357-9367.
- Megel, C., Morelle, G., Lalande, S., Duchene, A.M., Small, I., and Marechal-Drouard, L. (2015). Surveillance and cleavage of eukaryotic tRNAs. *International journal of molecular sciences* 16, 1873-1893.
- Mei, Y., Yong, J., Liu, H., Shi, Y., Meinkoth, J., Dreyfuss, G., and Yang, X. (2010). tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Molecular cell* 37, 668-678.
- Mei, Y.P., Liao, J.P., Shen, J., Yu, L., Liu, B.L., Liu, L., Li, R.Y., Ji, L., Dorsey, S.G., Jiang, Z.R., *et al.* (2012). Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. *Oncogene* 31, 2794-2804.
- Meier, U.T. (2005). The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma* 114, 1-14.
- Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F., and Fischer, U. (2001). A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nature cell biology* 3, 945-949.
- Melen, K., Tynell, J., Fagerlund, R., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D., and Julkunen, I. (2012). Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. *Virology journal* 9, 167.
- Mello, J.A., Sillje, H.H., Roche, D.M., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO reports* 3, 329-334.
- Menne, T.F., Goyenechea, B., Sanchez-Puig, N., Wong, C.C., Tonkin, L.M., Ancliff, P.J., Brost, R.L., Costanzo, M., Boone, C., and Warren, A.J. (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nature genetics* 39, 486-495.
- Mereau, A., Fournier, R., Gregoire, A., Mouglin, A., Fabrizio, P., Luhrmann, 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. *Journal of molecular biology* 273, 552-571.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews Genetics* 11, 31-46.
- Michel, C.I., Holley, C.L., Scruggs, B.S., Sidhu, R., Brookheart, R.T., Listenberger, L.L., Behlke, M.A., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2011). Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress. *Cell metabolism* 14, 33-44.
- Michot, B., Joseph, N., Mazan, S., and Bachellerie, J.P. (1999). Evolutionarily conserved structural features in the ITS2 of mammalian pre-rRNAs and potential interactions with the snoRNA U8 detected by comparative analysis of new mouse sequences. *Nucleic Acids Res* 27, 2271-2282.
- Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D., and Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 5546-5553.
- Miller, K.M., Tjeertes, J.V., Coates, J., Legube, G., Polo, S.E., Britton, S., and Jackson, S.P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nature structural & molecular biology* 17, 1144-1151.
- Miller, O.L., Jr., and Beatty, B.R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* 164, 955-957.
- Millson, S.H., Vaughan, C.K., Zhai, C., Ali, M.M., Panaretou, B., Piper, P.W., Pearl, L.H., and Prodromou, C. (2008). Chaperone ligand-discrimination by the TPR-domain protein Tah1. *The Biochemical journal* 413, 261-268.
- Miron-Garcia, M.C., Garrido-Godino, A.I., Garcia-Molinero, V., Hernandez-Torres, F., Rodriguez-Navarro, S., and Navarro, F. (2013). The prefoldin bud27 mediates the assembly of the eukaryotic RNA polymerases in an rpb5-dependent manner. *PLoS genetics* 9, e1003297.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Tollervey, D. (2003). Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable RNAs. *Molecular and cellular biology* 23, 6982-6992.
- Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1996). The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes & development* 10, 502-513.

- Mizuta, K., and Warner, J.R. (1994). Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis. *Molecular and cellular biology* 14, 2493-2502.
- Moazed, D. (2001). Common themes in mechanisms of gene silencing. *Molecular cell* 8, 489-498.
- Moggs, J.G., Grandi, P., Quivy, J.P., Jonsson, Z.O., Hubscher, U., Becker, P.B., and Almouzni, G. (2000). A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular and cellular biology* 20, 1206-1218.
- Mondal, T., Rasmussen, M., Pandey, G.K., Isaksson, A., and Kanduri, C. (2010). Characterization of the RNA content of chromatin. *Genome research* 20, 899-907.
- 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.
- Morabito, M.V., Abbas, A.I., Hood, J.L., Kesterson, R.A., Jacobs, M.M., Kump, D.S., Hachey, D.L., Roth, B.L., and Emeson, R.B. (2010). Mice with altered serotonin 2C receptor RNA editing display characteristics of Prader-Willi syndrome. *Neurobiology of disease* 39, 169-180.
- Morimoto, M., and Boerkoel, C.F. (2013). The role of nuclear bodies in gene expression and disease. *Biology* 2, 976-1033.
- Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E., and Shen, X. (2004). INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* 119, 767-775.
- Morrison, A.J., and Shen, X. (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 373-384.
- Morrissey, J.P., and Tollervey, D. (1997). U14 small nucleolar RNA makes multiple contacts with the pre-ribosomal RNA. *Chromosoma* 105, 515-522.
- Mosammaparast, N., Ewart, C.S., and Pemberton, L.F. (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *The EMBO journal* 21, 6527-6538.
- Motorin, Y., and Helm, M. (2011). RNA nucleotide methylation. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 2, 611-631.
- Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J., and Bordonne, R. (2002). Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Molecular cell* 9, 891-901.
- Mougin, A., Gottschalk, A., Fabrizio, P., Luhrmann, 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. *Journal of molecular biology* 317, 631-649.
- Mourao, A., Varrot, A., Mackereth, C.D., Cusack, S., and Sattler, M. (2010). Structure and RNA recognition by the snRNA and snoRNA transport factor PHAX. *Rna* 16, 1205-1216.
- Mourtada-Maarabouni, M., Hedge, V.L., Kirkham, L., Farzaneh, F., and Williams, G.T. (2008). Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *Journal of cell science* 121, 939-946.
- Mourtada-Maarabouni, M., Pickard, M.R., Hedge, V.L., Farzaneh, F., and Williams, G.T. (2009). GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene* 28, 195-208.
- Mueller, C.L., and Jaehning, J.A. (2002). Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. *Molecular and cellular biology* 22, 1971-1980.
- Muller-McNicoll, M., and Neugebauer, K.M. (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nature reviews Genetics* 14, 275-287.
- Murtaza, M., Dawson, S.J., Tsui, D.W., Gale, D., Forshew, T., Piskorz, A.M., Parkinson, C., Chin, S.F., Kingsbury, Z., Wong, A.S., et al. (2013). Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497, 108-112.
- Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Molecular cell* 4, 529-540.
- Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., and Horikoshi, M. (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4285-4290.
- Myslinski, E., Segault, 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

- Nabavi, S., and Nazar, R.N. (2008). U3 snoRNA promoter reflects the RNA's function in ribosome biogenesis. *Current genetics* 54, 175-184.
- Nagarajan, P., Ge, Z., Sirbu, B., Doughty, C., Agudelo Garcia, P.A., Schleiderer, M., Annunziato, A.T., Cortez, D., Kenner, L., and Parthun, M.R. (2013). Histone acetyl transferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4. *PLoS genetics* 9, e1003518.
- Nahkuri, S., Taft, R.J., Korbie, D.J., and Mattick, J.S. (2008). Molecular evolution of the HBII-52 snoRNA cluster. *Journal of molecular biology* 381, 810-815.
- Nakagawa, S., and Kageyama, Y. (2014). Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-beyond skepticism. *Biochimica et biophysica acta* 1839, 215-222.

- Nakano, S., Stillman, B., and Horvitz, H.R. (2011). Replication-coupled chromatin assembly generates a neuronal bilateral asymmetry in *C. elegans*. *Cell* **147**, 1525-1536.
- Nano, N., and Houry, W.A. (2013). Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **368**, 20110399.
- Narayanan, A., Speckmann, W., Terns, R., and Terns, M.P. (1999). Role of the box C/D motif in localization of small nucleolar RNAs to coiled bodies and nucleoli. *Molecular biology of the cell* **10**, 2131-2147.
- Nathan, D.F., Vos, M.H., and Lindquist, S. (1997). In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12949-12956.
- Neckers, L. (2007). Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *Journal of biosciences* **32**, 517-530.
- Neckers, L., and Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 64-76.
- Neil, H., Malabat, C., d'Aubenton-Carafa, Y., Xu, Z., Steinmetz, L.M., and Jacquier, A. (2009). Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* **457**, 1038-1042.
- Neuenkirchen, N., Englbrecht, C., Ohmer, J., Ziegenhals, T., Chari, A., and Fischer, U. (2015). Reconstitution of the human U snRNP assembly machinery reveals stepwise Sm protein organization. *The EMBO journal* **34**, 1925-1941.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., and Koonin, E.V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome research* **9**, 27-43.
- Newman, D.R., Kuhn, J.F., Shanab, G.M., and Maxwell, E.S. (2000). Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription. *Rna* **6**, 861-879.
- Ng, H.H., Dole, S., and Struhl, K. (2003a). The Rtf1 component of the Paf1 transcriptional elongation complex is required for ubiquitination of histone H2B. *The Journal of biological chemistry* **278**, 33625-33628.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2002). Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes & development* **16**, 806-819.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003b). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell* **11**, 709-719.
- Ng, S.Y., Lin, L., Soh, B.S., and Stanton, L.W. (2013). Long noncoding RNAs in development and disease of the central nervous system. *Trends in genetics : TIG* **29**, 461-468.
- Nguyen, V.Q., Ranjan, A., Stengel, F., Wei, D., Aebersold, R., Wu, C., and Leschziner, A.E. (2013). Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1. *Cell* **154**, 1220-1231.
- Nicholls, R.D., and Knepper, J.L. (2001). Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annual review of genomics and human genetics* **2**, 153-175.
- Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature reviews Cancer* **9**, 293-302.
- Niewiarowski, A., Bradley, A.S., Gor, J., McKay, A.R., Perkins, S.J., and Tsaneva, I.R. (2010). Oligomeric assembly and interactions within the human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 complexes. *The Biochemical journal* **429**, 113-125.
- Noble, M., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (1989). The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *The Journal of cell biology* **109**, 3367-3376.
- Nolivos, S., Carpousis, A.J., and Clouet-d'Orval, B. (2005). The K-loop, a general feature of the *Pyrococcus* C/D guide RNAs, is an RNA structural motif related to the K-turn. *Nucleic Acids Res* **33**, 6507-6514.
- Nottrott, S., Hartmuth, K., Fabrizio, P., Urlaub, H., Vidovic, I., Ficner, R., and Luhrmann, R. (1999). Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA. *The EMBO journal* **18**, 6119-6133.
- Nottrott, S., Urlaub, H., and Luhrmann, R. (2002). Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *The EMBO journal* **21**, 5527-5538.
- O**
- O'Donnell, A.F., Brewster, N.K., Kurniawan, J., Minard, L.V., Johnston, G.C., and Singer, R.A. (2004). Domain organization of the yeast histone chaperone FACT: the conserved N-terminal domain of FACT subunit Spt16 mediates recovery from replication stress. *Nucleic Acids Res* **32**, 5894-5906.
- Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Spohn, W.H., and Busch, H. (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **54**, 123-133.
- 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. *Molecular cell* **36**, 768-781.
- Ogura, T., Whiteheart, S.W., and Wilkinson, A.J. (2004). Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *Journal of structural biology* **146**, 106-112.

- Ohdate, H., Lim, C.R., Kokubo, T., Matsubara, K., Kimata, Y., and Kohno, K. (2003). Impairment of the DNA binding activity of the TATA-binding protein renders the transcriptional function of Rvb2p/Tih2p, the yeast RuvB-like protein, essential for cell growth. *The Journal of biological chemistry* 278, 14647-14656.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M., and Mattaj, I.W. (2000). PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101, 187-198.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., *et al.* (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling* 3, ra3.
- Omer, A.D., Lowe, T.M., Russell, A.G., Ebhardt, H., Eddy, S.R., and Dennis, P.P. (2000). Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science* 288, 517-522.
- Omer, A.D., Zago, M., Chang, A., and Dennis, P.P. (2006). Probing the structure and function of an archaeal C/D-box methylation guide sRNA. *Rna* 12, 1708-1720.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5289-5294.
- Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N.T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C., *et al.* (2008). Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 456, 611-616.
- Ono, M., Scott, M.S., Yamada, K., Avolio, F., Barton, G.J., and Lamond, A.I. (2011). Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 39, 3879-3891.
- Ooi, S.L., Samarsky, D.A., Fournier, M.J., and Boeke, J.D. (1998). Intronic snoRNA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the lariat-debranching enzyme: intron length effects and activity of a precursor snoRNA. *Rna* 4, 1096-1110.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105-116.
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* 400, 284-288.
- Oruganti, S., Zhang, Y., and Li, H. (2005). Structural comparison of yeast snoRNP and spliceosomal protein Snu13p with its homologs. *Biochemical and biophysical research communications* 333, 550-554.
- Oruganti, S., Zhang, Y., Li, H., Robinson, H., Terns, M.P., Terns, R.M., Yang, W., and Li, H. (2007). Alternative conformations of the archaeal Nop56/58-fibrillarin complex imply flexibility in box C/D RNPs. *Journal of molecular biology* 371, 1141-1150.
- 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*. *Molecular cell* 16, 943-954.
- Osley, M.A., Gould, J., Kim, S., Kane, M.Y., and Hereford, L. (1986). Identification of sequences in a yeast histone promoter involved in periodic transcription. *Cell* 45, 537-544.
- Osley, M.A., and Lycan, D. (1987). Trans-acting regulatory mutations that alter transcription of *Saccharomyces cerevisiae* histone genes. *Molecular and cellular biology* 7, 4204-4210.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281-300.
- Oum, J.H., Seong, C., Kwon, Y., Ji, J.H., Sid, A., Ramakrishnan, S., Ira, G., Malkova, A., Sung, P., Lee, S.E., *et al.* (2011). RSC facilitates Rad59-dependent homologous recombination between sister chromatids by promoting cohesin loading at DNA double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* 31, 3924-3937.
- Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development* 22, 3172-3183.
- ## P
- Paci, A., Liu, X.H., Huang, H., Lim, A., Houry, W.A., and Zhao, R. (2012). The stability of the small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) assembly protein Pih1 in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by its C terminus. *The Journal of biological chemistry* 287, 43205-43214.
- Pal, M., Morgan, M., Phelps, S.E., Roe, S.M., Parry-Morris, S., Downs, J.A., Polier, S., Pearl, L.H., and Prodromou, C. (2014). Structural basis for phosphorylation-dependent recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Structure* 22, 805-818.
- Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O.J., and Peterson, C.L. (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* 144, 200-213.
- 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. *Molecular and cellular biology* 7, 2899-2913.
- Parker, R. (2012). RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 671-702.
- Parthun, M.R., Widom, J., and Gottschling, D.E. (1996). The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87, 85-94.

- Patel, S., and Latterich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends in cell biology* 8, 65-71.
- Peculis, B.A. (1997). The sequence of the 5' end of the U8 small nucleolar RNA is critical for 5.8S and 28S rRNA maturation. *Molecular and cellular biology* 17, 3702-3713.
- 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.
- Pedrotti, B., and Islam, K. (1994). Purified native microtubule associated protein MAP1A: kinetics of microtubule assembly and MAP1A/tubulin stoichiometry. *Biochemistry* 33, 12463-12470.
- Pene, J.J., Knight, E., Jr., and Darnell, J.E., Jr. (1968). Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes. *Journal of molecular biology* 33, 609-623.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T., and Price, D.H. (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes & development* 12, 755-762.
- 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.
- Pennisi, R., Ascenzi, P., and di Masi, A. (2015). Hsp90: A New Player in DNA Repair? *Biomolecules* 5, 2589-2618.
- Perry, R.P. (2005). The architecture of mammalian ribosomal protein promoters. *BMC evolutionary biology* 5, 15.
- Perumal, K., and Reddy, R. (2002). The 3' end formation in small RNAs. *Gene expression* 10, 59-78.
- Petfalski, E., Dandekar, T., Henry, Y., and Tollervey, D. (1998). Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. *Molecular and cellular biology* 18, 1181-1189.
- Petukhov, M., Dagkessamanskaja, A., Bommer, M., Barrett, T., Tsaneva, I., Yakimov, A., Queval, R., Shvetsov, A., Khodorkovskiy, M., Kas, E., *et al.* (2012). Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA+ TIP49 ATPases. *Structure* 20, 1321-1331.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & development* 20, 2922-2936.
- Phipps, K.R., Charette, J., and Baserga, S.J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 2, 1-21.
- Phizicky, E.M., and Hopper, A.K. (2010). tRNA biology charges to the front. *Genes & development* 24, 1832-1860.
- Piekna-Przybylska, D., DiChiacchio, L., Mathews, D.H., and Bambara, R.A. (2010). A sequence similar to tRNA 3 Lys gene is embedded in HIV-1 U3-R and promotes minus-strand transfer. *Nature structural & molecular biology* 17, 83-89.
- Pignatelli, M., Vilella, A.J., Muffato, M., Gordon, L., White, S., Flicek, P., and Herrero, J. (2016). ncRNA orthologies in the vertebrate lineage. *Database : the journal of biological databases and curation* 2016.
- Pillai, R.N., and Ramalingam, S.S. (2014). Heat shock protein 90 inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Current opinion in oncology* 26, 159-164.
- Pluk, H., Soffner, J., Luhrmann, 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.
- Polo, S.E. (2015). Reshaping chromatin after DNA damage: the choreography of histone proteins. *Journal of molecular biology* 427, 626-636.
- Powell, W.T., Coulson, R.L., Crary, F.K., Wong, S.S., Ach, R.A., Tsang, P., Alice Yamada, N., Yasui, D.H., and Lasalle, J.M. (2013a). A Prader-Willi locus lncRNA cloud modulates diurnal genes and energy expenditure. *Human molecular genetics* 22, 4318-4328.
- Powell, W.T., Coulson, R.L., Gonzales, M.L., Crary, F.K., Wong, S.S., Adams, S., Ach, R.A., Tsang, P., Yamada, N.A., Yasui, D.H., *et al.* (2013b). R-loop formation at Snord116 mediates topotecan inhibition of Ube3a-antisense and allele-specific chromatin decondensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 13938-13943.
- Pradet-Balade, B., Girard, C., Boulon, S., Paul, C., Azzag, K., Bordonne, R., Bertrand, E., and Verheggen, C. (2011). CRM1 controls the composition of nucleoplasmic pre-snoRNA complexes to licence them for nucleolar transport. *The EMBO journal* 30, 2205-2218.
- Prendergast, J.A., Murray, L.E., Rowley, A., Carruthers, D.R., Singer, R.A., and Johnston, G.C. (1990). Size selection identifies new genes that regulate *Saccharomyces cerevisiae* cell proliferation. *Genetics* 124, 81-90.
- Prestayko, A.W., Tonato, M., and Busch, H. (1970). Low molecular weight RNA associated with 28 s nucleolar RNA. *Journal of molecular biology* 47, 505-515.
- Prochasson, P., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2005). The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes & development* 19, 2534-2539.
- Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90, 65-75.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., *et al.* (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-684.

Puri, T., Wendler, P., Sigala, B., Saibil, H., and Tsaneva, I.R. (2007). Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *Journal of molecular biology* 366, 179-192.

Q

Qian, Y.W., and Lee, E.Y. (1995). Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast. *The Journal of biological chemistry* 270, 25507-25513.

Qian, Y.W., Wang, Y.C., Hollingsworth, R.E., Jr., Jones, D., Ling, N., and Lee, E.Y. (1993). A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature* 364, 648-652.

Qiao, D., Zeeman, A.M., Deng, W., Looijenga, L.H., and Lin, H. (2002). Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 21, 3988-3999.

Qiu, H., Eifert, J., Wacheul, L., Thiry, M., Berger, A.C., Jakovljevic, J., Woolford, J.L., Jr., Corbett, A.H., Lafontaine, D.L., Terns, R.M., *et al.* (2008). Identification of genes that function in the biogenesis and localization of small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 28, 3686-3699.

Qiu, X.B., Lin, Y.L., Thome, K.C., Pian, P., Schlegel, B.P., Weremowicz, S., Parvin, J.D., and Dutta, A. (1998). An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *The Journal of biological chemistry* 273, 27786-27793.

Qu, G., van Nues, R.W., Watkins, N.J., and Maxwell, E.S. (2011). The spatial-functional coupling of box C/D and C'/D' RNPs is an evolutionarily conserved feature of the eukaryotic box C/D snoRNP nucleotide modification complex. *Molecular and cellular biology* 31, 365-374.

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. *Molecular and cellular biology* 19, 1144-1158.

Quadroni, M., Potts, A., and Waridel, P. (2015). Hsp90 inhibition induces both protein-specific and global changes in the ubiquitinome. *Journal of proteomics* 120, 215-229.

Queval, R., Papin, C., Dalvai, M., Bystricky, K., and Humbert, O. (2014). Reptin and Pontin oligomerization and activity are modulated through histone H3 N-terminal tail interaction. *The Journal of biological chemistry* 289, 33999-34012.

Quinternet, M., Rothé, B., Barbier, M., Bobo, C., Saliou, J.M., Jacquemin, C., Back, R., Chagot, M.E., Cianferani, 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. *Journal of molecular biology* 427, 2816-2839.

Quivy, J.P., Gerard, A., Cook, A.J., Roche, D., and Almouzni, G. (2008). The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nature structural & molecular biology* 15, 972-979.

R

Radovani, E., Cadorin, M., Shams, T., El-Rass, S., Karsou, A.R., Kim, H.S., Kurat, C.F., Keogh, M.C., Greenblatt, J.F., and Fillingham, J.S. (2013). The carboxyl terminus of Rtt109 functions in chaperone control of histone acetylation. *Eukaryotic cell* 12, 654-664.

Radovic, S., Rapisarda, V.A., Tosato, V., and Bruschi, C.V. (2007). Functional and comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* RVB1 and RVB2 genes with bacterial Ruv homologues. *FEMS yeast research* 7, 527-539.

Rai, T.S., and Adams, P.D. (2012). Lessons from senescence: Chromatin maintenance in non-proliferating cells. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 322-331.

Rajasethupathy, P., Antonov, I., Sheridan, R., Frey, S., Sander, C., Tuschl, T., and Kandel, E.R. (2012). A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell* 149, 693-707.

Rajewsky, N. (2006). microRNA target predictions in animals. *Nature genetics* 38 Suppl, S8-13.

Rakitina, D.V., Taliany, M., Brown, J.W., and Kalinina, N.O. (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Res* 39, 8869-8880.

Ramachandran, S., and Henikoff, S. (2015). Replicating Nucleosomes. *Science advances* 1.

Ransom, M., Dennehey, B.K., and Tyler, J.K. (2010). Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* 140, 183-195.

Ransom, M., Williams, S.K., Dechassa, M.L., Das, C., Linger, J., Adkins, M., Liu, C., Bartholomew, B., and Tyler, J.K. (2009). FACT and the proteasome promote promoter chromatin disassembly and transcriptional initiation. *The Journal of biological chemistry* 284, 23461-23471.

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. *Journal of molecular biology* 333, 295-306.

Ravens, S., Yu, C., Ye, T., Stierle, M., and Tora, L. (2015). Tip60 complex binds to active Pol II promoters and a subset of enhancers and co-regulates the c-Myc network in mouse embryonic stem cells. *Epigenetics & chromatin* 8, 45.

Rebane, A., Roomere, H., and Metspalu, A. (2002). Locations of several novel 2'-O-methylated nucleotides in human 28S rRNA. *BMC molecular biology* 3, 1.

Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences* 21, 267-271.

- Reichow, S.L., Hamma, T., Ferre-D'Amare, A.R., and Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res* 35, 1452-1464.
- Reinberg, D., and Sims, R.J., 3rd (2006). de FACTo nucleosome dynamics. *The Journal of biological chemistry* 281, 23297-23301.
- Renalier, M.H., Joseph, N., Gaspin, C., Thebault, P., and Mougin, A. (2005). The Cm56 tRNA modification in archaea is catalyzed either by a specific 2'-O-methylase, or a C/D sRNP. *Rna* 11, 1051-1063.
- Rhoades, A.R., Ruone, S., and Formosa, T. (2004). Structural features of nucleosomes reorganized by yeast FACT and its HMG box component, Nhp6. *Molecular and cellular biology* 24, 3907-3917.
- Ricciuti, B., Mecca, C., Crino, L., Baglivo, S., Cenci, M., and Metro, G. (2014). Non-coding RNAs in lung cancer. *Oncoscience* 1, 674-705.
- Richard, P., Darzacq, X., Bertrand, E., Jady, B.E., Verheggen, C., and Kiss, T. (2003). A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs. *The EMBO journal* 22, 4283-4293.
- Richard, P., Kiss, A.M., Darzacq, X., and Kiss, T. (2006). Cotranscriptional recognition of human intronic box H/ACA snoRNAs occurs in a splicing-independent manner. *Molecular and cellular biology* 26, 2540-2549.
- Roberts, J.D., Thapaliya, A., Martinez-Lumbreras, S., Kryzstofinska, E.M., and Isaacson, R.L. (2015). Structural and Functional Insights into Small, Glutamine-Rich, Tetratricopeptide Repeat Protein Alpha. *Frontiers in molecular biosciences* 2, 71.
- Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L.C., Hozak, P., and Castano, E. (2015). Fibrillarin from Archaea to human. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 107, 159-174.
- Rogelj, B., Hartmann, C.E., Yeo, C.H., Hunt, S.P., and Giese, K.P. (2003). Contextual fear conditioning regulates the expression of brain-specific small nucleolar RNAs in hippocampus. *The European journal of neuroscience* 18, 3089-3096.
- Roger, B., Moisand, A., Amalric, F., and Bouvet, P. (2003). Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. *Chromosoma* 111, 399-407.
- Rolef Ben-Shahar, T., Castillo, A.G., Osborne, M.J., Borden, K.L., Kornblatt, J., and Verreault, A. (2009). Two fundamentally distinct PCNA interaction peptides contribute to chromatin assembly factor 1 function. *Molecular and cellular biology* 29, 6353-6365.
- Romeo, M.J., Angus-Hill, M.L., Sobering, A.K., Kamada, Y., Cairns, B.R., and Levin, D.E. (2002). HTL1 encodes a novel factor that interacts with the RSC chromatin remodeling complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 22, 8165-8174.
- Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A., *et al.* (2008). MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature biotechnology* 26, 462-469.
- Ross, R.J., Weiner, M.M., and Lin, H. (2014). PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature* 505, 353-359.
- Rothé, B. (2013). Étude des processus de biogenèse des petites particules ribonucléoprotéiques nucléolaires à boîtes C/D (snoRNP C/D) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Caractérisation fonctionnelle et structurale d'une machinerie dédiée à l'assemblage de ces RNP. . Thèse.
- 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., Pena, 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.
- Rowley, A., Singer, R.A., and Johnston, G.C. (1991). CDC68, a yeast gene that affects regulation of cell proliferation and transcription, encodes a protein with a highly acidic carboxyl terminus. *Molecular and cellular biology* 11, 5718-5726.
- Rozhdestvensky, T.S., Robeck, T., Galiveti, C.R., Raabe, C.A., Seeger, B., Wolters, A., Gubar, L.V., Brosius, J., and Skryabin, B.V. (2016). Maternal transcription of non-protein coding RNAs from the PWS-critical region rescues growth retardation in mice. *Scientific reports* 6, 20398.
- Rufiange, A., Jacques, P.E., Bhat, W., Robert, F., and Nourani, A. (2007). Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Molecular cell* 27, 393-405.
- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J., and Allfrey, V.G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190, 117-128.
- Runte, M., Huttenhofer, A., Gross, S., Kieffmann, M., Horsthemke, B., and Buiting, K. (2001). The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Human molecular genetics* 10, 2687-2700.
- Runte, M., Varon, R., Horn, D., Horsthemke, B., and Buiting, K. (2005). Exclusion of the C/D box snoRNA gene cluster HBII-52 from a major role in Prader-Willi syndrome. *Human genetics* 116, 228-230.
- Ruone, S., Rhoades, A.R., and Formosa, T. (2003). Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form yFACT complexes and to reorganize nucleosomes. *The Journal of biological chemistry* 278, 45288-45295.

Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L., and Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of biochemistry* 72, 481-516.

S

Sahoo, T., del Gaudio, D., German, J.R., Shinawi, M., Peters, S.U., Person, R.E., Garnica, A., Cheung, S.W., and Beaudet, A.L. (2008). Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nature genetics* 40, 719-721.

Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 630-642.

Samarsky, D.A., and Fournier, M.J. (1998). Functional mapping of the U3 small nucleolar RNA from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 18, 3431-3444.

Santamaria, A., Wang, B., Elowe, S., Malik, R., Zhang, F., Bauer, M., Schmidt, A., Sillje, H.H., Korner, R., and Nigg, E.A. (2011). The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M110 004457.

Santisteban, M.S., Hang, M., and Smith, M.M. (2011). Histone variant H2A.Z and RNA polymerase II transcription elongation. *Molecular and cellular biology* 31, 1848-1860.

Saraiya, A.A., and Wang, C.C. (2008). snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS pathogens* 4, e1000224.

Schaeffer, D., Clark, A., Klauer, A.A., Tsanova, B., and van Hoof, A. (2011). Functions of the cytoplasmic exosome. *Advances in experimental medicine and biology* 702, 79-90.

Schattner, P., Barberan-Soler, S., and Lowe, T.M. (2006). A computational screen for mammalian pseudouridylation guide H/ACA RNAs. *Rna* 12, 15-25.

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., and Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210.

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. *The EMBO journal* 8, 4015-4024.

Schmid, M., and Jensen, T.H. (2008). The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends in biochemical sciences* 33, 501-510.

Schmitz, J., Zemmann, A., Churakov, G., Kuhl, H., Grutzner, F., Reinhardt, R., and Brosius, J. (2008). Retroposed SNOfall—a mammalian-wide comparison of platypus snoRNAs. *Genome research* 18, 1005-1010.

Schneider, J., Bajwa, P., Johnson, F.C., Bhaumik, S.R., and Shilatfard, A. (2006). Rtt109 is required for

proper H3K56 acetylation: a chromatin mark associated with the elongating RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* 281, 37270-37274.

Schubert, H.L., Blumenthal, R.M., and Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in biochemical sciences* 28, 329-335.

Schubert, T., and Langst, G. (2013). Changes in higher order structures of chromatin by RNP complexes. *RNA biology* 10, 175-179.

Schubert, T., Pusch, M.C., Diermeier, S., Benes, V., Kremmer, E., Imhof, A., and Langst, G. (2012). Df31 protein and snoRNAs maintain accessible higher-order structures of chromatin. *Molecular cell* 48, 434-444.

Schule, B., Albalwi, M., Northrop, E., Francis, D.I., Rowell, M., Slater, H.R., Gardner, R.J., and Francke, U. (2005). Molecular breakpoint cloning and gene expression studies of a novel translocation t(4;15)(q27;q11.2) associated with Prader-Willi syndrome. *BMC medical genetics* 6, 18.

Schultz, A., Nottrott, S., Hartmuth, K., and Luhrmann, R. (2006a). RNA structural requirements for the association of the spliceosomal hPrp31 protein with the U4 and U4atac small nuclear ribonucleoproteins. *The Journal of biological chemistry* 281, 28278-28286.

Schultz, A., Nottrott, S., Watkins, N.J., and Luhrmann, R. (2006b). 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. *Molecular and cellular biology* 26, 5146-5154.

Scott, M.S., Avolio, F., Ono, M., Lamond, A.I., and Barton, G.J. (2009). Human miRNA precursors with box H/ACA snoRNA features. *PLoS computational biology* 5, e1000507.

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

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

Segref, A., Mattaj, I.W., and Ohno, M. (2001). The evolutionarily conserved region of the U snRNA export mediator PHAX is a novel RNA-binding domain that is essential for U snRNA export. *Rna* 7, 351-360.

Seitz, H., Royo, H., Bortolin, M.L., Lin, S.P., Ferguson-Smith, A.C., and Cavaille, J. (2004). A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome research* 14, 1741-1748.

Shabalina, S.A., and Koonin, E.V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in ecology & evolution* 23, 578-587.

Sharp, J.A., Fouts, E.T., Krawitz, D.C., and Kaufman, P.D. (2001). Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Current biology : CB* 11, 463-473.

- Sheldon, K.E., Mauger, D.M., and Arndt, K.M. (2005). A Requirement for the *Saccharomyces cerevisiae* Paf1 complex in snoRNA 3' end formation. *Molecular cell* 20, 225-236.
- Shen, M., Eyras, E., Wu, J., Khanna, A., Josiah, S., Rederstorff, M., Zhang, M.Q., and 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, 9720-9730.
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., and Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541-544.
- Shi, X., Chen, C.H., Gao, W., Chao, S.H., and Meldrum, D.R. (2015). Parallel RNA extraction using magnetic beads and a droplet array. *Lab on a chip* 15, 1059-1065.
- Shibahara, K., and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 96, 575-585.
- Shibata, Y., and Morimoto, R.I. (2014). How the nucleus copes with proteotoxic stress. *Current biology* : CB 24, R463-474.
- Shimoda, M., Morita, S., Obata, Y., Sotomaru, Y., Kono, T., and Hatada, I. (2002). Imprinting of a small nucleolar RNA gene on mouse chromosome 12. *Genomics* 79, 483-486.
- Shirayama, M., Seth, M., Lee, H.C., Gu, W., Ishidate, T., Conte, D., Jr., and Mello, C.C. (2012). piRNAs initiate an epigenetic memory of nonself RNA in the *C. elegans* germline. *Cell* 150, 65-77.
- Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., and Deshaies, R.J. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97, 233-244.
- 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.
- Sienski, G., Donertas, D., and Brennecke, J. (2012). Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* 151, 964-980.
- Silva-Martin, N., Dauden, M.I., Glatt, S., Hoffmann, N.A., Kastiris, P., Bork, P., Beck, M., and Muller, C.W. (2016). The Combination of X-Ray Crystallography and Cryo-Electron Microscopy Provides Insight into the Overall Architecture of the Dodecameric Rvb1/Rvb2 Complex. *PloS one* 11, e0146457.
- Silva, A.C., Xu, X., Kim, H.S., Fillingham, J., Kislinger, T., Mennella, T.A., and Keogh, M.C. (2012). The replication-independent histone H3-H4 chaperones HIR, ASF1, and RTT106 co-operate to maintain promoter fidelity. *The Journal of biological chemistry* 287, 1709-1718.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *The EMBO journal* 22, 1846-1856.
- Simon, M.D., Wang, C.I., Kharchenko, P.V., West, J.A., Chapman, B.A., Alekseyenko, A.A., Borowsky, M.L., Kuroda, M.I., and Kingston, R.E. (2011). The genomic binding sites of a noncoding RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 20497-20502.
- Simoneau, A., Delgosaie, N., Celic, I., Dai, J., Abshiru, N., Costantino, S., Thibault, P., Boeke, J.D., Verreault, A., and Wurtele, H. (2015). Interplay between histone H3 lysine 56 deacetylation and chromatin modifiers in response to DNA damage. *Genetics* 200, 185-205.
- Siprashvili, Z., Webster, D.E., Johnston, D., Shenoy, R.M., Ungewickell, A.J., Bhaduri, A., Flockhart, R., Zarnegar, B.J., Che, Y., Meschi, F., *et al.* (2015). The noncoding RNAs SNORD50A and SNORD50B bind K-Ras and are recurrently deleted in human cancer. *Nature genetics*.
- Siprashvili, Z., Webster, D.E., Johnston, D., Shenoy, R.M., Ungewickell, A.J., Bhaduri, A., Flockhart, R., Zarnegar, B.J., Che, Y., Meschi, F., *et al.* (2016). The noncoding RNAs SNORD50A and SNORD50B bind K-Ras and are recurrently deleted in human cancer. *Nature genetics* 48, 53-58.
- Sloan, K.E., Gleizes, P.E., and Bohnsack, M.T. (2015). Nucleocytoplasmic Transport of RNAs and RNA-Protein Complexes. *Journal of molecular biology*.
- Sloan, K.E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Puijn, G.J., and Watkins, N.J. (2013). Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *The Journal of cell biology* 200, 577-588.
- Smerdon, M.J. (1991). DNA repair and the role of chromatin structure. *Current opinion in cell biology* 3, 422-428.
- Smith, C.L., Matheson, T.D., Trombly, D.J., Sun, X., Campeau, E., Han, X., Yates, J.R., 3rd, and Kaufman, P.D. (2014). A separable domain of the p150 subunit of human chromatin assembly factor-1 promotes protein and chromosome associations with nucleoli. *Molecular biology of the cell* 25, 2866-2881.
- Smith, D.F. (2004). Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell stress & chaperones* 9, 109-121.
- Smith, D.J., and Whitehouse, I. (2012). Intrinsic coupling of lagging-strand synthesis to chromatin assembly. *Nature* 483, 434-438.
- Smith, D.M., Benaroudj, N., and Goldberg, A. (2006). Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. *Journal of structural biology* 156, 72-83.

- Smith, J.S., and Boeke, J.D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes & development* 11, 241-254.
- Smith, S., and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* 58, 15-25.
- Smith, S., and Stillman, B. (1991). Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *The EMBO journal* 10, 971-980.
- Sobel, R.E., Cook, R.G., Perry, C.A., Annunziato, A.T., and Allis, C.D. (1995). Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1237-1241.
- Sobol, M., Yildirim, S., Philimonenko, V.V., Marasek, P., Castano, E., and Hozak, P. (2013). UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus* 4, 478-486.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Song, J.J., Garlick, J.D., and Kingston, R.E. (2008). Structural basis of histone H4 recognition by p55. *Genes & development* 22, 1313-1318.
- Sorenson, G.D., Pribish, D.M., Valone, F.H., Memoli, V.A., Bzik, D.J., and Yao, S.L. (1994). Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 3, 67-71.
- Soroka, J., Wandinger, S.K., Mausbacher, N., Schreiber, T., Richter, K., Daub, H., and Buchner, J. (2012). Conformational switching of the molecular chaperone Hsp90 via regulated phosphorylation. *Molecular cell* 45, 517-528.
- Souquere, S., Weil, D., and Pierron, G. (2015). Comparative ultrastructure of CRM1-Nucleolar bodies (CNoBs), Intranucleolar bodies (INBs) and hybrid PML/p62 bodies uncovers new facets of nuclear body dynamic and diversity. *Nucleus* 6, 326-338.
- Speranza, M.C., Nowicki, M.O., Behera, P., Cho, C.F., Chiocca, E.A., and Lawler, S.E. (2016). BKM-120 (Buparlisib): A Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitor with Anti-Invasive Properties in Glioblastoma. *Scientific reports* 6, 20189.
- Squazzo, S.L., Costa, P.J., Lindstrom, D.L., Kumer, K.E., Simic, R., Jennings, J.L., Link, A.J., Arndt, K.M., and Hartzog, G.A. (2002). The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo. *The EMBO journal* 21, 1764-1774.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 363-375.
- Stark, K.L., Xu, B., Bagchi, A., Lai, W.S., Liu, H., Hsu, R., Wan, X., Pavlidis, P., Mills, A.A., Karayiorgou, M., et al. (2008). Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nature genetics* 40, 751-760.
- Steinmetz, E.J., and Brow, D.A. (1998). Control of pre-mRNA accumulation by the essential yeast protein Nrd1 requires high-affinity transcript binding and a domain implicated in RNA polymerase II association. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6699-6704.
- Steinmetz, E.J., Conrad, N.K., Brow, D.A., and Corden, J.L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* 413, 327-331.
- Steinmetz, E.J., Ng, S.B., Cloute, J.P., and Brow, D.A. (2006). cis- and trans-Acting determinants of transcription termination by yeast RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 26, 2688-2696.
- Stillman, B. (1986). Chromatin assembly during SV40 DNA replication in vitro. *Cell* 45, 555-565.
- Stillman, D.J. (2010). Nhp6: a small but powerful effector of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1799, 175-180.
- Straight, A.F., Shou, W., Dowd, G.J., Turck, C.W., Deshaies, R.J., Johnson, A.D., and Moazed, D. (1999). Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 97, 245-256.
- Stuwe, T., Hothorn, M., Lejeune, E., Rybin, V., Bortfeld, M., Scheffzek, K., and Ladurner, A.G. (2008). The FACT Spt16 "peptidase" domain is a histone H3-H4 binding module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8884-8889.
- Su, D., Hu, Q., Li, Q., Thompson, J.R., Cui, G., Fazly, A., Davies, B.A., Botuyan, M.V., Zhang, Z., and Mer, G. (2012). Structural basis for recognition of H3K56-acetylated histone H3-H4 by the chaperone Rtt106. *Nature* 483, 104-107.
- Su, H., Xu, T., Ganapathy, S., Shadfan, M., Long, M., Huang, T.H., Thompson, I., and Yuan, Z.M. (2014). Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* 33, 1348-1358.
- Sun, C., and Woolford, J.L., Jr. (1994). The yeast NOP4 gene product is an essential nucleolar protein required for pre-rRNA processing and accumulation of 60S ribosomal subunits. *The EMBO journal* 13, 3127-3135.
- Suravajhala, P., Kogelman, L.J., and Kadarmideen, H.N. (2016). Multi-omic data integration and analysis using systems genomics approaches: methods and applications in animal production, health and welfare. *Genetics, selection, evolution : GSE* 48, 38.
- Sutton, A., Bucaria, J., Osley, M.A., and Sternglanz, R. (2001). Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription. *Genetics* 158, 587-596.
- Sweet, T., Yen, W., Khalili, K., and Amini, S. (2008). Evidence for involvement of NFBP in processing of

ribosomal RNA. *Journal of cellular physiology* 214, 381-388.

Szewczak, L.B., DeGregorio, S.J., Strobel, S.A., and Steitz, J.A. (2002). Exclusive interaction of the 15.5 kD protein with the terminal box C/D motif of a methylation guide snoRNP. *Chemistry & biology* 9, 1095-1107.

T

Tackett, A.J., Dilworth, D.J., Davey, M.J., O'Donnell, M., Aitchison, J.D., Rout, M.P., and Chait, B.T. (2005). Proteomic and genomic characterization of chromatin complexes at a boundary. *The Journal of cell biology* 169, 35-47.

Taft, R.J., Glazov, E.A., Cloonan, N., Simons, C., Stephen, S., Faulkner, G.J., Lassmann, T., Forrest, A.R., Grimmond, S.M., Schroder, K., *et al.* (2009a). Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. *Nature genetics* 41, 572-578.

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

Taft, R.J., Pheasant, M., and Mattick, J.S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29, 288-299.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51-61.

Taipale, M., Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 515-528.

Takahata, S., Yu, Y., and Stillman, D.J. (2009a). The E2F functional analogue SBF recruits the Rpd3(L) HDAC, via Whi5 and Stb1, and the FACT chromatin reorganizer, to yeast G1 cyclin promoters. *The EMBO journal* 28, 3378-3389.

Takahata, S., Yu, Y., and Stillman, D.J. (2009b). FACT and Asf1 regulate nucleosome dynamics and coactivator binding at the HO promoter. *Molecular cell* 34, 405-415.

Tan, Y., Xue, Y., Song, C., and Grunstein, M. (2013). Acetylated histone H3K56 interacts with Oct4 to promote mouse embryonic stem cell pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 11493-11498.

Tanaka, N., Smith, P., and Shuman, S. (2011). Crystal structure of Rcl1, an essential component of the eukaryal pre-rRNA processosome implicated in 18s rRNA biogenesis. *Rna* 17, 595-602.

Tanaka, R., Satoh, H., Moriyama, M., Satoh, K., Morishita, Y., Yoshida, S., Watanabe, T., Nakamura, Y., and Mori, S. (2000). Intronic U50 small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene of no protein-coding potential is mapped at the chromosome breakpoint t(3;6)(q27;q15) of human B-cell lymphoma. *Genes to*

cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 5, 277-287.

Tang, Y., Poustovoitov, M.V., Zhao, K., Garfinkel, M., Canutescu, A., Dunbrack, R., Adams, P.D., and Marmorstein, R. (2006). Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nature structural & molecular biology* 13, 921-929.

Tanner, K.G., Landry, J., Sternglanz, R., and Denu, J.M. (2000). Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14178-14182.

Tapia, H., and Morano, K.A. (2010). Hsp90 nuclear accumulation in quiescence is linked to chaperone function and spore development in yeast. *Molecular biology of the cell* 21, 63-72.

Tarkar, A., Loges, N.T., Slagle, C.E., Francis, R., Dougherty, G.W., Tamayo, J.V., Shook, B., Cantino, M., Schwartz, D., Jahnke, C., *et al.* (2013). DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nature genetics* 45, 995-1003.

Te, J., Jia, L., Rogers, J., Miller, A., and Hartson, S.D. (2007). Novel subunits of the mammalian Hsp90 signal transduction chaperone. *Journal of proteome research* 6, 1963-1973.

Terns, M.P., and Dahlberg, J.E. (1994). Retention and 5' cap trimethylation of U3 snRNA in the nucleus. *Science* 264, 959-961.

Terns, M.P., and Terns, R.M. (2002). Small nucleolar RNAs: versatile trans-acting molecules of ancient evolutionary origin. *Gene expression* 10, 17-39.

Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., and Kouzarides, T. (2014). Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* 505, 564-568.

Thaminy, S., Newcomb, B., Kim, J., Gatbonton, T., Foss, E., Simon, J., and Bedalov, A. (2007). Hst3 is regulated by Mec1-dependent proteolysis and controls the S phase checkpoint and sister chromatid cohesion by deacetylating histone H3 at lysine 56. *The Journal of biological chemistry* 282, 37805-37814.

Tiwari, S., Thakur, R., and Shankar, J. (2015). Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. *Biotechnology research international* 2015, 132635.

Tjeertes, J.V., Miller, K.M., and Jackson, S.P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *The EMBO journal* 28, 1878-1889.

Toiber, D., Erdel, F., Bouazoune, K., Silberman, D.M., Zhong, L., Mulligan, P., Sebastian, C., Cosentino, C., Martinez-Pastor, B., Giacosa, S., *et al.* (2013). SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Molecular cell* 51, 454-468.

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. *The EMBO journal* 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.
- Topisirovic, I., Svitkin, Y.V., Sonenberg, N., and Shatkin, A.J. (2011). Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 2, 277-298.
- Torchet, C., and Hermann-Le Denmat, S. (2000). Bypassing the rRNA processing endonucleolytic cleavage at site A2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* 6, 1498-1508.
- Torreira, E., Jha, S., Lopez-Blanco, J.R., Arias-Palomo, E., Chacon, P., Canas, C., Ayora, S., Dutta, A., and Llorca, O. (2008). Architecture of the pontin/reptin complex, essential in the assembly of several macromolecular complexes. *Structure* 16, 1511-1520.
- Tosi, A., Haas, C., Herzog, F., Gilmozzi, A., Berninghausen, O., Ungewickell, C., Gerhold, C.B., Lakomek, K., Aebersold, R., Beckmann, R., *et al.* (2013). Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex. *Cell* 154, 1207-1219.
- Tran, E., Zhang, X., Lackey, L., and Maxwell, E.S. (2005). Conserved spacing between the box C/D and C'/D' RNPs of the archaeal box C/D sRNP complex is required for efficient 2'-O-methylation of target RNAs. *Rna* 11, 285-293.
- Tran, E.J., Zhang, X., and Maxwell, E.S. (2003). Efficient RNA 2'-O-methylation requires juxtaposed and symmetrically assembled archaeal box C/D and C'/D' RNPs. *The EMBO journal* 22, 3930-3940.
- Trembley, J.H., Chen, Z., Unger, G., Slaton, J., Kren, B.T., Van Waes, C., and Ahmed, K. (2010). Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy. *BioFactors* 36, 187-195.
- Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., and Neckers, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nature reviews Cancer* 10, 537-549.
- Tsaneva, I.R., Muller, B., and West, S.C. (1993). RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli* exhibit DNA helicase activity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1315-1319.
- Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology* 13, 255-263.
- Tschopp, J., Esmen, P.C., and Schekman, R. (1984). Defective plasma membrane assembly in yeast secretory mutants. *Journal of bacteriology* 160, 966-970.
- Tsubota, T., Berndsen, C.E., Erkmann, J.A., Smith, C.L., Yang, L., Freitas, M.A., Denu, J.M., and Kaufman, P.D. (2007). Histone H3-K56 acetylation is catalyzed by histone chaperone-dependent complexes. *Molecular cell* 25, 703-712.
- Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A., and Osley, M.A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438, 379-383.
- Tudek, A., Porrua, O., Kabzinski, T., Lidschreiber, M., Kubicek, K., Fortova, A., Lacroute, F., Vanacova, S., Cramer, P., Stefl, R., *et al.* (2014). Molecular basis for coordinating transcription termination with noncoding RNA degradation. *Molecular cell* 55, 467-481.
- Turner, A.J., Knox, A.A., Prieto, J.L., McStay, B., and Watkins, N.J. (2009). A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4. *Molecular and cellular biology* 29, 3007-3017.
- Tveteraas, I.H., Aasrum, M., Brusevold, I.J., Odegard, J., Christoffersen, T., and Sandnes, D. (2015). Lysophosphatidic acid induces both EGFR-dependent and EGFR-independent effects on DNA synthesis and migration in pancreatic and colorectal carcinoma cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Tyc, K., and Steitz, J.A. (1989). U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. *The EMBO journal* 8, 3113-3119.
- Tycowski, K.T., Aab, A., and Steitz, J.A. (2004). Guide RNAs with 5' caps and novel box C/D snoRNA-like domains for modification of snRNAs in metazoa. *Current biology : CB* 14, 1985-1995.
- Tycowski, K.T., Shu, M.D., and Steitz, J.A. (1996). A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products. *Nature* 379, 464-466.
- Tycowski, K.T., and Steitz, J.A. (2001). Non-coding snoRNA host genes in *Drosophila*: expression strategies for modification guide snoRNAs. *European journal of cell biology* 80, 119-125.
- Tyler, J.K. (2002). Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines. *European journal of biochemistry / FEBS* 269, 2268-2274.
- Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* 402, 555-560.
- Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amiott, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (2001). Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Molecular and cellular biology* 21, 6574-6584.

U

Udem, S.A., and Warner, J.R. (1972). Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology* 65, 227-242.

Uliel, S., Liang, X.H., Unger, R., and Michaeli, S. (2004). Small nucleolar RNAs that guide modification in trypanosomatids: repertoire, targets, genome organisation, and unique functions. *International journal for parasitology* 34, 445-454.

V

- Valleron, W., Laprevotte, E., Gautier, E.F., Quelen, C., Demur, C., Delabesse, E., Agirre, X., Prosper, F., Kiss, T., and Brousset, P. (2012). Specific small nucleolar RNA expression profiles in acute leukemia. *Leukemia* 26, 2052-2060.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000a). 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. *The EMBO journal* 19, 1357-1365.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000b). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Molecular and cellular biology* 20, 441-452.
- Van Lijsebettens, M., and Grasser, K.D. (2010). The role of the transcript elongation factors FACT and HUB1 in leaf growth and the induction of flowering. *Plant signaling & behavior* 5, 715-717.
- 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. *The EMBO journal* 30, 2420-2430.
- Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. (2005). A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS biology* 3, e189.
- VanDemark, A.P., Blanksma, M., Ferris, E., Heroux, A., Hill, C.P., and Formosa, T. (2006). The structure of the yFACT Pob3-M domain, its interaction with the DNA replication factor RPA, and a potential role in nucleosome deposition. *Molecular cell* 22, 363-374.
- VanDemark, A.P., Xin, H., McCullough, L., Rawlins, R., Bentley, S., Heroux, A., Stillman, D.J., Hill, C.P., and Formosa, T. (2008). Structural and functional analysis of the Spt16p N-terminal domain reveals overlapping roles of yFACT subunits. *The Journal of biological chemistry* 283, 5058-5068.
- Varshavsky, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2, 13-28.
- Vasiljeva, L., and Buratowski, S. (2006). Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Molecular cell* 21, 239-248.
- Vasiljeva, L., Kim, M., Mutschler, H., Buratowski, S., and Meinhardt, A. (2008). The Nrd1-Nab3-Sen1 termination complex interacts with the Ser5-phosphorylated RNA polymerase II C-terminal domain. *Nature structural & molecular biology* 15, 795-804.
- Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., and Stroun, M. (1994). Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British journal of haematology* 86, 774-779.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1995). Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1629-1650.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics* 33, 261-311.
- Venema, J., Vos, H.R., Faber, A.W., van Venrooij, W.J., and Raue, 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.
- Venteicher, A.S., Meng, Z., Mason, P.J., Veenstra, T.D., and Artandi, S.E. (2008). Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* 132, 945-957.
- Verheggen, C., Lafontaine, D.L., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J.M., Bordonne, R., and Bertrand, E. (2002). Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *The EMBO journal* 21, 2736-2745.
- Verheggen, C., Mouaikel, J., Thiry, M., Blanchard, J.M., Tollervey, D., Bordonne, 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. *The EMBO journal* 20, 5480-5490.
- Verheggen, C., Pradet-Balade, B., and Bertrand, E. (2015). SnoRNPs, ZNHIT proteins and the R2TP pathway. *Oncotarget* 6, 41399-41400.
- Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes & development* 14, 1430-1438.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87, 95-104.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1998). Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Current biology : CB* 8, 96-108.
- Vidovic, I., Nottrott, S., Hartmuth, K., Luhmann, R., and Ficner, R. (2000). Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Molecular cell* 6, 1331-1342.
- Vincenti, S., De Chiara, V., Bozzoni, I., and Presutti, C. (2007). The position of yeast snoRNA-coding regions within host introns is essential for their biosynthesis and for efficient splicing of the host pre-mRNA. *Rna* 13, 138-150.
- Vitali, P., Basyuk, E., Le Meur, E., Bertrand, E., Muscatelli, F., Cavaille, J., and Huttenhofer, A. (2005). ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. *The Journal of cell biology* 169, 745-753.
- Vitali, P., Royo, H., Marty, V., Bortolin-Cavaille, M.L., and Cavaille, J. (2010). Long nuclear-retained non-coding RNAs and allele-specific higher-order chromatin organization at imprinted snoRNA gene arrays. *Journal of cell science* 123, 70-83.

- Vitali, P., Royo, H., Seitz, H., Bachellerie, J.P., Huttenhofer, A., and Cavaille, J. (2003). Identification of 13 novel human modification guide RNAs. *Nucleic Acids Res* 31, 6543-6551.
- Vizan, P., Beringer, M., Ballare, C., and Di Croce, L. (2015). Role of PRC2-associated factors in stem cells and disease. *The FEBS journal* 282, 1723-1735.
- Volk, A., and Crispino, J.D. (2015). The role of the chromatin assembly complex (CAF-1) and its p60 subunit (CHAF1b) in homeostasis and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1849, 979-986.
- Volle, C., and Dalal, Y. (2014). Histone variants: the tricksters of the chromatin world. *Current opinion in genetics & development* 25, 8-14,138.
- von Morgen, P., Horejsi, Z., and Macurek, L. (2015). Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress. *Frontiers in genetics* 6, 69.
- Vos, H.R., Faber, A.W., de Gier, M.D., Vos, J.C., and Raue, H.A. (2004). 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**
- Wachsberger, P.R., Lawrence, Y.R., Liu, Y., Rice, B., Feo, N., Leiby, B., and Dicker, A.P. (2014). Hsp90 inhibition enhances PI-3 kinase inhibition and radiosensitivity in glioblastoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 140, 573-582.
- Wang, H., Boisvert, D., Kim, K.K., Kim, R., and Kim, S.H. (2000). Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *The EMBO journal* 19, 317-323.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences* 24, 437-440.
- Washietl, S., Pedersen, J.S., Korbelt, J.O., Stocsits, C., Gruber, A.R., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Reiche, K., Tanzer, A., *et al.* (2007). Structured RNAs in the ENCODE selected regions of the human genome. *Genome research* 17, 852-864.
- Watanabe, S., Tan, D., Lakshminarasimhan, M., Washburn, M.P., Hong, E.J., Walz, T., and Peterson, C.L. (2015). Structural analyses of the chromatin remodelling enzymes INO80-C and SWR-C. *Nature communications* 6, 7108.
- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N., and Imai, H. (2006). Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & development* 20, 1732-1743.
- 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 interdisciplinary reviews RNA* 3, 397-414.
- Watkins, N.J., Dickmanns, A., and Luhrmann, 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. *Molecular and cellular biology* 22, 8342-8352.
- Watkins, N.J., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hossbach, M., Urlaub, H., and Luhrmann, R. (2004). Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Molecular cell* 16, 789-798.
- Watkins, N.J., Segault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C., and Luhrmann, R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell* 103, 457-466.
- Wayne, N., and Bolon, D.N. (2007). Dimerization of Hsp90 is required for in vivo function. Design and analysis of monomers and dimers. *The Journal of biological chemistry* 282, 35386-35395.
- Weaver, P.L., Sun, C., and Chang, T.H. (1997). Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3. *Molecular and cellular biology* 17, 1354-1365.
- Weber, M.J. (2006). Mammalian small nucleolar RNAs are mobile genetic elements. *PLoS genetics* 2, e205.
- Weinberg, R.A. (1973). Nuclear RNA metabolism. *Annual review of biochemistry* 42, 329-354.
- Weinberg, R.A., and Penman, S. (1968). Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. *Journal of molecular biology* 38, 289-304.
- Weinberg, Z., Barrick, J.E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J.N., Gore, J., Wang, J.X., Lee, E.R., Block, K.F., Sudarsan, N., *et al.* (2007). Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic Acids Res* 35, 4809-4819.
- Weinberg, Z., Wang, J.X., Bogue, J., Yang, J., Corbino, K., Moy, R.H., and Breaker, R.R. (2010). Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome biology* 11, R31.
- Weinstein, L.B., and Steitz, J.A. (1999). Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Current opinion in cell biology* 11, 378-384.
- Welch, W.J. (1991). The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. *Current opinion in cell biology* 3, 1033-1038.
- Welch, W.J., and Feramisco, J.R. (1982). Purification of the major mammalian heat shock proteins. *The Journal of biological chemistry* 257, 14949-14959.
- Westman, B.J., and Lamond, A.I. (2011). A role for SUMOylation in snoRNP biogenesis revealed by quantitative proteomics. *Nucleus* 2, 30-37.
- Westman, B.J., Verheggen, C., Hutten, S., Lam, Y.W., Bertrand, E., and Lamond, A.I. (2010). A proteomic screen for nucleolar SUMO targets shows

SUMOylation modulates the function of Nop5/Nop58. *Molecular cell* 39, 618-631.

Williams, G.T., and Farzaneh, F. (2012). Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? *Nature reviews Cancer* 12, 84-88.

Williams, G.T., Hughes, J.P., Stoneman, V., Anderson, C.L., McCarthy, N.J., Mourtada-Maarabouni, M., Pickard, M., Hedge, V.L., Trayner, I., and Farzaneh, F. (2006). Isolation of genes controlling apoptosis through their effects on cell survival. *Gene therapy & molecular biology* 10, 255-262.

Williams, S.K., and Tyler, J.K. (2007). Transcriptional regulation by chromatin disassembly and reassembly. *Current opinion in genetics & development* 17, 88-93.

Wilusz, J.E. (2016). Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability. *Biochimica et biophysica acta* 1859, 128-138.

Winkler, D.D., Muthurajan, U.M., Hieb, A.R., and Luger, K. (2011). Histone chaperone FACT coordinates nucleosome interaction through multiple synergistic binding events. *The Journal of biological chemistry* 286, 41883-41892.

Winkler, D.D., Zhou, H., Dar, M.A., Zhang, Z., and Luger, K. (2012). Yeast CAF-1 assembles histone (H3-H4)₂ tetramers prior to DNA deposition. *Nucleic Acids Res* 40, 10139-10149.

Winkler, W.C., and Breaker, R.R. (2003). Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 4, 1024-1032.

Wittmeyer, J., and Formosa, T. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein. *Molecular and cellular biology* 17, 4178-4190.

Wlotzka, W., Kudla, G., Granneman, S., and Tollervey, D. (2011). The nuclear RNA polymerase II surveillance system targets polymerase III transcripts. *The EMBO journal* 30, 1790-1803.

Wong, M.M., Cox, L.K., and Chrivia, J.C. (2007). The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. *The Journal of biological chemistry* 282, 26132-26139.

Wright, M.W., and Bruford, E.A. (2011). Naming 'junk': human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature. *Human genomics* 5, 90-98.

Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.C., Dufour, M.E., Boulay, J., Regnault, B., Devaux, F., Namane, A., Seraphin, B., *et al.* (2005). Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121, 725-737.

X

Xiao, T., Kao, C.F., Krogan, N.J., Sun, Z.W., Greenblatt, J.F., Osley, M.A., and Strahl, B.D. (2005). Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 25, 637-651.

Xie, H., Ma, H., and Zhou, D. (2013). Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma. *BioMed research international* 2013, 136106.

Xie, W., Song, C., Young, N.L., Sperling, A.S., Xu, F., Sridharan, R., Conway, A.E., Garcia, B.A., Plath, K., Clark, A.T., *et al.* (2009). Histone h3 lysine 56 acetylation is linked to the core transcriptional network in human embryonic stem cells. *Molecular cell* 33, 417-427.

Xin, H., Takahata, S., Blanksma, M., McCullough, L., Stillman, D.J., and Formosa, T. (2009). yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement. *Molecular cell* 35, 365-376.

Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2005). Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* 121, 375-385.

Xu, F., Zhang, Q., Zhang, K., Xie, W., and Grunstein, M. (2007). Sir2 deacetylates histone H3 lysine 56 to regulate telomeric heterochromatin structure in yeast. *Molecular cell* 27, 890-900.

Xu, H., Kim, U.J., Schuster, T., and Grunstein, M. (1992). Identification of a new set of cell cycle-regulatory genes that regulate S-phase transcription of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 12, 5249-5259.

Xu, M., Long, C., Chen, X., Huang, C., Chen, S., and Zhu, B. (2010). Partitioning of histone H3-H4 tetramers during DNA replication-dependent chromatin assembly. *Science* 328, 94-98.

Xu, W., Marcu, M., Yuan, X., Mimnaugh, E., Patterson, C., and Neckers, L. (2002). Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12847-12852.

Xu, Y., Ayrappetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., and Price, B.D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Molecular cell* 48, 723-733.

Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature reviews Molecular cell biology* 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. *Molecular cell* 39, 939-949.

Y

Yamada, K., Kunishima, N., Mayanagi, K., Ohnishi, T., Nishino, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H., and Morikawa, K. (2001). Crystal structure of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1442-1447.

- Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G.F., and Anderson, P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *The Journal of cell biology* 185, 35-42.
- Yamashita, R., Suzuki, Y., Takeuchi, N., Wakaguri, H., Ueda, T., Sugano, S., and Nakai, K. (2008). Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics. *Nucleic Acids Res* 36, 3707-3715.
- Yan, Z., Hu, H.Y., Jiang, X., Maierhofer, V., Neb, E., He, L., Hu, Y., Hu, H., Li, N., Chen, W., *et al.* (2011). Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. *Nucleic Acids Res* 39, 6596-6607.
- Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., *et al.* (2007). The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature medicine* 13, 486-491.
- Yang, B., Miller, A., and Kirchmaier, A.L. (2008). HST3/HST4-dependent deacetylation of lysine 56 of histone H3 in silent chromatin. *Molecular biology of the cell* 19, 4993-5005.
- Yang, B., Zwaans, B.M., Eckersdorff, M., and Lombard, D.B. (2009). The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. *Cell cycle* 8, 2662-2663.
- Yang, L., Lin, C., Liu, W., Zhang, J., Ohgi, K.A., Grinstein, J.D., Dorrestein, P.C., and Rosenfeld, M.G. (2011). ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell* 147, 773-788.
- Yang, P.K., Hoareau, C., Froment, C., Monsarrat, B., Henry, Y., and Chanfreau, G. (2005). Cotranscriptional recruitment of the pseudouridylsynthetase Cbf5p and of the RNA binding protein Naf1p during H/ACA snoRNP assembly. *Molecular and cellular biology* 25, 3295-3304.
- Yang, P.K., Rotondo, G., Porras, T., Legrain, P., and Chanfreau, G. (2002). The Shq1p.Naf1p complex is required for box H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein particle biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 277, 45235-45242.
- Yao, W., King, D.A., Beckwith, S.L., Gowans, G.J., Yen, K., Zhou, C., and Morrison, A.J. (2016). The INO80 Complex Requires the Arp5-Ies6 Subcomplex for Chromatin Remodeling and Metabolic Regulation. *Molecular and cellular biology* 36, 979-991.
- Yata, K., Lloyd, J., Maslen, S., Bleuyard, J.Y., Skehel, M., Smerdon, S.J., and Esashi, F. (2012). Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. *Molecular cell* 45, 371-383.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13808-13813.
- Ye, X., Franco, A.A., Santos, H., Nelson, D.M., Kaufman, P.D., and Adams, P.D. (2003). Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Molecular cell* 11, 341-351.
- Yeo, G.W., Coufal, N.G., Liang, T.Y., Peng, G.E., Fu, X.D., and Gage, F.H. (2009). An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nature structural & molecular biology* 16, 130-137.
- Yildirim, S., Castano, E., Sobol, M., Philimonenko, V.V., Dzajak, R., Venit, T., and Hozak, P. (2013). Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *Journal of cell science* 126, 2730-2739.
- Yin, H., and Lin, H. (2007). An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 450, 304-308.
- Yin, Q.F., Yang, L., Zhang, Y., Xiang, J.F., Wu, Y.W., Carmichael, G.G., and Chen, L.L. (2012). Long noncoding RNAs with snoRNA ends. *Molecular cell* 48, 219-230.
- Yip, W.S., Shigematsu, H., Taylor, D.W., and Baserga, S.J. (2016). Box C/D sRNA stem ends act as stabilizing anchors for box C/D di-sRNPs. *Nucleic Acids Res*.
- Yip, W.S., Vincent, N.G., and Baserga, S.J. (2013). Ribonucleoproteins in archaeal pre-rRNA processing and modification. *Archaea* 2013, 614735.
- Yogesha, S.D., Mayfield, J.E., and Zhang, Y. (2014). Cross-talk of phosphorylation and prolyl isomerization of the C-terminal domain of RNA Polymerase II. *Molecules* 19, 1481-1511.
- Yoo, D., Wootton, S.K., Li, G., Song, C., and Rowland, R.R. (2003). Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *Journal of virology* 77, 12173-12183.
- Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K., and Hartl, F.U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 781-791.
- Yu, F., Bracken, C.P., Pillman, K.A., Lawrence, D.M., Goodall, G.J., Callen, D.F., and Neilsen, P.M. (2015a). p53 Represses the Oncogenic Sno-MiR-28 Derived from a SnoRNA. *PloS one* 10, e0129190.
- Yu, J.W., Mendrola, J.M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D.B., Murray, D., Emr, S.D., and Lemmon, M.A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Molecular cell* 13, 677-688.
- Yu, Z., Liu, J., Deng, W.M., and Jiao, R. (2015b). Histone chaperone CAF-1: essential roles in multi-cellular organism development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 327-337.
- Yu, Z., Wu, H., Chen, H., Wang, R., Liang, X., Liu, J., Li, C., Deng, W.M., and Jiao, R. (2013). CAF-1 promotes Notch signaling through epigenetic control of target gene expression during *Drosophila* development. *Development* 140, 3635-3644.
- Yuan, G., Klambt, C., Bachellerie, J.P., Brosius, J., and Huttenhofer, A. (2003). RNomics in *Drosophila*

melanogaster: identification of 66 candidates for novel non-messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 31, 2495-2507.

Yuan, J., Pu, M., Zhang, Z., and Lou, Z. (2009). Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell cycle* 8, 1747-1753.

Z

Zeng, A., Li, Y.Q., Wang, C., Han, X.S., Li, G., Wang, J.Y., Li, D.S., Qin, Y.W., Shi, Y., Brewer, G., *et al.* (2013). Heterochromatin protein 1 promotes self-renewal and triggers regenerative proliferation in adult stem cells. *The Journal of cell biology* 201, 409-425.

Zeng, L., Zhang, Q., Li, S., Plotnikov, A.N., Walsh, M.J., and Zhou, M.M. (2010). Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature* 466, 258-262.

Zhai, N., Zhao, Z.L., Cheng, M.B., Di, Y.W., Yan, H.X., Cao, C.Y., Dai, H., Zhang, Y., and Shen, Y.F. (2012). Human PIH1 associates with histone H4 to mediate the glucose-dependent enhancement of pre-rRNA synthesis. *Journal of molecular cell biology* 4, 231-241.

Zhang, K., Gao, Y., Li, J., Burgess, R., Han, J., Liang, H., Zhang, Z., and Liu, Y. (2016a). A DNA binding winged helix domain in CAF-1 functions with PCNA to stabilize CAF-1 at replication forks. *Nucleic Acids Res.*

Zhang, L., Wu, C., Cai, G., Chen, S., and Ye, K. (2016b). Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast. *Genes & development* 30, 718-732.

Zhang, M., Wang, W., Li, T., Yu, X., Zhu, Y., Ding, F., Li, D., and Yang, T. (2016c). Long noncoding RNA SNHG1 predicts a poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 80, 73-79.

Zhang, R., So, B.R., Li, P., Yong, J., Glisovic, T., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2011). Structure of a key intermediate of the SMN complex reveals Gemin2's crucial function in snRNP assembly. *Cell* 146, 384-395.

Zhang, W., Tyl, M., Ward, R., Sobott, F., Maman, J., Murthy, A.S., Watson, A.A., Fedorov, O., Bowman, A., Owen-Hughes, T., *et al.* (2013a). Structural plasticity of histones H3-H4 facilitates their allosteric exchange between RbAp48 and ASF1. *Nature structural & molecular biology* 20, 29-35.

Zhang, X.O., Yin, Q.F., Wang, H.B., Zhang, Y., Chen, T., Zheng, P., Lu, X., Chen, L.L., and Yang, L. (2014). Species-specific alternative splicing leads to unique expression of sno-lncRNAs. *BMC Genomics* 15, 287.

Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & development* 13, 1924-1935.

Zhang, Y., Wang, J., Ding, M., and Yu, Y. (2013b). Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome. *Nature methods* 10, 981-984.

Zhang, Z., Shibahara, K., and Stillman, B. (2000). PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 408, 221-225.

Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y.C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A.B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., *et al.* (2005). Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* 120, 715-727.

Zhao, R., Kakiyama, Y., Gribun, A., Huen, J., Yang, G., Khanna, M., Costanzo, M., Brost, R.L., Boone, C., Hughes, T.R., *et al.* (2008). Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *The Journal of cell biology* 180, 563-578.

Zhao, Y., Ransom, J.F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A.N., Tsuchihashi, T., McManus, M.T., Schwartz, R.J., and Srivastava, D. (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 129, 303-317.

Zhong, F., Zhou, N., Wu, K., Guo, Y., Tan, W., Zhang, H., Zhang, X., Geng, G., Pan, T., Luo, H., *et al.* (2015). A SnoRNA-derived piRNA interacts with human interleukin-4 pre-mRNA and induces its decay in nuclear exosomes. *Nucleic Acids Res* 43, 10474-10491.

Zhu, Q., Wani, G., Arab, H.H., El-Mahdy, M.A., Ray, A., and Wani, A.A. (2009). Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. *DNA repair* 8, 262-273.

Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2004). Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Molecular biology of the cell* 15, 81-90.

Zou, A.E., Ku, J., Honda, T.K., Yu, V., Kuo, S.Z., Zheng, H., Xuan, Y., Saad, M.A., Hinton, A., Brumund, K.T., *et al.* (2015). Transcriptome sequencing uncovers novel long noncoding and small nucleolar RNAs dysregulated in head and neck squamous cell carcinoma. *Rna* 21, 1122-1134.

Zunder, R.M., Antczak, A.J., Berger, J.M., and Rine, J. (2012). Two surfaces on the histone chaperone Rtt106 mediate histone binding, replication, and silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E144-153.

Zunder, R.M., and Rine, J. (2012). Direct interplay among histones, histone chaperones, and a chromatin boundary protein in the control of histone gene expression. *Molecular and cellular biology* 32, 4337-4349.

ANNEXE 1

Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction

Benjamin Rothé¹, Jean-Michel Saliou², Marc Quinternet³, Régis Back¹, Decebal Tiotiu¹, Clémence Jacquemin¹, Christine Loegler¹, Florence Schlotter¹, Vlad Peña⁴, Kelvin Eckert⁵, Solange Moréra⁵, Alain Van Dorsselaer², Christiane Branlant^{1,*}, Séverine Massenet¹, Sarah Sanglier-Cianféron², Xavier Manival¹ and Bruno Charpentier^{1,*}

¹Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS Université de Lorraine, Biopôle, Campus Biologie Santé, 9 avenue de la forêt de Haye, CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France, ²Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS, UMR 7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France, ³FR CNRS-3209 Bioingénierie Moléculaire, Cellulaire et Thérapeutique (BMCT), CNRS, Université de Lorraine, Biopôle, Campus Biologie Santé, CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France, ⁴Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abtl. Röntgenkristallographie, Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany and ⁵Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales (LEBS), CNRS, 1 Avenue de Terrasse, 91198 Gif-sur Yvette, France

Received April 1, 2014; Revised June 23, 2014; Accepted June 24, 2014

ABSTRACT

Biogenesis of eukaryotic box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles (C/D snoRNPs) involves conserved *trans*-acting factors, which are proposed to facilitate the assembly of the core proteins Snu13p/15.5K, Nop58p/NOP58, Nop56p/NOP56 and Nop1p/Fibrillarin on box C/D small nucleolar RNAs (C/D snoRNAs). In yeast, protein Rsa1 acts as a platform, interacting with both the RNA-binding core protein Snu13 and protein Pih1 of the Hsp82–R2TP chaperone complex. In this work, a proteomic approach coupled with functional and structural studies identifies protein Hit1 as a novel Rsa1p-interacting partner involved in C/D snoRNP assembly. Hit1p contributes to *in vivo* C/D snoRNA stability and pre-RNA maturation kinetics. It associates with U3 snoRNA precursors and influences its 3'-end processing. Remarkably, Hit1p is required to maintain steady-state levels of Rsa1p. This stabilizing activity is likely to be general across eukaryotic species, as the human protein ZNHIT3 (TRIP3) showing sequence homology

with Hit1p regulates the abundance of NUFIP1, the Rsa1p functional homolog. The nuclear magnetic resonance solution structure of the Rsa1p_{317–352}–Hit1p_{70–164} complex reveals a novel mode of protein–protein association explaining the strong stability of the Rsa1p–Hit1p complex. Our biochemical data show that C/D snoRNAs and the core protein Nop58 can interact with the purified Snu13p–Rsa1p–Hit1p heterotrimer.

INTRODUCTION

In eukaryotes, snoRNPs (small nucleolar RNPs) and scaRNPs (small Cajal body RNPs) are essential to biogenesis of ribosomes and spliceosomes, respectively (for review (1–3)). They mediate site-specific modification of ribosomal RNAs (rRNAs) and U-rich small nuclear RNAs (UsnRNAs); box C/D snoRNPs and scaRNPs (C/D sno/scaRNPs) catalyze 2'-O-methylation of riboses, while box H/ACA snoRNPs and scaRNPs (H/ACA sno/scaRNPs) catalyze conversion of uridine to pseudouridine. Furthermore, some snoRNPs, C/D snoRNPs U3 and U8 (4,5), and mammalian U17 and yeast snR30 H/ACA

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 383 68 55 08; Fax: +33 383 68 55 09; Email: bruno.charpentier@univ-lorraine-nancy.fr
Correspondence may also be addressed to Christiane Branlant. Tel: +33 383 68 55 01; Fax: +33 383 68 55 09; E-mail: christiane.branlant@univ-lorraine.fr
Present addresses:

Benjamin Rothé, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL) SV ISREC, Station 19, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

Jean-Michel Saliou, Plateforme de Protéomique et Peptides Modifiés (P3M), Institut Pasteur de Lille, CNRS, Université Lille Nord, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France.

Régis Back, Laboratoire de Biochimie, CNRS UMR7654, Ecole Polytechnique, Route de Saclay, 91128 Palaiseau, France.

© The Author(s) 2014. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

snoRNPs (6,7), are not involved in nucleotide modifications but are implicated in pre-RNA endonucleolytic cleavages.

C/D snoRNPs each contain a box C/D small nucleolar RNA (C/D snoRNA) and a set of four core proteins, Snu13p, Nop1p, Nop56p and Nop58p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and 15.5K, Fibrillarin, NOP56 and NOP58 in human cells (8–11). Snu13p and 15.5K belong to the L7Ae family of RNA binding proteins (12) which members are components of essential RNPs: snRNP U4 (13), H/ACA snoRNPs (14), telomerase (15) and SECIS mRNPs (16,17). The L7Ae-like proteins specifically recognizes kink-turn (K-turn) or kink-loop (K-loop) RNA motifs (10,18).

Biogenesis of snoRNPs is a complex process including transcription and maturation of snoRNAs, synthesis and nuclear import of core proteins, and their assembly on snoRNAs. Mature RNPs are then delivered to their functional sites. Several studies have highlighted the involvement of *trans*-acting factors during snoRNP assembly. Two specific factors Shq1p/SHQ1 and Naf1p/NAF1, which both bind to Cbf5 core protein, play a key role in H/ACA sno/scaRNP biogenesis. Shq1p functions as an RNA mimic to prevent unspecific RNA binding (19), while Naf1p facilitates the H/ACA snoRNP co-transcriptional assembly by interacting with the RNA polymerase II CTD (20). In addition, assembly of C/D, H/ACA snoRNPs and telomerase require the Hsp82/Hsp90 co-chaperone R2TP complex (21–24), which is composed of the two AAA⁺ hexameric helicases Rvb1p/TIP49 and Rvb2p/TIP48, Tah1p/hSPAGH (RPAP3), and Pih1p/hPIH1 (PIH1D1, NOP17). The Hsp82/Hsp90 chaperone interacts with the R2TP complex by binding to the TPR domain of protein Tah1 (23,25). Data obtained in human cells indicate that in association with the R2TP complex, Hsp90 controls the stability of RNP core proteins (15.5K, NOP58, NHP2, SBP2) and participates in the assembly process (21,22,25,26). The ATPase activities of the TIP48 and TIP49 helicases are also involved in this process, since the A and B Walker motifs of TIP48 are required for yeast C/D snoRNA accumulation (21,22,27,28).

Another protein Rsa1p/NUFI1 plays a central role in R2TP recruitment on pre-snoRNPs. It interacts with Pih1p/hPIH1D1, Rvb1p/hTIP49 and Rvb2p/hTIP48, and with the RNP core proteins (21,22). In particular, a conserved stretch of 32 amino acids (yPEP in Rsa1p and hPEP in NUF1P1) is dedicated to the interaction with the C/D snoRNP protein Snu13p/15.5K (21). We identified residues required for the Snu13p–Rsa1p interaction and showed that the RNA and Rsa1p interact with opposite faces of Snu13p (29). Rsa1p/NUFI1 and in a nucleotide-dependent manner, the Rvb1p/TIP49 and Rvb2p/TIP48 components of the R2TP complex, cooperate together to scaffold C/D snoRNP assembly (28).

By interacting both with proteins Tah1 and Nop58, Pih1p plays an important role in C/D snoRNP assembly (25,26,30,31). This is illustrated by reduced amounts of C/D core proteins (26) and their mislocation in the cytosol and the nucleoplasm (31) in a Δ PIH1 strain. Structural information on the Pih1p–Tah1p interaction was recently gained by nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray studies (32,33).

Despite these recent advances in identification of cellular proteins involved in C/D snoRNPs assembly, their precise mechanism of action remains poorly understood, and functional maturation complexes have not been purified yet. There is even no evidence that the full set of C/D snoRNP assembly factors has been identified. In the present work, we identify a new participant in C/D snoRNP assembly, protein Hit1 (High Temperature growth, YJR055W). This 164 amino acid protein was originally identified in a screen for temperature sensitive mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (34), but due to the absence of further analysis, the Hit1p function remained obscure. A potential zinc finger-like domain is present in its N-terminal end. Here, we identify a functional role of Hit1p. The starting point was our co-purification of Hit1p with TAP-tagged Rsa1p in a cellular extract. Then, by *in vitro* assays and co-expression in *Escherichia coli*, we demonstrated a direct and stable interaction between the two proteins and explained this stability by NMR structural analysis of the interacting domains. In parallel, we showed that Hit1p and Rsa1p are functionally linked and that the Rsa1p steady-state level depends upon Hit1p expression. We showed that the purified recombinant Snu13p–Rsa1p–Hit1p heterotrimer binds C/D snoRNAs and Nop58p. Altogether, the data reveal a role of Hit1p in C/D snoRNP assembly and bring new insights into the assembly complexes involved in this process. In addition, according to our study of ZNHIT3 (TRIP3), a human homologue of Hit1p, some of our conclusions can be extended to vertebrates.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids, yeast and bacterial strains used

For protein co-expression in *E. coli*, PCR-amplified fragments were cloned between the *Nde*I and *Bam*HI sites of plasmids pNEA-3CH (His₆-tagged protein) and pNCS, as described (29). Snu13p was expressed using plasmid pGEX-6P-1::SNU13 (35). Derivatives of plasmid pACTII expressing Gal4-AD-Rsa1p and Gal4-AD-Rsa1_{230–381} (21) were used for Y2H assays and we built a pAS2 plasmid expressing Gal4-BD-Hit1p. Plasmid pASZ11 was used to produce U3 Δ 2,3,4 in yeast as described (35). The yeast strains (MATa, *ade2*, *arg4*, *leu2*–3,112, *trp1*–289, *ura3*–52) were used for TAP-Tagged experiments (SC4186 (RSA1-TAP), SC3760 (HIT1-TAP) and SC3165 (PIH1-TAP)) according to (36), and knocked out strains derivatives of the *S. cerevisiae* BY4741 strain (MATa; *his3* Δ 1; *leu2* Δ 0; *met15* Δ 0; *ura3* Δ 0) were provided by Euroscarf. The *S. cerevisiae* strains Y190 and Y187 were used for Y2H assays (Clontech). The *E. coli* strains CodonPlus and pRare2 (Novagen) were used for co-expression assays and protein production, respectively.

Complex purification by protein A selection affinity and their analysis by mass spectrometry

Saccharomyces cerevisiae strains expressing TAP-tagged proteins, as well as the untagged strain BY4741, were grown at 30°C in YPD to A₆₀₀ ~0.8–1. Cells were lysed by bead-beating in breaking buffer (100 mM NaCl, 8% glycerol, 0.1

mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 8). Protein A-based purifications were performed using cell amounts corresponding to 2500 A₆₀₀ U of culture (37). Total cellular extracts were incubated for 12 h at 4°C with IgG-Sepharose beads (Sigma-Aldrich). Beads were washed in washing buffer (100 mM NaCl, 0.1% IGEPAL, 0.1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4), using Mobicol columns (MoBiTec). After TEV cleavage, eluted proteins were fractionated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with Colloidal Coomassie Blue. Gel slices were picked systematically each 2 mm along the gel. In gel digestion of SDS-PAGE gel slices and mass spectrometry (MS) analysis of peptide extracts were performed as previously (38), and details are available in Supplemental Materials and Methods.

RNA co-IP and protein co-IP assays

Yeast cells expressing the TAP-tagged proteins were grown as above. Cells were lysed by bead-beating in breaking buffer; lysates were added to IgG-Sepharose beads (Sigma-Aldrich) and incubated 2 h at 4°C. Beads were washed four times in washing buffer. RNAs were extracted with phenol-chloroform and analyzed by RT-PCR using the oligonucleotides given in Supplementary Table S2 in Supplementary material. cDNAs were generated using primer OG-Rev containing sequence exogenous to the yeast genome, and used as templates for PCR amplification. PCR was performed with the 5' oligonucleotide OG-5'PCRa or the OG-5'PCRB and the 3' oligonucleotide OG-3'PCR.

Northern blot analyses

Total RNAs were extracted from exponentially growing cells (A₆₀₀ ~0.8). Northern blot was carried on 5 µg of total RNA fractionated on polyacrylamide denaturing gels (for small RNAs) or 1.2% glyoxal/DMSO agarose gels (for rRNAs). After transfer to Zeta-Probe membrane (Bio-rad), RNAs were detected using specific 5' ³²P-radiolabeled oligonucleotide probes (Supplementary Table S2 and Supplementary materials).

Protein detection by western blot

Crude cell extracts were prepared from pellets of 7 × 10⁸ yeast cells resuspended in 300 µl of buffer (150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% TRITON-X100, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5), and lysed by bead beating. The lysates were centrifuged twice at 10 000 g for 5 min. Equivalent amounts of proteins were fractionated on 12.5% SDS-PAGE and western blots were performed according to standard procedures using rabbit commercial Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP), anti-GFP, anti-HA, or anti-PMA1 (provided by B. André, LPMC, IBMM-ULB, Bruxelles, Belgium) and anti-AspRS (provided by C. Allmang-Cura and G. Eriani, IBMC, Strasbourg, France).

Immunoprecipitations using HeLa cells and analysis by SDS-PAGE and western blotting were performed as previously described (39).

Yeast two hybrid assays

For Y2H assays, appropriate pACTII and pAS2 plasmids were used to transform haploid yeast cells (strains Y190 and Y187, respectively), which were then crossed. Diploids were selected on Leu⁻, Trp⁻ medium and plated on Leu⁻, Trp⁻, His⁻ medium to test for the interaction. Various concentrations of 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) (Sigma) were used to evaluate the strength of the interactions. Growth was assessed following three days of incubation at 30°C.

Tests for synthetic lethality

Diploid strains were obtained by cross-breeding on YPD plates of simple knock-out haploid strains BY4741 (MATa) and BY4742 (MATα) from Euroscarf. Diploid cells were resuspended in 2 ml of sporulation medium (1% potassium acetate; 0.05% zinc acetate). Sporulation cultures were incubated on a roller wheel for five days at 25°C, then for three days at 30°C. Cells were dissected with a micromanipulator and separated on YPD plates. Strain genotypes were confirmed by genomic DNA extraction and PCR analysis.

RNAi experiments and analysis

HeLa cells were transfected using the Calphos Mamalian Transfection Kit (Clontech) with ON-TARGET plus SMART pool siRNAs targeting human ZNHIT3 (TRIP3) (ThermoScientific) or firefly luciferase siRNAs as a negative control. After 48 h of incubation, total extracts were prepared and analysed by western blotting. The following antibodies were used: anti-SRP68 (Proteintech), anti-β-tubulin (Sigma), anti-TRIP3 (Abcam) and anti-NUFIP1 (Proteintech). Quantification was performed using Fusion Solo bio-ID software (Vilber Lourmat).

Production of recombinant proteins

The recombinant GST-Snu13 protein was purified from cellular extract under native conditions as described (29).

Complex production by co-expressed in *E. coli*

The recombinant plasmids pnEA-3CH encoding His₆Snu13p, His₆Rsa1p, His₆Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅, or His₆Tah1p, and the recombinant plasmid pnCS encoding Hit1p, Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅, or Pih1p, were simultaneously transformed into pRare2 *E. coli* host cells (Novagen). Co-expression tests were carried out using the described procedure (29,40).

His-tagged protein pull-down

Complex formation was tested in 20 µl of buffer D (20 mM HEPES, pH 7.9, 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol) in the presence of recombinant proteins at a 2.5 µM concentration and 4 µl of ³⁵S radiolabeled Nop58p, obtained by using the *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega). After 20 min at 30°C, 180 µl of binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal, 5 mM imidazole) and 20 µl of cobalt-sepharose beads (GE Healthcare) were added. The mixture was incubated on a spinning wheel at 4°C for 90 min. Beads were washed three times with binding buffer, and retention of radiolabeled protein was analyzed by 7.5% SDS-PAGE.

Native MS

MS experiments were performed on a hybrid quadrupole/ion mobility separator/time-of-flight instrument (Synapt HDMS G2, Waters, Manchester, UK) equipped with an automated chip-based nanoelectrospray source (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY, USA) operating in the positive ion mode. External calibration was performed with the multiply charged ions produced by 2 μ M horse heart myoglobin diluted in 1:1 (v/v) water/acetonitrile acidified with 1% (v/v) formic acid. Prior to noncovalent analysis, protein buffer was exchanged against 500 mM or 1 M ammonium acetate buffer, pH 7.5, using microcentrifuge gel-filtration columns (Zeba 0.5 ml, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Mass measurements under denaturing conditions were carried out by diluting samples to 2 μ M in water/acetonitrile/formic acid (50:50:1). The Accelerating voltage (Vc) was set to 20 or 40 V, while pressure in the interface region (Pi) was 1.1 mbar. Either 500 mM (for Rsa1p_{230–375}-Hit1p) or 1 M (for Snu13p-Rsa1p_{230–375}-Hit1p) ammonium acetate buffer at pH 7.5 was used. Optimal interface parameters (Vc, Pi) were used in order to allow for detection of intact noncovalent complexes under conditions of efficient ion desolvation and ion transmission in the mass spectrometer (41). Data analysis was performed with MassLynx 3.5 (Waters, Manchester, UK).

Electrophoresis mobility shift assays

Yeast U14 snoRNA, U3 Δ 2,3,4 snoRNA (35) and tRNA^{His} were *in vitro* transcribed and 5'-end labeled as described (21). Five hundred nanomolar of various proteins or complexes was mixed and incubated for 20 min at 4°C with 5 fmol of 5'-end ³²P-radiolabeled RNA in buffer D. The RNA-protein complexes formed were visualized by native gel electrophoresis.

NMR spectroscopy and structure calculation

One millimolar ¹⁵N and ¹³C-¹⁵N labeled samples of Rsa1p_{317–352}-Hit1p_{70–164} in buffer (10 mM sodium phosphate, pH 6.4, 150 mM NaCl, 10% D₂O) were used for NMR experiments. Essentially complete resonance assignment was achieved using a classical approach based on 3D NMR spectra recorded at 293 K on 600 and 950 MHz Bruker spectrometers, both equipped with cryoprobes. Dynamics and folding of the backbone were evaluated through measurement of the ¹H-¹⁵N heteronuclear nOe and Het-SOFAST ratios (42) recorded in the same conditions as the ones used for assignment. For structure determination, distance and dihedral angle restraints were derived respectively from NOESY-HSQC ¹H-¹⁵N and ¹H-¹³C NMR experiments and from TALOS+ (43). The NMR structures were calculated using the automated procedure of CYANA 3.0 (44). The NOE assignments were carefully checked after the final iteration. Finally, RECOORD scripts were used to generate 200 water-refined structures and the 20 structures with the lowest overall energies were selected as the most representative (45). In the final structures, 99.0% of residues were in favored to generously allowed regions of Ramachandran space and 1.0% were outside.

RESULTS

Association of Rsa1p with Hit1p in yeast cells

To better characterize complexes formed during C/D snoRNP biogenesis, we tried to identify partners of proteins Rsa1 and Pih1 in yeast cells. We used a single-step immunoglobulin G (IgG) affinity purification procedure based on TAP-tagged Rsa1p and Pih1p, followed by a proteomics-based analysis. After cleavage with the TEV protease, the Rsa1p and Pih1p co-purified proteins were fractionated by 1D SDS-PAGE. Gel slices were cut systematically along the gel, and protein contents were identified by MS.

As illustrated by the spectral counts of unique peptides detected for the identified proteins, the Rvb1p, Rvb2p and Tah1p components of the R2TP complex were uniquely found in significant amounts in the Pih1p-TAP purification (Table 1) and an unexpected partner of Rsa1p, protein Hit1, was detected in the Rsa1p-TAP purification (Table 1). In both TAP-tag experiments, only three of the C/D core proteins were detected: Snu13p, Nop1p in both experiments, together with either Nop56p (Rsa1p-TAP) or Nop58p (Pih1p-TAP), and these proteins were represented by a limited number of peptides. Absence of detectable Rsa1p in the Pih1p-TAP purification and of Pih1p in the Rsa1p-TAP purification was surprising. It might reflect short life span of the interactions *in vivo*, or their destabilization during extraction. The TAP sequences might have reinforced the instability.

Nevertheless, detection of a Rsa1p-Hit1p association was interesting and to verify this association, we performed an IgG affinity purification with cells expressing Hit1p-TAP. Rsa1p was found to be associated with Hit1p, as 10 unique Rsa1p peptides were detected at high levels in the eluted Hit1p-TAP samples. Here again, no peptide from the R2TP complex was observed (Table 1). Taken together, these data suggested the existence in yeast cells of a complex containing Rsa1p and Hit1p. By screening the literature, we noticed that a possible interaction between Rsa1p and Hit1p had also been found in a large yeast two-hybrid (Y2H) screen for protein-protein interactions in yeast (46). This prompted us to test for possible direct interaction between these two proteins.

The Rsa1p-Hit1p interaction is direct and compatible with the Snu13p-Rsa1p interaction

First, we showed by Y2H assays that the Rsa1p C-terminal fragment extending from Pro230 to Lys381 (Rsa1p_{230–381}), which ectopic expression restores normal growth of a slow growing Δ RSA1 strain (21), is sufficient for association with Hit1p (Figure 1A). As this fragment carries the yPEP domain (residues 230–263), which constitutes the Snu13p-binding site of Rsa1p (21,29), we tested by co-expression in various combinations of His₆-tagged Snu13p, Hit1p and Rsa1p in *E. coli* cells, whether the Rsa1p-Hit1p interaction is direct and whether Rsa1p can simultaneously interact with Snu13p and Hit1p. Co-expressed proteins were co-purified from bacterial extracts by immobilized metal ion affinity chromatography, fractionated by SDS-PAGE and analyzed by MS. As MS analysis revealed spontaneous proteolysis of the six C-terminal amino acids of Rsa1p_{230–381}

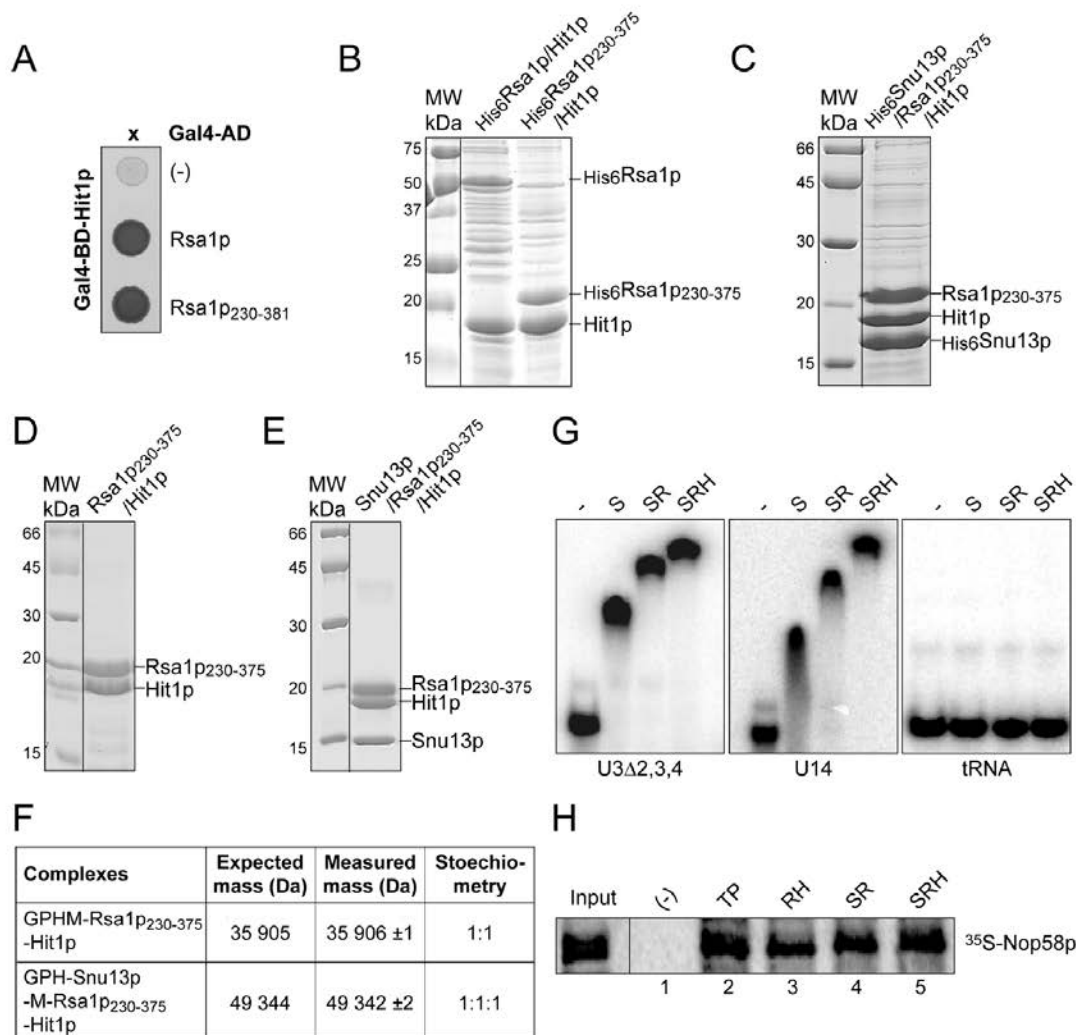


Figure 1. Rsa1p and Hit1p form a stable heterodimer able to bind Snu13p and Nop58p. (A) Y2H assay. Rsa1p and Rsa1p₂₃₀₋₃₈₁ fused to the Gal4 activation domain (AD) interact with Hit1p fused to the Gal4 DNA binding domain (BD) as evidenced by growth on a His deprived medium. (B, C, D and E) Co-expression assays in *E. coli* and complex purifications. In (B) His₆-tagged Rsa1p and Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅ were co-expressed with Hit1p, in (C) His₆-tagged Snu13p was co-expressed with Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅ and Hit1p. Complexes were selected from crude extracts by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC), followed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. Molecular weight markers (MW) (in kDa) were loaded on the left. (D and E) complexes released by cleavage of the His₆ tag with the PreScission protease were purified by size exclusion chromatography (Superdex 200 prep grade column, GE Healthcare) using GF buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, and 5 mM β-mercaptoethanol). (F) Native MS characterization of the complexes purified by gel filtration in (D) and (E). NanoESI mass spectra performed under nondenaturing conditions as described in Materials and Methods confirmed the presence of a 1:1 Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅-Hit1p and a 1:1:1 Snu13p-Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅-Hit1p complex. Removal of the His₆ tag generates the N-terminal sequences GPHM for Rsa1p and GPH for Snu13p. (G) The trimeric complex His₆Snu13p-Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅-Hit1p interacts *in vitro* with RNAs containing a K-turn RNA motif. Formation of RNA-protein complexes was assessed by EMSA. Radiolabeled U3Δ2,3,4 and U14 RNAs and a control tRNA were incubated with His₆Snu13p (lane S), His₆Snu13p-Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅ (lane SR), or His₆Snu13p-Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅-Hit1p (lane SRH) complexes obtained by IMAC followed by elution in presence of 200 mM imidazole and purified as in (D) and (E). The RNP complexes formed were resolved on a 6% non-denaturing polyacrylamide gels. (H) His-pull down assays with Nop58p. Complexes formed between ³⁵S Nop58p translated *in vitro* in bacterial S30 lysate and purified recombinant His₆Tah1p-Pih1p (lane TP), His₆Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅-Hit1p (lane RH), and SR and SRH complexes of panel (G) were bound to cobalt-Sepharose beads and analyzed by SDS-PAGE. 10% of the ³⁵S Nop58p used per assay was loaded in the Input lane.

Table 1. Identification of Hit1p as an interacting partner of Rsa1p

	Protein name	Accession number	MW (Da)	No TAP		PIH1-TAP		RSA1-TAP		HIT1-TAP	
				Unique pep (% cover)	Spectral count	Unique pep (% cover)	Spectral count	Unique pep (% cover)	Spectral count	Unique pep (% cover)	Spectral count
	Rsa1p	Q08932	43981	-	-	-	-	10 (35,4)	81	10 (32,0)	77
	Hit1p	P46973	18358	-	-	2 (20,7)	2	7 (54,9)	31	7 (54,9)	49
Box C/D core proteins	Snu13p	P39990	13551	-	-	2 (36,5)	6	2 (36,5)	9	2 (36,5)	8
	Nop1p	P15646	34195	2 (10,4)	4	4 (21,4)	5	5 (24,5)	9	6 (27,8)	9
	Nop56p	Q12460	56849	-	-	-	-	5 (20,4)	7	-	-
	Nop58p	A6ZPE5	57176	-	-	2 (6,8)	3	-	-	-	-
R2TP proteins	Pih1p	P38768	39503	-	-	13 (51,7)	58	-	-	-	-
	Tah1p	P25638	12493	-	-	4 (69,4)	34	-	-	-	-
	Rvb1p	Q03940	50436	-	-	16 (47,7)	26	-	-	-	-
	Rvb2p	Q12464	51595	-	-	17 (46,9)	34	-	-	-	-

List of the C/D snoRNP biogenesis related proteins identified by proteomic analysis after tandem affinity experiments using Rsa1p-TAP, Hit1p-TAP, Pih1p-TAP and an untagged negative control (no TAP).

(data not shown), we expressed the Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅ fragment lacking these residues. Hit1p co-purified with both His₆Rsa1p and His₆Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅ (Figure 1B). After cleavage of the His₆ tag, the release Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅-Hit1p heterodimer could be purified at homogeneity by gel filtration, demonstrating the direct interaction of the two proteins (Figure 1D). In addition, co-expressed Rsa1p₂₃₀₋₃₇₅ and Hit1p formed a heterotrimer with His₆Snu13p (Figure 1C) that was purified at homogeneity (Figure 1E). Native MS confirmed the respective 1:1 and 1:1:1 stoichiometry of the heterodimer and heterotrimer (Figure 1F). These data demonstrated the capability of Rsa1p to interact simultaneously with Hit1p and Snu13p, which was a strong hint for its possible involvement in snoRNP assembly. Therefore, we tested the effect of *HIT1* gene disruption on this process.

Synthetic lethality tests reveal functional links between Hit1p, Rsa1p and Pih1p

We previously observed decreased levels of snoRNA and growth defects upon *RSA1* gene disruption (21,29), therefore, for further analysis of Hit1p function, we compared the growth phenotypes of *S. cerevisiae* cells carrying individual deletions of the *HIT1* and *RSA1* genes, and of the *PIH1* gene encoding another snoRNP assembly factor. Very similar slow growth phenotypes were observed after *HIT1* or *RSA1* gene inactivation, while a twice less marked effect was found for *PIH1* gene disruption (Figure 2A). In addition, to test for possible functional links be-

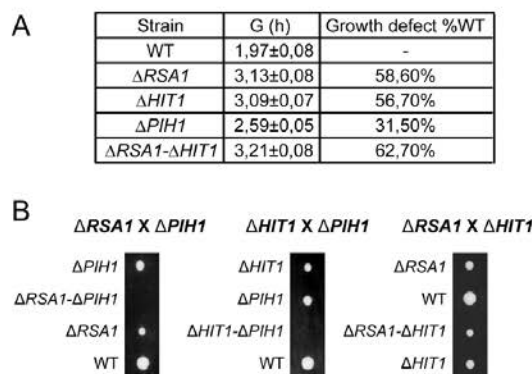


Figure 2. Growth of $\Delta RSA1$, $\Delta HIT1$, $\Delta PIH1$ and $\Delta RSA1\text{-}\Delta HIT1$ BY4741 mutant cells. (A) Growth of WT and mutant strains in YPD medium was monitored over time by A_{600} measuring. Doubling times (G) were calculated and growth defects are expressed as a percentage of the doubling time of the WT strain. (B) Strains lacking Rsa1p and Pih1p, or Hit1p and Pih1p are not viable. Diploid strains generated from crossbreeding between $\Delta RSA1$, $\Delta PIH1$ or $\Delta HIT1$ haploid BY4741 (MAT α) strains with BY4742 (MAT α) strain were placed under starvation conditions for meiosis and spore formation. Tetrads were dissected and haploid spores were deposited on YPD plates and incubated for one week at 30°C. A representative dissection of tetrads is shown for each crossbreeding.

tween these three genes, we crossed single knock-out haploid strains to obtain heterozygous diploid strains. Tetrads of haploid cells were produced by meiosis during sporulation and dissected, and growth of the haploid cells was tested on YPD media plates (Figure 2B). The genotypes of the haploids were identified by PCR amplification. Interestingly, the $\Delta RSA1$ - $\Delta HIT1$ double knock-out haploid strain did not reveal any cumulative growth retardation relative to the phenotypes of the single knock-out strains. Altogether, the data strongly suggested that Hit1p and Rsa1p are involved in the same cellular process(es). Moreover, the absence of growth found for cells combining null mutations of *RSAl* and *PIH1* genes, or null mutations of *HIT1* and *PIH1* genes (Figure 2B), was a strong hint for a functional connection between these three genes and snoRNP assembly.

Hit1p is required to maintain the steady-state level of C/D snoRNAs

For complete demonstration of the involvement of Hit1p in snoRNA biogenesis, we compared the levels of C/D and H/ACA snoRNAs, as well as UsnRNAs, in the $\Delta HIT1$, $\Delta RSA1$ and $\Delta PIH1$ mutants and the isogenic wild-type (WT) strains. As previously observed in the *RSAl* knock-out strain (29), lower levels of the tested C/D snoRNAs, except U3, and unchanged levels of H/ACA snoRNAs and UsnRNAs were observed in the three mutant strains (Figure 3A), which strongly reinforced the idea of an implication of Hit1p in snoRNP biogenesis. Noticeably, in accord with the stronger growth phenotypes found for the $\Delta RSA1$ and $\Delta HIT1$ mutants compared to the $\Delta PIH1$ mutant, a stronger snoRNA destabilization effect was observed for the $\Delta RSA1$ and $\Delta HIT1$ mutants compared to the $\Delta PIH1$ mutant.

Given that snoRNPs participate in ribosome biogenesis, we further analyzed the effects of the $\Delta RSA1$, $\Delta HIT1$ and $\Delta PIH1$ disruptions on 35S pre-ribosomal RNA (35S pre-rRNA) processing, using previously described protocols (47). Total RNAs fractionated on agarose gels were transferred on membrane and probed with a series of 5'-end labeled probes to test for accumulation of pre-18S and pre-25S intermediates (probes p1 to p4, Figure 3B and C), and to evaluate relative levels of mature 18S and 25S rRNAs (p2 and p5) (Figure 3B and C). A marked accumulation of 27S precursors of the 5.8S and 25S rRNAs (27SA2, A3, B_g and/or B_L) and increased steady-state levels of the 35S pre-rRNA, 32S, 23S and 20S intermediates were observed for the three strains (Figure 3B and C). Here again, the similar features observed for the $\Delta RSA1$ and $\Delta HIT1$ mutants reinforced the idea of a functional link between Rsa1p and Hit1p. Accumulation of the same pre-rRNA intermediates in the $\Delta PIH1$ mutant, demonstrated its role in pre-rRNA maturation and its possible functional link with Rsa1p and Hit1p.

Hit1p influences U3 snoRNA 3'-terminal processing

U3 snoRNA level did not seem to be markedly modified in the absence of Rsa1p, Hit1p or Pih1p (Figure 3A). However, U3 snoRNA production in *S. cerevisiae* is a complex process including the production by RNA polymerase

II of a precursor RNA (pre-U3) containing one intron, which is spliced by the spliceosome (48), and an extended 3'-end (49). Unspliced pre-U3 and spliced pre-U3 could be detected by RT-PCR using a reverse-primer hybridizing in the 3'-extension (Figure 4A). Due to efficient splicing, unspliced pre-U3 was detected in low amounts. Nevertheless, we used such detection assay to test for association of U3 precursors with the TAP-tagged snoRNP core proteins, the already described assembly factors, and Hit1p. The results strongly suggested the *in vivo* association of both the spliced and unspliced pre-U3 containing a 3' extension with the Nop1p, Nop56p and Nop58p core proteins (Figure 4B), and the Rsa1p, Hit1p, Pih1p, Rvb1p and Rvb2p proteins (Figure 4C). This prompted us to test for a possible influence of Hit1p expression on maturation of the U3 snoRNA 3'-extension. Truncations within the sequence coding for the 3' structural domains of *S. cerevisiae* U3A snoRNA gene (U3 Δ 2,3,4) generate the accumulation of 3'-end maturation intermediates I' and I (49) and the amounts of these maturation intermediates increase in the absence of Rsa1p expression (21). We show here that the absence of Hit1p and Rsa1p expressions has similar effects on accumulation of U3 Δ 2,3,4 intermediates (Figure 4D), with a parallel decrease of mature U3 Δ 2,3,4 RNA, indicating that both Hit1p and Rsa1p likely influence the kinetics of U3 snoRNA 3'-end processing.

Hit1p regulates the steady-state level of Rsa1p and this feature is conserved in human cells

The above data all revealed identical defects upon the absence of expression of Rsa1p or Hit1p. Therefore, we tried to determine the reason for this interdependency and found that Hit1p controls the cellular concentration of Rsa1p. Indeed, we observed a lower level of Rsa1p-TAP in the $\Delta HIT1$ knock-out strain (Figure 5A, compare lanes 1 and 2), while ectopic expression of HA-Hit1p was associated with high level of Rsa1p-TAP protein (lane 3). The influence of Hit1p on the abundance of Rsa1p was confirmed by comparing the amounts of plasmid-expressed GFP-Rsa1p fusion protein in a $\Delta RSA1$ strain and in the double $\Delta RSA1$ - $\Delta HIT1$ knock-out strain (Figure 5B, compare lanes 2 and 3). In contrast, the absence of Rsa1p did not show a strong effect on the level of Hit1p fused to the HA epitope from influenza hemagglutinin (lanes 5 and 6).

Then, in order to identify Hit1p sequences required to maintain the cellular concentration of Rsa1p, we complemented the $\Delta HIT1$ strain with several constructs expressing various Hit1p fragments (Supplementary Figure S1). In particular, we tested fragments carrying the first 43 amino acids proposed to correspond to a Zn-finger domain. In fact, residues 70–164 were found to be sufficient to restore the WT growth phenotype. In accord with the proposed role of Hit1p, there was a good correlation between the ability of the fragments to complement the growth defect and the measured intracellular levels of Rsa1p (Figure 5C). Therefore, we concluded that the Zn-finger domain of Hit1p is not essential for this function.

By co-immunoprecipitation (co-IP) assays carried out with HeLa cell total extracts and anti-NUFIPI or anti-ZNHIT3 antibodies bound to Protein A-Sepharose beads,

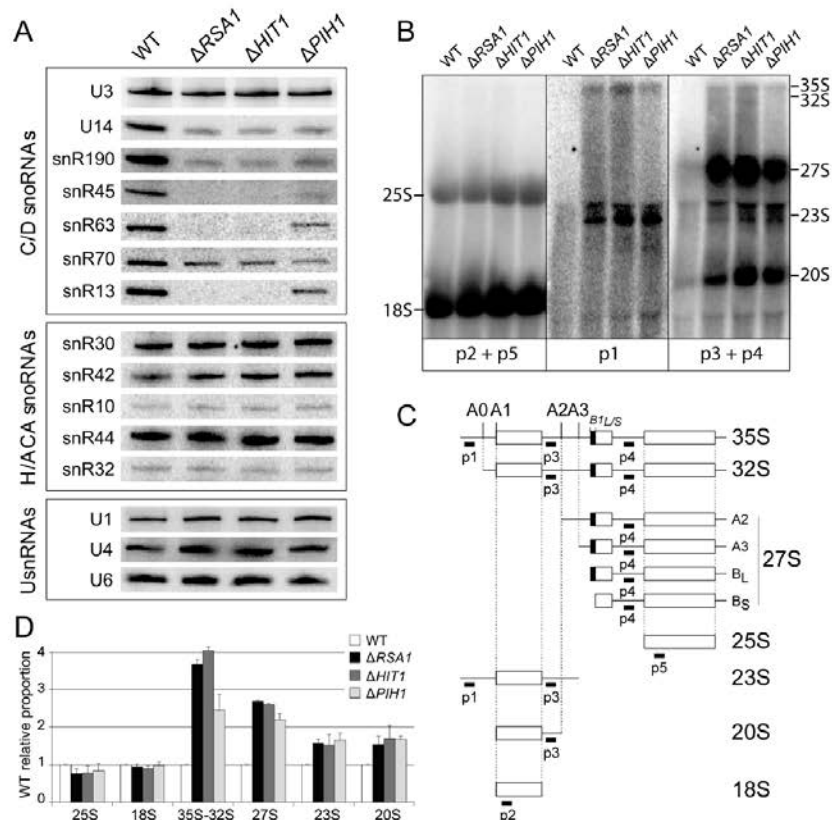


Figure 3. Rsa1p, Hit1p and Pih1p expressions are required for accumulation of C/D snoRNAs and pre-rRNA processing. (A) Northern blot analysis of steady-state levels in exponential phase of various RNAs (C/D snoRNAs, H/ACA snoRNAs and UsnRNAs) in the WT and the null mutant strains. Hybridizations were performed with specific radiolabeled probes (see Supplementary Table S2). (B, C, D) Analysis of pre-rRNA processing. In (B), total RNA from WT and mutant BY4741 strains were extracted in log phase and fractionated on 1.2% glyoxal/DMSO agarose gels. Northern blotting was performed by hybridization with ^{32} P labeled probes p1, p2, p3, p4 and p5 (see Supplementary Table S2), allowing detection of mature rRNAs (p2 + p5), or the pre-rRNA processing intermediates schematically represented in (C) (p1, or p3 + p4). In (C), sequences targeted by the probes are indicated under the schemes of *S. cerevisiae* pre-rRNA processing intermediates. In (D) quantification of data from northern blot experiments (B). Radioactivity in the bands of gel was quantified with the ImageQuant software after exposure of a phosphorimager screen. The signal for each RNA species was divided by the accrued signal of all RNA species in the same lane. The ratios corresponding to the mature forms (25S and 18S), the precursors (35S and 32S) and the maturation intermediates (27S A2 + A3 + B_S + B_L, 23S and 20S) in WT strain were arbitrary considered as having a value of 1, and the ratios of the corresponding RNAs in the mutants were expressed relative to this value. Error bars represent the standard deviation obtained from the mean value of two independent experiments.

we showed that NUFIP1 and ZNHIT3, the human homologues of Rsa1p and Hit1p, also associate in human cell extract (Figure 5D). The co-IP specificity was verified by the absence of selection of β -tubulin used as a control. We next tested whether ZNHIT3 is also important to control the cellular concentration of NUFIP1. RNA interference knock-down experiments were performed using ZNHIT3-specific siRNAs, and the firefly luciferase siRNA as a negative control (Figure 5E). The ZNHIT3 protein level was reduced by $\sim 50\%$, leading to a significant decrease in the level of NUFIP1 ($\sim 40\%$), whereas the levels of the β -tubulin and SRP68 proteins used as negative controls remained stable. Our results therefore support the conclusion that ZNHIT3 is also required to maintain the steady-state level of NUFIP1 in HeLa cells.

Purified Snul3p–Rsa1p_{230–375}–Hit1p heterotrimer can bind C/D RNAs and Nop58p

Having shown the functional link between Rsa1p and Hit1p and developed conditions for purification to homogeneity of the Snul3p–Rsa1p_{230–375}–Hit1p complex, we used this complex to get information on complexes that may be formed during C/D snoRNP assembly. First, as Snul3p is known to interact with C/D snoRNAs and with Rsa1p (29), we tested by electrophoresis mobility shift assays (EMSA) whether the Rsa1p–Hit1p interaction is compatible with binding of Rsa1p to a [C/D snoRNA–Snul3p] complex. As illustrated in Figure 1G, when incubated with a Snul3p–Rsa1p–Hit1p purified ternary complex, a radiolabeled C/D snoRNA is found in a complex displaying a slower mo-

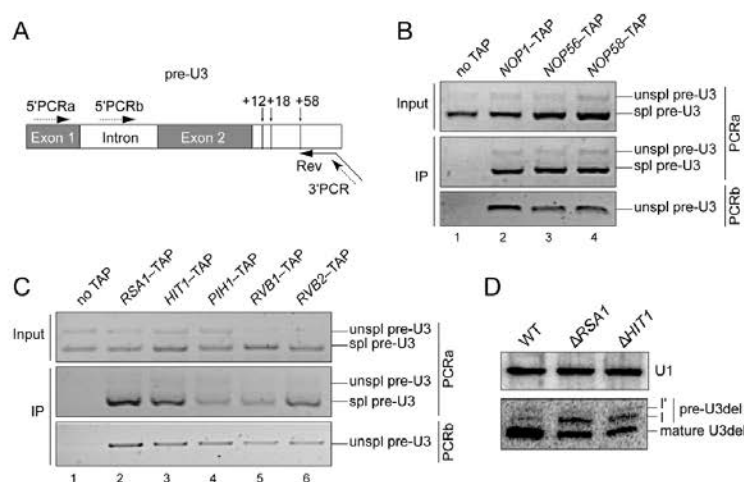


Figure 4. Core proteins and assembly factors are associated with U3 precursors, and Rsa1p and Hit1p are involved in its processing. (A) Scheme of the U3 transcript showing its intron and extended 3'-end. Positions of cleavages in the 3'-extension are indicated by vertical arrows. Synthesis of cDNAs was primed by oligonucleotide Rev (broken arrow) interacting with the U3 3'-extension. Primers 5'PCRa, 5'PCRB, and 3'PCR used for the PCR amplifications are indicated by dotted arrows. (B, C) Log phase extracts prepared from various TAP-tagged strains (core proteins (B) and assembly factors (C)) were purified on IgG-Sepharose beads and analyzed by RT-PCR using primer 5'PCRB specific for unspliced (unspl) or 5'PCRa amplifying both spliced (spl) and unspliced U3 precursors carrying the full length 3'-extension. An untagged strain was used as negative control. Inputs correspond to 10% of cellular extracts used in IPs. (D) Northern blot analysis of processing of the U3Δ2,3,4 variant RNA in the WT, Δ*RSA1* and Δ*HIT1* strains reveals the accumulation of pre-U3Δ2,3,4 precursors in the two mutant strains, especially precursors cleaved at positions +12 (band I) or +18 (band I'). U1 snRNA was used as a loading control.

bility compared to the complex formed with the purified Snu13p–Rsa1p heterodimer. Therefore, binding of Hit1p does not impair the capacity of Snu13p–Rsa1p to interact with RNA, and the Rsa1p–Hit1p interaction is stable in the presence of the RNA.

Furthermore, as association of Nop58p with Rsa1p (21) and Pih1p (31) had been detected by Y2H assay, it was interesting to test whether ³⁵S radiolabeled Nop58p produced in *E. coli* S30 extract can interact with purified recombinant His₆Tah1p–Pih1p, His₆Rsa1p_{230–375}–Hit1p and His₆Snu13p–Rsa1p_{230–375}–Hit1p complexes immobilized on Ni-Sepharose beads. Nop58p was retained on the His₆Tah1p–Pih1p (Figure 1H, lane 2), His₆Rsa1p_{230–375}–Hit1p (lane 3), His₆Snu13p–Rsa1p_{230–375} (lane 4) and His₆Snu13p–Rsa1p_{230–375}–Hit1p complexes (lane 5), but not in the absence of His₆-tagged complex (lane 1). Therefore, Nop58p can associate directly with Pih1p and with Rsa1p in the absence of RNA, and the binding of Tah1p to Pih1p and of Hit1p to Rsa1p does not impair formation of these interactions. Furthermore, in agreement with the idea that Hit1p can participate to large pre-snoRNP assembly complexes (Figure 4C), our data indicate that the Rsa1p–Hit1p complex can interact simultaneously with Snu13p and Nop58p.

NMR structure of the Rsa1p–Hit1p interaction explains its high stability

For complete understanding of the Rsa1p–Hit1p interaction, we solved the 3D structure of their interacting domains by multi-dimensional NMR spectroscopy, following co-expression of fragments of both proteins in ¹³C,

¹⁵N-isotopically-enriched minimal medium. First, by using various conditions for limited proteolysis and native MS analyses of the Snu13p–Rsa1p_{230–375}–Hit1p, we identify the Rsa1p_{230–375}–Hit1p_{70–164} sub-complex suitable for structural analysis. Secondly, NMR ¹H–¹⁵N HSQC analysis showed that segments P230–E316 and S353–A375 of Rsa1p are not required for the Rsa1p–Hit1p interaction (Supplementary Figure S2). With a remarkable homogeneity and very few resonance overlaps, the ¹H–¹⁵N HSQC spectrum of a complex formed between Rsa1p_{317–352} and Hit1p_{70–164} displayed the features of a well-folded entity suitable for 3D solution structure determination (Figure 6).

The water-refined NMR structure of the Rsa1p_{317–352}–Hit1p_{70–164} complex yielded secondary structure RMSD values of 0.53 ± 0.08 Å and 1.03 ± 0.28 Å, measured on backbone and heavy atoms respectively (Figure 7; for structural statistics, see Supplementary Table S1). Hit1p_{70–164} comprises five α-helices and one long internal disordered loop (between α3 and α4), while Rsa1p_{317–352} contains two α-helices α'1 and α'2 linked by a well-defined linear fragment. This secondary structure pattern composed of helices is in good agreement with the ¹H–¹⁵N heteronuclear and HetSOFAS ratios (Supplementary Figure S3). In the complex, Hit1p_{70–164} acts as a jaw which almost completely encloses Rsa1p_{317–352} (Figure 7B). Among the 130 amino acids of the two Hit1p and Rsa1p fragments, 58 residues including 31 mainly hydrophobic, 14 charged and 11 polar residues along with 2 glycines form the protein interface (i.e. distance of separation less than 3.5 Å) (Figure 8). These residues (33 from Hit1p_{70–164} and 25 from Rsa1p_{317–352}) bury a mean surface area of 3267 ± 128 Å², which rep-

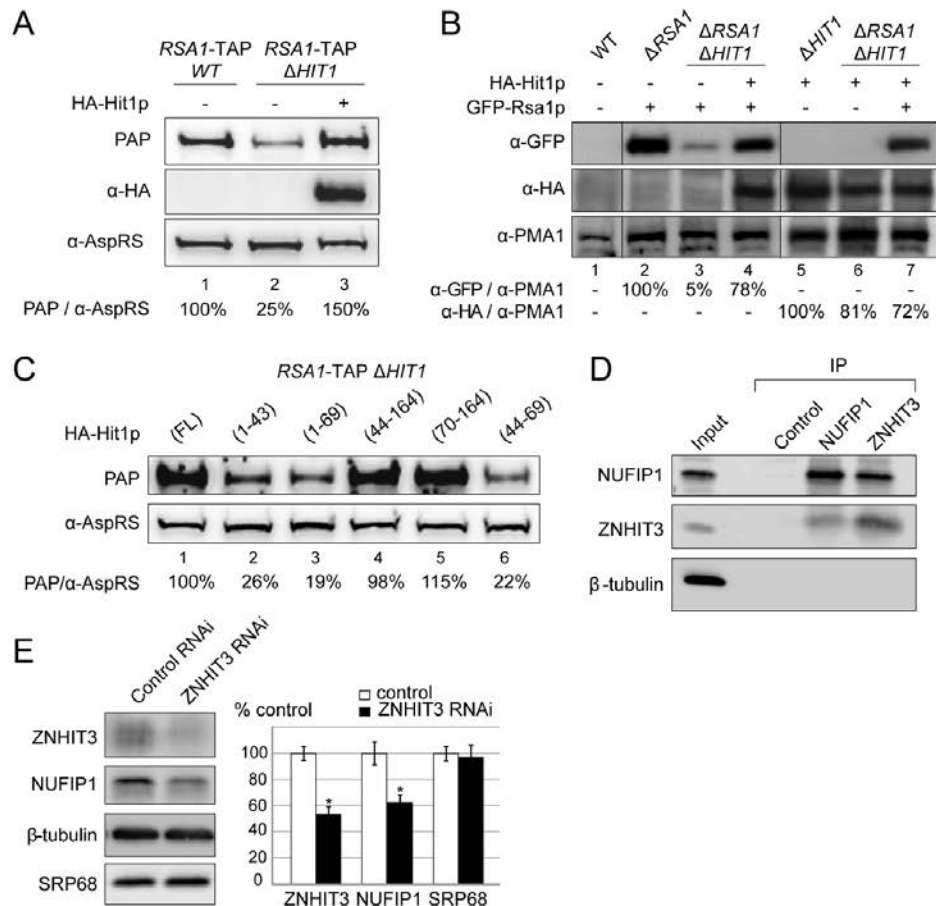


Figure 5. Hit1p/ZNHIT3 is required for accumulation of Rsa1p/NUFIP1. (A, B) Hit1p stabilizes Rsa1p. Cells were grown to $A_{600} \sim 0.8-1$. Equal amounts of cells ($30 A_{600}$ U) were used for crude cell extract preparation. Western blot analysis of equal amounts of total cell lysates from the *RSA1*-TAP strain (A, lane 1), the isogenic Δ HIT1 mutant (A, lanes 2–3), WT BY4741 (B, lane 1), the isogenic Δ RSA1 (B, lane 2), Δ HIT1 (B, lane 5), and Δ RSA1 Δ HIT1 (B, lanes 3–4, 6–7) mutants with or without ectopic expression of HA-Hit1p (A, B) and/or GFP-Rsa1p (B). Rsa1p tagged proteins were detected with PAP (A) or anti-GFP antibodies (B). Anti-HA (α -HA) were used for Hit1p (A, B). The PMA1 and AspRS proteins used as loading controls were detected using specific anti-PMA1 (α -PMA1) and anti-AspRS (α -AspRS) antibodies. Relative amounts of Rsa1p (PAP/ α -AspRS, or α -GFP/ α -PMA1) or of Hit1p (α -HA/ α -PMA1) were determined from the ratio of band intensities in each lane. They are expressed as a percentage of the value obtained for lane 1 (A) or lanes 2 and 5 (B) (100%). (C) Western blot analysis of equal amounts of total cell lysates from the *HIT1* null mutant strain expressing the *RSA1*-TAP protein (strain *RSA1*-TAP/ Δ HIT1) transformed with plasmids expressing various fragments of HA-Hit1p. Tagged proteins were detected as in panel (A). The relative amounts of Rsa1p indicated below each lane were estimated as in panel (A). (D) ZNHIT3 co-precipitates with NUFIP1. Immunoprecipitation (IP) experiments were carried out on HeLa total extracts using anti-NUFIP1 or anti-ZNHIT3 antibodies bound to Protein A Sepharose. Protein A Sepharose alone was used as control. Co-immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with the antibodies indicated on the left; 5% of total proteins used per assay were loaded in lane Input. (E) ZNHIT3 concentration influences NUFIP1 steady-state level. HeLa cells were transfected with negative control Gl2 firefly luciferase (Control RNAi) or ZNHIT3 siRNAs (ZNHIT3 RNAi). Total extracts were analyzed by western blotting. β -tubulin and SRP68 served as loading controls. Experiments were performed in triplicate and relative amounts of proteins in HeLa cells transfected with ZNHIT3 siRNAs were plotted as a% of proteins in HeLa cells transfected with the control siRNAs. Error bars indicate the standard error of the mean values (s.e.m); (* $P < 0.05$).

resents almost 40% of the solvent-exposed surface of the Rsa1p_{317–352}–Hit1p_{70–164} complex. More specifically, the five α -helices of Hit1p_{70–164} form a ‘claw’ which locks helix $\alpha 1'$ of Rsa1p_{317–352}, while the Rsa1p_{317–352} helix $\alpha 2'$ packs against the exposed surface of the Hit1p_{70–164} helix $\alpha 3$. Thus helix $\alpha 1'$ of the Rsa1p_{320–334} forms the architectural base for the heterodimeric complex. Some of the

stabilizing non-polar or polar interactions are highlighted in panels B and C of Figure 8. Interestingly, interfacing residues of the Rsa1p_{317–352}–Hit1p_{70–164} complex are conserved among species such as L93, L102, L109 in $\alpha 2$, $\alpha 3$ helices or L156, L/V159 in $\alpha 5$ helix of Hit1p_{70–164}, and E330, L331 and G332 in the keystone $\alpha 1'$ helix of Rsa1p_{317–352} (Figure 8A). Added to co-IP and siRNA assays, we may

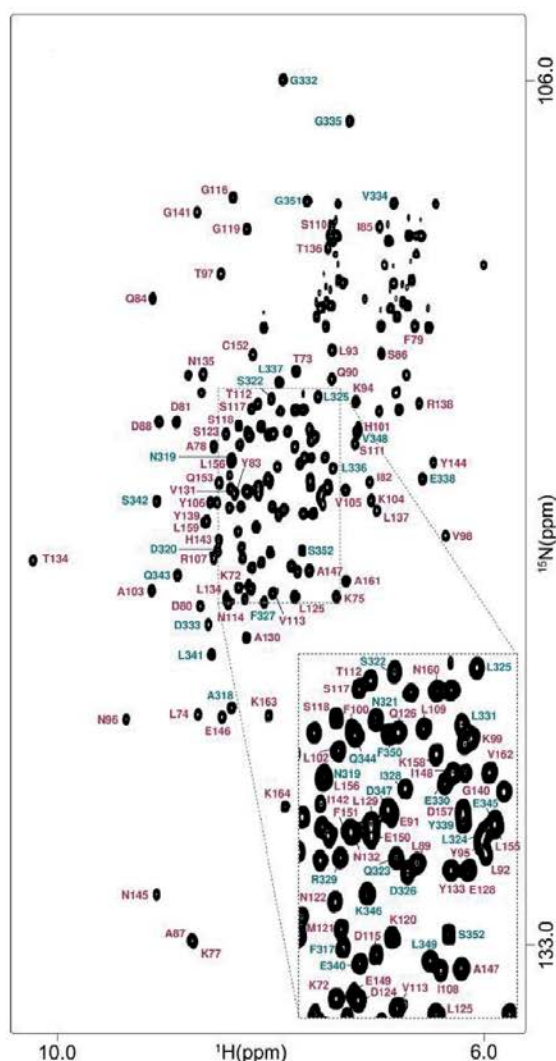


Figure 6. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the complex formed between Rsa1p_{317–352} and Hit1p_{70–164}. The spectrum was recorded on a 600 MHz NMR spectrometer in NaPi 10 mM, pH 6.4, NaCl 150 mM and at 293K. Assignment of the main-chain amide groups is figured in teal blue and in magenta for Rsa1p_{317–352} and Hit1p_{70–164}, respectively.

assume that the structural interleaved mode of interaction between Rsa1p/NUFIP1 and Hit1p/ZNHIT3 is similar in yeast and mammals. Nonetheless, multiple sequence alignment reveals insertions in NUFIP1 and deletions in ZNHIT3, indicating that the mammal complex could exhibit significant changes compared to what is observed in yeast. By site-directed mutagenesis of both Rsa1p and Hit1p, we tried to abolish the capability of interaction of the two proteins in *in vivo* and *in vitro* assays. However, the amino acids involved in the interaction turned to be required for both

stability and solubility of each of the two partners and we could not get soluble mutant proteins having lost their interaction capacities.

Remarkably, DALI (50) and VAST (51) servers failed to identify similar global structures of protein–protein complexes in the Protein Data Bank, highlighting the unique and novel feature of this protein association. Due to its particular structural features, we propose to name the fold of Hit1p_{70–164}, the Pac-Hit fold that mimics the figure of Pac-Man, the iconic video game character. Overall, these data reveal an intricate interaction of Rsa1p with Hit1p explaining the participation of Hit1p together with Rsa1p in common steps of box C/D snoRNP biogenesis.

DISCUSSION

Rsa1p–Hit1p is a specific sub-complex of C/D snoRNP assembly in yeast

Although yeast Hit1p was discovered many years ago, its function has not been evident, aside from the fact that disruption of its encoding gene leads to a thermo-sensitive phenotype (34). Here, we demonstrate that Hit1p is a component of the C/D snoRNP assembly machinery, which is required to control the abundance of Rsa1p, one of the key factors involved in C/D snoRNP biogenesis (21), and which is also involved in 60S ribosomal subunit production (52). Deletions of either the *HIT1* or the *RS1* genes results in similar growth defects in yeast cells. According to our data, these results are explained by the decreased levels of several C/D snoRNAs and reduced rates of some pre-rRNA maturation steps. Taken together, these data reinforce the idea that Rsa1p plays an important role in C/D snoRNP assembly and ribosome biogenesis.

As previously observed for yeast *RS1* gene deletion, the *HIT1* gene deletion did not alter H/ACA snoRNA levels, showing that activity of the Rsa1p–Hit1p complex is dedicated to C/D snoRNP assembly. Therefore, biogenesis of the two classes of yeast snoRNPs depends both upon a common factor, the R2TP complex (21,22,24,26,28), and specific factors: Shq1p and Naf1p for H/ACA snoRNPs (for review (20)), and Rsa1p and Hit1p for C/D snoRNPs. Previous observations (26) suggested that R2TP components are not each required to the same extent for C/D and H/ACA RNP assembly. Here, we confirm that Pih1p is necessary for maintaining C/D snoRNA levels, while its absence has no marked effect on H/ACA snoRNA levels (26), an observation which contrasts with the strong requirement for the Rvb1 and Rvb2 AAA+ helicases for H/ACA compared to C/D snoRNP (26,28).

Rsa1p–Hit1p constitutes a functional module for the early stages of C/D snoRNP assembly

In the current model of C/D snoRNP assembly, an initial interaction between proteins Snul3p/15.5K in eukaryotes or L7Ae in archaea and the K-turn motif present in C/D snoRNAs is required for subsequent assembly of the other RNP proteins (53–57). However, how these RNPs are assembled *in vivo* and the precise functions of the assembly factors are not well understood. The K-turn may be initially bound by the free form of Snul3p and subsequently by the

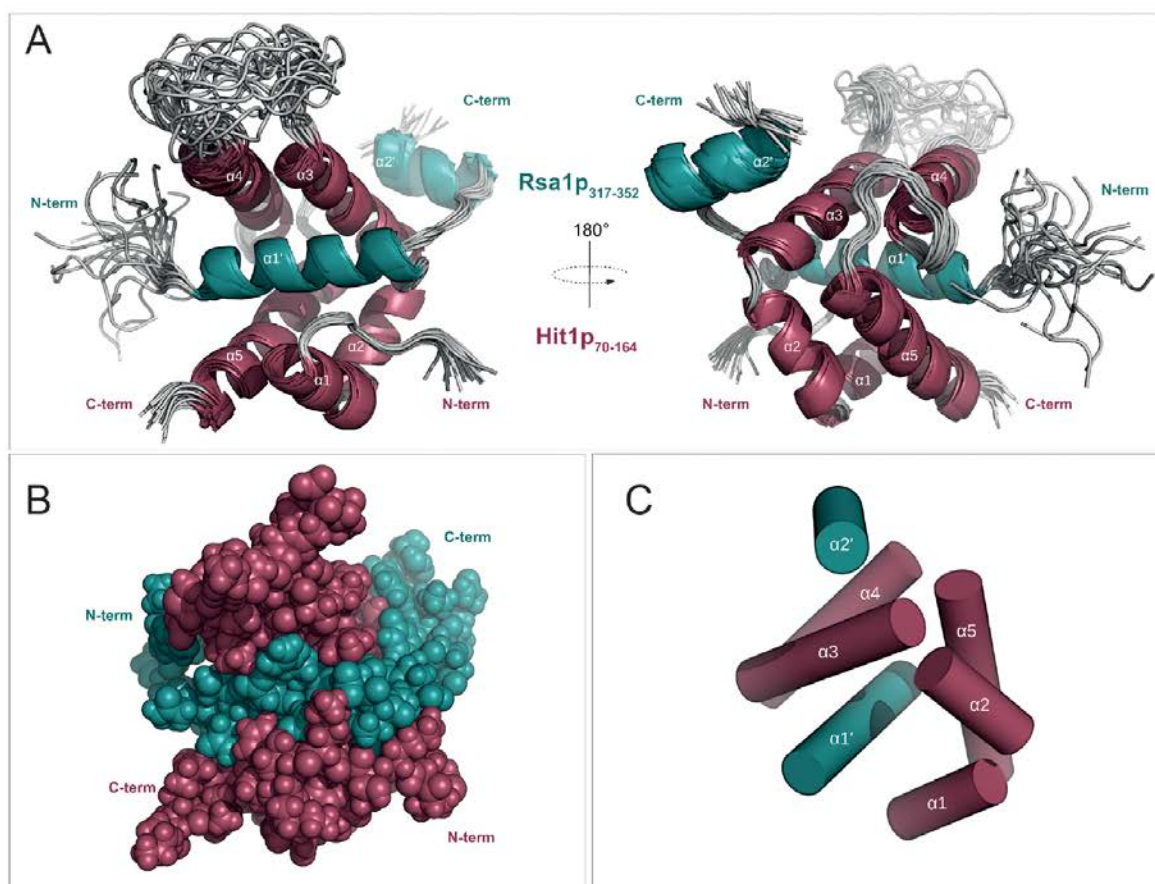


Figure 7. NMR solution structure of the complex formed between Rsa1p_{317–352} and Hit1p_{70–164}. Two-side view of the cartoon representations of the 20 lowest energy NMR structures (A) and sphere representation of the best NMR structure (B) calculated with RECOORD scripts. (C) Spatial organization of the seven α -helices. Proteins Rsa1p_{317–352} and Hit1p_{70–164} are represented in teal blue and in magenta, respectively.

Rsa1p–Hit1p sub-complex or directly by a Snu13p–Rsa1p–Hit1p complex (Figure 9, Pathway A, Step 1). This scenario is plausible because such stable heterotrimeric complex can be purified (Figure 1E), and because association of Rsa1p and Hit1p with Snu13p does not impair the RNA binding capacity of Snu13p (Figure 1G). The C-terminal Rsa1p_{230–381} segment, which represents the minimal fragment able to restore normal growth in yeast (21), contains several binding sites for proteins involved in C/D snoRNP assembly. In this manner, it constitutes a platform for several non-mutually exclusive interactions: the Rsa1p_{230–261} segment binds Snu13p (29), the Rsa1p_{317–352} segment binds Hit1p, and according to the present data, another segment, which has yet to be identified, interacts directly with Nop58p. The formation of these interactions is probably favored by the low level of internal structuration of Rsa1p, as evidenced by secondary structure predictions. This flexibility may explain its high sensitivity to proteolysis and the need for protection by Hit1p. Nevertheless, we cannot exclude the possibility of specific sites for ubiquitinylation in

Rsa1p, which may contribute to its rapid degradation in yeast cells.

Given that Snu13p does not possess a nuclear localization signal (NLS), one possibility would be that Rsa1p or Hit1p serves as protein cargo for the import of Snu13p into the nucleus. Interestingly, an NLS signal is present in the functional C-terminal region of Rsa1p. Hence, Snu13p–Rsa1p–Hit1p may represent a pre-formed module for nuclear import and RNA binding (Figure 9, Step 1).

Transient functional association between Rsa1p–Hit1p and R2TP

Given that Snu13p–Rsa1p–Hit1p can be associated with Nop58p (Figure 1H), it is also possible that a larger multiprotein complex containing the full set of proteins, but that was not detected by our proteomic analysis, can be recruited to the snoRNA (Figure 9, pathway B, Steps 1' and 2'). GST pull down and Y2H experiments previously revealed a possible interaction between Rsa1p and Pih1p (21),

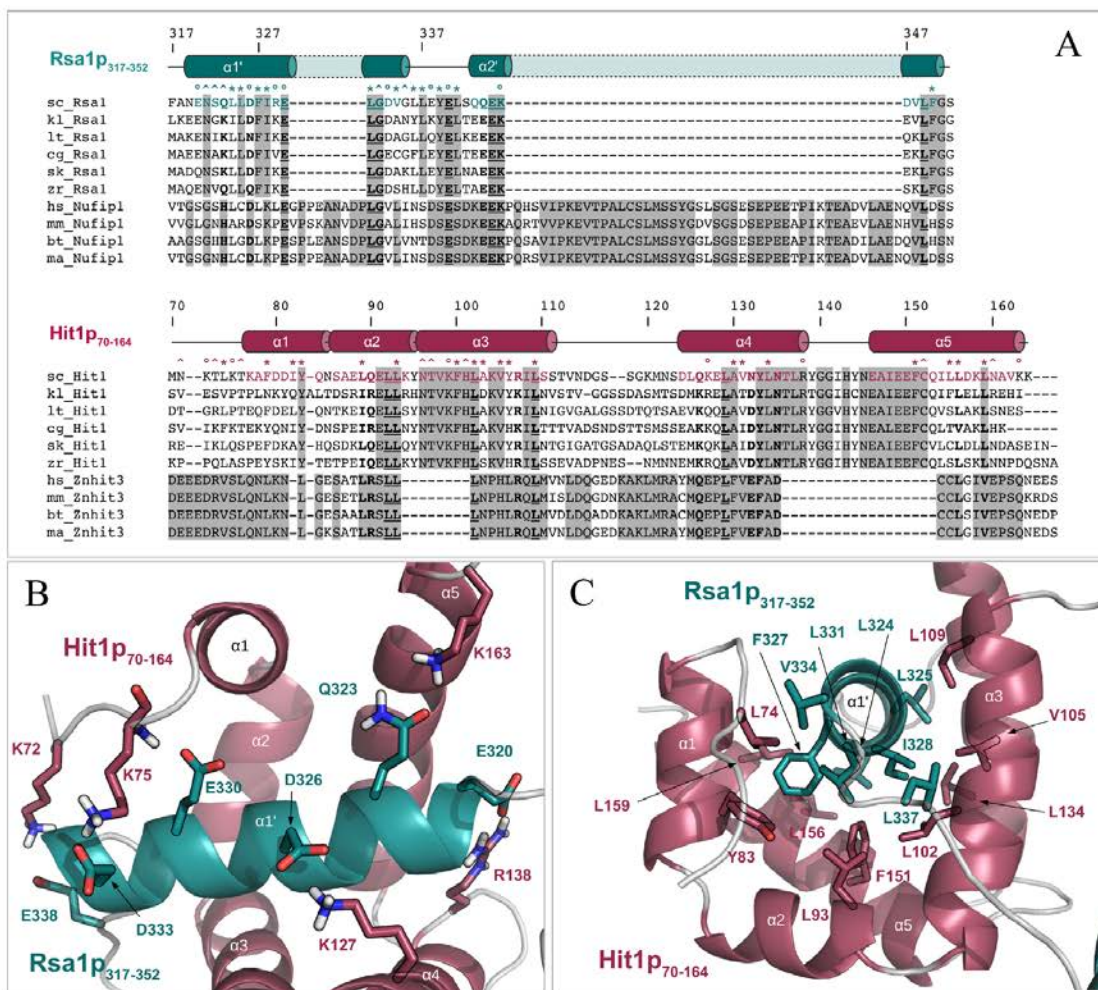


Figure 8. The protein–protein interface between Rsa1p_{317–352} and Hit1p_{70–164} is maintained by hydrophobic and polar contacts involving conserved residues. (A) Multiple amino acid sequence alignments of proteins Rsa1/NUFI1 and Hit1/ZNHIT3 present in *Saccharomyces cerevisiae* (sc.), *Khuyveromyces lactis* (kl.), *Lachancea thermotolerans* (lt.), *Candida glabrata* (cg.), *Saccharomyces (Lachancea) kluyveri* (sk.), *Zygosaccharomyces rouxii* (zr.), *Homo sapiens* (hs.), *Mus musculus* (mm.), *Bos taurus* (bt.) and *Macaca mulatta* (ma.), and constructed using CLUSTALW. Strictly matching residues in yeast or in mammals are highlighted using gray squares. Strictly conserved inter-species positions are underlined and highlighted in bold. Inter-species residues with groups of strongly similar properties are indicated in bold. Secondary structures extracted from the Rsa1p_{317–352}–Hit1p_{70–164} 3D structure are represented above the protein sequences, using cylinders for α-helices and lines for loops. Residues located at the interface between the two proteins (according to an intermolecular distance cut-off of 3.5 Å) are highlighted using circles, stars and carets for charged, mainly hydrophobic and neutral to polar amino acids respectively. (B) and (C) Representation of some hydrophobic (B) and polar (C) contacts located at the protein–protein interface of the Rsa1p_{317–352}–Hit1p_{70–164} complex. Non-polar hydrogens are not represented.

and accordingly, we found that Rsa1p is required to tether Pih1p–Tah1p to a [C/D RNA–Snu13p] complex (29). Nop58p was initially shown to interact with Pih1p (31), and previous Y2H assays (21) and the present *in vitro* binding assays (Figure 1H) have revealed that Nop58p also associates with the purified Rsa1p_{230–375}–Hit1p and Snu13p–Rsa1p_{230–375}–Hit1p complexes. Thus, at some point during C/D snoRNP biogenesis, Nop58p could associate with or be exchanged between Pih1p and the Snu13p–Rsa1p–Hit1p

complex (Figure 9, Step 2). The intricate network of interactions between the [RNA–Snu13p–Rsa1p–Hit1p] complex (pre-snoRNP 1 in Figure 9), R2TP components and Nop58p can explain the fact that we detected the association of pre-U3 snoRNA with proteins of these complexes using the sensitive RT-PCR approach, and interestingly, that Rsa1p and Hit1p influence U3 3'-terminal maturation. However, with the exception of Rsa1p–Hit1p, such a complete protein complex was not detected by proteomic anal-

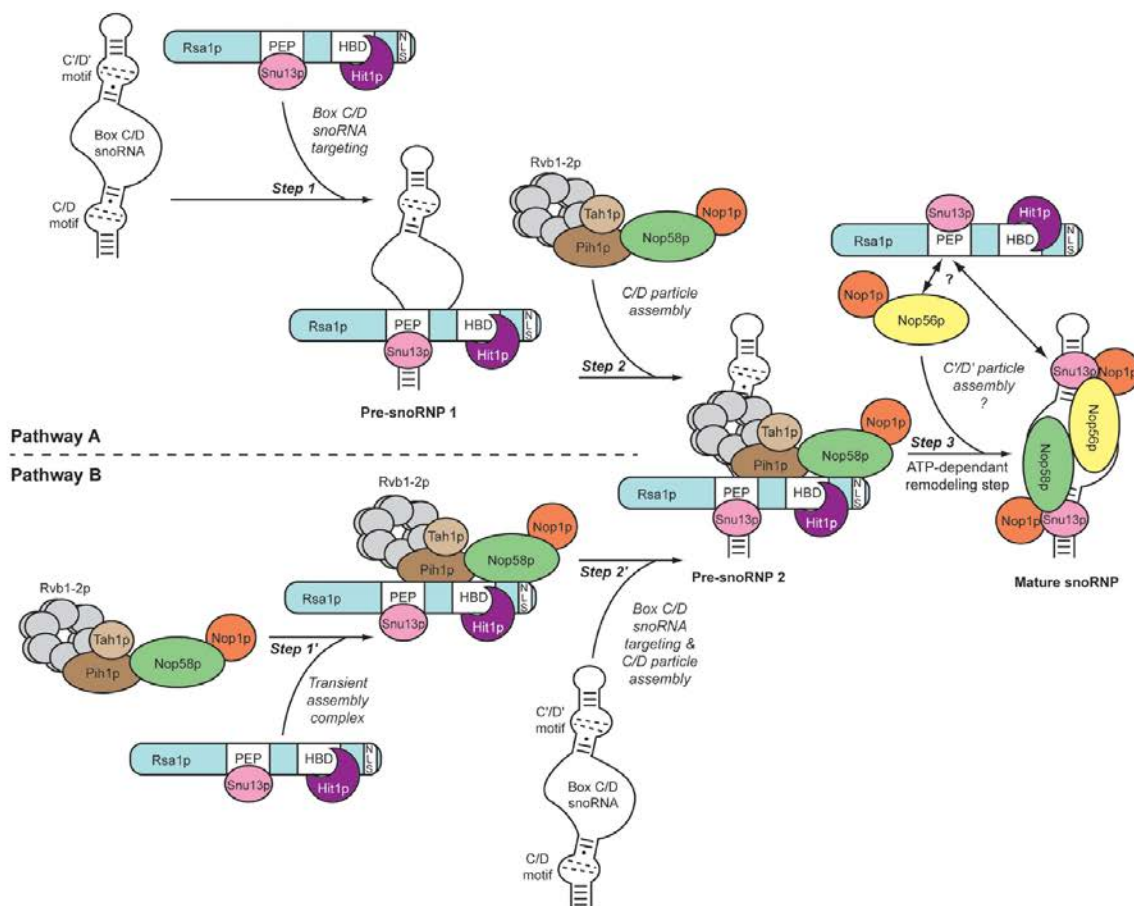


Figure 9. Model for the box C/D snoRNP assembly pathway. The particles [RNA-Snu13p-Nop58p-Nop1p] and [RNA-Snu13p-Nop56p-Nop1p], respectively nucleated on the C/D and C'/D' motifs, are linked by a coiled-coil dimer in the mature snoRNP (59). Two alternative assembly pathways are proposed: the primary targeting of the snoRNA by the complex Snu13p-Rsa1p-Hit1p (Pathway A) or the initial formation of a large transient RNA-free complex (Pathway B). The existence of the pre-snoRNP 2, common to the two scenarios, is based on the detection of the various assembly factors on the same U3 snoRNA precursors (Figure 4). The Snu13p-binding site (PEP), the Hit1p-binding site (HBS) and the nuclear localization signal (NLS) are displayed on the functional C-terminal part of Rsa1p. Bed1p specifically controls stability of the C/D snoRNAs and is essential for cell viability. It was not identified in our proteomic analysis but should play an important role in C/D snoRNP biogenesis.

ysis of yeast cellular extracts. This suggests that (i) *in celulo* interactions may be transient and rapidly disrupted by ATPase activity, so that free Rsa1p-Hit1p and free R2TP are predominant in the extract; (ii) the TAP sequence may decrease complex stability; (iii) accessibility of the TAP sequence may be low within large complexes and/or (iv) complexes might be tightly associated with chromatin or components of nucleolar bodies.

If a transient cooperation between the two sub-complexes exists, Rsa1p could facilitate the recruitment of the Nop proteins to the [RNA-Snu13p] pre-RNP (21,22,28), while R2TP could participate in a conformational remodeling required for the progression of the RNP assembly by the helicase activity of the Rvb1p-Rvb2p proteins (21,28,58) (Figure 9, Step 3).

Finally, many lines of evidence suggest that the assembly of Nop56p on the box C'/D' couple is a secondary event. Indeed, the C'/D' motif is a sub-optimal K-turn, exhibiting a lower affinity for Snu13p, and the nucleation of a particle [C'/D' motif-Snu13p-Nop56p-Nop1p] seems highly dependent on the establishment of a coiled-coil dimer between Nop56p and Nop58p pre-positioned on the box C/D particle (59,60). In contrast to Nop58p which is mainly associated with the R2TP complex components, we found Nop56p associated with Rsa1p in our TAP-tag assay (Table 1). This observation raises the question of the role played by Rsa1p-Hit1p in the assembly of the C'/D' particle (Figure 9, Step 3). A future issue to address will be to determine the stoichiometry of the assembly process and if a second Snu13p-Rsa1p-Hit1p module is involved in this final assembly step.

Possible additional functions of the Rsa1p–Hit1p complex

ZNHIT3 and Hit1p both carry a Zn finger domain. However, this domain might have another functional role, as the Hit1p Zn finger domain is not required to maintain cellular concentrations of Rsa1p. In this context, it is worth noting that Rsa1p was originally identified as being required for production of ribosomal 60S subunit (52). Interestingly, deletion of *RSA1*, *HIT1* or *PIH1* induces marked defects in the pre-rRNA maturation steps occurring after cleavages at sites A1 and A2 (Figure 3). Indeed, the released 20S and 27S intermediates accumulate (Figure 3). One attractive possibility is that some 2'-O modifications catalyzed by C/D RNPs increase the efficiency of 20S maturation into 18S and processing of 27S into 5.8S and 25S precursors, which may contribute to the effect of *RSA1* deletion on 60S production (52). A direct role for Rsa1p–Hit1p in these steps is also possible.

ZNHIT3, also known as TRIP3 (Thyroid Hormone Receptor Interacting protein 3), is a co-activator of several transcription factors (thyroid hormone receptor RXR (61), nuclear hepatocyte factor 4 α (62), peroxisome proliferator activated receptor γ (63)). Furthermore, the cellular level of ZNHIT3 influences proliferation of cancer cells (64). It remains to be defined whether this property relies on its capacity to control cell growth through its involvement in nuclear-receptor dependant transcription, or by promoting C/D snoRNP biogenesis and ribosome synthesis.

ACCESSION NUMBERS

Chemical shifts data referenced to DSS were deposited in the Biological Magnetic Resonance Data Bank under entry 19626. The corresponding coordinates and restraints for structure calculations have been deposited in the Protein Data Bank with accession code 2MJF.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to E. Bertrand (IGM Montpellier) who provided the GFP-Rsa1p expression vector and shared unpublished data. We thank the CNRS TGIR-RMN-THC Fr3050 facilities, the Proteomic French Infrastructure (ANR-10-INSB-08-03), the SCBIM platform of UL and FR BMCT CNRS 3209 for access to the 600 MHz NMR spectrometer.

FUNDING

The Centre National de la Recherche Scientifique, University of Lorraine, University of Strasbourg; the Agence Nationale de la Recherche [ANR-06-BLAN-0208; ANR-11-BSV8-01503]; the Pôle de Recherche Scientifique et Technologique IMTS of Région Lorraine; the European Associated Laboratory on pre-mRNA splicing (CNRS, Lorraine University, Montpellier Universities and the Max Planck Institut); the Fondation pour la Recherche Médicale, the Région Alsace. B.R. and R.B. were fellows of the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Kiss, T. (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*, **109**, 145–148.
- 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.
- Matera, A.G., Terns, R.M. and Terns, M.P. (2007) Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 209–220.
- 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.
- Peculis, B.A. (1997) 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.
- Atzorn, V., Frapapan, P. and Kiss, T. (2004) U17/snoR30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 1769–1778.
- Morrissey, J.P. and Tollervey, D. (1993) Yeast snoR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 2469–2477.
- 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.
- Watkins, N.J., Segault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C. and Luhrmann, R. (2000) A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell*, **103**, 457–466.
- Watkins, N.J., Newman, D.R., Kuhn, J.F. and Maxwell, E.S. (1998) In vitro assembly of the mouse U14 snoRNP core complex and identification of a 65-kDa box C/D-binding protein. *RNA*, **4**, 582–593.
- Koonin, E.V., Bork, P. and Sander, C. (1994) A novel RNA-binding motif in omnipotent suppressors of translation termination, ribosomal proteins and a ribosome modification enzyme? *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2166–2167.
- Nottrott, S., Hartmuth, K., Fabrizio, P., Urlaub, H., Vidovic, I., Ficner, R. and Luhrmann, 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.
- Henras, A., Henry, Y., Bousquet-Antonelli, C., Noaillac-Depeyre, J., Gelugne, J.P. and Caizergues-Ferrer, M. (1998) Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.*, **17**, 7078–7090.
- Mitchell, J.R., Wood, E. and Collins, K. (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, **402**, 551–555.
- Allmang, C., Carbon, P. and Krol, A. (2002) The SBP2 and 15.5 kD/Snu13p proteins share the same RNA binding domain: identification of SBP2 amino acids important to SECIS RNA binding. *RNA*, **8**, 1308–1318.
- Copeland, P.R., Fletcher, J.E., Carlson, B.A., Hatfield, D.L. and Driscoll, D.M. (2000) A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.*, **19**, 306–314.
- Vidovic, I., Nottrott, S., Hartmuth, K., Luhrmann, R. and Ficner, R. (2000) Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Mol. Cell*, **6**, 1331–1342.
- Walbott, H., Machado-Pinilla, R., Liger, D., Blaud, M., Rety, S., Grozdanov, P.N., Godin, K., van Tilbeurgh, H., Varani, G., Meier, U.T. et al. (2011) The H/ACA RNP assembly factor SHQ1 functions as an RNA mimic. *Genes Dev.*, **25**, 2398–2408.
- Kiss, T., Fayet-Lebaron, E. and Jady, B.E. (2010) Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol. Cell*, **37**, 597–606.
- Boulon, S., Marmier-Gourrier, N., Pradet-Balade, B., Wurth, L., Verheggen, C., Jady, B.E., Rothe, 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.
22. 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.
 23. Zhao, R. and Houry, W.A. (2005) Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell Biol.*, **83**, 703–710.
 24. Machado-Pinilla, R., Liger, D., Leulliot, N. and Meier, U.T. (2012) Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA*, **18**, 1833–1845.
 25. Back, R., Dominguez, C., Rothe, B., Bobo, C., Beaufils, C., Morera, S., Meyer, P., Charpentier, B., Branlant, C., Allain, F.H. *et al.* (2013) High-resolution structural analysis shows how Tah1 tethers Hsp90 to the R2TP complex. *Structure*, **21**, 1834–1847.
 26. Zhao, R., Kakiyama, Y., Gribun, A., Huen, J., Yang, G., Khanna, M., Costanzo, M., Brost, R.L., Boone, C., Hughes, T.R. *et al.* (2008) Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J. Cell Biol.*, **180**, 563–578.
 27. King, T.H., Decatur, W.A., Bertrand, E., Maxwell, E.S. and Fournier, M.J. (2001) A well-connected and conserved nucleoplasmic helixase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 7731–7746.
 28. McKeegan, K.S., Debieux, C.M. and Watkins, N.J. (2009) Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Mol. Cell Biol.*, **29**, 4971–4981.
 29. Rothe, B., Back, R., Quinternet, M., Bizarro, J., Robert, M.C., Bland, M., Romier, C., Manival, X., Charpentier, B., Bertrand, E. *et al.* (2014) 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.
 30. Eckert, K., Saliou, J.M., Monlezun, L., Vigouroux, A., Atmane, N., Caillat, C., Quevillon-Cheruel, S., Madiou, K., Nicaise, M., Lazereg, S. *et al.* (2010) The Pih1-Tah1 co-chaperone complex inhibits Hsp90 molecular chaperone ATPase activity. *J. Biol. Chem.*, **285**, 31304–31312.
 31. Gonzales, F.A., Zanchin, N.I., 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.
 32. Manival, X., Jacquemin, C., Charpentier, B. and Quinternet, M. (2014) ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments of the yeast Pih1 and Tah1 C-terminal domains complex. *Biomol. NMR Assignments*, [Epub ahead of print].
 33. Pal, M., Morgan, M., Phelps, S.E., Roe, S.M., Parry-Morris, S., Downs, J.A., Polier, S., Pearl, L.H. and Prodromou, C. (2014) Structural basis for phosphorylation-dependent recruitment of tel2 to hsp90 by pih1. *Structure*, **22**, 805–818.
 34. Kawakami, K., Shafer, B.K., Garfinkel, D.J., Strathern, J.N. and Nakamura, Y. (1992) Ty element-induced temperature-sensitive mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **131**, 821–832.
 35. Marmier-Gourrier, N., Clery, A., Senty-Segault, 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.
 36. Gavin, A.C., Bosche, 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.
 37. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 1030–1032.
 38. Miguet, L., Bechade, G., Fornecker, L., Zink, E., Felden, C., Gervais, C., Herbrecht, R., Van Dorsselaer, A., Mauvieux, L. and Sanglier-Cianferani, S. (2009) Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J. Proteome Res.*, **8**, 3346–3354.
 39. Piazzon, N., Rage, F., Schlotter, F., Moine, H., Branlant, C. and Massenet, S. (2008) In vitro and in cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. *J. Biol. Chem.*, **283**, 5598–5610.
 40. Romier, C., Ben Jelloul, M., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P.H., Christodoulou, E., De Marco, V., van Gerwen, S., Knipscheer, P. *et al.* (2006) Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62**, 1232–1242.
 41. Sanglier, S., Atmanene, C., Chevreux, G. and Dorsselaer, A.V. (2008) Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries. *Methods Mol. Biol.*, **484**, 217–243.
 42. Schanda, P., Forge, V. and Brutscher, B. (2006) HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains. *Magn. Reson. Chem.* **44** Spec No, S177–S184.
 43. Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. and Bax, A. (2009) TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR*, **44**, 213–223.
 44. Lopez-Mendez, B. and Guntert, P. (2006) Automated protein structure determination from NMR spectra. *JACS*, **128**, 13112–13122.
 45. Nederveen, A.J., Doreleijers, J.F., Vranken, W., Miller, Z., Spronk, C.A., Nabuurs, S.B., Guntert, P., Livny, M., Markley, J.L., Nilges, M. *et al.* (2005) RECOORD: a recalculated coordinate database of 500+ proteins from the PDB using restraints from the BioMagResBank. *Proteins*, **59**, 662–672.
 46. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 4569–4574.
 47. Marmier-Gourrier, N., Clery, A., Schlotter, F., Senty-Segault, 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.
 48. Myslinski, E., Segault, V. and Branlant, C. (1990) An intron in the genes for U3 small nucleolar RNAs of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **247**, 1213–1216.
 49. Kufel, J., Allmann, C., Chanfreau, G., Petfalski, E., Lafontaine, D.L. and Tollervy, 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.
 50. Holm, L. and Rosenstrom, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.*, **38**, W545–W549.
 51. Gibrat, J.F., Madej, T. and Bryant, S.H. (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 377–385.
 52. Kressler, D., Doere, M., Rojo, M. and Linder, P. (1999) Synthetic lethality with conditional dbp6 alleles identifies rsalp, a nucleoplasmic protein involved in the assembly of 60S ribosomal subunits. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 8633–8645.
 53. 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.
 54. 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.
 55. 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.
 56. Tran, E.J., Zhang, X. and Maxwell, E.S. (2003) Efficient RNA 2'-O-methylation requires juxtaposed and symmetrically assembled archaeal box C/D and C'/D' RNPs. *EMBO J.*, **22**, 3930–3940.
 57. Watkins, N.J., Dickmanns, A. and Luhrmann, 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.
 58. Watkins, N.J., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hossbach, M., Urlaub, H. and Luhrmann, R. (2004) Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol. Cell*, **16**, 789–798.

59. 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.
60. Qu, G., van Nues, R.W., Watkins, N.J. and Maxwell, E.S. (2011) The spatial-functional coupling of box C/D and C'/D' RNPs is an evolutionarily conserved feature of the eukaryotic box C/D snoRNP nucleotide modification complex. *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 365–374.
61. Lee, J.W., Choi, H.S., Gyuris, J., Brent, R. and Moore, D.D. (1995) Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 243–254.
62. Iwahashi, H., Yamagata, K., Yoshiuchi, I., Terasaki, J., Yang, Q., Fukui, K., Ihara, A., Zhu, Q., Asakura, T., Cao, Y. *et al.* (2002) Thyroid hormone receptor interacting protein 3 (trip3) is a novel coactivator of hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Diabetes*, **51**, 910–914.
63. Koppen, A., Houtman, R., Pijnenburg, D., Jeniga, E.H., Ruijtenbeek, R. and Kalkhoven, E. (2009) Nuclear receptor-coregulator interaction profiling identifies TRIP3 as a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma cofactor. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 2212–2226.
64. Brito, G.C., Fachel, A.A., Vettore, A.L., Vignal, G.M., Gimba, E.R., Campos, F.S., Barcinski, M.A., Verjovski-Almeida, S. and Reis, E.M. (2008) Identification of protein-coding and intronic noncoding RNAs down-regulated in clear cell renal carcinoma. *Mol. Carcinog.*, **47**, 757–767.

Supplementary data

Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of protein Rsa1p by direct interaction

Benjamin Rothé, Jean-Michel Saliou, Marc Quintemet, Régis Back, Decebal Tiotiu, Clémence Jacquemin, Christine Loegler, Florence Schlotter, Vlad Peña, Kelvin Eckert, Solange Moréra, Alain Van Dorselaer, Christiane Branlant, Séverine Massenet, Sarah Sanglier-Cianférani, Xavier Manival, and Bruno Charpentier

Supplemental Materials and Methods

Mass spectrometry-based proteomic analysis

In gel digestion of SDS-PAGE gel slices was performed as previously described (Miguet et al. 2009). The resulting peptide extracts were analyzed by nanoLC-MS/MS on a nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (UPLC, Waters, Milford, UK) coupled to a SYNAPT HDMS G1 hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Waters, Milford, UK) equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. Peptide mixtures were loaded on a Symmetry C18 trap precolumn (180 μ m inner diameter $\times$ 20 mm, particle size 5 μ m; Waters, Milford, UK) and peptides were separated on a ACQUITY UPLC BEH130 C18 column, 75 μ m $\times$ 200 mm, 1.7 μ m particle size (Waters, Milford, UK). The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). Trapping was performed during 3 min at 5 μ L/min with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution was performed at a flow rate of 400 nL/min, using a 1–50 % gradient of solvent B over 35 min at 45 °C followed by 65% solvent B over 5 min. The mass spectrometer parameters were set as follows: capillary voltage 3500 V and cone voltage 35 V. Mass calibration of the TOF was achieved using [Glu1]-fibrinopeptide B (GFP) over the m/z range 50–2000 in the positive ion mode. Online correction of this calibration was achieved using lock-mass on product ions derived from the [Glu1]-fibrinopeptide B (GFP). The ion (M+2H)²⁺ at m/z 785.8426 was used

to calibrate MS data and the fragment ion $(M+H)^+$ at m/z 684.3469 was used to calibrate MS/MS data during the analysis. For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The four most abundant peptides, preferably doubly and triply charged ions, were selected from each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation. MS/MS fragmentation was performed in the collision cell using argon as collision gas. The complete system was fully controlled by MassLynx 4.1 (SCN 566, Waters, Milford, UK). Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were processed and converted with ProteinLynx Browser 2.3 (23, Waters, Milford, UK) into *.pkl peak list format. The MS/MS data were submitted to the Mascot search engine (Matrix Science, London, UK) installed in its 2.2.04 version on a local server. Searches were performed against a composite target-decoy database including both forward (target) and reverse (decoy) SwissProt protein sequences (21 January 2010, 5 1028424 total entries). Searches were performed with a tolerance on mass measurements of 0.2 Da for precursor and 25 ppm for fragment ions. Carbamidomethylation of cysteine residues, oxidation of methionine residues and acetylation of protein N-terminal residues were searched as variable modifications. A single missed cleavage was allowed. Scaffold V3_00_01 (Proteome Science, Portland, USA) was used for identification validation and false positive rate estimation for protein identification. For each sample, peptides were filtered out according to the cutoff set for proteins hits with two or more peptides (Mascot Ion Score >20 and Mascot Ion Score - Mascot Identity Score >0) and no false positive proteins were identified. Further data treatment was performed with Microsoft Excel.

Supplemental references

Miguet L, Bechade G, Fornecker L, Zink E, Felden C, Gervais C, Herbrecht R, Van Dorsselaer A, Mauvieux L, Sanglier-Cianferani S. 2009. Proteomic analysis of malignant B-

cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J Proteome Res* **8**: 3346-3354.

Supplemental Figures & Tables

Table S1. Structural statistics obtained on Rsa1p₃₁₇₋₃₅₂-Hit1p₇₀₋₁₆₄. Constraints used for RECOORD scripts and statistics on the 20 NMR structures with the lowest final energies are listed.

Rsa1p ₃₁₇₋₃₅₂ /Hit1p ₇₀₋₁₆₄	
NMR distances and dihedral constraints	
Distance constraints	
Total NOE	3378
Intra-residue	955
Inter-residue	2423
Sequential ($ i - j = 1$)	810
Medium-range ($ i - j < 4$)	868
Long-range ($ i - j > 5$)	745
Total dihedral angle restraints	
ϕ	95
ψ	95
Structure statistics	
Violation occurrences	
Distance constraints ($> 0.5 \text{ \AA}$)	0
Dihedral angle constraints ($> 5^\circ$)	0
Deviations from idealized geometry	
Bond lengths ($\text{\AA}$)	0.0032 +/- 0.0001
Bond angles ($^\circ$)	0.465 +/- 0.013
Impropers ($^\circ$)	1.129 +/- 0.041
R.M.S.D. on secondary structures ($\text{\AA}$)	
Heavy	1.03 +/- 0.12
Backbone	0.53 +/- 0.09
Ramachandran statistics	
Residues in most favoured regions	87.7 %
Residues in additional allowed regions	10.5 %
Residues in generously allowed regions	0.8 %
Residues in disallowed regions	1.0 %
Rsa1p ₃₁₇₋₃₅₂ surface ($\text{\AA}^2$)	4341 +/- 71
Hit1p ₇₀₋₁₆₄ surface ($\text{\AA}^2$)	11836 +/- 97
Complex surface ($\text{\AA}^2$)	8569 +/- 165
Complex buried surface area ($\text{\AA}^2$)	3267 +/- 128

Table S2. DNA oligonucleotides used for rRNAs, snoRNAs and UsnRNAs detection.

Experiments	Oligonucleotides	Sequences	Target RNAs
pre-rRNA/rRNA Northern-blot	p1	CTTGCGACCGGCTATTC	5'ETS pre-rRNA
	p2	CATGGCTTAATCTTTGAGAC	18S rRNA
	p3	AAAGCTCTCATGCTCTTGCC	ITS1 pre-rRNA
	p4	CGCCTAGACGCTCTCTTCTTA	ITS2 pre-rRNA
	p5	CTCCGCTTATTGATATGC	25S rRNA
snoRNA/UsnRNA Northern-blot	NB-U3	CCGTCAGACTGTTCA	C/D snoRNA U3
	NB-U14	TCACTCAGACATCCTAG	C/D snoRNA U14
	NB-snr13	AGCTTGAGTTTTCCACACC	C/D snoRNA snR13
	NB-snr45	GTATTTGCGCTCAGGTTGC	C/D snoRNA snR45
	NB-snr63	TTATGTTGGCCACTCATCAC	C/D snoRNA snR63
	NB-snr70	TGACCAATCATCAATTCTCC	C/D snoRNA snR70
	NB-snr190	CGAGGAAAGAAGAGACACCATTATC	C/D snoRNA snR190
	NB-snr10	CCTTGCAACGGTCCTCATCCGGG	H/ACA snoRNA snR10
	NB-snr30	GTCCGAAGCGCCATCTAG	H/ACA snoRNA snR30
	NB-snr32	GGGTCAAGCTTTGCAATTCT	H/ACA snoRNA snR32
	NB-snr42	TCAAACAATAGGCTCCCTAAAGCATCACAA	H/ACA snoRNA snR42
	NB-snr44	GGTAATGGATATAGTAGCTA	H/ACA snoRNA snR44
	NB-U1	GACCAAGGAGTTTGCATCAATGA	UsnRNA U1
	NB-U4	TAAATTTCAACCAGGGAAACACAATCTCGGACGAA	UsnRNA U4
	NB-U6	CAGGGGAACGCTG	UsnRNA U6
RT-PCR	OG-Rev	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCTGAAAACCAACCTTTGG	pre-U3 (+exogenous anchor)
	OG-5'PCRa	TCTGTGTCGACGTACTTCA	pre-U3 (Exon 1)
	OG-5'PCRB	AGTCTTAGGTACTAGAGTTT	pre-U3 (Intron)
	OG-3'PCR	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATT	pre-U3 (exogenous anchor)

Figure S1. Analysis of functional domains in the Hit1 protein. Various fragments of Hit1p were expressed in yeast strain $\Delta HIT1$ and tested for complementation of the growth defect.

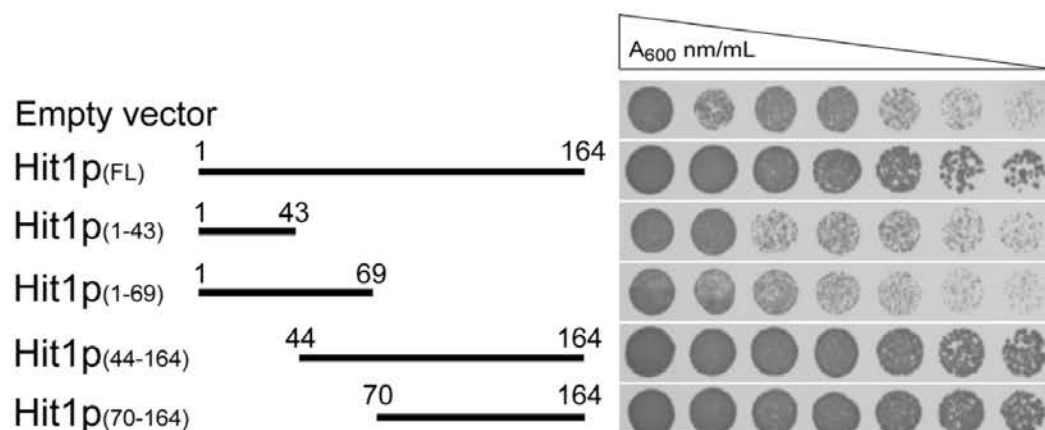


Figure S2. Comparison of HSQC ^1H - ^{15}N spectra recorded at 293K on RsaIp₃₁₇₋₃₇₅-HitIp₄₄₋₁₆₄ (red), RsaIp₃₁₇₋₃₇₅-HitIp₇₀₋₁₆₄ (green) and RsaIp₃₁₇₋₃₅₂-HitIp₇₀₋₁₆₄. All complexes were obtained upon co-expression of the protein partners in *E. coli* and are ^{15}N -labelled. As the size of the complex decreases, the three spectra remain superimposable for the majority of resonances except those located in the middle portion of the HSQC map. Using 3D NMR spectra, the latter resonances have been assigned to the C-terminal tail of RsaIp₃₁₇₋₃₇₅ (i.e. fragment 353-375) and to the N-terminal tail of HitIp₄₄₋₁₆₄ (i.e. fragment 44-69). This observation indicates that these tails are not involved in stabilization of the complex.

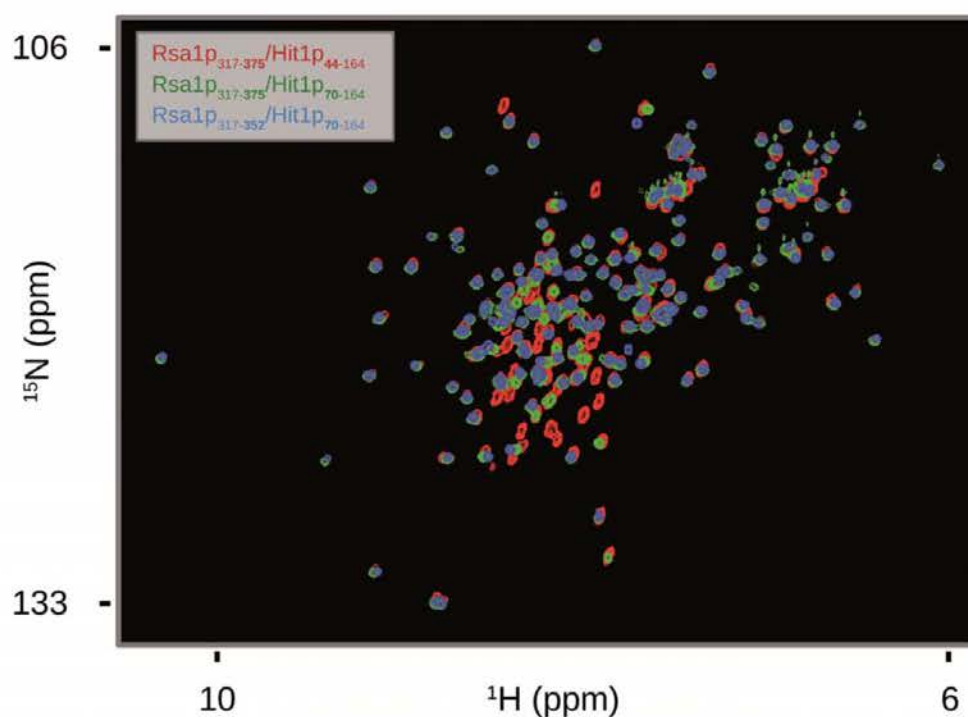
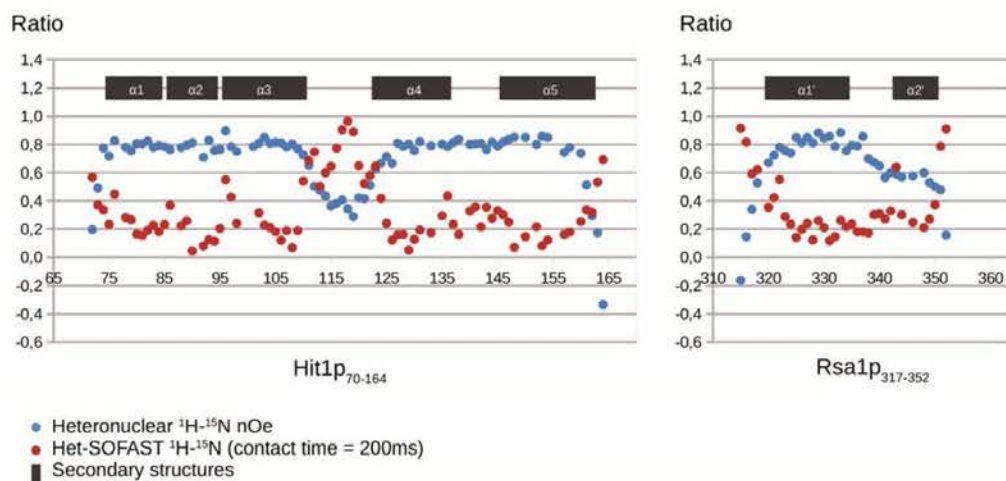
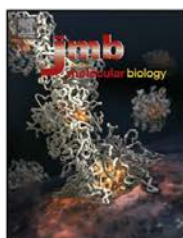


Figure S3. ^1H - ^{15}N heteronuclear nOe (blue circles) and Het-SOFAST (red circles) ratios are plotted vs. the primary sequences of Hit1p₇₀₋₁₆₄ and Rsa1p₃₁₇₋₃₅₂. Secondary structures are indicated using grey squares.



ANNEXE 2



Functional and Structural Insights of the Zinc-Finger HIT protein family members Involved in Box C/D snoRNP Biogenesis

Benoit Bragantini^{1,†}, Decebal Tiotiu^{1,†}, Benjamin Rothé¹, Jean-Michel Saliou^{3,4}, Hélène Marty¹, Sarah Cianférani^{3,4}, Bruno Charpentier¹, Marc Quinternet² and Xavier Manival¹

1 - Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365, CNRS Université de Lorraine, Biopôle, Campus Biologie-Santé, 9 Avenue de la Forêt de Haye, CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

2 - FR 3209, CNRS-Université de Lorraine, Bioingénierie Moléculaire, Cellulaire et Thérapeutique, Biopôle, Campus Biologie-Santé, CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

3 - BioOrganic Mass Spectrometry Laboratory (LSMBO), IPHC, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

4 - IPHC, UMR 7178, CNRS, 67087 Strasbourg, France

Correspondence to Marc Quinternet and Xavier Manival: marc.quinternet@univ-lorraine.fr; xavier.manival@univ-lorraine.fr
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.028>

Edited by Mingjie Zhang

Abstract

Zf-HIT family members share the zf-HIT domain (ZHD), which is characterized by a fold in “treble-clef” through interleaved CCCC and CCHC ZnF motifs that both bind a zinc atom. Six proteins containing ZHD are present in human and three in yeast proteome, all belonging to multimodular RNA/protein complexes involved in gene regulation, chromatin remodeling, and snoRNP assembly. An interesting characteristic of the cellular complexes that ensure these functions is the presence of the RuvBL1/2/Rvb1/2 ATPases closely linked with zf-HIT proteins. Human ZNHIT6/BCD1 and its counterpart in yeast Bcd1p were previously characterized as assembly factors of the box C/D snoRNPs. Our data reveal that the ZHD of Bcd1p is necessary but not sufficient for yeast growth and that the motif has no direct RNA-binding capacity but helps Bcd1p maintain the box C/D snoRNAs level in steady state. However, we demonstrated that Bcd1p interacts nonspecifically with RNAs depending on their length. Interestingly, the ZHD of Bcd1p is functionally interchangeable with that of Hit1p, another box C/D snoRNP assembly factor belonging to the zf-HIT family. This prompted us to use NMR to solve the 3D structures of ZHD from yeast Bcd1p and Hit1p to highlight the structural similarity in the zf-HIT family. We identified structural features associated with the requirement of Hit1p and Bcd1p ZHD for cell growth and box C/D snoRNA stability under heat stress. Altogether, our data suggest an important role of ZHD could be to maintain functional folding to the rest of the protein, especially under heat stress conditions.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Zinc-binding proteins are one of the largest protein superfamilies in eukaryotes and represent up to 10% of the human proteome [1]. These proteins contribute to functionally important protein-protein or protein-nucleic acid interactions for regulation of gene expression including transcription regulation, chromatin remodeling, and mRNA stability and processing [2]. The most common types of coordination environment for zinc-finger (ZnF) motifs are the CCCC and CCHH type (C for cysteine and H for histidine), and the classification of the zinc-binding

proteins in different subfamilies relies on a combination of these ZnF motifs. In the TRASH (trafficking, resistance, and sensing of heavy metals) superfamily, the members of the zf-HIT family share the zf-HIT domain (ZHD), which is characterized by a fold in “treble-clef” [3,4]. The name of this family derives from the yeast protein Hit1, which is the first protein for which ZHD was defined [5]. The globular 3D fold of the ZHD was described for the first time in the ZNHIT2 protein and consists of two or four β -strands followed by a C-terminal short α -helix packed against the second β -sheet [4]. Amino acid sequence analysis revealed that the zf-HIT family is

divided into three distinct subgroups (Fig. 1). The first subgroup includes proteins with the interleaved CCCC and CCHC ZnF motifs [first zinc finger (ZnF1) and second zinc finger (ZnF2)] that bind two zinc atoms. The CCHC ZnF motif is not conserved in the second and third subgroups, leading to the proposal that these subgroups bind a single zinc ion [4]. This type of classification is also consistent with results of phylogenetic analysis of zf-HIT-containing proteins. Indeed, the first subgroup includes proteins with a single ZHD with two ZnF motifs, whereas the second and third subgroups include a ZHD consisting of a single ZnF motif. The second and third groups are also characterized by the presence of extra domains such as the PAPA-1 homology sequence and the DEAD-box helicase, respectively [4].

ZHD is mainly found in nuclear proteins involved in gene regulation, chromatin remodeling, and pre-snoRNP assembly, but its precise function remains largely unknown. Six Zinc finger HIT domain-containing proteins (ZNHIT1 to 6) are present in the human proteome and three in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* proteome (Fig. 1) [6]. In the rest of the paper, mammal proteins are written in uppercase and yeast proteins in lowercase. The ZNHIT1 protein specifically associates with class I histone deacetylase, which was suggested to reduce the acetylation level of histone H4 in the CDK6 promoter region [7]. Moreover, ZNHIT1 protein is associated with helicases TIP49/RuvBL1 and TIP48/RuvBL2 (here called RuvBL1/2) within the complex SRCAP (SNF2-related CBP activator protein; aka hINO80). Its counterpart SWR1 complex (SWR-C) in yeast [8] contains the putative homolog of ZNHIT1 (i.e., the vacuolar protein sorting-associated protein 71, Vps71p, also Swc6p) and proteins Rvb1/2, which are the yeast counterparts of RuvBL1/2. Affinity purification and mass spectrometry (AP-MS) analysis showed that

the second protein ZNHIT2 of the human zf-HIT family associates with RuvBL1/2 and RPAP3 (Tah1p in yeast) [9,10]. ZNHIT2 has no known homolog in yeast. The third protein ZNHIT3 (Hit1p in yeast) or human thyroid hormone receptor interacting protein 3 (TRIP3) is a cofactor of the hepatocyte nuclear factor 4 α , which is a transcription factor and a member of the steroid hormone receptor superfamily [11]. Mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene are known to cause maturity-onset diabetes of the young [12]. Recently, ZNHIT3(TRIP3)/Hit1p in human and yeast, respectively, was reported as new cofactor of the platform protein NUFIP1 (Rsa1p in yeast) involved in box C/D small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) assembly and tightly associated with RuvBL1/2 [13,14]. Like ZNHIT1, the ZNHIT4 (INO80B) protein was reported to be a core component of the INO80 complex, which also includes RuvBL1/2 [15,16]. Recent structural data indicate that the yeast counterpart of ZNHIT4, les2p (Ino eighty subunit 2), interacts with proteins Rvb1/2 to recruit these proteins within the INO80 complex [17]. ZNHIT5 (also DDX59 for DEAD box polypeptide 59) protein is a relatively uncharacterized member of the DEAD-box-containing RNA helicase family of proteins that is known to play a critical role in many aspects of RNA metabolism. Finally, the last member of the family, ZNHIT6 (also BCD1 for box C/D snoRNA protein 1), is the ortholog of yeast Bcd1p that was identified by high-throughput genetic screening of yeast mutants associated with defects in non-coding RNA biogenesis [18]. Sequence analysis of the 366 aa of Bcd1p revealed the presence of a ZHD, which is conserved in human and is similar to the one found in the N-terminal part of the TRIP3/Hit1p protein (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1). Taken together, these data emphasize the close connection between the zf-HIT proteins and the RuvBL1/2/Rvb1/2 ATPases.

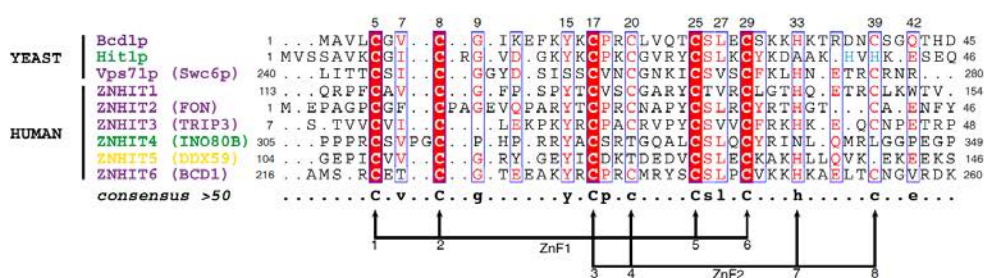


Fig. 1. Sequence comparison between members of the zf-HIT family. Multiple-sequence alignment of different known ZHD sequences obtained from Pfam (Bateman et al., 2004) and made with the ESPrnt 3.0 program [54] and manually optimized. The cysteine and histidine residues of Bcd1p coordinating zinc ions are indicated by black arrows pointing upwards toward the bottom of the sequences. Numbering at the top corresponds to yeast Bcd1p. Histidine residues involved in the coordination of the second zinc ion in the ZHD of Hit1p are in blue. The three subgroups are in different colors corresponding with the name of the sequences: purple, green, and yellow, for respectively, the first, second, and third subgroups [4].

TIP49(RuvBL1)/Rvb1 and TIP48(RuvBL2)/Rvb2 are two homologous, highly conserved ATP-binding proteins belonging to the AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) superfamily (for review, see Ref. [19]). They are crucial for a large number of cellular processes and are involved in the assembly of an eclectic set of protein or ribonucleo-protein complexes in the cytoplasm and the nucleus, including various ATP-dependent chromatin remodeling machines such as INO80, SWR1, and p400 [20–24], the histone acetyltransferase TIP60 complex [20], the box H/ACA and box C/D ribonucleo-protein particles [25–27], transcription regulation complexes [28,29], the telomerase complex [30], the RNA polymerase II [31], PIKKs (phosphatidylinositol-3-kinase-like kinases) such as mTOR and SMG1 [32,33], and axonemal dynein [34].

In the recent years, our team has made a particular effort to decipher the mechanisms through which snoRNPs are assembled. Each box C/D snoRNP includes a unique box C/D guide RNA, but they all share a common set of four core proteins, SNU13/Snu13p, NOP58/Nop58p, NOP56/Nop56p, and Fibrillarin/Nop1, in human/yeast, respectively. The box C/D snoRNPs are catalysts for ribose 2'-O-methylation during the biosynthesis and processing of the pre-rRNA, and these modifications take place in functional regions such as decoding and peptidyl-transferase centers [35]. Concerning the snoRNP biogenesis, the individual depletion of the proteins RuvBL1/Rvb1 and RuvBL2/Rvb2 affects the cellular level of box C/D snoRNAs and leads to incorrect localization of the snoRNP core proteins, both in human and yeast [36,37]. In yeast, the ability of Rvb2 to bind and/or hydrolyze ATP is essential for the accumulation of box C/D snoRNAs [38].

Interestingly, ZNHIT3/Hit1p, which was recently described as a new snoRNP assembly factor specific to the box C/D pathway, is also required for the proper accumulation of box C/D snoRNAs [13,14]. Protein Bcd1 also contributes to the specific stability of the box C/D snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae* and is essential for cellular viability [18,39]. In addition, RNA immunoprecipitation experiments revealed that BCD1 is specifically associated with nucleoplasm precursors of snoRNAs U3 and U8 [40,41]. RNAi-mediated depletion of BCD1 resulted in a significant reduction in the amounts of U3, U8, and U14 but also in a change in the location of U3 snoRNP [40]. These associations probably take place in large assembly complexes, since BCD1 protein is co-purified with proteins NOP58, NOP56, NUFIP1, PIH1D1, and RuvBL1/2 [40]. Pull-down assays using recombinant BCD1 allowed partial mapping of these interactions [40,41]. The truncated 1–360 form of protein BCD1, which contains the ZHD, interacts *in vitro* with Fibrillarin, NUFIP1, and RuvBL1/2, and these interactions are modulated by ATP. The presence of the C-terminal

domain of BCD1 is required to establish an association with SNU13. Finally, no direct interaction has been observed with PIH1D1. Recently, BCD1 was shown in close association in cells with RuvBL1/2 in an early protein-only complex of the snoRNP biogenesis pathways [13]. Altogether, these results show that BCD1/Bcd1p is a major factor in the biogenesis of box C/D snoRNP.

Here, we report the results of new functional and structural analysis of the Bcd1 and Hit1 yeast proteins that advance our understanding of the box C/D snoRNP biogenesis pathway. Through domain-mapping experiments, we show that ZHD of Bcd1p (ZHD-Bcd1p) is necessary but not sufficient for its function, even if it is not involved in direct RNA binding. Interestingly, we demonstrate that Bcd1 is however able to nonspecifically bind different RNAs in a size-dependent manner. Our data reveal that zinc coordination is nonetheless crucial for the ability of Bcd1p to maintain the box C/D snoRNAs in steady state. Thus, the mutation of the ZnF2 of Bcd1p exhibits a temperature-sensitive phenotype. Using NMR, we solved the high-resolution structures of the ZHD of both Bcd1p (ZHD-Bcd1p) and Hit1p (ZHD-Hit1p) to highlight the determinants of yeast ZHD proteins involved in the box C/D snoRNP assembly. Our data also demonstrate that these two domains adopt similar folds and that their swap did not alter the function of Bcd1p. All these data are discussed with respect to past classification and genetic evolution of ZHD proteins.

Results

Human and yeast sequence analysis of zf-HIT family

Respectively, three and six members of the zf-HIT family are expressed in the yeast *S. cerevisiae* and in human. Multiple sequence alignment confirmed the conservation of eight residues, including seven cysteines and one histidine, which may coordinate two zinc ions with the following spacing: C₁xxC₂-C₅xxxC₆ interleaved with C₃xxC₄-H₇xxxxxC₈ (Fig. 1). The first, second, fifth, and sixth positions correspond to zinc ion ligands in the ZnF1, and the third, fourth, seventh, and eighth positions correspond to the ZnF2. Nevertheless, residues corresponding to the fourth, seventh, and eighth ligand positions are not strictly conserved in Hit1, ZNHIT4, and ZNHIT5 proteins. This observation raised the question of the fold of the ZnF2 motif in these proteins.

In addition to the eight zinc-coordinating residues, other amino acids are significantly conserved (consensus line, Fig. 1), for example, a Val or hydrophobic residue in position 7, a Gly residue in position 9, a Tyr residue in position 15, a Ser residue in position

26, a Leu or Val residue in position 27, and a Glu residue in position 42.
Remarkably, two factors involved in the biogenesis of box C/D snoRNP, proteins Hit1 and Bcd1 and their

respective counterparts TRIP3 and BCD1 in human, belong to the zf-HIT family. Given our team's interest in the assembly of these particles in yeast, we focused our work on Hit1p and Bcd1p.

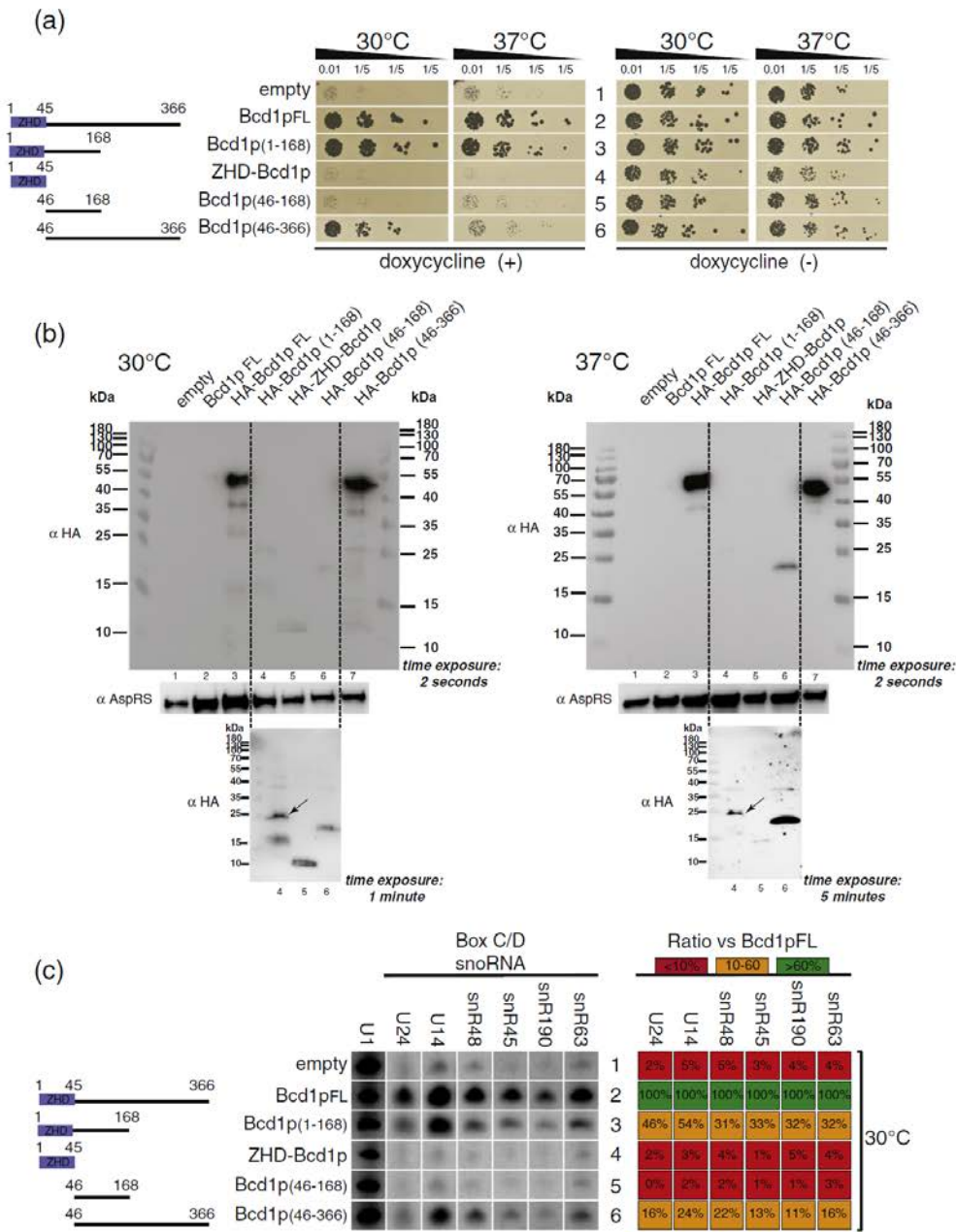


Fig. 2 (legend on next page)

The ZHD of Bcd1p is required for the functionality of the protein

Previously, we showed that the Rsa1p-binding domain of Hit1p, but not its ZHD, is required for the function of Hit1p in snoRNP biogenesis [14]. To test the functional importance of the ZHD of Bcd1p in this pathway, we designed several fragments based on sequence conservation and secondary structure prediction (Fig. 2a). First, each fragment was tested in a complementation assay by ectopic expression in the yeast strain *tetO_z::BCD1* in which expression of the endogenous Bcd1p is repressed upon treatment with doxycycline [18]. The presence of doxycycline (Fig. 2a, left panel *versus* right panel) completely inhibited growth when the cells were transformed with the empty vector p413-TEF (row 1), confirming that Bcd1p expression is essential for cell viability, at both 30 °C and 37 °C. By contrast, the ectopic expression of the full-length 1–366 Bcd1p (row 2) restored growth similar to that in the untreated cells (Fig. 2a, left panel *versus* right panel). Only fragment 1–168 that includes the ZHD allowed complementation at both temperatures (row 3). Even so, the ZHD was not sufficient for complementation (row 4) but was apparently required to maintain the cell viability, since no growth was observed with fragment 46–168 (row 5). This fragment-based approach to complementation assays, which was not previously performed on Bcd1p, revealed that lack of ZHD did not have the same drastic effect since fragment 46–366 allowed partial growth recovery, although only at 30 °C (row 6). The different fragments are not expressed at same levels as shown by western blot analysis of extracts prepared from cells expressing an HA-tagged version of these fragments (Fig. 2b). The amounts of fragments 1–168 (lanes 4) and 46–168 (lanes 6) are similar but much lower

(~3-fold change at 30 °C) than the amounts of full-length Bcd1p (Bcd1p-FL) (lanes 3); fragment 46–366 (lanes 7) is expressed even at a higher level (~1.4-fold change at 30 °C). Nevertheless, only expression of fragment 1–168 allowed an apparent growth similar to the one obtained upon expression of Bcd1p-FL. This showed that the first 168 aa of the N-terminal end represent a functional domain *in vivo*. Interestingly, we showed that the ZHD plays an essential role in the function of the protein and consequently in cell viability.

The ZHD of Bcd1p contributes to the steady-state level of the box C/D snoRNAs

Previously, T.R. Hughes' team demonstrated that Bcd1p depletion causes a specific and drastic decrease in the amount of box C/D snoRNAs in the yeast strain *tetO_z::BCD1* upon doxycycline treatment [18,39]. We next checked for a correlation between the ability of each fragment to complement the growth defect of the *tetO_z::BCD1* strain and to maintain the amount of box C/D snoRNAs. The steady-state levels of a selected series of box C/D snoRNAs were analyzed by Northern blot hybridization on total RNA extracted from cells expressing the different constructs at 30 °C (Fig. 2c). U1 snRNA was used as negative control and as the internal reference for quantification. The resulting data are in agreement with those obtained in the complementation assays (Fig. 2a). Indeed, the absence of Bcd1p (Fig. 2c, row 1) led to a 25-fold average decrease in the levels of the box C/D snoRNAs, while complementation with Bcd1p-FL restored a high level of these RNAs (row 2). Fragment 1–168 (row 3) and to a lesser extent fragment 46–366 (row 6) restored the level of snoRNAs partially but sufficiently to ensure cell growth. These results

Fig. 2. Functional analysis of Bcd1p domains. (a) Complementation assays. Different fragments of Bcd1p were expressed in *tetO_z::BCD1* (R1158) strain transformed with the recombinant p413-TEF(*HIS3*) vector. In this strain, expression of the endogenous gene *BCD1* is repressed in the presence of doxycycline [18]. The panel on the left represents the different fragments, and ZHD is identified by a blue rectangle. Transformed cells were harvested from His⁺ plates, and a stock dilution with $A_{600} = 1$ per mL was prepared in sterile water. The first sample was diluted to $A_{600} 0.01$, four successive cascade dilutions with a factor of 1/5 were prepared, and 10 μ L of each samples were spotted on solid selective (His⁺) media prepared in the presence or absence of 50 μ g/mL doxycycline. Cell growth was assessed after 72 h at 30 °C and 37 °C. The strain transformed with the empty vector p413TEF was used as a negative control (empty). (b) Western blot analysis of equal amounts of total cell lysates from *tetO_z::BCD1* (R1158) strain transformed with the recombinant p413-TEF(*HIS3*)-HA, grown at 30 °C and 37 °C and expressing the different HA-tagged fragments. Tagged proteins were detected with anti-HA (α -HA) antibodies. AspRS protein used as loading control was detected using specific anti-AspRS (α -AspRS) antibodies. (c) Northern blot analysis and heat map representation of steady-state levels of six representative box C/D snoRNAs at 30 °C during the exponential growth phase. Total RNAs were extracted from recombinant *tetO_z::BCD1* (R1158) cells used in the complementation assays, and 10 μ g were fractionated on 6% polyacrylamide denaturing gels. After transfer to Zeta-Probe membrane (Biorad), RNAs were detected by hybridization with specific 5' ³²P-radiolabeled oligonucleotides probes (see Materials and Methods) and visualized with a Phosphorimager (Typhoon 9410, GE Healthcare). U1 snoRNA was used as an internal control. The figure was built by cutting the bands obtained at the same exposure from the Northern blot membrane. The radioactivity in each snoRNA band was quantified using ImageQuant software version 5.2 (Molecular Dynamics). The percentage of snoRNA in the different total RNAs extracts was calculated from the radioactivity in each band relative to the radioactivity in the band of U1 snRNA. The percentage of each snoRNA relative to the WT cells is presented on the right.

suggest that the contribution of Bcd1p to the expression of box C/D snoRNAs relies at least in part on its ZHD.

NMR solution structure of the ZHD of Bcd1p

To learn more about the minimal fragment 1-168 of Bcd1p, we sought to produce a recombinant form using a standard immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) approach in *Escherichia coli*. Unfortunately, after several attempts, we were still not able to perform full purification. To go further in our functional analysis of ZHD-Bcd1p, we decided to solve the NMR solution structure of fragments 1-45 of Bcd1p.

We first checked for the presence of zinc ions in ZHD-Bcd1p *in vitro*. Native MS analysis revealed the presence of two zinc ions for a total monoisotopic mass of 5465.39 ± 0.01 Da, which is in agreement with the expected mass (ZHD-Bcd1p - 3H + 2Zn, $5337.5 - 3.03 + 130.76 = 5465.23$ Da) (Supplementary Fig. S2A). The need for zinc ions for correct

folding of ZHD-Bcd1p was then highlighted using a large excess of EDTA that completely deteriorated the ^1H - ^{15}N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) NMR spectrum of the protein (Supplementary Fig. S3A).

The use of two temperatures (298 K and 313 K) was required to reach an almost complete NMR assignment. Next, a long range ^1H - ^{15}N HSQC spectrum showed a neutral tautomeric form of the imidazole ring of His33, with the protonation of nitrogen $\text{N}^{\delta 1}$ [42]. Thus, inter-proton distance restraints derived from 2D and 3D nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY) spectra, together with zinc-coordination restraints (see [Materials and Methods](#)), enabled us to access the solution structure of ZHD-Bcd1p.

The 20 most representative conformers obtained after water refinement with RECOORD scripts are shown in Fig. 3a, and the statistics for the calculation are listed in Table 1. With RMSD values of 0.44 ± 0.06 Å and 1.28 ± 0.13 Å, respectively, for the backbone and heavy atoms of the ordered

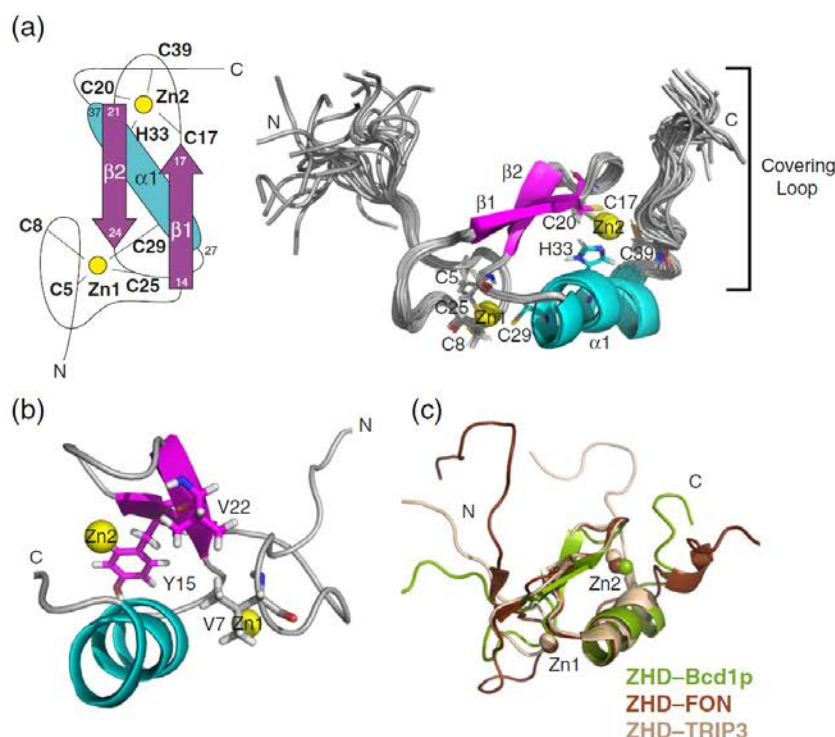


Fig. 3. Solution structures of the ZHD of Bcd1p. (a) Topology diagrams of ZHD-Bcd1p and cartoon representation of the 20 NMR structures with the lowest energies. Zinc ions are in yellow and secondary structures for α -helices in cyan and of β -strands in magenta. Cysteine and histidine residues involved in the zinc coordination are labeled and their side chains are represented by lines. (b) Ribbon representation of the first NMR structure of ZHD-Bcd1p. The side chains of residues Val7, Tyr15, and Val22 are labeled and represented by sticks. (c) Superimposition of the ZHD structures of Bcd1p (1-45) (green), FON (1-46) (brown, PDB code 1X4S), and TRIP3 (7-46) (wheat, PDB code 2YQQ).

Table 1. Statistics of the 20 final solution structures of the Bcd1p and Hit1p ZHDs. The RMSD were calculated using residues 5-39 for ZHD-Bcd1p and 6-41 for ZHD-Hit1p

	ZHD-Bcd1p	ZHD-Hit1p
<i>NMR distances constraints</i>		
Total NOE	902	932
Intra-residue	204	208
Inter-residue		
Sequential ($ i - j = 1$)	248	266
Medium-range ($ i - j < 5$)	158	156
Long-range ($ i - j > 5$)	292	302
Zinc-related restraints	27	26
Dihedral angle restraints	9	10
Average constraints/residues	18.8	19.0
<i>Structure statistics</i>		
Average number of noe violations (>0.5 Å)	0.1 ± 0.3	0.0
<i>Deviations from idealized geometry</i>		
Bond length ($\pm 10^{-3}$ Å)	3.629 ± 0.261	3.604 ± 0.157
Bond angle ($^{\circ}$)	0.607 ± 0.031	0.550 ± 0.034
Impropers ($^{\circ}$)	1.394 ± 0.173	1.147 ± 0.073
Mean CNS energy (kcal mol^{-1})	-1348.40 ± 47.2	-1502 ± 16.3
<i>Ramachandran plot statistics (%)</i>		
Residues in most favored regions	67.8	68.6
Residues in additional allowed regions	28.9	29.9
Residues in generously allowed regions	2.0	1.2
Residues in disallowed regions	1.3	1.3
<i>Average CNS pairwise RMSD (Å)</i>		
Backbone atoms	0.44 ± 0.06	0.28 ± 0.06
Heavy atoms	1.28 ± 0.13	1.30 ± 0.14

region 5-39, the ensemble of NMR structures is well defined.

In detail, this ZHD comprises successively a structured loop (5–13), a two-stranded antiparallel β -sheet (14–17 and 21–24) and an α -helix (27–37) (Fig. 3a). The first zinc ion is located between the N-terminal structured loop and the very beginning of the α -helix, and its binding site is formed by Cys5, Cys8, Cys25, and Cys29 (Fig. 1). The second zinc ion is located between the loop connecting the two β -strands and the α -helix, and its binding site is formed by Cys17, Cys20, His33, and Cys39 (Fig. 3a). The average distance between the two zinc ions is 12.82 ± 0.08 Å.

We observed that the second zinc ion is protected by a covering loop in the C-terminal part of ZHD-Bcd1p (37–45), creating a more crowded neighborhood for the second ion than for the first (Fig. 3a). The loop is stabilized in part by the side chain of Arg19, which belongs to the connecting loop between the two β -strands. Moreover, the second zinc finger motif clamps the β -sheet over the α -helix and thus could be needed for the stabilization of secondary structures of ZHD-Bcd1p. It contrasts slightly with the first zinc finger motif, which appears more as an appendix positioned at the beginning of the fold (Fig. 3a). However, as expected, the two zinc finger motifs are arranged in a treble-clef-type domain, which is locked by hydrophobic contacts involving residues Val7 and Val22 (Fig. 3b).

Coordination of zinc ions is crucial for the function of the ZHD of Bcd1p in snoRNP biogenesis

With the help of our structural data highlighting the binding mode of zinc ions in ZHD-Bcd1p, we decided to check if the capacity of Bcd1p to coordinate zinc ions contributed to protein functionality. Thus, we introduced several combinations of point mutations in the full-length protein that consisted of the substitution of the first two cysteines of ZnF1 and/or ZnF2 by Serine (Fig. 4a). Each variant was expressed in *E. coli*, purified, and analyzed by circular dichroism to estimate protein secondary structure. All the variants were soluble and stable. Supplementary Fig. S4 showed that both single, mutated proteins (ZHD_{C5S+C8S}-Bcd1p and ZHD_{C17S+C20S}-Bcd1p) lost typical helical secondary structure, compared to wild-type (WT) Bcd1p, but remained identical to each other. The double-mutated variant (ZHD_{C5S+C8S+C17S+C20S}-Bcd1p) showed much less secondary structure than each of the single-mutated variants. In addition, we substituted the solvent-exposed amino acid Tyr15 by alanine (Figs. 1, 3b, and 4a), this residue being conserved in yeast only in ZHD involved in the box C/D snoRNP assembly pathway (i.e., Hit1p and Bcd1p, but not Vps71p).

We then tested the contribution of the substituted residues to cell growth (Fig. 4b) and to the steady-state level of box C/D snoRNAs (Fig. 4c). Complementation of full-length proteins with mutations in

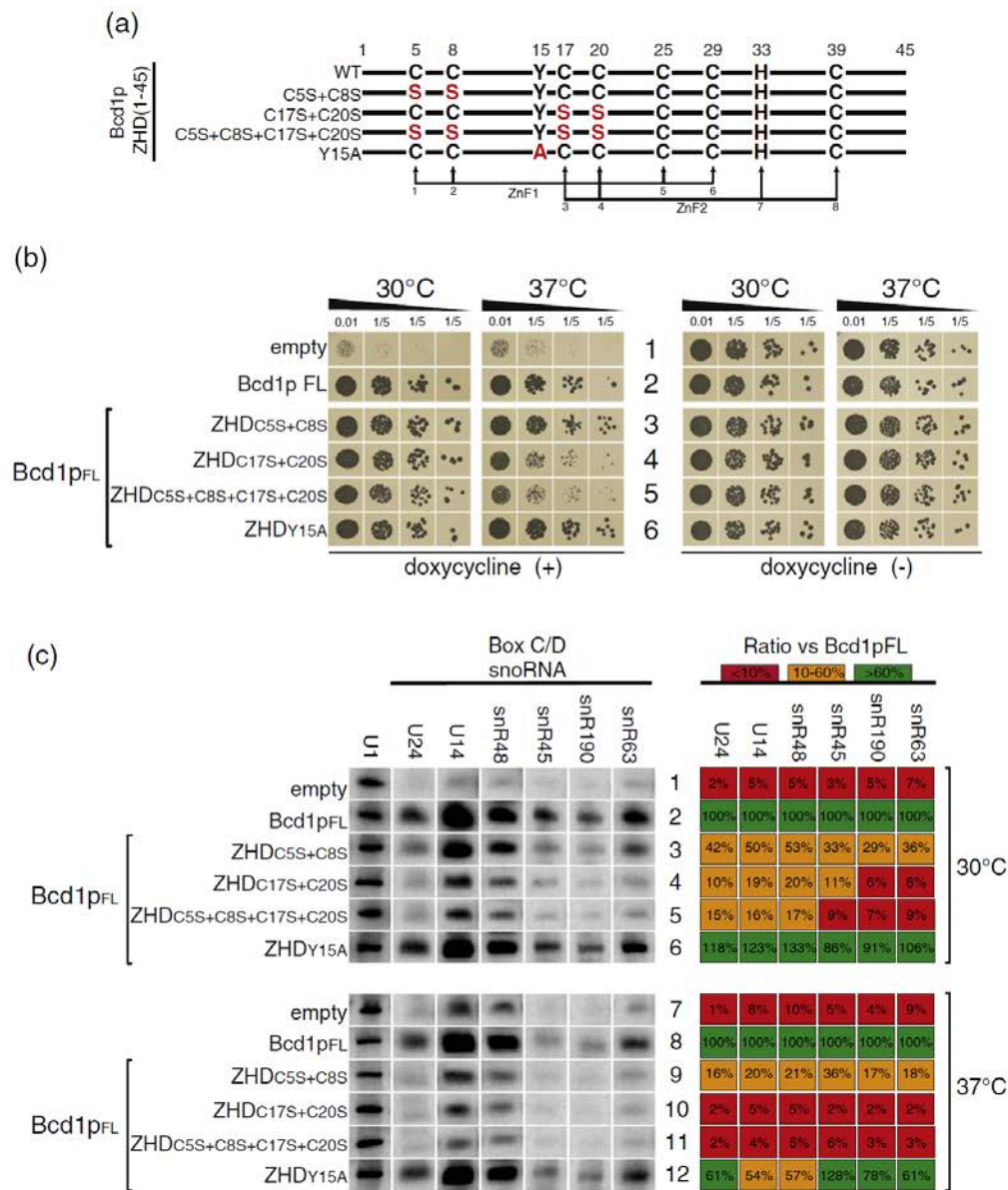


Fig. 4. Functional analysis of the ZHD of Bcd1p in the full-length context. (a) Representation of mutations in ZHD. Cysteine (C) residues substituted by serine (S), and tyrosine (Y) residue substituted by alanine (A) in four variants of Bcd1p-FL. (b) Complementation assays performed as in Fig. 2a for variants of the ZHD. (c) Northern blot analysis of steady-state levels of different box C/D snoRNAs performed as in Fig. 2b.

one of the two zinc fingers allowed growth comparable to that of the WT at 30 °C (rows 3–4) but significantly decreased the amounts of box C/D snoRNAs (rows 3–4). Interestingly, ZnF2 mutations led to a greater reduction in the amount of snoRNA than the ZnF1 mutations, but no cumulative effects

were observed either on growth or snoRNA levels, when the two ZnF motifs were mutated (Fig. 4b–c, compare row 3 with rows 4 and 5). Remarkably, in terms of snoRNA amounts, point mutations in ZnF1 and ZnF2 reproduced the behavior of fragments 1–168 and 46–366, respectively (Fig. 2b, rows 3

and 6 versus Fig. 4c, rows 3 and 4). More impressively, a growth defect was observed at 37 °C when the ZnF2 was modified, again without a cumulative effect in the double mutants (Fig. 4b, rows 4 and 5). First, we observed a global drop in snoRNA amounts with increasing temperature. Then, the remarkable growth defect in the ZnF2 mutant at 37 °C was even more clearly associated with a drastic reduction in the amounts of snoRNAs (Fig. 4c, row 10). These data clearly reinforce the role played by the ZHD of Bcd1p in snoRNP biogenesis. More precisely, the heat sensitivity induced by mutations in ZnF2 strongly suggests that this motif contributes more significantly to the ZHD function than ZnF1. In agreement with this hypothesis, observation of the 3D structure of ZHD-Bcd1p revealed that the ZnF2 motif was involved in the correct positioning of the secondary structures (Fig. 3a).

Second, we wondered if the part of functionality carried by the ZHD in Bcd1p could be based on interactions with protein partners. Thanks to its conservation and solvent exposure, the Tyr15 residue, which is intrinsically able to establish polar and/or hydrophobic contacts, was a target of choice to address this question (Fig. 3b). However, we observed that the Y15A mutation did not significantly impair growth or snoRNAs amounts whatever the conditions tested (Fig. 4b, row 6, and Fig. 4c rows 6 and 12). A single mutation was probably not sufficient to conclude on the protein binding properties of ZHD-Bcd1p, and we thus leave this question open. Since no clear effect was observed upon mutation of residue with protein-interface properties, we next hypothesized that the ZHD interacts with other entities such as nucleic acids or simply maintains a functional entity of folding for the Bcd1p-FL.

The ZHD of Bcd1p is not a DNA/RNA interaction module

Examination of the electrostatic potential of ZHD-Bcd1p derived from our 3D structure revealed a mainly positive charge distribution (Supplementary Fig. S5A) featuring nucleic acid binding properties shared by numerous zinc finger proteins. To check whether the ZHD of Bcd1p contributed to nucleic acid binding, we used electrophoretic mobility shift assays (EMSA) to assess its ability to bind *in vitro* a 20-mer polydIdC oligonucleotide or a box C/D snoRNA (Fig. 5). Recombinant His-tagged full-length and truncated Bcd1p, that is, ZHD-Bcd1p and fragment 46-366 lacking the ZHD (Bcd1p-ΔZHD), were produced in *E. coli* and purified by IMAC. In addition, the ZHD of Hit1p was tested for the sake of comparison. As shown in Fig. 5a, at the highest concentration (20 μM), the Bcd1p-FL significantly retarded migration of the

radiolabeled oligonucleotide dIdC (RNP1). Bcd1p-ΔZHD caused the same band shift as Bcd1p-FL, suggesting that its ZHD is not required for nucleic acid binding. This is in agreement with the fact that neither ZHD-Bcd1p nor ZHD-Hit1p displayed binding properties for the polydIdC oligonucleotide. Interestingly, a 10-fold lower concentration (2 μM) of Bcd1p and Bcd1p-ΔZHD was sufficient to allow complete complex formation with the U14 box C/D snoRNA (RNP2, Fig. 5b).

These data show that Bcd1p exhibits a medium RNA-binding affinity. Furthermore, it appears that the ZHD of Bcd1p, although necessary for cell growth and for maintaining high levels of snoRNAs, is not involved in direct RNA interactions.

Bcd1p interacts nonspecifically with RNAs but binding relies on RNA length

Given the interaction observed *in vitro* between Bcd1p and the U14 snoRNA, we investigated on the specificity of Bcd1p toward this family of RNAs by EMSA. By comparison with U14, we first observed that Bcd1p exhibits a similar affinity for the U3Δ2,3,4 snoRNA, a functional truncated version of U3 previously characterized by our group (Fig. 6a). The U3 snoRNA contains two K-turns that are formed, respectively, by the C'/D motif and by the U3-specific B/C motif. To verify if these K-turn motifs are responsible for the binding of Bcd1p, we used two variants of the U3Δ2,3,4 RNA mutated for the B box (variant U3Δ2,3,4-mutB) or for the D box (variant U3Δ2,3,4-mutD). These mutations are known to abolish the formation of the corresponding K-turns and the recruitment of Snu13p [43]. As shown in the Fig. 6a, the affinity of Bcd1p is similar for the WT and the two U3 RNA variants, suggesting that Bcd1p has no specificity for K-turn-containing RNAs.

Then, we tested its association with various RNAs other than box C/D snoRNAs. For this purpose, we used an approach of competition by EMSA (Fig. 6b). Bcd1p was incubated simultaneously with the radiolabeled U14 snoRNA and with an increasing concentration of unlabeled RNA competitor. The unlabeled U14 snoRNA was used as control competitor. As observed in the Fig. 6b, a concentration of 500 nM of unlabeled U14 is necessary to fully inhibit the association of Bcd1p with the radiolabeled RNA. As other competitors, we used molecules from various RNA families, that is, the SelN mRNA motif that is dedicated to the incorporation of selenocysteine during the translation, yeast tRNAs, the snR36 box H/ACA snoRNA, the U4/U6 snRNA duplex that is a component of the spliceosome, and a fragment of the genomic RNA of the Rous sarcoma virus (RSV). Interestingly, we noticed that the capacity of these molecules to compete with the radiolabeled U14 is proportional to their size. Indeed, the smallest molecules SelN (59 nt) and

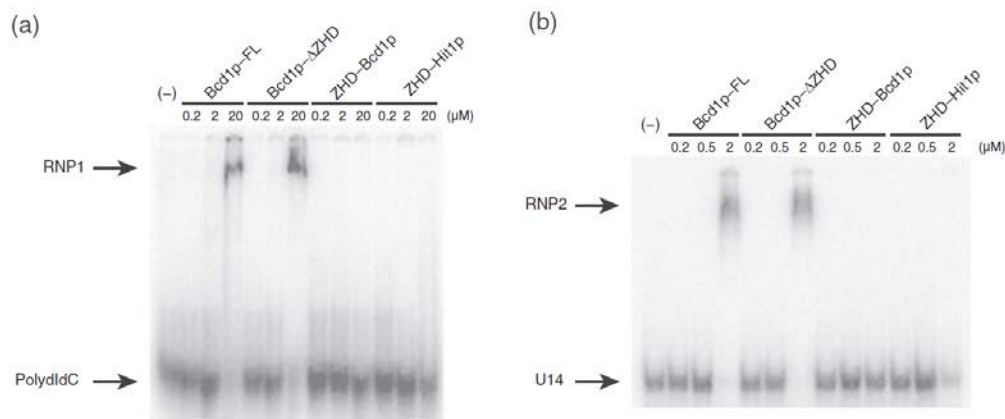


Fig. 5. Bcd1p associates with nucleic acids but has higher affinity for RNA. (a) Bcd1p has very low affinity for a DNA polymer. ^{32} P-labeled 20-mer dldC oligonucleotide was incubated with increasing amounts (0.2; 2; 20 mM) of Bcd1p-FL, Bcd1p- Δ ZHD lacking the ZHD, ZHD-Bcd1p, and ZHD-Hit1p in conditions described in [Materials and Methods](#). The complexes formed were fractionated by EMSA using 8% polyacrylamide native gel. The positions of the Bcd1p:polydldC (RNP1) complex and the free polydldC are indicated on the left side of the autoradiogram. (b) Bcd1p affinity for U14 snoRNA. ^{32} P-labeled U14 snoRNA was incubated with increasing amounts (0.2; 0.5; 2 mM) of the proteins used in panel A. The complexes formed were fractionated like in panel A, except that 6% acryl native gel was used. The positions of the Bcd1p:U14 RNA (RNP2) complex and the free U14 RNA (U14) are indicated on the left side of the autoradiogram.

tRNAs (70 nt) do not compete, the snR36 snoRNA (182 nt), which has an intermediate size and is the closest to U14 (128 nt), competes similarly as U14 (Fig. 6b). Finally, the two largest molecules, U4/U6 snRNAs (248 nt) and RSV (266 nt) show the maximal competitor effect, since a concentration of 125 nM is sufficient to prevent the complex formation with radiolabeled RNA.

Collectively, these data show that Bcd1p has RNA-binding capacity, likely by interacting with the phosphate backbone of RNA. It exhibits no apparent sequence specificity, because interaction is driven by the length of the RNA molecule.

The ZHD of Hit1p is functional in Bcd1p

As hypothesized above, we next wondered if the role of ZHD-Bcd1p lies in its ability to maintain functional folding to the rest of the protein. To test this hypothesis, we investigated if the ZHD of Bcd1p could be swapped with another ZHD. Genetic constructs expressing chimeric proteins of Bcd1p encompassing yeast ZHD of Hit1p and Vps71p were generated to perform complementation assays (Fig. 7a). As control, we fused Bcd1p to the C-terminal extremity of the double zinc-finger motif of Rph1p, a protein that does not belong to the zf-HIT family. The ZHDs of Hit1p and Vps71p exhibited the ability to restore the cell growth at 30 °C, while the ZnF-Rph1p did not (Fig. 7b, rows 3 and 4). The amounts of snoRNA obtained upon the expression of the Hit1p chimera were close to those obtained with Bcd1p-FL, except

snoRNA snR45 (Fig. 7c, rows 2 and 3). For the Vps71p chimera, the amounts were similar to those obtained with fragment 46–366 of Bcd1p (compare Fig. 2c, row 6 and Fig. 7c, row 4). Surprisingly, the Rph1p chimera, despite expressed at equivalent levels compared to the WT protein (Fig. 7d), displayed an important growth defect at 30 °C associated with very low amounts of snoRNAs. Finally, under heat stress (37 °C), only the Hit1p chimera enabled similar growth to the Bcd1p-FL (Fig. 7b, rows 2 and 3).

The full functionality of ZHD-Hit1p in Bcd1p observed under normal and stress conditions leads us to several conclusions. The presence of yeast ZHDs at the N-terminal part of Bcd1p appears to be required for adequate production of snoRNP for efficient cell growth. However, the presence of zinc ions does not contribute to the functionality of the protein, since the Rph1p chimera is not functionally effective. Moreover, it demonstrates that a swap of the N-terminal zinc finger domain could be more destabilizing for the function of the protein than a deletion. Thus, we can assume that the ZHD maintains functional folding to the entire Bcd1p.

The result obtained under heat stress conditions, which implied efficient production of snoRNP by active assembly factors, reinforces the hypothesis of a crucial role for Bcd1p in this adaptive pathway. This could explain why Vps71p, which has not been shown to be involved in snoRNP biogenesis, does not fully retrieve complementation capacity at 37 °C through its ZHD when it is fused to Bcd1p. These data suggest that only Bcd1p and Hit1p share some

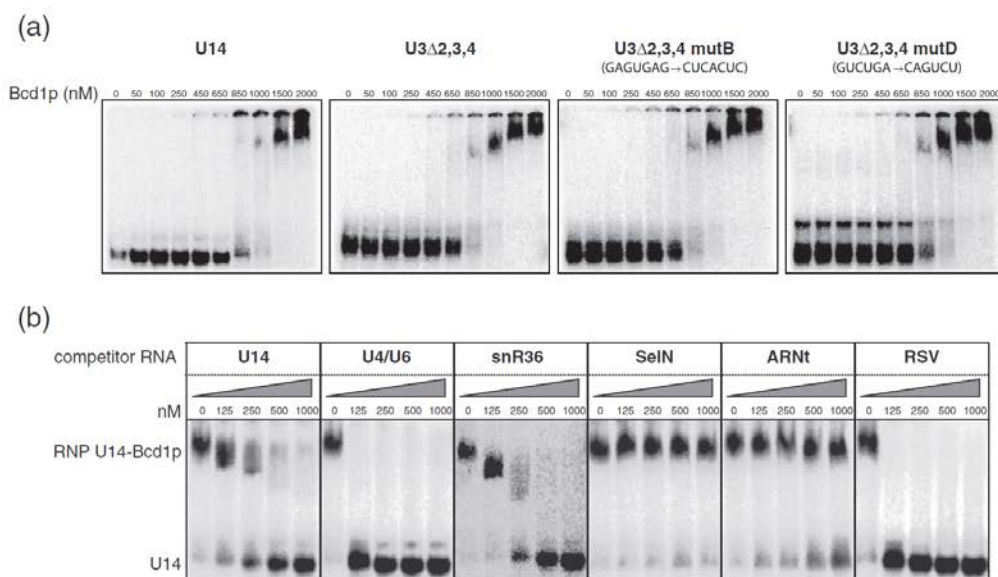


Fig. 6. *In vitro* Bcd1p interacts nonspecifically with RNAs, and affinity relies on the length of the RNA molecule. (a) EMSA between recombinant Bcd1p and radiolabeled U14, U3Δ2,3,4, U3Δ2,3,4 mutB et U3Δ2,3,4 mutD snoRNAs. RNAs were incubated with an increasing range of Bcd1p (from 50 nM to 2 μM). Mutations of B and D boxes totally disrupt the respective B/C and C'/D motifs as previously shown by Ref. [43]. (b) Measurement by EMSA of the affinity of Bcd1p for a set of RNAs of variable length. The affinity of Bcd1p to each RNA was assessed by competition assay between the radiolabeled U14 snoRNA and unlabeled RNA competitors. Recombinant Bcd1p was incubated at a concentration of 1 μM, with 5 fmoles of radiolabeled U14 snoRNA and an increasing concentration of unlabeled RNA (from 125 nM to 1 μM). The unlabeled U14 snoRNA was used as control competitor. The competitors are of different length: SelN mRNA (59 nt), tRNA (70 nt), U14 box C/D snoRNA (128 nt), snR36 box H/ACA snoRNA (182 nt), U4/U6 snRNAs duplex (248 nt), and RSV viral RNA (266 nt corresponding to the fragment 691–956 [55]).

common features of their respective ZHD that appear to be functionally interchangeable.

NMR solution structure of the ZHD of Hit1p

Given the functional redundancy of Bcd1p and Hit1p ZHDs, we decided to solve the solution structure of ZHD–Hit1p (fragment 1–46) to identify shared structural determinants with ZHD–Bcd1p. Until now, Hit1p has been classified as a protein with a single ZnF motif. However, detailed observation of the sequence alignment enabled us to identify not only a potential CCCC zinc finger (Cys8, Cys11, Cys28, and Cys32) but also a hypothetical second zinc coordination motif with a CCHH pattern (Cys20, Cys23, His39, and His41) (Fig. 1). Confirming the presence of these two zinc ions in ZHD–Hit1p will be important because it would be the only member of the zf–HIT superfamily to exhibit a singular narrow HxH motif at the C terminus. First, native MS analysis of ZHD–Hit1p revealed the ability of the protein to bind predominantly two zinc ions (Supplementary Fig. S2B). Second, a ¹⁵N-labeled sample of ZHD–Hit1p containing high concentrations of reducing

agents (DTT + TCEP) produced a homogeneous and well-dispersed ¹H–¹⁵N HSQC NMR spectrum, with the expected number of resonances (considering that ZHD–Hit1p is monomeric) (Supplementary Fig. S3B). As before, a large excess of EDTA was responsible for the deterioration of the ¹H–¹⁵N HSQC spectrum. Taken together, these data showed that ZHD–Hit1p trapped two zinc ions with one CCCC and, certainly, one CCHH motif.

Next, we obtained the almost complete NMR assignment of ZHD–Hit1p, and a long range ¹H–¹⁵N HSQC spectrum revealed a neutral tautomeric form with protonated nitrogen N^δ1 for His39 and His41. The neutral form determined for the two imidazole rings was in strong agreement with the ability of this domain to bind two zinc ions. Consequently, as for the ZHD–Bcd1p, the NMR solution structure of ZHD–Hit1p was determined using NOE-derived data supplemented with zinc cluster restraints.

The solution structure of the 20 most representative conformers of ZHD–Hit1p obtained after water refinement with RECOORDS scripts are presented in Fig. 8a. The statistics used for the calculation are listed in Table 1. After exclusion of the disordered

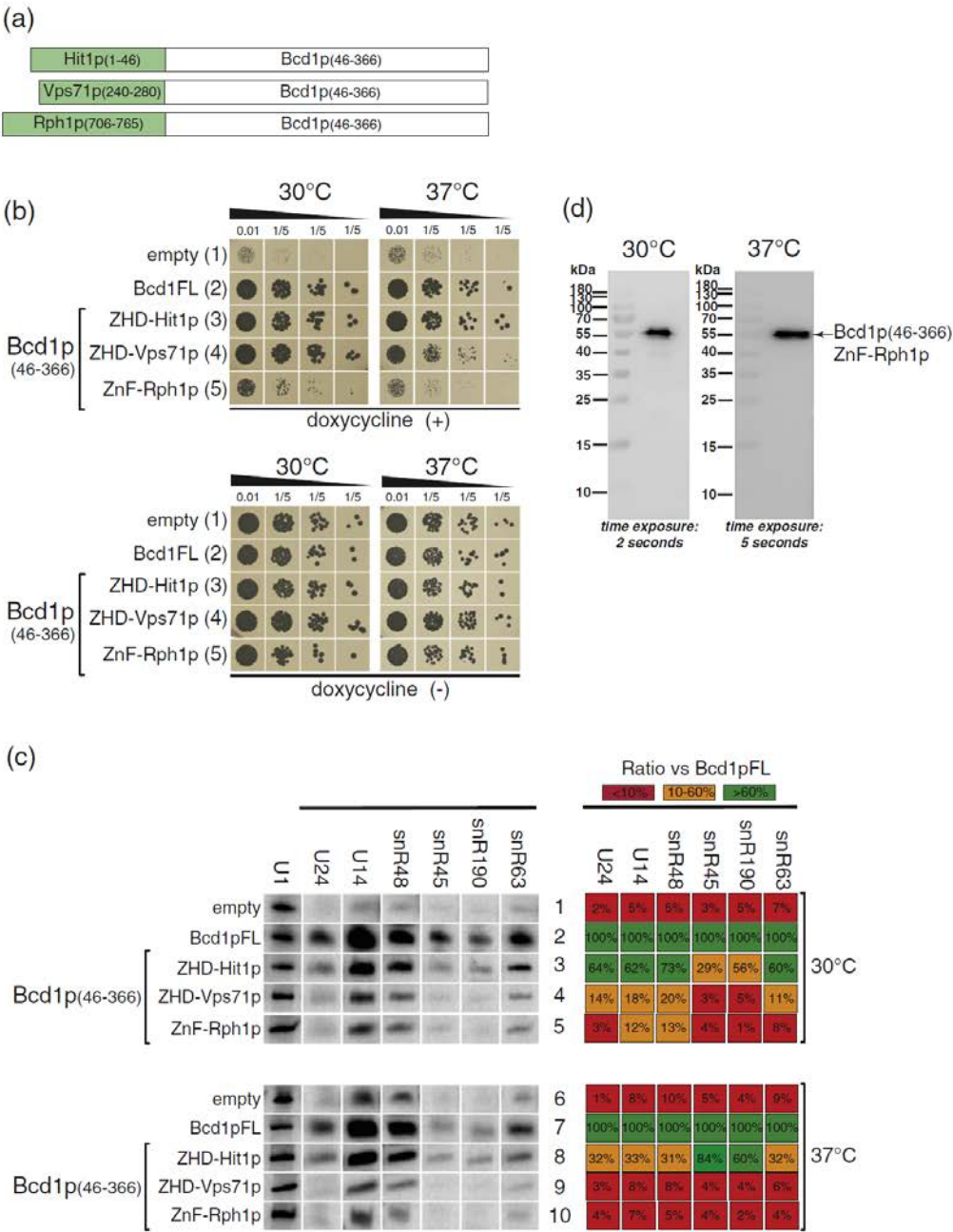


Fig. 7. Functional analysis of chimeric Bcd1p containing different ZnF motifs. (a) Representation of the chimeric proteins for which the endogenous ZHD of Bcd1p was replaced by different yeast ZnF domains (green rectangles): ZHD-Vps71p (residues 240–280) and ZnF-Rph1p (residues 706–765). (b and c) Complementation assays and Northern blot analysis performed as in Fig. 2. (d) Western blot analysis of the amounts of chimeric protein containing the Rph1p ZHD. Detection of a HA-tagged form was performed in conditions described in Fig. 2b.

regions 1–5 and 42–46, we obtained well-converged final ensembles of structures with RMSD values of 0.28 ± 0.06 Å and 1.30 ± 0.14 Å for backbone and heavy atoms, respectively.

In detail, this domain is composed successively of a structured loop (6–16), a two-stranded antiparallel β -sheet (17–20 and 24–27), and a short α -helix (30–33) followed by another structured loop (34–41), which is generated by the presence of the singular HxH motif (Fig. 8a). The first zinc ion is located between the N-terminal structured loop and the α -helix, and its binding site is formed by Cys8, Cys11, Cys28, and Cys32 residues (Figs. 1 and 8a). The second zinc ion is located between the loop connecting the two β -strands and the last structured loop, and its binding site is formed by Cys20, Cys23, His39, and His41 residues (Fig. 8a). The β -sheet packs against the α -helix and the HxH motif to form the second zinc finger. The average distance between the two zinc ions is 12.6 ± 0.1 Å. Like Bcd1p, a treble-clef fold is maintained by hydrophobic contacts involving Ile10 and Val25 residues (Fig. 8b).

Comparison of the Bcd1p and Hit1p ZHD structures

The superimposition of the ZHD–Hit1p structure on that of ZHD–Bcd1p revealed high similarity with the α -helix, with a backbone C α -RMSD of 0.7 Å between residues 5–30 of Bcd1p and 8–33 of Hit1p (25 residues) (Fig. 8c). The main difference was the singular HxH motif present in Hit1p. This motif prevents the formation of the long helix as in Bcd1p. The fact that these two close histidine residues coordinate a zinc ion creates a sharp rigid turn in the ZHD–Hit1p structure composed of residues Asp35, Ala36, Ala37, and Lys38. However, this difference does not appear to influence the overall folding of these two domains as their 3D structures remain similar and involve similar zinc binding. As evidence, the Zn–Zn distances were very close in the two structures. Supplementary Figure S5B shows a positive electrostatic potential for ZHD–Hit1p with a more pronounced and uniform trend in the N-terminal and central parts than in Bcd1p. However, as in the

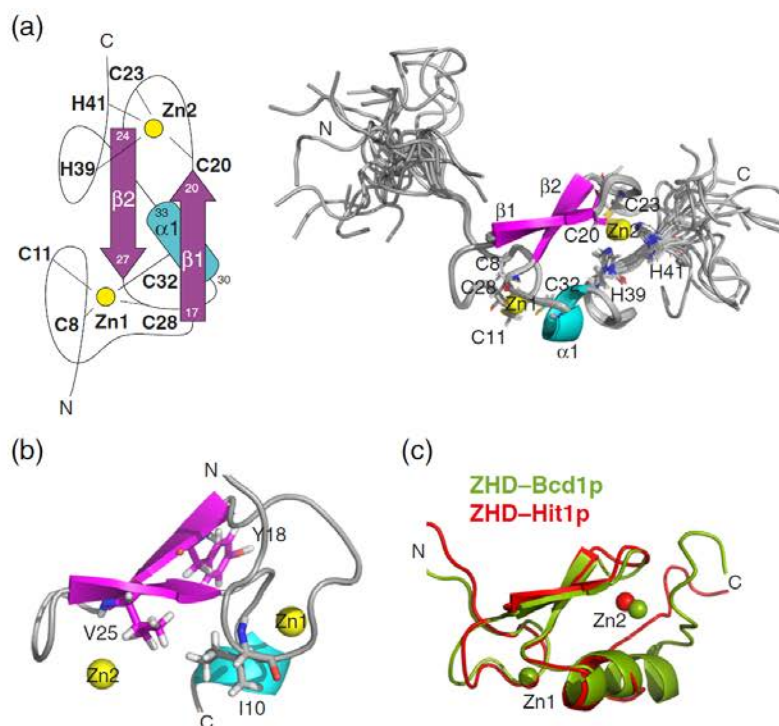


Fig. 8. Solution structures of the ZHD of Hit1p. (a) Topology diagram of ZHD–Hit1p and cartoon representation of the 20 NMR structures with the lowest energies. Zinc ions are in yellow and secondary structures of α -helices in cyan and of β -strands in magenta. Cysteine and histidine residues involved in the zinc coordination are labeled and their side chains are represented by lines. (b) Ribbon representation of the first NMR structure of ZHD–Bcd1p. The side chains of residues Ile10, Tyr18, and Val25 are labeled and represented in sticks. (c) Superimposition of the ZHD structures of Bcd1p (1–45) (green) and Hit1p (1–46) (red).

case of ZHD-Bcd1p, we showed that ZHD-Hit1p was not able to bind nucleic acids (Fig. 5).

Hence, the similar conformation found for ZHD-Hit1p and ZHD-Bcd1p is in good agreement with the results of the domain swapping experiments and confirms the functionality of the chimeric protein ZHD-Hit1p-Bcd1p.

Discussion

Refinement of the organization of the zf-HIT family

As shown in Fig. 3c, the NMR structure of ZHD-Bcd1p is very similar to the two other known structures of the zf-HIT family of the first subgroup, that is, the human proteins ZNHIT2/FON (PDB entry 1X4S) and ZNHIT3/TRIP3 (PDB entry 2YQQ). The protein FON exhibits a 3_{10} -helix, containing the last cysteine of the second zinc-coordinating cluster at the C-terminal position, and a shorter α -helix compared to the one present in Bcd1p. Bcd1p and Hit1p also lack the additional β -sheet present at the N-terminal part of the FON protein. The structure of Bcd1p is more similar to protein FON (C α -RMSD ~ 0.8 Å) than to protein TRIP3 (C α -RMSD ~ 1.1 Å). Similarly, the ZHD-Hit1p 3D structure is closer to that of FON (C α -RMSD ~ 0.7 Å) than to that of TRIP3 (C α -RMSD ~ 1.1 Å). Overall, our structural data confirm similar folding in the members of the zf-HIT family.

According to the sequence analysis depicted in Fig. 1, the ZHDs of Bcd1p and Hit1p were predicted to coordinate two and one zinc ions, respectively. He and collaborators thus proposed that Hit1p belongs to the second subgroup whose members bind a single zinc atom (Fig. 1) [4]. Our MS and NMR analyses revealed that ZHD-Hit1p was able to coordinate two zinc ions with the pattern $C_1xxC_2-C_5xxx C_6-C_3xxC_4-H_7xH_8$. This points to a restrained HxH motif not found in any other members of the zf-HIT family. Finally, we demonstrated experimentally that Hit1p belongs to the first subgroup with Bcd1p and Vps71p.

An exhaustive search of the databases identified the solution structure of a member of the zf-HIT family, ZNHIT5 [or DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 59]. As suggested by the sequence alignment in Fig. 1, this structure confirms the presence of a single ZnF motif (PDB code: 2YQP). Even in the presence of only one zinc ion, the 3D structure of ZNHIT5 is typical of a ZHD, that is, a treble-clef fold very close to ZHD-Bcd1p (C α -RMSD ~ 0.9 Å). However, the missing zinc ion corresponds to the one that, in ZHD-Bcd1, locks the β -sheet against the α -helix (Fig. 3), strongly suggesting that the comparable organization of secondary structures in ZNHIT5 does not depend only on metal

coordination. Nonetheless, the close inspection of the 3D structure of ZHD-ZNHIT5 did not reveal any strong stabilizing contacts except one salt bridge between Glu123 and His135. Interestingly, we showed that cysteine to serine substitutions in the ZnF2 motif of ZHD-Bcd1p promoted heat sensitivity in yeast growth correlated with a marked decrease in snoRNA amounts (Figs. 3 and 4). We reasonably link this feature with the destabilization of the tertiary structures. Although we do not know the exact function of ZNHIT5, we can assume that its ZHD contributes to the stability of the protein in the face of heat stress. More importantly, we can hypothesize that coordination of a second zinc ion conveys a functional advantage, in the form of thermal stability, to other members of the zf-HIT family. It is easy to see that whatever the external conditions, a snoRNP assembly factor such as Bcd1p needs to be relatively stable to fulfill its crucial function.

Due to its sequence homology with ZNHIT5, it is very likely that ZNHIT4 has only one ZnF motif too (Fig. 1). In this case, in human, ZNHIT4 and 5 would be the only members of this family with a single zinc finger.

Evolution of Bcd1p and Hit1p zinc fingers

Our past and present analyses in yeast revealed that the two ZHDs do not contribute to the function of Bcd1p and Hit1p in the same way. Indeed, under standard growth conditions, this domain is necessary for the functioning of Bcd1p (Fig. 2) but is not required for the functioning of Hit1p [14]. The sequence comparison between these two proteins and their human counterparts illustrates this difference. The ZHD of Bcd1p showed 90% sequence similarity with that of the human protein BCD1, while the ZHD of Hit1p showed only 30% sequence similarity with that of TRIP3 (Fig. 1). The presence of the same motif in these two proteins involved together in snoRNP biogenesis pathway raises the question of functional redundancy. One possibility is that such redundancy involves lower selection pressure on one of the two ZHD molecules and, hence, divergence for the ZHD sequences of TRIP3/Hit1p.

Moreover, the ZHD sequences of Bcd1p and Hit1p showed 36% similarity, whereas their similarity to the ZHD of Vps71p—the third member of this family in yeast—was only 24% and 10%, respectively. Nonetheless, the data resulting from the functional assays performed with the chimeric proteins showed that among the zf-HIT family, only ZHD-Hit1p can efficiently substitute for the ZHD-Bcd1p in terms of growth and snoRNA amounts (Fig. 7). All these observations, especially the functionality of Hit1p lacking its ZHD at 30 °C [14] and 37 °C (data not shown), corroborate the hypothesis under which TRIP3/Hit1p, although still able to ensure the

functionality of Bcd1p, has started to diverge from other ZHDs.

Hypothesis of a functional link between the members of zf-HIT family and the ATPases TIP49(RuvBL1)/Rvb1-TIP48(RuvBL2)/Rvb2 in human and yeast

In the literature, among the three yeast and the six human proteins of the zf-HIT family, we found a pair of common functional partners, TIP49(RuvBL1)/Rvb1 and TIP48(RuvBL2)/Rvb2 ATPases [6]. These proteins are expressed in different structural forms (monomers, hexamers, and dodecamers) specific to the different multicomponent complexes they compose [44]. This structural diversity confers a specific biological activity to each complex and may reflect the acquisition of novel functions during evolution with the assistance of associated factors such as nucleotides, binding partners, or post-translational modifications. The examples we can cite in the context of this work are Vps71p and ZNHIT4 for the yeast chromatin remodeling complexes SWR-C and INO80-C, respectively, and Bcd1p/Hit1p for the yeast box C/D pre-snoRNPs. One possibility is that the proteins BCD1/Bcd1 and/or TRIP3/Hit1 are able, on one hand, to bind/regulate TIP49/Rvb1 and TIP48/Rvb2 ATPases through their ZHD, and on the other hand, to recruit the platform protein NUFIP1/Rsa1p via the C terminus of TRIP3/Hit1p [14]. Their specific recruitment on the pre-snoRNP to assemble might be enabled by the interaction between NUFIP1/Rsa1p and the core protein SNU13/Snu13p [13,45], which specifically recognizes the snoRNAs through their box C/D motif [46,47]. In this context, the RNA-binding properties of Bcd1p may help to accommodate the complex on the nascent pre-snoRNA once this one has reached a length compatible for binding (Fig. 6).

A functional link between these ATPases and BCD1/Bcd1p can be hypothesized. In yeast, a two-hybrid assay identified an association between Bcd1p and Rvb2, while a direct ATP-dependent interaction has been shown between BCD1 and the TIP49/TIP48 complex [40,41]. One possibility will be to test whether these zinc finger proteins help regulate the biological activity of the TIP49/TIP48 complex and its assembly in different structural forms. The possibility of a direct interaction between ZHDs and the domain II of ATPases could be tested. Indeed, an analysis of dodecameric TIP49/Rvb1 and TIP48/Rvb2 structures indicated that the most likely potential interaction domain is domain II of TIP48/Rvb2. A structural study of domain II of TIP48/Rvb2 interacting with Bcd1p, with or without ATP, would be of interest as knowledge of the structure could explain how the Rvb1/2 proteins are able to re-structure pre-snoRNP and modulate protein-protein interactions within it.

The Bcd1p-FL is required for complete functionality

Throughout our experimental procedure, we mainly focused on the N-terminal part of Bcd1p, that is, its ZHD and fragment 1–168, to demonstrate the functional interest of this region. However, we also demonstrated the importance of having a full-length protein to preserve the same accumulation of snoRNAs as that observed for Bcd1p WT. Since the Bcd1p-FL could be replaced by a Hit1p chimera, we assumed that the ZHD stabilized the functional folding of the entire protein. Interestingly, the secondary structure predictions for Bcd1p-FL emphasize the presence of several β -strands and α -helices for the fragment Δ ZHD of Bcd1p, but the overall 3D organization does not match any known or conserved domain, suggesting a new RNA-binding domain (Supplementary Fig. S1). Thus, the ZHD resembles a satellite acting as a fold stabilizer. Nonetheless, we experimentally proved that this unknown fold is able to direct RNA binding. The medium affinity of this binding is in agreement with the role of Bcd1p in the large family of box C/D snoRNAs. In addition, protein partners have already been described in databanks as being associated with Bcd1p using Affinity Capture-RNA, tandem affinity purification, or the two-hybrid assay [48]. Some of these proteins have strong functional links with nucleic acids. We can cite GIS2 and SHE2 gene products, which both bind mRNA; proteins Rtt106 and Ahr2, which are both linked with histone acetylation; MSA2 or MOT3 gene products, which are putative transcriptional factors; and the SFH1 subunit of the chromatin structure-remodeling complex. It would be of great interest to access the 3D structure of Bcd1p full length. This would allow: (i) a better understanding of the role played by its ZHD and (ii) the identification of new surfaces possibly involved in RNA or protein binding.

To go further, Bcd1p is also annotated as a potential partner for proteins of the chaperoning system (Ssa1 to Ssa3, Ssb1, Ssc3, T-complex protein 1 subunit zeta) [48]. We showed that under heat stress, the ZHD of the protein significantly contributes to cell growth. We wonder if this phenotype relies on direct contacts between this domain and proteins of the chaperone family.

Finally, the organization of the mammalian BCD1 diverges significantly from the yeast Bcd1p, whereas similar functions have been described in the two [13,40,41]. It is certain that they share a common ZHD (Fig. 1) but, as often, many sequence insertions are observed in the yeast protein (Supplementary Fig. S1). However, the region downstream from the ZHD is quite nicely conserved, suggesting the ability of the human protein to directly bind snoRNAs through a common 3D fold in the C-terminal domain.

More remarkably, the mammalian Bcd1p counterparts exhibit a supplemental N-terminal region of around 200 residues located upstream from the ZHD and predicted to contain several α -helices. We consequently wonder if this region corresponds to a mammalian gain of function, a hypothesis that remains to be investigated.

Materials and Methods

Plasmid constructs and protein purification

For protein production in *E. coli*, PCR-amplified fragments were cloned between the *NdeI* and *BamHI* restriction sites of the expression vector pNEA-3CH, leading to the production of fusion proteins with an N-terminal His₆-tag and a PreScission cleavage site (details on the pNEA-3CH on request).

For NMR studies on ZHDs, *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2 cells were transformed with pNEA-3CH recombinant plasmids, and uniformly labeled recombinant proteins were produced by growing the cells under agitation in M9 minimal medium containing 1 g/L ¹⁵N ammonium chloride (U-¹⁵N 98%, Aldrich) and 2 g/L ¹³C-glucose (U-¹³C 99%, Isotec), 100 μ g/mL ampicillin, 25 μ g/mL chloramphenicol, and 100 μ M zinc sulfate at 37 °C to an absorbance of 0.6–0.8 at 600 nm (*A*₆₀₀), and expression was then induced with 1 mM IPTG for 16 h at 20 °C. The fused proteins were purified using a 5-mL HiTrap TALON column (GE Healthcare) and digested overnight in solution with PreScission Protease at 4 °C to remove the N-terminal His₆-tag. This step was followed by preparative gel filtration (HiLoad 16/60 Superdex 75, GE Healthcare) on an AKTA prime system in 10 mM phosphate buffer (pH 6.4), 150 mM NaCl, and TCEP 0.5 mM. The ZnFs of Bcd1p and Hit1p were concentrated to ~0.8 mM and ~2.2 mM, respectively. For the NMR measurement, 3 mM deuterated DTT and 10% D₂O (vol/vol) were added to the protein samples.

For the production of the proteins used for gel shift assays, *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2 cells were transformed and grown under agitation in LB medium containing 100 μ g/mL ampicillin and 10 μ g/mL chloramphenicol at 37 °C to *A*₆₀₀ 0.6–0.8, and expression was then induced with 0.3 mM IPTG for 16 h at 20 °C. The fusion proteins were purified using TALON resin (GE Healthcare) and digested overnight in solution with PreScission Protease at 4 °C to remove the N-terminal His₆-tag. This step was followed by preparative size-exclusion chromatography (HiLoad 16/60 Superdex 75, GE Healthcare) on an AKTA prime plus system in 20 mM Hepes-KOH buffer (pH 7.9), 150 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂.

For expression in *S. cerevisiae*, Bcd1p and Bcd1p domains (1–45, 1–168, 46–168, and 46–366) were amplified by PCR from *S. cerevisiae* genomic DNA and introduced between the *BamHI* and *SalI* restriction sites of the p413TEF (CEN/ARS, *HIS3*) expression vector. Constructs expressing chimeric proteins Bcd1p_{46–366}ZHD-Hit1p, Bcd1p_{46–366}ZHD-Vps71p, and Bcd1p_{46–366}ZHD-Rph1p were obtained by cloning the ZHD of protein Hit1p, Vps71p, and Rph1p in the recombinant

p413TEF::Bcd1p_{46–366}. For expression of fragment with an HA tag at their N-terminal ends, *BamHI*–*SalI* fragments from the recombinant p413TEF vectors were subcloned into a p413TEF vector containing an HA tag introduced upstream of the *BamHI* site. The expression level of each HA-tagged fragments was estimated by western blot analysis in previously described conditions using rabbit commercial anti-HA antibodies [14]. Anti-AspRS antibodies were used to detect Asp aminoacyl tRNA synthetase as internal control. *S. cerevisiae* strain *tetO₇::BCD1* (R1158) [18] was used for the complementation assays.

NMR spectroscopy and resonance assignments

The NMR experiments on ¹³C/¹⁵N-labeled ZHD–Bcd1p and ZHD–Hit1p samples were performed at 298 K and 313 K on a Bruker Avance III 600MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed with the program TopSpin 3.0 (Bruker) and analyzed with the program Sparky [49]. An almost complete resonance assignment was achieved using combinations of 2D ¹H–¹H NOESY, ¹H–¹⁵N and ¹H–¹³C HSQC spectra, and of 3D HNHA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCO, H(C)CH–TOCSY, ¹H–¹⁵N and ¹H–¹³C NOESY-HSQC spectra. All NOESY spectra were recorded with a mixing time of 200 ms. The protonation state of the imidazole rings of histidine residues (and consequently, of which the two nitrogen atoms coordinates zinc ion) was determined using long range ¹H–¹⁵N HSQC experiments [42].

Calculation of zinc finger structure

The automated procedure of CYANA 3.0 [50] was used to determine the NMR solution structure of each ZHD. Distances between protons were derived from the 2D and 3D NOESY experiments mentioned above. To ensure approximate tetrahedral zinc coordination, we added distance constraints for Zn–C _{β} (3.4–3.6 Å), Zn–S _{γ} (2.2–2.4 Å), Zn–N _{ϵ 2} (1.9–2.1 Å), S _{γ} –S _{γ} (3.7–3.95 Å), and S _{γ} –N _{ϵ 2} (3.7–3.95 Å) [51]. The final set of restraints resulting from the last CYANA iteration was carefully checked and used for water refinement with RECOORD scripts [52]. Water refinement was also performed in the presence of distance and dihedral constraints around the zinc-coordinating residues. Among the 250 structures calculated, the 20 structures with the lowest overall energy were selected as the most representative. Secondary structures were determined with dss (defines secondary structure), and all figures involving 3D structures were drawn with the program PyMOL [53].

EMSA and competition assays

RNA transcripts were synthesized by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase using a PCR fragment carrying the RNA coding sequence in previously described conditions [45]. The 20-mer dIdC oligodeoxynucleotide was purchased from Sigma. The oligodeoxynucleotide and the transcribed U14 RNA were 5' end labeled with T4 polynucleotide kinase in the presence of [γ -³²P]ATP and purified with a mini Quick Spin RNA

column (Roche) or by gel electrophoresis. For EMSA, WT or variant Bcd1p and ZHD-Hit1p at different concentrations indicated in figure legends were incubated for 20 min at 4 °C with 5 fmoles of ³²P-radiolabeled U14 RNA or polydIdC in buffer D (20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 150 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂). The nucleic acid-protein complexes formed were resolved by native gel electrophoresis on 8% and 6% acrylamide gels without EDTA for 20-mer dIdC and U14 RNA, respectively. Bands containing labeled nucleic acids were visualized with a Phosphorimager (Typhoon 9410, GE healthcare). For the competition assays, the protein and the radiolabeled RNA were mixed at the same time with the different concentrations of unlabeled RNA competitors as indicated in figure legends.

Yeast complementation tests

To test whether fragments of Bcd1p can complement depletion of the endogenous Bcd1p protein, we transformed *S. cerevisiae* strain *tetO₇::BCD1* (R1158) with recombinant p413 plasmids encoding various WT and mutated fragments of Bcd1p. After transformation, recombinant clones were collected from His⁺ plates and serial dilutions were prepared in sterile water before spotting on selective His⁺ plates in the absence or presence of 50 µg/mL doxycycline. Cell growth was assessed after 72 h at 30 °C and 37 °C. Clones of the cells transformed with the empty vector p413TEF were used as negative control.

Measurement of snoRNAs levels in yeast by Northern blot

Total RNAs were extracted from exponentially growing yeast cultures at 30 °C. Northern blot analyses were performed in standard conditions using 10 µg of total RNAs and specific ³²P-radiolabeled antisense probes: OG-U1 (5'-GACCAAGGAGTTTGCATCAATGA-3'), OG-snr63 (5'-AAGGTTATGTTGGCCACTCA-3'), OG-snr190 (5'-CGAGGAAAGAAGAGACACCATTATC-3'), OG-snr45 (5'-CCTCAGATCGCTCCGAGA-3'), U14 (5'-TCACTCAGACATCCTAG-3'), OG-snr48 (5'-GAATGGAGAGTACTTAACTTCACATCC-3'), OG-snr52 (5'-TTCAGAAGGAAGGCAACATAAG-3'), and OG-U24 (5'-GATCTTGTTGATAATTGGTA-3'). Bands containing snoRNAs and U1 snRNA were visualized with a Phosphorimager (Typhoon 9410, GE healthcare). The radioactivity present in each snoRNA and U1 snRNA band was quantified using the ImageQuant software version 5.2 (Molecular Dynamics).

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.028>.

Accession numbers

Chemical shifts and coordinates of ZHD-Bcd1p and ZHD-Hit1p have been deposited in the Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu/>) and in the RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) under accession numbers 26691/2N94 and 25881/2N95, respectively.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Lorraine (UL), the Agence Nationale de la Recherche [ANR-11-BSV8-01503], the PRST IMTS of Plan Etat Région Lorraine, and the Région Alsace for the funding of mass spectrometer. We thank the SCBIM platform of FR3209 CNRS BMCT and UL for NMR facilities. We thank Benjamin Bardiaux for technical support with the ZnF-HIT water-refinement procedure, Alexandre Kriznik for Circular Dichroism technical assistance, and Stéphane Erb for the acquisition of mass spectra.

Received 28 December 2015;

Received in revised form 20 April 2016;

Accepted 23 April 2016

Available online 30 April 2016

Keywords:

zinc finger protein;
Bcd1p;
Hit1p;
box C/D snoRNA;
NMR structure

†B.B. and D.T. contributed equally to this work.

Present address: B. Rothé, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL) SV ISREC, Station 19, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

Present address: J.-M. Saliou, Lille Center for Infection and Immunity, Institut Pasteur de Lille, UMR 8204 CNRS-Université Lille Nord de France, INSERM U1019, 1 rue du Professeur Calmette, 59800 Lille, France.

Abbreviations used:

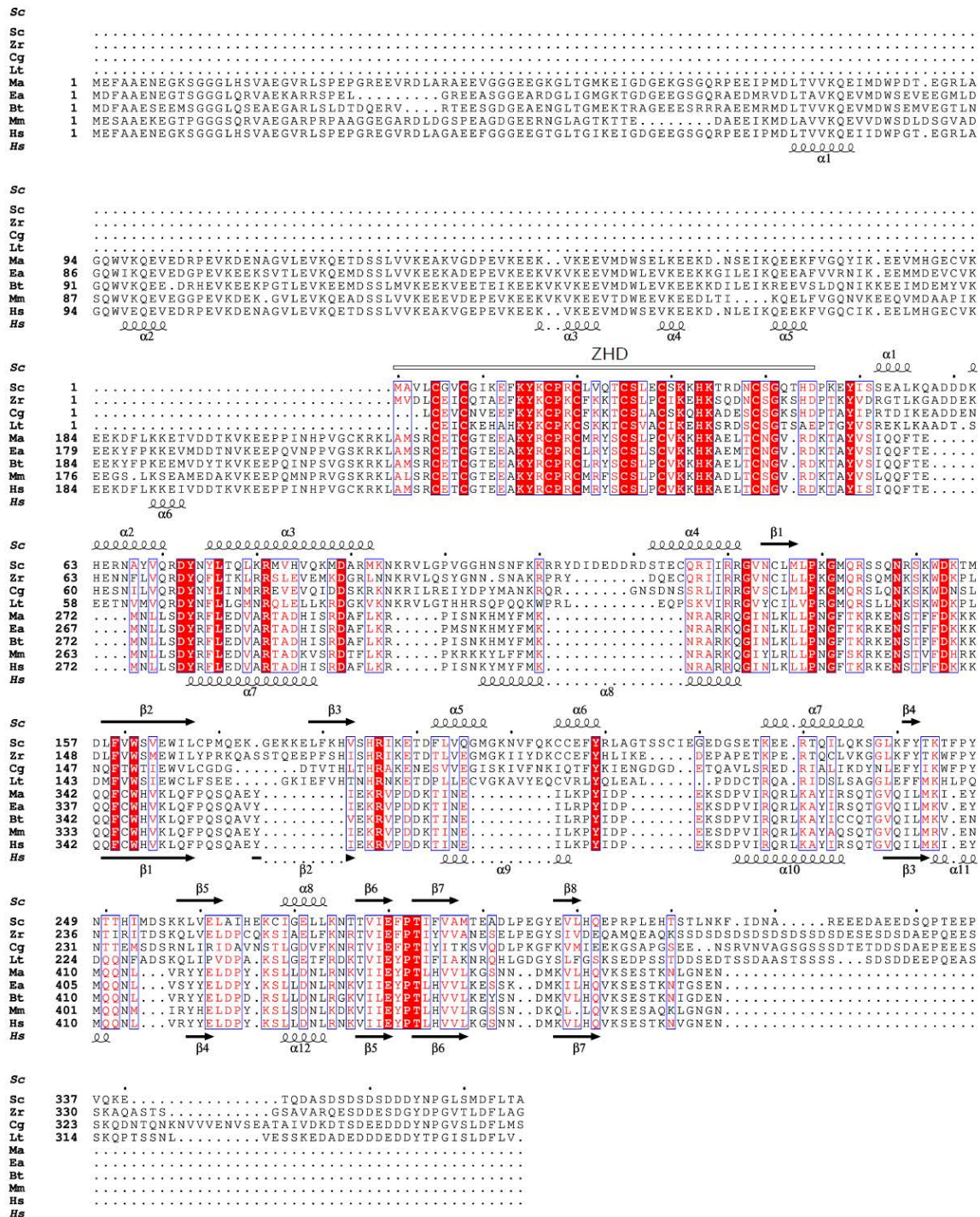
ZnF, zinc-finger; ZHD, zf-HIT domain; AP-MS, affinity purification and mass spectrometry; TRIP3, thyroid hormone receptor interacting protein 3; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; ZnF1, first zinc finger; ZnF2, second zinc finger; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; NOESY, nuclear Overhauser enhancement spectroscopy; Bcd1p-FL, full-length Bcd1p; WT, wild-type; RSV, Rous sarcoma virus; SelN, Selenoprotein N.

References

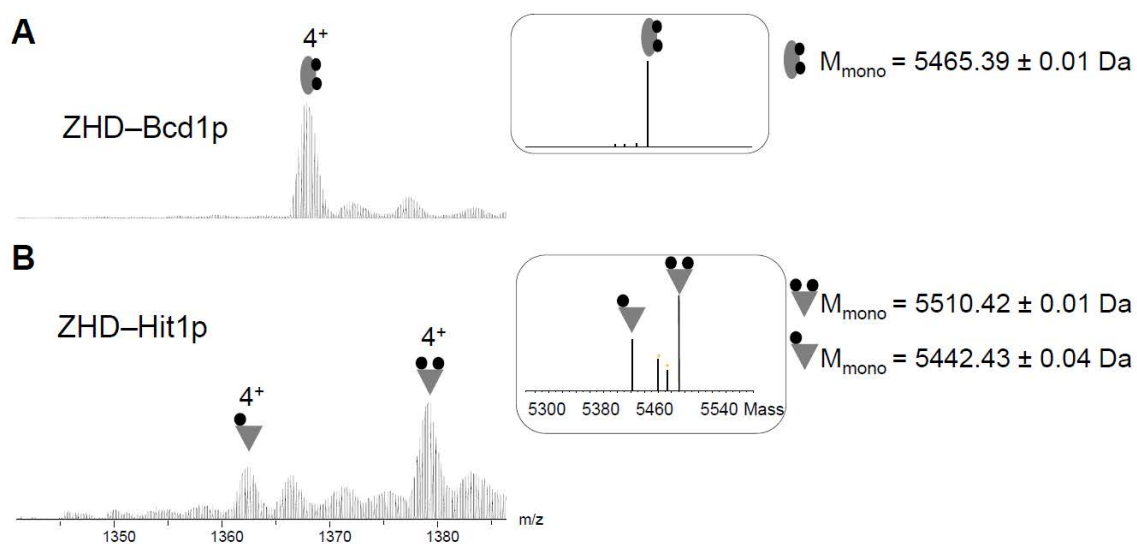
- [1] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, Counting the zinc-proteins encoded in the human genome, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 196–201.
- [2] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, Zinc through the three domains of life, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 3173–3178.
- [3] T.J. Ettema, M.A. Huynen, W.M. de Vos, J. van der Oost, TRASH: a novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 170–173.

- [4] F. He, T. Umehara, K. Tsuda, M. Inoue, T. Kigawa, T. Matsuda, et al., Solution structure of the zinc finger HIT domain in protein FON, *Protein Sci.* 16 (2007) 1577–1587.
- [5] K. Kawakami, B.K. Shafer, D.J. Garfinkel, J.N. Strathern, Y. Nakamura, Ty element-induced temperature-sensitive mutations of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 131 (1992) 821–832.
- [6] C. Verheggen, B. Pradet-Balade, E. Bertrand, SnoRNPs, ZNHIT proteins and the R2TP pathway, *Oncotarget*. (2015).
- [7] Z. Yang, Y. Cao, X. Zhu, Y. Huang, Y. Ding, X. Liu, Znhit1 causes cell cycle arrest and down-regulates CDK6 expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386 (2009) 146–152.
- [8] A.J. Morrison, X. Shen, Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 373–384.
- [9] C. Jeronimo, D. Forget, A. Bouchard, Q. Li, G. Chua, C. Poitras, et al., Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme, *Mol. Cell.* 27 (2007) 262–274.
- [10] M. Taipale, G. Tucker, J. Peng, I. Krykbaeva, Z.Y. Lin, B. Larsen, et al., A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways, *Cell*. 158 (2014) 434–448.
- [11] H. Iwahashi, K. Yamagata, I. Yoshiuchi, J. Terasaki, Q. Yang, K. Fukui, et al., Thyroid hormone receptor interacting protein 3 (trip3) is a novel coactivator of hepatocyte nuclear factor-4alpha, *Diabetes*. 51 (2002) 910–914.
- [12] K. Yamagata, H. Furuta, N. Oda, P.J. Kaisaki, S. Menzel, N.J. Cox, et al., Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1), *Nature*. 384 (1996) 458–460.
- [13] J. Bizarro, C. Charron, S. Boulon, B. Westman, B. Pradet-Balade, F. Vandermoere, et al., Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control, *J. Cell Biol.* 207 (2014) 463–480.
- [14] B. Rothe, J.M. Saliou, M. Quinternet, R. Back, D. Tiotiu, C. Jacquemin, et al., Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction, *Nucleic Acids Res.* (2014).
- [15] L. Chen, Y. Cai, J. Jin, L. Florens, S.K. Swanson, M.P. Washburn, et al., Subunit organization of the human INO80 chromatin remodeling complex: an evolutionarily conserved core complex catalyzes ATP-dependent nucleosome remodeling, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 11,283–11,289.
- [16] J. Jin, Y. Cai, T. Yao, A.J. Gottschalk, L. Florens, S.K. Swanson, et al., A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41,207–41,212.
- [17] A. Tosi, C. Haas, F. Herzog, A. Gilmozzi, O. Berninghausen, C. Ungewickell, et al., Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex, *Cell*. 154 (2013) 1207–1219.
- [18] W.T. Peng, M.D. Robinson, S. Mnaimneh, N.J. Krogan, G. Cagney, Q. Morris, et al., A panoramic view of yeast noncoding RNA processing, *Cell*. 113 (2003) 919–933.
- [19] S. Jha, A. Dutta, RVB1/RVB2: running rings around molecular biology, *Mol. Cell.* 34 (2009) 521–533.
- [20] T. Ikura, V.V. Ogryzko, M. Grigoriev, R. Groisman, J. Wang, M. Horikoshi, et al., Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis, *Cell*. 102 (2000) 463–473.
- [21] Z.O. Jonsson, S. Jha, J.A. Wohlschlegel, A. Dutta, Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex, *Mol. Cell.* 16 (2004) 465–477.
- [22] G. Mizuguchi, X. Shen, J. Landry, W.H. Wu, S. Sen, C. Wu, ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex, *Science*. 303 (2004) 343–348.
- [23] A.V. Samuelson, M. Narita, H.M. Chan, J. Jin, E. de Stanchina, M.E. McCurrach, et al., p400 is required for E1A to promote apoptosis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21,915–21,923.
- [24] X. Shen, G. Mizuguchi, A. Hamiche, C. Wu, A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing, *Nature*. 406 (2000) 541–544.
- [25] Y. Kakiyama, W.A. Houry, The R2TP complex: discovery and functions, *Biochim. Biophys. Acta*. 2012 (1823) 101–107.
- [26] R. Machado-Pinilla, D. Liger, N. Leulliot, U.T. Meier, Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs, *RNA*. 18 (2012) 1833–1845.
- [27] D.R. Newman, J.F. Kuhn, G.M. Shanab, E.S. Maxwell, Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription, *RNA*. 6 (2000) 861–879.
- [28] Z.O. Jonsson, S.K. Dhar, G.J. Narlikar, R. Auty, N. Wagle, D. Pellman, et al., Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5% of yeast genes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16,279–16,288.
- [29] H. Ohdate, C.R. Lim, T. Kokubo, K. Matsubara, Y. Kimata, K. Kohno, Impairment of the DNA binding activity of the TATA-binding protein renders the transcriptional function of Rvb2p/Tih2p, the yeast RuvB-like protein, essential for cell growth, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14,647–14,656.
- [30] A.S. Venteicher, Z. Meng, P.J. Mason, T.D. Veenstra, S.E. Artandi, Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly, *Cell*. 132 (2008) 945–957.
- [31] S. Boulon, B. Pradet-Balade, C. Verheggen, D. Molle, S. Boireau, M. Georgieva, et al., HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II, *Mol. Cell.* 39 (2010) 912–924.
- [32] Z. Horejsi, H. Takai, C.A. Adelman, S.J. Collis, H. Flynn, S. Maslen, et al., CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability, *Mol. Cell.* 39 (2010) 839–850.
- [33] H. Takai, Y. Xie, T. de Lange, N.P. Pavletich, Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes, *Genes Dev.* 24 (2010) 2019–2030.
- [34] H. Omran, D. Kobayashi, H. Olbrich, T. Tsukahara, N.T. Loges, H. Hagiwara, et al., Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins, *Nature*. 456 (2008) 611–616.
- [35] W.A. Decatur, M.J. Fournier, rRNA modifications and ribosome function, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 344–351.
- [36] N.J. Watkins, I. Lemm, D. Ingelfinger, C. Schneider, M. Hossbach, H. Urlaub, et al., Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multi-protein complex, *Mol. Cell.* 16 (2004) 789–798.
- [37] R. Zhao, Y. Kakiyama, A. Gribun, J. Huen, G. Yang, M. Khanna, et al., Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation, *J. Cell Biol.* 180 (2008) 563–578.

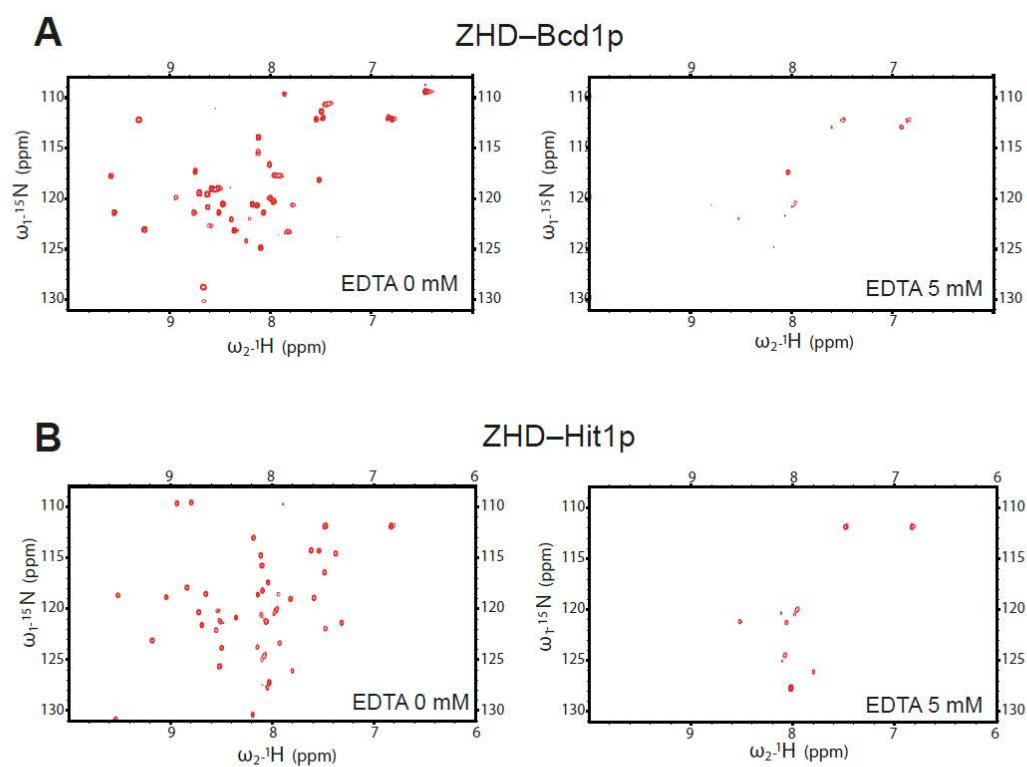
- [38] T.H. King, W.A. Decatur, E. Bertrand, E.S. Maxwell, M.J. Fournier, A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 7731–7746.
- [39] S.L. Hiley, T. Babak, T.R. Hughes, 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 (2005) 3048–3056.
- [40] K.S. McKeegan, C.M. Debieux, S. Boulon, E. Bertrand, N.J. Watkins, A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 6782–6793.
- [41] K.S. McKeegan, C.M. Debieux, N.J. Watkins, Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 4971–4981.
- [42] J.G. Pelton, D.A. Torchia, N.D. Meadow, S. Roseman, Tautomeric states of the active-site histidines of phosphorylated and unphosphorylated IIIIGlc, a signal-transducing protein from *Escherichia coli*, using two-dimensional heteronuclear NMR techniques, *Protein Sci.* 2 (1993) 543–558.
- [43] N. Marmier-Gourrier, A. Clery, V. Senty-Segault, B. Charpentier, F. Schlotter, F. Leclerc, et al., A structural, phylogenetic, and functional study of 15.5-kD/Snu13 protein binding on U3 small nucleolar RNA, *RNA* 9 (2003) 821–838.
- [44] K.L. Cheung, J. Huen, W.A. Houry, J. Ortega, Comparison of the multiple oligomeric structures observed for the Rvb1 and Rvb2 proteins, *Biochem. Cell Biol.* 88 (2010) 77–88.
- [45] B. Rothe, R. Back, M. Quinternet, J. Bizarro, M.C. Robert, M. Blaud, et al., 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 (2014) 2015–2036.
- [46] I. Vidovic, S. Nottrott, K. Hartmuth, R. Luhmann, R. Ficner, Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment, *Mol. Cell.* 6 (2000) 1331–1342.
- [47] N.J. Watkins, V. Segault, B. Charpentier, S. Nottrott, P. Fabrizio, A. Bachi, et al., A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP, *Cell* 103 (2000) 457–466.
- [48] C. UniProt, UniProt: a hub for protein information, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) D204–D212.
- [49] T.D. Goddard, D.G. Kneller, in: University of California SF (Ed.), *Sparky 3*, 2002.
- [50] P. Guntert, Automated NMR structure calculation with CYANA, *Methods Mol. Biol.* 278 (2004) 353–378.
- [51] B. Wang, S.L. Alam, H.H. Meyer, M. Payne, T.L. Stemmler, D.R. Davis, et al., Structure and ubiquitin interactions of the conserved zinc finger domain of Npl4, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 20,225–20,234.
- [52] A.J. Nederveen, J.F. Doreleijers, W. Vranken, Z. Miller, C.A. Spronk, S.B. Nabuurs, et al., RECOORD: a recalculated coordinate database of 500+ proteins from the PDB using restraints from the BioMagResBank, *Proteins* 59 (2005) 662–672.
- [53] W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 13r1, Schrödinger, LLC, New York, 2010.
- [54] X. Robert, P. Gouet, Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) W320–W324.
- [55] A. Bar, V. Marchand, G. Khoury, N. Dreumont, A. Mouglin, N. Robas, et al., Structural and functional analysis of the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing and demonstration of its activation by the 9G8 SR protein, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 3388–3403.



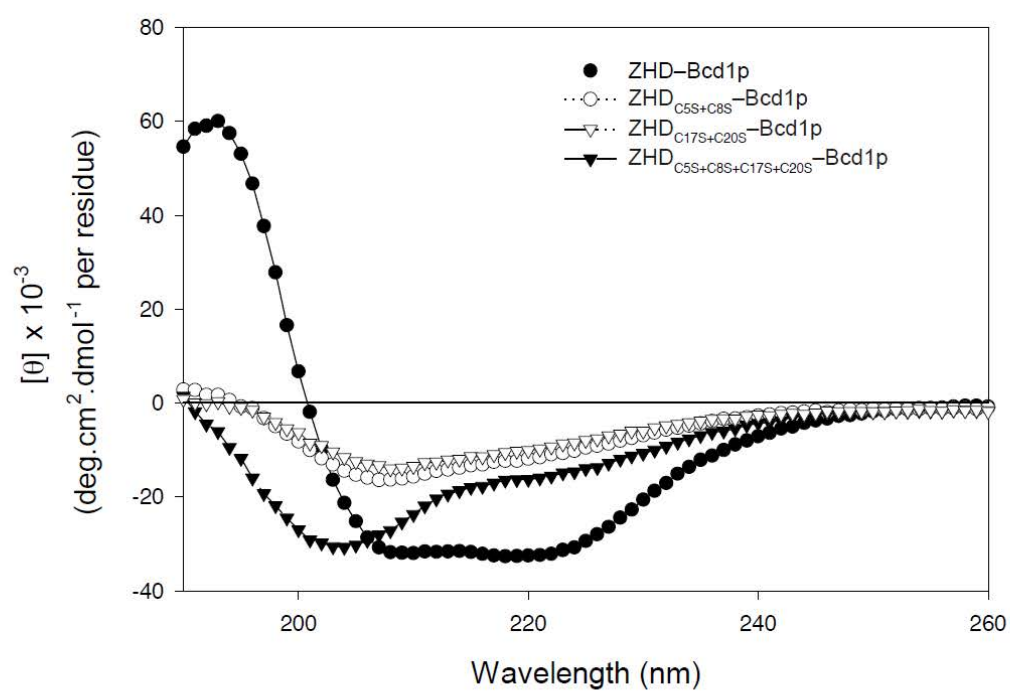
Supplementary Figure S1



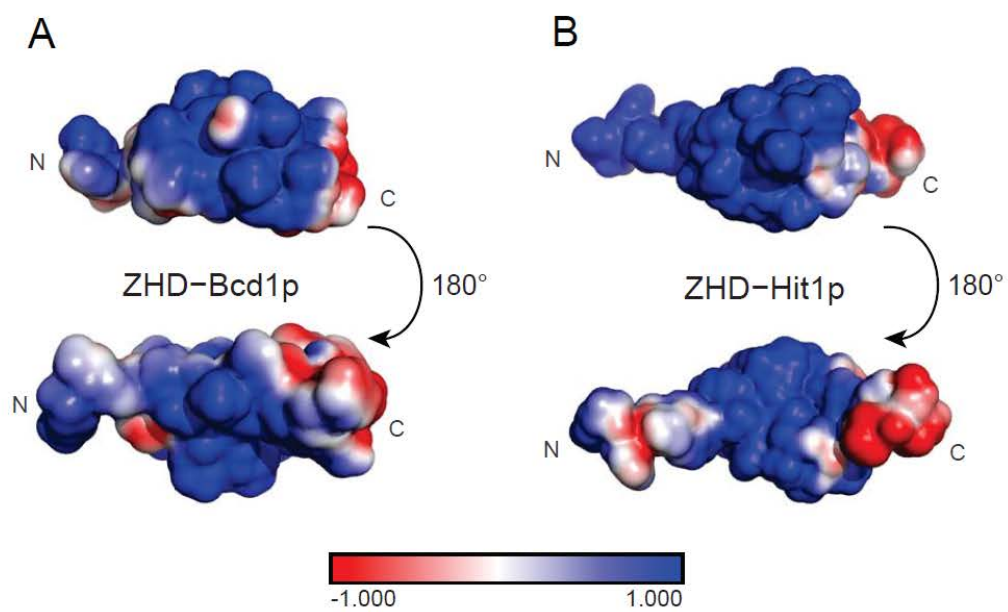
Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S5

Analyse fonctionnelle des protéines Hit1 et Bcd1 impliquées dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D eucaryotes

Chez les eucaryotes, la biogenèse des ribosomes débute dans le nucléole par la maturation et la modification des ARN ribosomiques (ARNr) à partir d'un précurseur pré-ARNr polycistronique. Ce mécanisme fait intervenir des centaines de particules ribonucléoprotéiques (RNP) distinctes, qui se répartissent en deux familles: les petites RNP nucléolaires (snoRNP) à boîtes H/ACA qui catalysent la conversion des Uridines en Pseudouridines, et les snoRNP à boîtes C/D qui portent une activité méthyl transférase ciblée sur la position 2'-OH des riboses. Quelques snoRNP ne catalysent pas ces modifications mais sont essentielles pour les étapes précoces de maturation du pré-ARNr. Chacune des snoRNP C/D est composée d'un ARN non codant spécifique appelé snoRNA à boîtes C/D, sur lequel s'assemble dans un mécanisme séquentiel le jeu invariant de 4 protéines, appelées Snu13p, Nop1p, Nop56p et Nop58p chez la levure. Cet assemblage nécessite l'intervention transitoire de facteurs protéiques constituant une machinerie d'assemblage spécifique. La protéine Rsa1p (NUFIP1 chez les vertébrés) associée précocement au pré-complexe Snu13p-snoRNA, sert de plateforme pour le recrutement des 3 autres protéines des snoRNP ainsi que pour des interactions avec le complexe R2TP qui est un co-chaperon de la protéine Hsp90 et composé des protéines (levure/vertébrés) Rvb1/TIP49, Rvb2/TIP48 de la famille des ATPases AAA+, de Pih1/PIH1D1 et de Tah1/RPAP3. Mon travail de thèse a visé à étudier le rôle fonctionnel chez la levure *S. cerevisiae* des protéines Hit1 et Bcd1. Par une approche protéomique réalisée lors du travail de thèse de B Rothé. Hit1p avait été trouvée être associée à Rsa1p, et montrée être impliquée dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D. De plus, il était connu que l'expression de Bcd1p est essentielle à la viabilité cellulaire et pour la stabilité des snoRNA à boîtes C/D. Les protéines Hit1p et Bcd1p partagent un domaine homologue à double motif en doigt de zinc (ZnF). Lors de ce travail, afin d'identifier les domaines importants pour la fonction de Hit1p et les acides aminés impliqués dans l'interaction Rsa1p-Hit1p, plusieurs fragments de Hit1p ainsi que des variants portant des substitutions ont été exprimés dans une souche invalidée pour le gène *HIT1* codant Hit1p. Nous avons testé l'effet de ces expressions sur la croissance cellulaire et sur le taux d'expression de Rsa1p. Nos résultats révèlent en particulier que le fragment 70-164 est suffisant pour la fonction de Hit1p dans la biogenèse des snoRNP à boîtes C/D et que le domaine ZnF n'est pas requis pour cette fonction. Par une approche similaire à celle utilisée pour Hit1p, nous avons recherché les domaines nécessaires à la fonctionnalité de Bcd1p, en utilisant une souche *tet07::BCD1* dans laquelle l'expression de la protéine endogène peut être réprimée. De plus, nous avons testé la fonctionnalité de protéines hybrides obtenues en échangeant mutuellement entre Hit1p et Bcd1p leur domaine ZnF. Nos données montrent que ZnF de Bcd1p est nécessaire mais pas suffisant pour la fonction de Bcd1p et qu'il peut être substitué par celui de Hit1p. En effet, la protéine hybride ZnF_{Hit1p}-Bcd1p complémente le défaut de croissance dû à l'absence d'expression du gène *BCD1* et restaure le taux des snoRNA à boîtes C/D. Par ce type d'approche nous avons aussi établi que les 115 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale sont suffisants pour assurer une croissance et un taux de snoARN C/D normaux. Le mécanisme par lequel Bcd1p influence spécifiquement les taux de snoRNA à boîtes C/D reste inconnu. Toutefois, au cours de ce travail j'ai identifié un nouveau partenaire potentiel - la chaperonne d'histone Rtt106p, qui interagit avec Bcd1p dans un test d'interaction par double-hybride et la formation d'un complexe stable avec Bcd1p *in vitro* a été confirmée par le groupe de X Manival. La dernière partie de mon travail a visé à rechercher le lien fonctionnel entre cette chaperonne d'histone et l'expression des snoRNA à boîtes C/D.

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, snoRNP, snoRNA à boîtes C/D, Hit1p, Rsa1p, Bcd1p, Rtt106p, R2TP

Functional analysis of the Hit1p and Bcd1p proteins involved in eukaryotic box C/D snoRNP biogenesis.

In eukaryotes, ribosome biogenesis begins in the nucleolus, by maturation and modification of ribosomal RNAs (rRNA) from a polycistronic pre-rRNA precursor. This mechanism involves hundreds of distinct ribonucleoprotein particles (RNP), which are divided into two families: box H/ACA small nucleolar RNP (snoRNP), that catalyze the conversion of Uridines in Pseudouridines, and box C/D snoRNP which have methyl transferase activity targeted on the position 2'-OH of riboses. Some snoRNP do not catalyze these changes but are critical to the early stages of pre-rRNA maturation. Each box C/D snoRNP is composed of a -specific non-coding RNA called box C/D snoRNA, on which are assembled in a sequential way the invariant set of 4 proteins, named Snu13p, Nop1p, Nop56p and Nop58p in yeast. This assembly process requires the transient intervention of protein factors constituting a specific assembly machinery. The protein Rsa1p (NUFIP1 in vertebrates) is early associated with the Snu13p-snoRNA pre-complex, and serves as a platform for recruiting other snoRNP proteins, as well as for interacting with the R2TP complex, which is a Hsp90 co-chaperone and composed of proteins Rvb1 / TIP49, Rvb2 / TIP48 of the family of AAA + ATPases, Pih1 / PIH1D1 and Tah1 / RPAP3 (yeast / vertebrates). My PhD work aimed to investigate the functional role of Bcd1p and Hit1p in the yeast *S. cerevisiae*. By a proteomic approach performed during B.Rothé's PhD work, Hit1p has been found associated with Rsa1p, and its involvement in box C/D snoRNP biogenesis was revealed. Moreover, it was known that Bcd1p expression is essential to cell viability and box C/D snoRNA stability. Hit1p and Bcd1p proteins share a homologous double zinc finger domain motif (ZnF). During this work, several Hit1p fragments and variants bearing substitutions of amino acids involved in Rsa1p-Hit1p interaction were expressed in a strain disabled for *HIT1* gene which codes for Hit1p. We assessed the effect induced by these variants on cell growth rate and Rsa1 cellular levels. Our results revealed that the 70-164 fragment is sufficient for Hit1p function in box C/D snoRNP biogenesis and that the Zn finger domain is not required for this function. By a similar approach to that used for Hit1p, we searched the domains necessary to the functionality of Bcd1p, using the *tet07::BCD1* strain, in which expression of the endogenous protein can be repressed. Additionally, we tested the functionality of hybrid proteins obtained by mutually exchanging the ZnF domains between Hit1p and Bcd1p. Our data show that Bcd1p Zn finger domain is necessary but not sufficient for the function of Bcd1p and can be substituted by that of Hit1p. Indeed, the ZnF_{Hit1p}-Bcd1 hybrid protein complements the growth failure due to a lack of expression of *BCD1* gene and restores box C/D snoRNA levels. By this approach we have also established that the first 115 N-terminal amino acids are sufficient to ensure normal cell growth and box C/D snoRNA levels. The mechanism by which Bcd1p specifically influences box C/D snoRNA levels is unknown. However, I identified a potentially new partner – the Rtt106p histone chaperone interacts with Bcd1p in a two-hybrid interaction test, and presence of a stable complex with Bcd1p *in vitro* was confirmed by X.Manival group. The last part of my work aimed to search for a functional link between this histone chaperone and box C/D snoRNA expression.

Key words : *Saccharomyces cerevisiae*, snoRNP, box C/D snoRNA, Hit1p, Rsa1p, Bcd1p, Rtt106p, R2TP