



**HAL**  
open science

# **Compréhension des rôles des complexes Nob1/Pno1 et RPS14/Cinap dans la maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique (pré-40S) chez les eucaryotes**

Raivoniaina Raelijaona

► **To cite this version:**

Raivoniaina Raelijaona. Compréhension des rôles des complexes Nob1/Pno1 et RPS14/Cinap dans la maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomique (pré-40S) chez les eucaryotes. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bordeaux, 2019. Français. ⟨NNT : 2019BORD0221⟩. ⟨tel-02460440⟩

**HAL Id: tel-02460440**

**<https://theses.hal.science/tel-02460440v1>**

Submitted on 30 Jan 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

**THÈSE PRÉSENTÉE**

**par**

**Finaritra RAOELIJAONA**

**POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

**ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé (SVS)**

Spécialité : Biochimie

**Compréhension du rôle des complexes Nob1/Pno1 et  
RPS14/Cinap dans la maturation de la petite sous-unité  
ribosomique (pré-40S) chez les eucaryotes.**

Sous la direction de : Dr Stéphane THORE

Soutenue le 14 novembre 2019

Membres du jury

Dr. BEHM-ANSMANT, Isabelle	IMoPA, Université de Lorraine	Rapporteur
Dr. GRAILLE, Marc	Ecole Polytechnique - UMR7654	Rapporteur
Pr. GLEIZES, Pierre-Emmanuel	LBME, Toulouse	Président
Dr. TISNE, Carine	Université Paris Diderot -UMR8261	Examineur
Dr. GIRAUD, Marie-France	IBGC-UMR5095	Examineur
Dr. THORE Stéphane	ARNA-INSERM U1212	Directeur de thèse
Dr. FRIBOURG, Sébastien	ARNA-INSERM U1212	Invité



**THÈSE PRÉSENTÉE**

**par**

**Finaritra RAOELIJAONA**

**POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

**ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé (SVS)**

Spécialité : Biochimie

**Compréhension du rôle des complexes Nob1/Pno1 et  
RPS14/Cinap dans la maturation de la petite sous-unité  
ribosomique (pré-40S) chez les eucaryotes.**

Sous la direction de : Dr Stéphane THORE

Soutenue le 14 novembre 2019

Membres du jury

Dr. BEHM-ANSMANT, Isabelle	IMoPA, Université de Lorraine	Rapporteur
Dr. GRAILLE, Marc	Ecole Polytechnique - UMR7654	Rapporteur
Pr. GLEIZES, Pierre-Emmanuel	LBME, Toulouse	Président
Dr. TISNE, Carine	Université Paris Diderot -UMR8261	Examineur
Dr. GIRAUD, Marie-France	IBGC-UMR5095	Examineur
Dr. THORE Stéphane	ARNA-INSERM U1212	Directeur de thèse
Dr. FRIBOURG, Sébastien	ARNA-INSERM U1212	Invité



# Remerciements

Alors pour commencer je tiens à remercier les membres du jury : Dr Isabelle BEHM-ANSMANT, Dr Marie-France GIRAUD, Dr Carine TISNE, Dr Marc GRAILLE et Pr Pierre-Emmanuel GLEIZES qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer le travail que j'ai effectué pendant ma thèse.

Puis, je tiens à remercier Dr Sébastien FRIBOURG, notre chef d'équipe pour m'avoir m'accueilli dans son groupe et pour m'avoir donné l'opportunité de participer au projet maturation du ribosome. Ce fut une expérience très enrichissante, merci pour les bons conseils qui m'ont permis de mener à bien le projet de thèse.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à toi Stéphane, pour la chance que tu m'as offerte et avoir eu assez confiance en moi pour m'avoir permis de réaliser une thèse sous ta direction. Merci pour ta grande patience malgré « les périodes difficiles », tu as toujours été présent et je t'en suis vraiment reconnaissante. Ce fut un honneur d'avoir travaillé à tes côtés et j'ai appris beaucoup de choses durant cette période qui me serviront sans nul doute dans le futur alors j'espère que j'ai été à la hauteur de ta confiance.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe Gleizes qui m'ont chaleureusement accueilli parmi eux, pour les discussions scientifiques qui m'ont beaucoup servi pour la réalisation du projet de thèse. Un grand merci à Dr Marie-Françoise O'DONOHUE et Dr Simon LEBARON membres de mon comité de mi-thèse. Vous m'aviez beaucoup aidé dans l'organisation du projet de thèse et grâce à vous j'ai eu l'opportunité d'apprendre d'autres techniques.

Merci à mon tuteur de thèse Dr Bertrand BEAUVOIS, pour votre encouragement et votre conseil afin de mener à bien la thèse.

Un grand merci au squad à l'origine de cette aventure Rachel, Brice, Thuy Than, Nils, Karima, Kareem, Sylvie, Dominique, Paul-Antoine sans oublier my sis' Tatiana, U da best !!!!!. Je tiens également à remercier Dr Isabelle BILLAS et Isabelle HAZEMANN pour une formation au top qui m'a incité à continuer en thèse.

Je tiens à remercier les Dr U1212 : Sara, Emilie, Shujaat, Arghya, vous êtes formidables et ces trois années ont été super avec vous tout comme Jennifer, Bianca, Hoany, Claire, Lucile, Manon, Lorena, Alexis, Thomas, Alizée, Edouard, Simon ... tous les collègues avec qui j'ai pu améliorer mes compétences de bowling.

Merci à tous les membres de la zone Nord carreire (Kati, Cathy, Delphine, Sandrine, Karine, Jacques, Muriel, Malika, Anais, Isabelle, Ronan, et tous les autres) merci d'avoir fait de ces trois années une aventure mémorable et ce fut un plaisir de faire partie des vôtres. Milles merci !!!!!

Je tiens aussi à te remercier Fanny à qui j'ai posé je ne sais combien de questions, merci pour ta gentillesse débordante, tes bons conseils, toutes les petites astuces ... Ton good vibe biochimique a été d'une grande aide pendant toute cette thèse. Merci à toi Hélène, ta gentillesse, ta bonne humeur et tes encouragements m'ont toujours permis de rester optimiste. Merci à toi Laurent et ta gentillesse « cachée », d'avoir dû me supporter pendant trois ans dans la salle p20 et merci aussi pour les haribo crocodiles.

Merci à vous Dr Lionel MINVIELLE-SEBASTIA, Dr Fabien DARFEUILLE, Dr Martin TEICHMANN et Dr Cameron MACKERETH pour les conseils et les discussions qui m'ont inspiré beaucoup non seulement durant la thèse mais aussi pour mon projet dans l'avenir.

Merci aussi à Dr Jeremie BURATTO mon partenaire de « screen » préféré et Marie PERRIN mon foodtrip advisor favoris, vous êtes formidables.

Et enfin merci à la team 28 (Rotsy et Vola), vous m'avez appris à toujours donner de son mieux et à ne jamais abandonner puis à ma famille, tout ceci c'est grâce à vous 😊.



## Résumé :

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques responsables de la traduction. Chez les eucaryotes, la biogénèse du ribosome est un processus complexe très régulé qui fait intervenir un nombre important de facteurs d'assemblage (~200). La construction d'un ribosome est initiée dans le nucléole puis continue dans le nucléoplasme et se termine dans le cytoplasme. La maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomale implique la dissociation séquentielle des facteurs d'assemblage tardifs et la maturation finale de l'ARNr 18S. Ce processus est catalysé par l'endonucléase Nob1 qui assure la coupure de l'extrémité 3' du précurseur de l'ARNr 18S (pré-18S) aboutissant à sa forme mature. Ce mécanisme est coordonné par la protéine Pno1 qui est le partenaire de Nob1. Des informations détaillées sur l'architecture des particules pré-ribosomiques nous ont permis de mieux comprendre les différents intermédiaires de la biogénèse. Cependant, certains aspects fonctionnels comme la conformation adoptée par Nob1 pour assurer la coupure du site D du pré-18S restaient encore flous. L'objectif de mon travail a été de mieux comprendre les aspects très tardifs de la maturation cytoplasmique du ribosome. Pour ce faire, nous avons redéfini l'organisation modulaire de l'endonucléase Nob1 chez les eucaryotes pour ensuite étudier son mode d'interaction avec son partenaire Pno1. Des tests fonctionnels *in vitro* ont été effectués pour étudier le rôle de Pno1 dans la régulation de la coupure par Nob1.

Nos résultats nous ont permis de montrer que le domaine catalytique de Nob1 adopte une conformation atypique. En effet le domaine PIN est composé de deux fragments (résidus 1-104 and 230-255) séparés par une boucle interne qui est importante pour la reconnaissance avec son partenaire Pno1. Nos études nous ont également montré que Pno1 inhibe l'activité de Nob1 en reconnaissant directement l'ARNr substrat, masquant ainsi le site de coupure de l'endonucléase. Ces résultats sont complémentaires et cohérents avec les données structurales de cryo-EM de la particule pré-40S humaine récemment publiées. En effet, Nob1 est dans une conformation incompatible avec la coupure du pré-ARNr puisque son domaine catalytique se retrouve à une distance d'environ 30Å de son ARN substrat. Ce phénomène implique donc des changements de conformations ou encore la nécessité de protéine accessoire pour déplacer certains facteurs. La protéine Cinap est impliquée dans la maturation de l'ARNr 18S. Nos études d'interaction avec les protéines localisées au niveau de la plateforme (à savoir RPS14, RPS26, le complexe Nob1/Pno1) ont permis de montrer que Cinap pouvait former un complexe tripartite avec l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1. De plus, Cinap est capable de reconnaître RPS26 dans un complexe RPS14-dépendant. Il est important de noter que RPS26 est un composant de la petite sous-unité qui remplace Pno1 dans le ribosome mature. De ce fait le recrutement de RPS26 au sein du pré-ribosome nécessite la dissociation de Pno1 et cet échange serait assuré par Cinap. Sur la base des travaux effectués, nous pouvons proposer un modèle de maturation où la formation du complexe Cinap/Pno1 induirait un changement de conformation permettant à Nob1 de reconnaître son substrat et donc de catalyser la coupure du site D qui aboutit à la maturation de l'ARNr 18S et donc à la production de la sous-unité 40S mature.

**Mots clés :** Biogénèse du ribosome, maturation de l'ARNr 18S, complexe Nob1/Pno1, clivage de l'extrémité 3' du pré-18S, interaction protéique

## **Abstract:**

Ribosomes are translational machineries universally responsible of protein synthesis. In eukaryote, ribosome assembly is a complex and highly regulated process that requires coordinated action of more than 200 biogenesis factors. Ribosome assembly initiates in the nucleolus, continues in the nucleoplasm and terminates in the cytoplasm. The cytoplasmic maturation events of the small ribosomal subunit are associated with the sequential release of the late assembly factors and concomitant maturation of the pre-rRNA. During final maturation of the small subunit, the pre-18S rRNA is cleaved off by the endonuclease Nob1, which activity is coordinated by its binding partner Pno1. Detailed information on pre-ribosomal particle architectures have been provided by structural snapshots of maturation events. However, key functional aspects such as the architecture required for pre-rRNA cleavage have remained elusive. In order to better understand these late steps of cytoplasmic pre-40S maturation, we first redefine the domain organization of Nob1, then study its binding mode with Pno1 using different tools such as sequence analysis, structure prediction and biochemical experiments and, we then performed functional assay to elucidate the role played by Pno1 during the pre-18S rRNA maturation.

Our results have shown that eukaryotic Nob1 adopts an atypical PIN domain conformation: two fragments (res 1-104 and 230-255) separated by an internal loop, which is essential for Pno1 recognition. We also found out that Pno1 inhibits Nob1 activity likely by masking the cleavage site. Our findings further support the recently published cryo-EM structure of the pre-40S, where Nob1 displays an inactive conformation. Moreover, 18S rRNA 3'-end cleavage has to happen and this implies structural rearrangement or requirement of some accessory proteins such as Cinap, an atypical kinase involved in pre-18S processing. Studying the interplay between proteins localized in the pre-40S platform (RPS14, RPS26, Nob1/Pno1 complex) has shown that Cinap is able to form a trimeric complex with Nob1 and its binding partner Pno1. Furthermore, Cinap can recognize RPS26 in a RPS14-dependent manner, which had already been studied with its yeast counterpart. It is important to note that RPS26 is the ribosomal protein replacing Pno1 in the mature ribosome. Our finding clearly suggests a mechanism where RPS26 recruitment to the ribosome requires Pno1 dissociation. This exchange would be carried out by Cinap. Therefore, we can suggest a simplified model as follow: upon binding with Pno1, the newly formed complex (Cinap/Pno1) will trigger a conformational change, which will allow the endonuclease Nob1 to reach its substrate (D-site) and perform its cleavage resulting in mature 18 rRNA generation.

**Keywords:** Ribosome biogenesis, 18S rRNA maturation, Nob1/Pno1 complex, pre-18S rRNA 3' end cleavage, protein - protein/RNA interaction

# SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	
INTRODUCTION.....	1
I. Généralités.....	3
1. Ribosomes.....	3
2. Chronologie des découvertes dans l'assemblage du ribosome chez les eucaryotes .....	5
3. La biogénèse du ribosome chez les eucaryotes.....	6
II. Les acteurs de la maturation.....	8
1. Les facteurs d'assemblage (AFs) .....	8
a) Les chaperonnes .....	8
b) Les enzymes .....	9
2. Les snoARN.....	9
III. Les maladies associées à la biogénèse du ribosome .....	10
1. Les ribosomopathies .....	10
a) Les maladies affectants la maturation précoce .....	11
b) Les maladies affectants la maturation intermédiaire .....	11
c) Les maladies affectants la maturation tardive, i.e. l'étape cytoplasmique .....	12
2. Relation entre la biogénèse et cancer .....	13
a) Des exemples d'oncogènes.....	13
b) Activation de p53 dans l'altération de la biogénèse du ribosome .....	14
IV. La maturation des ARNr chez l'homme et chez la levure .....	16
1. Des sites de maturations conservés .....	16
2. La maturation de la séquence primaire pré-ARNr 35S chez la levure .....	17
3. La maturation de l'ARNr 18S chez l'homme .....	19
4. Modifications des ARNr .....	20
V. Le mécanisme d'assemblage d'un point de vue structural .....	22
1. Formation de la particule pré-90S .....	22
2. La maturation de la petite SU .....	24
3. Export nucléaire du pré-40S .....	25
VI. Situation du sujet .....	27
1. La maturation finale de l'ARNr 18S.....	27
2. Les acteurs de la maturation très tardive de l'ARNr 18S .....	28
a) Rio1 kinase (Rio pour Right Open reading frame one) .....	28
b) RPS14 (pour Ribosomal protein Small 14) .....	30

c) RPS26 (pour Ribosomal protein Small 26) .....	32
d) Cinap/AK6 (Coilin Interacting nuclear ATPase Protein/ Adenylate Kinase 6 ou Factor Activating Pos9 (Fap7)) .....	33
e) Nob1 (Nin one Binding protein) .....	36
f) Pno1 (Protein associated to Nob1) .....	38
VII. Problématique et projet de thèse.....	40
RESULTATS .....	43
I. Etude du mode de reconnaissance entre l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1 .....	45
1. Organisation de l'endonucléase Nob1 et cartographie des interactions du complexe Nob1/Pno1 chez l'homme .....	45
a) Données supplémentaires .....	53
2. Cristallisation.....	57
a) Purification et cristallisation du complexe Nob1/Pno1 chez l'homme.....	58
b) Purification et cristallisation du complexe Nob1/Pno1 chez d'autre organisme .....	70
c) Le complexe protéique Nob1/Pno1 chez <i>E. cuniculi</i> .....	71
d) Purification et cristallisation du domaine PIN.....	75
i. Chez l'homme .....	75
ii. <i>EcNob1</i> (1-125) l'orthologue chez <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	80
e) Purification et cristallisation du complexe Cinap et Pno1 de <i>E. cuniculi</i> .....	82
II. Etudes fonctionnelles et validation chez la levure .....	85
1. Mécanisme de reconnaissance entre Nob1 et Pno1 conservé chez la levure.....	85
2. Effet des mutants de Nob1 sur l'activité endonucléolytique et Rôle de Pno1 dans la régulation de l'activité enzymatique de Nob1 chez la levure.....	88
III. Identification des autres facteurs accessoires impliqués dans la maturation du 18S.....	91
1. Rio kinase permettant de déplacer Pno1 .....	91
2. Cinap comme facteur accessoire impliqué dans le déplacement de Pno1 .....	93
a) Effet de l'ATP sur la dissociation du complexe Cinap/RPS14.....	93
b) Cinap/Fap7 reconnaît Nob1 et Pno1 .....	95
c) Affinement de la reconnaissance entre Nob1 et Cinap .....	98
d) Effet de l'ATP dans la reconnaissance entre Cinap/Nob1 et Pno1 .....	99
e) Cinap/Fap7 comme facteur d'échange entre RPS26 et Pno1.....	103
DISCUSSION.....	107
I. Reconstitution du complexe Nob1/Pno1 en vue d'une étude structurale.....	109
1. Organisation du complexe Nob1/Pno1.....	110
2. Orientation des études structurales vers un complexe ARN/protéine .....	112
3. Le complexe Cinap/Pno1 .....	114

II.	Compréhension de la maturation de l'ARNr 18S .....	115
1.	Rôle de Pno1 dans la régulation de la coupure par Nob1 .....	115
2.	Pno1 impliquée dans la régulation de l'activité endonucléolytique de Nob1 mais aussi dans son recrutement au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S .....	117
3.	Proposition d'un modèle de maturation .....	118
III.	Conclusions et perspectives .....	121
	MATERIELS & METHODES .....	123
I.	Génération des clones pour le projet .....	125
1.	Amplification des gènes d'intérêts .....	125
a)	La méthode PCR (pour Polymerization chain reaction) .....	125
b)	Conditions PCR .....	125
2.	Linéarisation des vecteurs pour le clonage .....	126
a)	Digestion à la française .....	126
b)	Déphosphorylation de l'extrémité 5' et 3' phosphate .....	127
3.	Clonage SLIC (Sequence and Ligation Independent Cloning) .....	128
4.	Transformation chimiocompétente .....	128
5.	Vérification de la présence de colonies positives .....	129
a)	PCR colonie .....	129
b)	Extraction du plasmide .....	129
c)	Double digestion enzymatique .....	129
II.	Production et purification des protéines et/ou complexes .....	130
1.	Transformation électrocompétente .....	130
2.	Test d'expression et de solubilité .....	130
a)	Production et expression protéique .....	130
b)	Mini-test .....	130
3.	Electrophorèse sur gel SDS PAGE .....	131
4.	Production à grande échelle .....	131
5.	Purification des protéines recombinants .....	131
a)	Lyse cellulaire .....	131
b)	Chromatographie d'affinité .....	132
i.	Chromatographie d'affinité sur ion métallique immobilisé (IMAC) .....	132
ii.	Chromatographie d'affinité à la protéine GST .....	133
c)	Clivage à la TEV .....	133
d)	Affinité inverse : Chromatographie d'affinité Nickel .....	133
e)	Concentration de la protéine .....	134
f)	Chromatographie d'exclusion stérique .....	134

III.	Test de cristallisation .....	135
IV.	Test fonctionnel .....	136
1.	Expérience de Pull down avec Cinap .....	136
2.	Test d'activité.....	136
	REFERENCES.....	137
	ANNEXES .....	153

# LISTE DES ABREVIATIONS

μL: microlitre	mL : millilitre
2yt: 2x yeast tryptone	mM: millimolaire
ADN : Acide desoxyribonucléique	MW: Molecular weight
ADNr : ADN ribosomique	NES: Nuclear export signal
ADP: Adénosine diphosphate	ng: nanogramme
AF: Assembly factors	NMP: Nucleoside monophosphate
ARN: Acide ribonucléique	NPC: Nuclear pore complex
ARNm: ARN messenger	N-ter: Amino-terminal
ARNr : ARN ribosomique	OD: Optical density
ARNt : ARN de transfert	PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis
ATP: Adénosine triphosphate	PCT: Pre-cristallisation test
BET: Bromure d'éthydiuim	PDB: Protein data bank
BSA : Bovine serum	PIN: Pilt N-terminus
Cryo-EM : cryo-microscopie electronique	PTC: peptidyl transferase center
C-ter : Carboxyle--terminal	Res: Résidu
CV : Colonne volume	RP: Ribosomal protéine
ETS: External transcribed spacer	S: Svedberg
FF: Fast flow	SDS: Sodium dodecyl sulfate
FL: Full length	sec: seconde
g: gramme	SLIC: Sequence ligation independent cloning
GSH: Gluthation (forme réduite)	SnoARN: Small nucleolar ARN
GST: Gluthation S-transferase	SnoRNP: Small nucleolar ribonucleic particle
IPTG: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	SSU: Small sub-unit
ITS: Internal transcribed spacer	SU : Sous-unité
kDa: kilodalton	TB : Terrific Broth
KH: K homology	TEV : Tobacco etch virus
LSU : Large sub-unit	U : unité
mAU : milli absorbance unit	UTP : U three protein
MDa : Megadalton	UV : ultra-violet
mg : milligramme	V : Volt
min : minute	ε : Epsilon



# INTRODUCTION



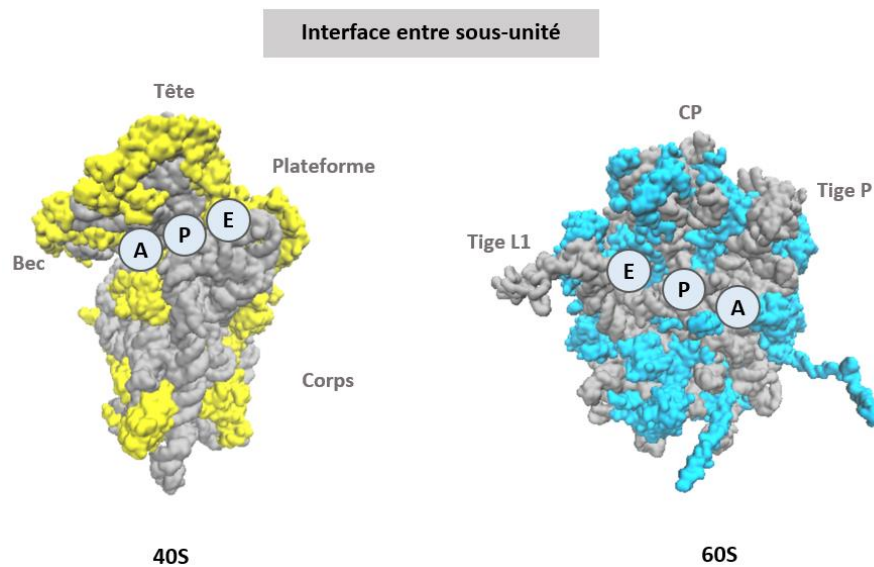
# I. Généralités

## 1. Ribosomes

Les ribosomes sont les machineries cellulaires responsables de la traduction de l'information génétique contenu dans l'ARN messager (ARNm) en protéines. Les premiers ribosomes ont été observée par Palade en 1954 sous forme de complexes granulaires associés au réticulum endoplasmique (Palade, 1955). Ces derniers sont des grands complexes nucléoprotéiques constitués de quatre ARN ribosomiques (ARNr) et d'environ 80 protéines ribosomiques (RPs). Les ribosomes sont les ribozymes les plus abondant dans la cellule, ces complexes font entre 25 à 30 nm de diamètre avec une taille d'environ 4 MDa chez les eucaryotes (Vourekas et al., 2008) . Les ribosomes sont présents dans les trois règnes du vivant, leur fonction ainsi que leur organisation sont conservées au cours de l'évolution. Des données génétiques corroborées à des études structurales ont montré que les ribosomes bactériens et eucaryotes partagent un cœur commun constitué de 34 protéines conservées (Melnikov et al., 2012). Environ 4400 bases d'ARN arborent les centres fonctionnels majeurs dans les ribosomes à savoir : le centre de décodage, le site peptidyl transférase (PTC) et les sites de liaison à l'ARN de transfert (ARNt) : A, P et E (*Figure 1*) (Yusupova and Yusupov, 2017).

Le ribosome est un complexe asymétrique constitué de deux sous-unités (SU) : la grande sous-unité (LSU) qui est deux fois plus grande en taille par rapport à la petite sous-unité (SSU) (Lake, 1976; Vasiliev, 1974). La SSU est responsable du décodage de l'ARN messager (ARNm). En effet, il sert de plateforme pour la reconnaissance entre l'ARNm et les anticodons présents dans les ARNt. Une coordination des changements de conformations dans la SSU va également permettre la translocation du couple d'ARNt/ARNm à travers le ribosome. La SSU eucaryote contient l'ARNr 18S et 33 RPs qui vont s'organiser en trois sous domaines structuraux distincts : le corps « body » qui contient le domaine 5' (5' domain) de l'ARNr 18S, la plateforme qui contient le domaine central (central domain) et enfin la tête (head) qui contient le domaine 3' (3' major et minor domain) (*Annexe 1*). La LSU quant à elle contient le centre peptidyl transférase (PTC) qui catalyse la formation des chaînes peptidiques. Cette SU est constituée par les trois autres ARNr (5S, 5.8S et 25S/28S) et 47 RPs (46 chez la levure,

absence de la protéine RPL 28 ou eL28). L'ARNr 25S est composé de six domaines différents qui sont entremêlés entre eux comparé à l'ARNr 18S. De ce fait, la LSU est décrit comme très monolithique avec quelques caractéristiques structurales comme la protubérance centrale (CP pour central protuberance) ainsi que les tiges L1 et P (L1 et P stalk) (*figure 1*) (Anger et al., 2013; Ben-Shem et al., 2011; de la Cruz et al., 2015; Khatter et al., 2015; Klinge et al., 2012). Le ribosome est une des plus vieilles machineries présentes dans la cellule et il existe un processus de synthèse et d'assemblage dédié à sa formation appelé « biogénèse du ribosome ».



**Figure 1 : Représentation des deux sous-unités du ribosome chez les eucaryotes** (d'après la structure du ribosome humain 4UG0 (Khatter et al., 2015)). (Gauche) La petite sous-unité 40S avec les différents domaines structuraux la composant (Bec, tête, plateforme et corps). Les RPs sont représentées en jaune et l'ARNr 18S en gris avec les trois sites de fixation des ARNt (A, P, E). (Droite) la grande sous-unité 60S avec les caractéristiques structurales telles que : la tige L1, la protubérance centrale (CP) et la tige P. Les RPs sont représentées en bleu et les ARNr en gris avec les positionnements des trois sites de fixation des ARNt.

## 2. Chronologie des découvertes dans l'assemblage du ribosome chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, l'assemblage du ribosome est étudié depuis les années 60. Les toutes premières connaissances résultent des études effectuées dans des cellules de mammifères avec l'utilisation des expériences de marquage d'ARN appelées « pulse-labeling ». Celles-ci ont montré que les deux SU ribosomiques sont synthétisées à partir d'un grand précurseur commun appelé « pré-ARNr 45S » qui sera par la suite mûri de manière co-transcriptionnelle dans différents compartiments cellulaires (Scherrer and Darnell, 1962; Scherrer et al., 1963). Ensuite, la combinaison d'autres outils comme la centrifugation en gradient de sucrose a mis en évidence l'existence des particules pré-ribosomiques suivantes : 90S, 66S et 43S (Tamaoki, 1966; Warner and Soeiro, 1967). Très vite, les analyses de la composition nucléoprotéique des particules 90S et 66S ont montré que ces complexes avaient une quantité de protéine et d'ARN plus importante que celle retrouvée dans les SU matures. Par conséquent, ces observations ont montré que des facteurs additionnels, différents des RPs, pouvaient exister et qu'ils étaient impliqués dans la biogénèse des ribosomes (Trapman et al., 1975).

L'utilisation de la microscopie électronique a permis de visualiser le premier intermédiaire de la maturation précoce du ribosome. En effet, ces études ont fourni des informations sur la synthèse séquentielle du grand précurseur conduite par l'ARN polymérase I le long des unités répétées de l'ADN ribosomique ressemblant à un arbre de Noël et désormais appelé « Miller spreads » (Miller and Beatty, 1969). De plus, l'utilisation de cette technique couplée à l'immuno-marquage des protéines nucléaires a permis de montrer que le nucléole servait de compartiment pour l'assemblage du pré-ARNr et des protéines ribosomales qui sont synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans le noyau.

Plus tard, l'utilisation de la levure a permis de combiner des expériences de génétique, de marquage mais aussi des tests biochimiques pour mieux décrire les voies d'assemblage du ribosome chez les eucaryotes. Par la suite, l'identification des facteurs d'assemblage ainsi que leurs fonctions ont principalement été révélées par l'utilisation des outils de criblage génétique mais aussi des anticorps contre les protéines nucléaires. Certains groupes pionniers ont montré l'implication des snoARN dans la maturation des ARNr (Beltrame and Tollervey, 1992; Tyc and Steitz, 1992; Watkins et al., 2000). Dans un second temps, des approches bioinformatiques ont permis de classer ces snoARN selon le type de modification que ces derniers introduisaient au niveau de l'ARNr.

L'implémentation des approches de purification par affinité *in-vivo* a permis d'isoler et de déterminer la composition des particules pré-ribosomiques (Fatica and Tollervey, 2002; Tschochner and Hurt, 2003). Certaines de ces particules ont été visualisées par microscopie électronique à des résolutions relativement basses et la méthode de détermination de structure tridimensionnelle par cristallographie aux rayons X a permis d'obtenir des structures de certains facteurs d'assemblage (Sengupta et al., 2010; Ulbrich et al., 2009). Les cinq dernières années ont été témoin des grands progrès de la cryo-microscopie électronique (cryo-EM) permettant ainsi de visualiser différents intermédiaires des particules pré-ribosomiques à haute résolution (atomique ou pseudo-atomique) (Barandun et al., 2017; Chaker-Margot, 2018). Ces études ont non seulement fourni des informations détaillées de l'architecture globale des particules pré-ribosomiques mais ont aussi permis de préciser l'implication fonctionnelle de nombreux facteurs de biogénèse dans un contexte natif (Baßler and Hurt, 2019; Kressler et al., 2017).

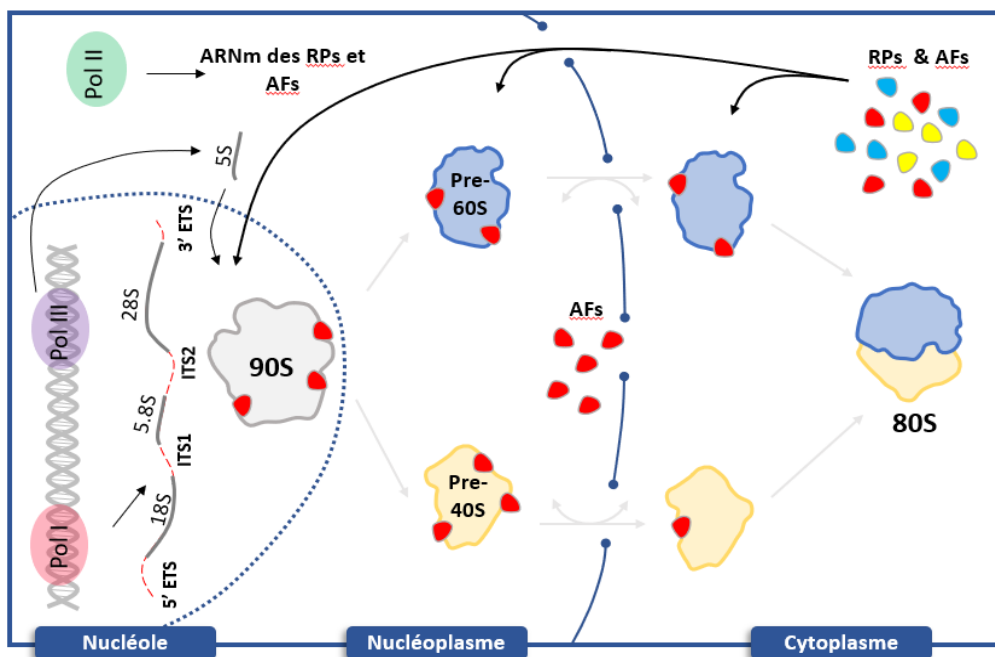
### 3. La biogénèse du ribosome chez les eucaryotes

La maturation du ribosome est nécessaire pour la prolifération, la différenciation et la croissance cellulaire (Wang et al., 2019). Chez les eucaryotes, à cause d'une organisation cellulaire plus complexe, la biogénèse du ribosome est compartimentalisée. La formation du ribosome se fait principalement dans le nucléole, elle est ensuite complétée dans le nucléoplasme et se termine dans le cytoplasme. Ce processus de maturation résulte de plusieurs séries d'étapes coordonnées (Drygin et al., 2010; Lempiäinen and Shore, 2009). La transcription de l'ADN ribosomique (ADNr) se fait dans le nucléole à partir de 400 copies en tandem des gènes ribosomiques. Celle-ci nécessite l'intervention des complexes multiprotéiques incluant l'ARN polymérase I (Pol I).

La transcription des gènes ribosomiques aboutit à la production de l'ARNr précurseur 47S qui va subir des événements de maturation pour générer les ARNr 18S, 5.8S et 28S matures. Le quatrième ARNr 5S est transcrit dans le nucléoplasme par l'ARN polymérase III (Pol III) et est ensuite importé dans le nucléole sous forme de complexe 5S RNP avec les protéines RPL5 (uL18) et RPL11 (uL5) (Ban et al., 2014). Ces ARNr sont assemblés avec les protéines ribosomiques (RPs) pour former les deux sous-unités matures 60S et 40S. Les messagers codants pour les RPs sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II). La synthèse de RPs se fait dans le cytoplasme puis celles-ci sont importées dans le noyau (Vladimirov et al., 1996). Les deux SU vont migrer le long du nucléoplasme puis être exportées dans le cytoplasme à

travers les pores nucléaires (NPC pour Nuclear Pore Complex) pour former la particule 80S mature (figure 2).

De ce fait, la biogénèse du ribosome est un processus complexe et très régulé qui consomme beaucoup d'énergie. De plus, la production de SU matures fait intervenir un nombre important de facteurs appelés « facteurs d'assemblage » (~200) et environ 75 snoARN (Fatica and Tollervey, 2002; Fromont-Racine et al., 2003; Kressler et al., 2010; Tschochner and Hurt, 2003).



**Figure 2 : Schéma simplifié de la biogénèse du ribosome chez les eucaryotes.** La formation du ribosome fait intervenir les 3 ARN polymérases (Pol I, II et III). Le processus est initié dans le nucléole suite à la synthèse du grand transcrit contenant les 3 ARNr (18S, 5.8S et 28S). Les fragments d'ARN sont séparés par des séquences internes appelées « ITS pour Internal transcribed Spacer » et flanqués à chaque extrémité par des séquences externes « ETS pour External Transcribed Spacer ». L'ARNr 5S est synthétisé dans le nucléoplasme puis importé dans le noyau pour être incorporé dans la particule pré-ribosomique. Les gènes codants pour les protéines ribosomiques (RPs) et les facteurs d'assemblage (AFs) sont transcrits par la Pol II puis la synthèse protéique se fait dans le cytoplasme. Les RPs vont être recrutées le long de la maturation aidée par les AFs qui s'associent dynamiquement avec les particules pré-ribosomiques pendant l'assemblage. La particule « pré-90S » est l'intermédiaire précoce caractérisé. Celle-ci contient les précurseurs de chaque sous-unité. Suite à une coupure du grand ARNr précurseur, les deux précurseurs vont être maturés indépendamment le long du nucléoplasme puis exportés dans le cytoplasme pour finaliser la maturation et former le ribosome mature 80S.

## II. Les acteurs de la maturation

### 1. Les facteurs d'assemblage (AFs)

Les facteurs d'assemblage ou facteurs de la biogénèse sont des protéines impliquées dans le processus de fabrication mais ils ne sont pas des composants structuraux du ribosome mature. Les AFs peuvent être de deux types : des chaperonnes ou des enzymes. En effet, ces facteurs vont assurer des interactions protéine-protéine et se comportent comme des échafaudages structuraux qui permettent de stabiliser des interactions ARN/protéines. D'autres facteurs possèdent des activités enzymatiques qui peuvent être des nucléases, des enzymes de modification, des kinases mais aussi des protéines nucléoside triphosphate (NTP)-dépendantes comme des GTPases, AAA-ATPase. Enfin, il y a aussi des hélicases à ARN pour promouvoir les nombreux remodelages d'évènements structuraux qui se produisent le long des ARNr (Bohnsack and Bohnsack, 2019). Dans les paragraphes suivants, je vais vous donner quelques exemples des nombreux facteurs identifiés dans la voie de synthèse et d'assemblage du ribosome.

#### *a) Les chaperonnes*

Chez les organismes eucaryotes, la maturation du ribosome est caractérisée par l'assemblage modulaire des complexes pré-ribosomiques. Des analyses par spectrométrie de masse de la composition de la particule précoce ont permis d'identifier environ 40 AFs (Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002). Dus à l'association de ces facteurs avec le snoARN U3, 20 AFs ont été renommés « UTP (pour U three proteins) » (Krogan et al., 2004). Les UTPs sont des complexes protéiques impliqués dans le remodelage de la structure du pré-ribosome ainsi que de la maturation des ARNr. Parmi les trois complexes UTP (A, B et C), UTPA est également nécessaire pour la transcription optimale de l'ADNr d'où la double dénomination UTPA/tUTP (pour transcription UTPs) (Gallagher et al., 2004; Krogan et al., 2004).

Chez l'homme comme chez la levure, les trois complexes UTP ainsi que le complexe snoRNP U3 puis l'hétérodimère RCL1-BMS1 et enfin le complexe IMP3-IMP4-MPP10 et EMG1 sont tous recrutés très tôt sur le nouveau transcrit. L'association de ces différents modules aboutit à la formation de ce que l'on appelle « SSU core processome » qui est le précurseur de la petite SU (Bohnsack and Bohnsack, 2019). De façon identique à ces évènements, des sous-complexes

tels que PeboW, (Nop7-Erb1-Ytm1 chez la levure) et PELP1-TEX10-WDR18 (Rix1-Ipi3-Ipi1 chez la levure) vont agir sur le processus de maturation du précurseur de la grande SU.

### *b) Les enzymes*

Chez la levure, six GTPases (Nog1, Nog2, Nug1, Bms1, Lsg1 et Efl1) participent à la biogénèse du ribosome. Les homologues de ces protéines existent également chez l'humain cependant leur fonction ne sont pas encore bien définies (Klinge and Woolford, 2019; Kressler et al., 2010).

Trois AAA-ATPases (Rea1/Mdn1, Rix7, Drg1) sont impliquées dans la dissociation des facteurs d'assemblage spécifiques à la maturation du 60S. Chez l'homme, les mêmes fonctions sont assurées par les homologues qui sont respectivement : MDN1, NVL2 et AFGH2 (Kressler et al., 2012).

En ce qui concerne les hélicases à ARN, leurs fonctions sont communes à la levure et à l'homme. En effet l'homologue de Dhr1 qui est DHX37 chez l'homme est impliqué dans la dissociation du snoARN U3 (Choudhury et al., 2019; Martin et al., 2013; Sardana et al., 2015). Chez l'homme des fonctions additionnelles ont été reportées pour certaines hélicases. Par exemple, la nécessité de l'enzyme DDX51 pour la dissociation du snoARN U8 du complexe pré-LSU (Srivastava et al., 2010) ou encore le rôle de DDX21 dans le couplage de la transcription et la voie de maturation du pré-ARNr, facilitant l'accès des snoRNP tardives dans la particule pré-ribosomique pré-40S (Calo et al., 2015; Sloan et al., 2016a). Dans la grande majorité des cas, les événements de remodelage assurés par les hélicases vont servir d'étapes du contrôle qualité dans la voie de maturation. Ces derniers permettent ainsi le maintien du sens de direction du processus d'assemblage du ribosome.

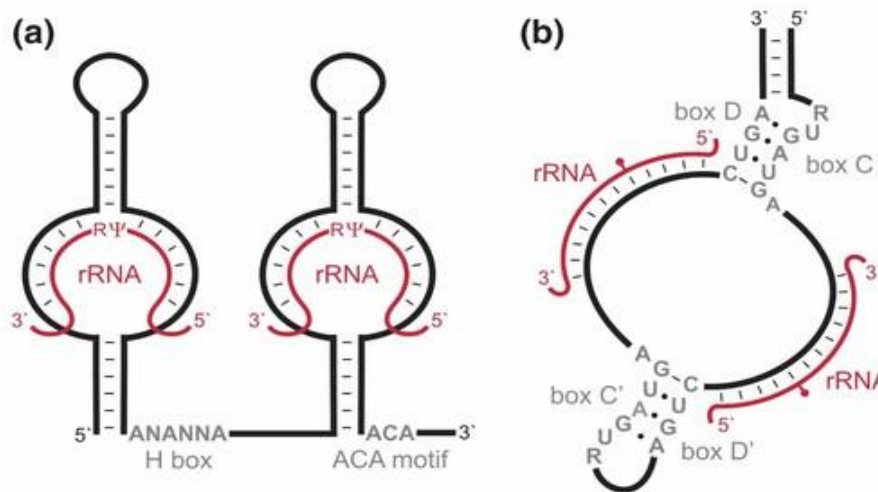
## 2. Les snoARN

Ce sont des petits ARN non codants qui vont s'apparier aux ARN cibles et servent de guide aux enzymes responsables de la modification en formant les complexes snoRNP. Selon le motif spécifique contenu dans les snoARN, on peut distinguer deux types de snoARN : à boîtes C/D ou H/ACA (*figure 3*).

Les snoARN à boîtes C/D vont s'associer à la fibrillarine qui est une méthyltransférase et aux protéines accessoires Nop56, Nop58 et la 15.5 K/NHPX pour former les complexes snoRNP à boîtes C/D. Ces complexes catalysent la méthylation des riboses de type « 2' O-méthylation (Nm) ». Les snoARN à boîtes H/ACA vont eux former un complexe snoRNP avec la

pseudouridine synthétase Dyskérine et les protéines accessoires Nhp2, Nop10 et Gar 1 pour introduire la pseudouridylation ( $\Psi$ ) (Watkins and Bohnsack, 2012).

Les snoARN sont impliqués dans le repliement de l'ARNr mais aussi dans les différentes séries de coupures endo et exonucléolytiques aboutissant à la maturation des ARNr (Tafforeau, 2015; Turi et al., 2019).



**Figure 3 : Structures et fonctions des snoARN.** Représentation schématisée des snoARN à motifs H/ACA (a) et à boîtes C/D (b). Les séquences conservées sont colorées en gris et l'ARNr cible en rouge. La base pseudouridylée ou méthylée est indiquée respectivement par un  $\Psi$  (a) ou encerclé en rouge (b) d'après (Watkins and Bohnsack, 2012)

### III. Les maladies associées à la biogénèse du ribosome

#### 1. Les ribosomopathies

La biogénèse du ribosome est un processus vital pour la cellule. Des défauts ne serait-ce que d'un seul composant du ribosome peuvent entraîner des conséquences considérables dans le processus cellulaire. Chez l'homme, le terme « ribosomopathies » regroupe les anomalies liées à des mutations dans les RPs, la voie de maturation de l'ARN ou encore les AFs (Narla and Ebert, 2010; Sondalle and Baserga, 2014). Ces mutations peuvent être de deux types : congénitales ou somatiques (Kampen et al., 2019). Les différentes maladies associées sont définies en fonction des protéines et de l'étape affectée dans le processus de maturation (*figure 4*).

### *a) Les maladies affectants la maturation précoce*

**Treacher Collins Syndrome (TCS)** : est causé par une absence d'activité des deux ARN polymérase (Pol I et III) qui sont dues à des mutations dans les gènes codants pour TCOF1, POLR1C et POLR1D. Ces défauts vont entraîner une baisse de la production des ribosomes matures et donc la diminution de la traduction qui va influencer l'activité de la cellule l'obligeant à entrer en quiescence (Dauwerse et al., 2011)

**Dyskeratosis Congenita (DKC)** : celui-ci est causé par la mutation de DKC1 qui code pour l'enzyme dyskérine responsable de la pseudouridylation des ARNr et des UsnARN. Cette enzyme est associée aux sno- ou scaARN pour former les complexes sno- et scaRNP à boîtes H/ACA impliqués dans la modification des ARNr et des UsnARN (Heiss et al., 1998).

**Bowen-Conradi syndrome (BCS)** : est une maladie causée par la mutation du facteur EMG1 qui est un composant du SSU processome. Il est important pour l'assemblage de la petite SU ainsi que la maturation de l'ARNr 18S (Bernstein et al., 2004)

**Cartilage Hair Hypoplasia (CHH)** : cette maladie est due à une mutation des gènes RMRP (RNase mitochondrial RNA processing complex) qui code pour un long ARN non codant appartenant au complexe RMRP. La mutation dans celui-ci va empêcher la coupure au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNr 5.8S dans l'ITS1 limitant ainsi la maturation des deux ARNr (18S et 5.8S) (Welting et al., 2004)

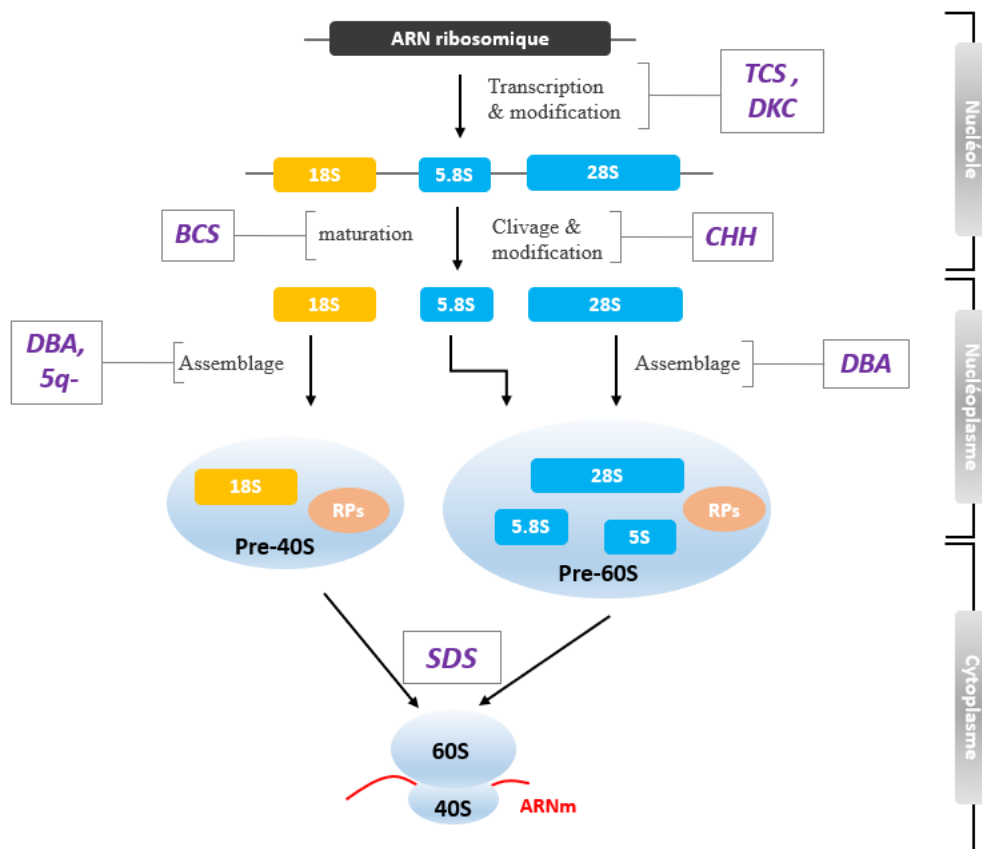
### *b) Les maladies affectants la maturation intermédiaire*

**Diamond Blackfan anemia (DBA)** : celui-ci est due à des mutations dans les RPs. Les premières mutations caractérisées sont celles des protéines RPS19 (eS19) et RPS24 (eS24) qui entraînent une altération de la voie de maturation du précurseur de l'ARN 18S entraînant une diminution de la production de la petite SU. Depuis de nombreuses autres mutations ont été identifiées notamment chez les protéines suivantes: RPL5 (uL18), RPL11 (uL5) et RPS10 (eS10) (Narla and Ebert, 2010).

**5q- syndrome** : cette anomalie est causée par la mutation des gènes codant pour la protéine RPS14 (uS11) qui entraîne une haploinsuffisance de celle-ci. Le déficit en RPS14 entraîne un blocage de maturation de l'ARNr 18S et par conséquent une diminution de la quantité de sous-unité 40S disponible pour traduire les ARNm cellulaires (Ebert et al., 2008)

c) Les maladies affectants la maturation tardive, i.e. l'étape cytoplasmique

**Shwachman Diamond Syndrome (SDS)** : 90% des patients portent une mutation silencieuse dans les gènes SDBS. En effet, le SDBS code pour un des facteurs d'assemblage impliqué dans la maturation cytoplasmique de la grande SU via la dissociation du facteur d'initiation EIF6. Ce dernier s'associe normalement à la grande SU et va la maintenir inactive en empêchant l'association prématurée avec la petite SU. Chez les patients atteints du SDS, la dissociation du facteur EIF6 est empêchée ce qui entraîne un blocage de la maturation (Finch et al., 2011).



**Figure 4 : Ribosomopathies, les différentes maladies associées à chaque étape de la maturation.** Dans le nucléole, les maladies associées à la maturation précoce : TCS (Treacher Collins Syndrome), DKC (Dyskeratosis Congenita), BCS (Bowen-Conradi Syndrome) et CHH (Cartilage Hair Hypoplasia). Dans le nucléoplasme, les maladies associées à la maturation intermédiaire : DBA (Diamond Blackfan Anemia) et 5q- (5q deletion syndrome). Dans le cytoplasme, les maladies associées à la maturation tardive : SDS (Shwachman Diamond Syndrome)

## 2. Relation entre la biogénèse et cancer

L'assemblage du ribosome est étroitement lié à des étapes de contrôle qualité afin d'assurer une production de SU matures et compétentes pour la traduction. Les dérégulations dans la voie de maturation peuvent entraîner une hyper prolifération cellulaire favorisant le développement de certains cancers. Des études ont d'ailleurs mis en évidence l'existence d'une relation directe entre les altérations de la biogénèse du ribosome et le cancer. En effet, on peut constater qu'une augmentation de la synthèse du ribosome est corrélée à une surexpression des oncogènes ou encore à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (*Figure 5*) (Bywater et al., 2012).

### *a) Des exemples d'oncogènes*

Des groupes ont observé la surexpression de certains facteurs impliqués dans la maturation du ribosome et la sévérité des cancers. Par exemple, le gène codant pour la protéine Nob1 (Nin 1 binding protein) a été identifié comme oncogène responsable de l'augmentation du taux de prolifération dans les cellules cancéreuses. La répression de gène de Nob1 inhibe la croissance du cancer ovarien ou encore le gliome (Lin et al., 2012; Lu et al., 2012). D'autres études ont aussi montré la corrélation entre la surexpression de la kinase Rio2 et de Nob1 avec le NSCLC (pour Non-Small Cell Lung Cancer), une forme sévère du cancer du poumon qui est associée à un taux de mortalité élevé dans 90% des cas du cancer du poumon (Liu et al., 2018; Molina et al., 2008). L'adénylate kinase Cinap (human coilin-interacting nuclear ATPase protein), une protéine impliquée dans l'assemblage et le contrôle de la traduction, est un facteur essentiel pour l'embryogenèse et la croissance des cellules tumorales (Bai et al., 2016). Parmi les facteurs surexprimés, on peut aussi retrouver la protéine GPATCH2 (G-patch domain-containing protein 2) qui régule l'activité de l'hélicase Prp43 (pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase) et joue un rôle critique dans le développement des cellules tumorales. D'ailleurs, dans la plupart des cancers du sein, GPATCH2 est surexprimée et des études basées sur le séquençage du génome ont caractérisé cette protéine comme un facteur oncogène (Lin et al., 2009).

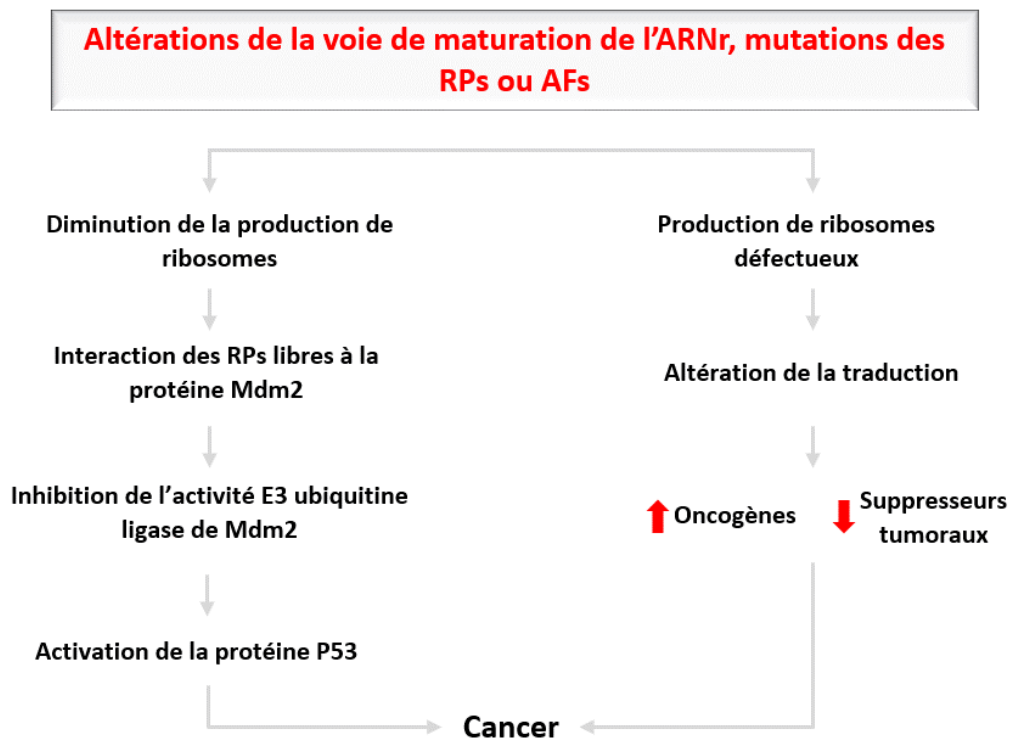
## *b) Activation de p53 dans l'altération de la biogénèse du ribosome*

**P53 dans les cellules normales :** La biogénèse du ribosome est un processus qui consomme énormément d'énergie pour permettre la croissance ainsi que la prolifération cellulaire. Lorsque la voie de maturation des ribosomes est perturbée, les cellules sont obligées d'arrêter leur cycle cellulaire pour éviter une croissance incomplète ou une division non préparée. Ce phénomène est contrôlé par la protéine p53 qui est un suppresseur de tumeur (Turi et al., 2019). Dans les conditions normales, la protéine p53 est exprimée dans la cellule à un taux relativement faible. Après la traduction, la répression de p53 est assurée par une E3 ubiquitine ligase appelée « Mdm2 (pour Murine domain minute 2) » (Haupt et al., 1997; Honda et al., 1997; Michael and Oren, 2003). L'ubiquitinylation de p53 par Mdm2 va donc stimuler l'export nucléaire de p53 puis sa dégradation par le protéasome (Hock and Vousden, 2014). Par ailleurs, l'interaction entre Mdm2 et p53 empêche l'action de p53 pour enclencher l'expression de gènes cibles (Toledo and Wahl, 2006).

**P53 en condition de stress :** La perturbation de la biogénèse du ribosome entraîne une diminution de la quantité de ribosome fonctionnel et l'augmentation de RPs libres dans la cellule. Ceci favorise le recrutement ainsi que l'interaction des RPs avec la protéine Mdm2 qui va perturber l'interaction de cette dernière avec p53. Cette perturbation va donc entraîner une activation de p53 puisque celle-ci n'est plus dégradée (Golomb et al., 2014; Zhang and Lu, 2009). Même si la relation entre la capacité d'interaction avec Mdm2 et l'activation de p53 a été démontrée pour un certain nombre de RPs, les deux RPs composant le 5S RNP jouent un rôle majeur dans l'activation de p53 en réponse au stress. D'ailleurs, cet effet est bien illustré par les études d'inhibition de la Pol I suite à un traitement à l'actinomycine D qui induit une réponse de p53. En absence de RPL5 (uL18) et/ou RPL11 (uL15), la stabilisation de p53 induite par l'actinomycine D est largement inhibée. Cependant le même phénomène n'est pas observé lors de la déplétion des autres RPs (Bursac et al., 2012; Fumagalli et al., 2012).

Malgré les altérations de la voie de maturation, les RPs sont toujours synthétisées et celles-ci sont rapidement dégradées par le protéasome (Bursac et al., 2012; Lam et al., 2007; Warner, 1977). Par contre, les deux protéines RPL5 (uL18) et RPL11 (uL15) peuvent s'accumuler indépendamment du ribosome. En effet, l'assemblage du complexe 5S RNP peut continuer malgré les défauts de synthèse du ribosome et la formation de cette particule est importante pour favoriser l'association entre les deux protéines RPL5 (uL18) et RPL11 (uL15) et la

protéine Mdm2. La formation du complexe 5S RNP peut donc rendre ces protéines plus résistantes à la dégradation (Donati et al., 2013). Ceci explique l'importance de leur rôle dans le point de contrôle dénommé « IRBC » (pour Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint) (Bursac et al., 2012).

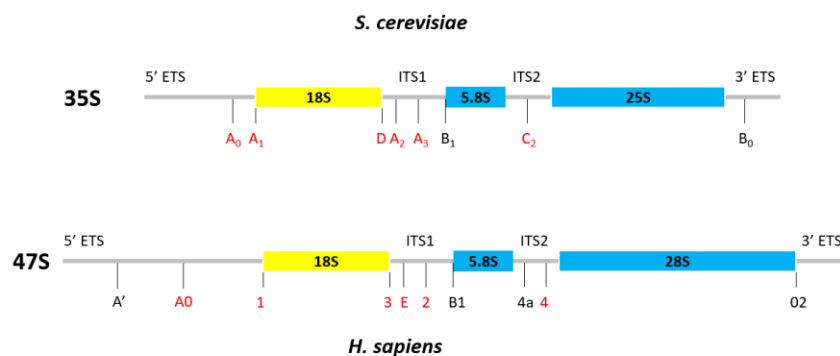


**Figure 5 : Relation entre la biogénèse du ribosome et la prolifération cellulaire.** Les défauts dans l'assemblage peuvent d'une part entraîner une diminution du nombre de ribosome augmentant ainsi le nombre de RPs non incorporés lors de la maturation qui peuvent interagir avec la protéine Mdm2 inhibant son activité et empêche la dégradation de la protéine p53. D'autre part, l'altération peut également entraîner la production de ribosomes défectueux entraînant une activité de traduction importante d'où la surexpression d'oncogènes et l'insuffisance des protéines suppresseurs de tumeur. Les deux cas vont alors favoriser la formation de cellules tumorales.

## IV. La maturation des ARNr chez l'homme et chez la levure

### 1. Des sites de maturations conservés

Durant la maturation des ARNr, les séquences dénommées espaceurs externes (ETS) et espaceurs (ITS) internes vont être éliminées par des réactions de coupure endo et exonucléolytiques (Henras et al., 2015; Tomecki et al., 2017). Chez la levure, l'élimination de l'extrémité 5'ETS et la coupure de la séquence ITS1 se fait principalement durant la transcription du pré-ARNr 35S tandis que chez l'homme, la majorité de la maturation se fait après la transcription (Lazdins et al., 1997). Malgré ces différences, des études ont montré que les sites identifiés chez la levure sont aussi présents chez l'homme. En effet, chez la levure, les sites (A<sub>0</sub> et A<sub>1</sub>) localisés dans l'extrémité 5' ETS vont correspondre aux sites (A<sub>0</sub> et 1) chez l'homme. Dans la séquence interne (ITS1), les sites de clivage D, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> sont également conservés et correspondent aux sites 3, E et 2 chez l'homme. Enfin le site C<sub>2</sub> de l'ITS2 du pré-ARNr 35S a une séquence analogue correspondant au site 4 chez l'homme. De même, certaines enzymes responsables des coupures de ces sites sont également conservées : Utp23 pour A<sub>0</sub>/A<sub>0</sub> ; Utp24 pour les sites A<sub>1</sub>/1 et A<sub>2</sub>/E ; Nob1 pour le site D/3 ; la RNase MRRP (RMRP) pour le site A<sub>3</sub>/2 et enfin l'enzyme Las1 pour le site C<sub>2</sub>/4 (Figure 6) mais il peut y avoir des exceptions (Fatica et al., 2003; Gasse et al., 2015; Goldfarb and Cech, 2017; Preti et al., 2013; Schmitt and Clayton, 1993; Sloan et al., 2013; Tomecki et al., 2015; Wells et al., 2016).



**Figure 6 : Représentation schématique des pré-ARNr de la levure (*S. cerevisiae* 35S) et de l'homme (*H. sapiens* 47S).** Les sites de clivage conservés dans les deux organismes sont représentés en rouge. Le pré-ARNr 47S est plus long et possède deux sites de clivages additionnels : A' (ou 01) et 4a.

## 2. La maturation de la séquence primaire pré-ARNr 35S chez la levure

En général, la maturation commence par la coupure du pré-ARNr 35S par l'enzyme Rnt1 pour générer l'extrémité 3' du transcrit primaire (Kufel et al., 1999). La coupure peut ensuite s'effectuer sur les sites A<sub>0</sub> ou A<sub>1</sub> dans l'extrémité 5' ou le site A<sub>2</sub> localisé dans la séquence espaceur interne ITS1. Ces différents intermédiaires peuvent tous être observés chez la levure. L'extrémité 5' est éliminée en deux étapes : une coupure au niveau du site A<sub>0</sub> qui aboutit à la formation du 33S puis une coupure au niveau du site A<sub>1</sub> qui va générer l'intermédiaire 32S (Beltrame and Tollervey, 1992; Hughes and Ares, 1991). La coupure au niveau du site A<sub>2</sub> va scinder le précurseur 32S en deux : 20S et 27S A<sub>2</sub> séparant ainsi la maturation des deux SU (Udem and Warner, 1972). La coupure qui entraîne la séparation de la maturation peut aussi être effectuée par la RNase MRP qui va couper l'ARNr au niveau du site A<sub>3</sub> aboutissant à la formation des deux précurseurs : 21S et 27S A<sub>3</sub> (Lygerou et al., 1996). Le pré-ARNr 20S va être empaqueté dans la particule 43S tandis que le 27S A<sub>2</sub> est trouvé dans le 66S (Trapman et al., 1975; Udem and Warner, 1973). La particule pré-43S est rapidement exportée dans le cytoplasme, où le pré-ARNr 20S va subir une coupure endonucléolytique pour éliminer la séquence correspondant à l'ITS1 (Fatica et al., 2003). Comparée à la voie de maturation du pré-43S, celle de la particule pré-66S est plus complexe et plus longue et va continuer dans le nucléoplasme. Le pré-ARNr 27S A<sub>2</sub> peut suivre deux voies de maturation alternatives.

- **La voie majoritaire**

Dans cette voie majoritaire (80%), le précurseur est réduit en 27S A<sub>3</sub> par une réaction endonucléolytique assurée par la RMRP au site A<sub>3</sub> (Chu et al., 1994; Lindahl et al., 1992; Lygerou et al., 1996; Schmitt and Clayton, 1993; Shuai and Warner, 1991). La séquence qui correspond à l'ITS est ensuite éliminée du pré-ARNr 27S par les exonucléases Rat1 et Rrp17 qui s'arrêtent au niveau du site B<sub>1S</sub> pour former l'extrémité 5' du pré-ARNr 27S B<sub>1S</sub> (Henry et al., 1994; Oeffinger et al., 2009).

- **La voie minoritaire**

La voie minoritaire (15%) où le pré-ARNr 27S est directement coupé au niveau du site B<sub>1L</sub> qui aboutit à la formation du pré-ARNr 27S B<sub>1L</sub>. Les deux formes 27S B<sub>1S</sub> et 27S B<sub>1L</sub> vont ensuite subir la même réaction de maturation dans la séquence correspondante à l'ITS2 au niveau du site C<sub>2</sub>, ce qui va aboutir aux précurseurs 25.5S et 7S<sub>S</sub> ou 7S<sub>L</sub>. Par la suite, l'extrémité 5' du

25.5S est rognée par Rat1 pour former l'ARNr 25S mature (Geerlings et al., 2000; Lygerou et al., 1996). L'extrémité 3' du 7S va continuer sa maturation par plusieurs étapes pour produire les deux formes matures de l'ARNr 5.8S (5.8S<sub>S</sub> et 5.8S<sub>L</sub>) qui diffèrent de 6 nt au niveau de leur extrémité 5' (Henry et al., 1994; Mitchell et al., 1996). Ces deux formes d'ARNr 5.8S sont présentes dans les ribosomes et toutes les deux sont fonctionnelles. Cette hétérogénéité est d'ailleurs conservée chez les eucaryotes supérieurs (Woolford and Baserga, 2013) (Figure 7).

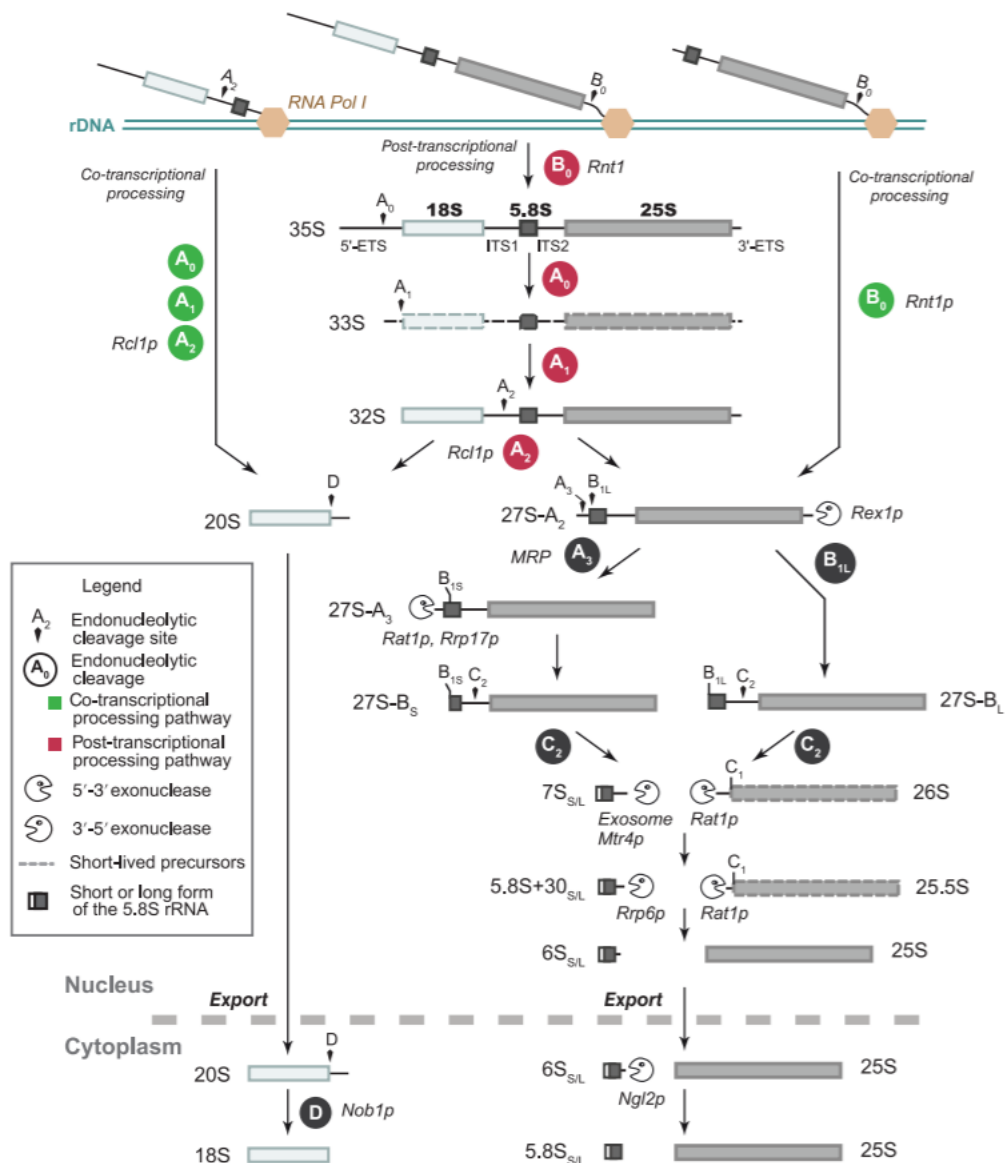


Figure 7 : Représentation schématique de la voie de maturation des ARNr (18S, 5.8S et 25S) chez la levure avec les sites de clivage et les enzymes responsables des réactions endo et exonucléolytiques d'après (Henras et al., 2015)

### 3. La maturation de l'ARNr 18S chez l'homme

La maturation de l'ARNr 18S débute par la coupure au niveau des sites A' et 02 ce qui va aboutir à la formation du pré-ARNr 45S (Prete et al., 2013; Tafforeau, 2015). Par la suite, deux voies de maturation alternatives peuvent exister.

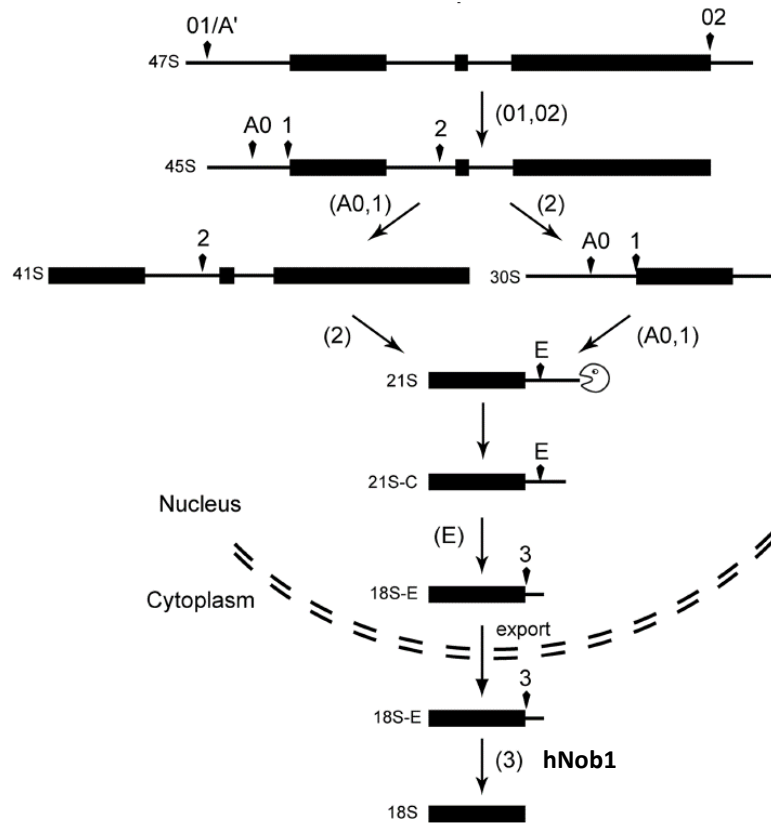
- **La voie majoritaire**

Le précurseur va subir une coupure au niveau du site 2 de l'ITS générant les deux intermédiaires 30S et 32S qui sont respectivement les précurseurs de la petite et la grande SU. L'extrémité 5' ETS va être éliminée par un couplage de coupure au niveau des sites A0 et 1 ce qui va donc générer l'intermédiaire 21S qui sera raccourci en 3 étapes par des exonucléases (3'→5') aboutissant à la formation du 21S-C. Le 21S-C va ensuite subir une coupure au niveau du site E aboutissant à la forme 18S-E. Cet intermédiaire est exporté dans le cytoplasme où il va subir une dernière coupure au niveau du site 3 aboutissant à l'ARNr 18S mature (Montellese et al., 2017; Prete et al., 2013).

- **La voie minoritaire**

Cette voie commence par l'élimination de l'extrémité 5' ETS par des réactions endonucléolytiques au niveau des sites A0 et 1. Celles-ci vont générer un précurseur appelé pré-ARNr 41S qui va subir une seconde coupure au niveau du site 2 et génère les deux intermédiaires 21S et 32S qui vont suivre la voie de maturation classique citée précédemment.

Comparée à la levure, la maturation nucléaire de l'ARNr 18S chez l'homme est plus complexe et des études ont montré que l'on peut observer différents intermédiaires avant l'export cytoplasmique. Cependant la maturation finale de l'ARNr 18S reste similaire puisque dans les deux cas la formation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S nécessite l'élimination du reste de la séquence correspondant à l'ITS1 qui est catalysée par l'endonucléase Nob1 au niveau du site D chez la levure et du site 3 chez l'homme. (*Figure 8*)



**Figure 8 : Représentation schématique de la voie de maturation de l'ARNr 18S chez l'homme d'après (Preti et al., 2013)**

#### 4. Modifications des ARNr

Une des caractéristiques des ARNr est la présence de modifications chimiques qui sont principalement localisées sur les bases des nucléotides impliqués dans la formation des centres fonctionnels du ribosome comme par exemple le site PTC, le site de décodage ou encore l'interface d'interaction entre les deux SU (Decatur and Fournier, 2002; Polikanov et al., 2015; Sloan et al., 2016a). Ces modifications sont impliquées dans le maintien de la stabilité structurale ainsi que dans la régulation de la fonction du ribosome.

La cartographie des sites de modifications des ARNr chez la levure et chez l'homme a montré qu'il existe respectivement 112 et 228 bases modifiées dans les séquences des ARNr. Récemment, des analyses structurales du ribosome humain ont permis de visualiser ces modifications (*Figure 9*) (Carlile et al., 2014; Krogh et al., 2016; Natchiar et al., 2017; Ofengand and Bakin, 1997; Piekna-Przybylska et al., 2008; Taoka et al., 2016, 2018). Chez les



Chez la levure, il peut exister des modifications indépendantes des snoRNP. C'est le cas de la modification 2'O-méthylation dans l'ARN 25S qui est assurée par l'enzyme Sbp1 (Lapeyre and Purushothaman, 2004). Cependant la déplétion de la protéine FTSJ3 qui est son homologue humaine peut aussi entraîner des défauts dans la maturation de la petite SU. Ces observations peuvent donc suggérer que cette enzyme possède des fonctions distinctes chez l'homme (Morello et al., 2011). En raison des appariements de bases nécessairement formés entre les snoARN et leur substrat, la majorité des modifications guidées par les snoARN est effectuée durant les étapes précoces de la biogénèse lorsque la structure du pré-ribosome est dans un état dit « ouvert », i.e. où les régions d'interaction entre les snoARN et les pré-ARNr sont disponibles. Si la majorité des modifications tant chez l'humain que chez la levure est principalement introduite pendant la transcription, certaines de ces modifications restent encore à déterminer (Bohnsack and Bohnsack, 2019).

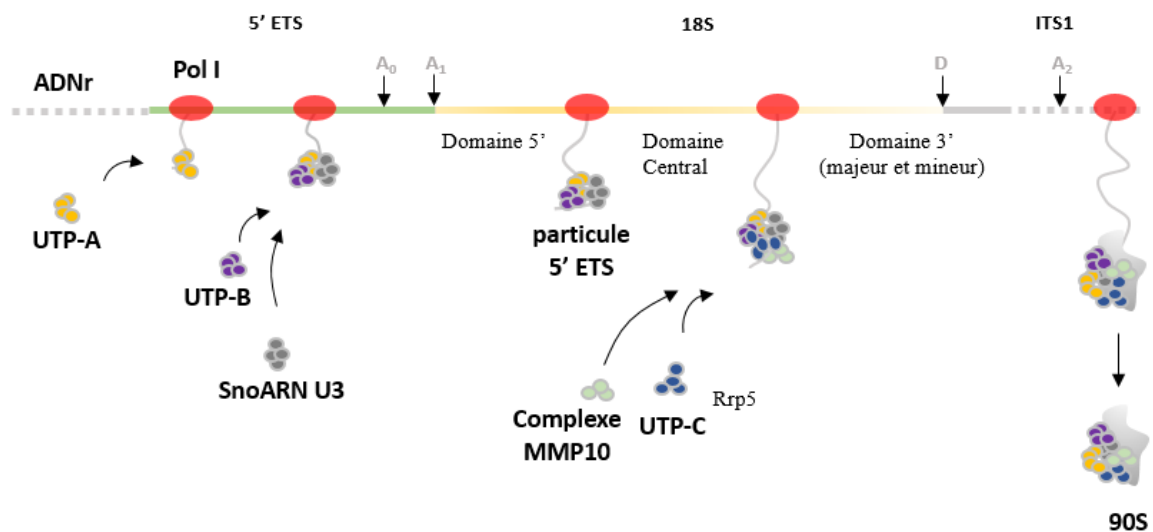
Le fait que le nombre de modifications est deux fois plus important chez l'homme que chez la levure peut être dû à la taille des ribosomes humains mais pourrait aussi refléter une régulation plus importante de l'expression des gènes par les modifications des pré-ARNr (Piekna-Przybylska et al., 2008; Sloan et al., 2016a; Taoka et al., 2016, 2018).

## V. Le mécanisme d'assemblage d'un point de vue structural

### 1. Formation de la particule pré-90S

La particule pré-90S est une structure à multiple sous-unités qui suit un protocole d'assemblage très hiérarchisé (Pérez-Fernández et al., 2007). Celle-ci constitue le premier intermédiaire formé lors du processus d'assemblage du ribosome (Phipps et al., 2011; Thomson et al., 2013). L'assemblage se fait concomitamment avec la transcription et le grand précurseur nouvellement synthétisé subit directement des modifications de type Nm ou  $\Psi$  qui sont assurées par les snoARN par appariement de bases avec les ARNr (Watkins and Bohnsack, 2012). Le grand précurseur va également subir différents repliements qui sont assurés par des chaperonnes et les snoARN vont être dissociés de la séquence grâce à l'action des hélicases (Martin et al., 2013; Rodríguez-Galán et al., 2013). La maturation précoce est également caractérisée par l'association co-transcriptionnelle des facteurs d'assemblage au pré-ARN

transcrit. L'association de ces facteurs va permettre de structurer le pré-ARNr et ainsi favoriser la formation des sous-domaines caractéristiques des SU du ribosome. Les U3 snoRNP ainsi que les complexes UTPs sont les premiers modules à s'associer au grand précurseur. Les études structurales ainsi que la caractérisation de ces complexes ont montré que le complexe UTPA est le premier à être recruté dans le processus d'assemblage qui est directement suivi par l'association du complexe UTPB et des snoARN U3. Récemment, des études structurales ont permis de visualiser l'organisation de ces complexes (Barandun et al., 2017; Chaker-Margot et al., 2017; Cheng et al., 2017; Hunziker et al., 2016; Sun et al., 2017). Ces deux modules vont s'associer au niveau de l'extrémité 5' qui contient la région flanquant 5' ETS ainsi que la séquence mature de l'ARNr 18S. Le complexe formé est ensuite rejoint par le complexe MMP10 (qui contient les protéines Mpp10–Imp3–Imp4–Utp3/Sas1) mais aussi du module UTPC (Granneman et al., 2003; Sá-Moura et al., 2017). Ces complexes vont contribuer au repliement de l'ARN et au recrutement des premières RPs (qui sont principalement des protéines constituant la petite SU) ainsi que les AFs (*Figure 10*).



**Figure 10 : Formation de la particule pré-90S.** Représentation schématique de la maturation précoce de la séquence primaire pré-35S. La synthèse du précurseur est assurée par l'ARN polymérase I (Pol I) (rouge). L'assemblage se fait de manière co-transcriptionnelle. La transcription de l'extrémité 5' ETS aboutit à la formation de la particule 5' ETS. La transcription continue le long de l'ADNr et la synthèse dans les régions constituant l'ARNr 18S entraîne le recrutement d'autres modules et facteurs. La formation de la particule 90S est effectuée lorsque toute la séquence de l'ARNr 18S est synthétisée.

L'architecture de la particule pré-90S obtenue chez les champignons (*S. cerevisiae* et *C. thermophilum*) a montré les différents traits caractéristiques de la future petite SU comme les composantes protéiques organisées autour du futur ARNr 18S (Barandun et al., 2017, 2018; Chaker-Margot et al., 2017; Cheng et al., 2017, 2019; Kornprobst et al., 2016; Sun et al., 2017). Les différents modules vont former un bloc qui va couvrir le précurseur de l'ARNr 18S. Ceci va permettre de protéger le précurseur de la dégradation et aider à son repliement et à sa maturation. La plupart des éléments des domaines de l'ARNr est bien organisée contrairement à celui du domaine majeur 3' qui est totalement différent de son organisation mature ce qui montre que la maturation est hiérarchisée avec une orientation dans le sens 5' → 3' (Biedka et al., 2018; de la Cruz et al., 2015; Pillet et al., 2017; Zhang et al., 2016).

Le complexe contenant le snoARN U3 joue un rôle important dans l'organisation puisqu'il va stimuler le repliement ainsi que les différentes modifications de l'ARN et bloque la particule précoce pré-90S dans un état intermédiaire pour donner le temps nécessaire à la maturation avant le relargage de la séquence 5' ETS et la formation de la structure centrale appelée « pseudo-knot » (Chaker-Margot et al., 2017; Cheng et al., 2017; Kornprobst et al., 2016; Kressler et al., 2017). Cette structure est nécessaire pour que les différentes régions de l'ARNr 18S puissent s'interconnecter. Une coupure interne va dissocier les précurseurs de chaque SU qui vont procéder à leur maturation de manière indépendante, dans le nucléole puis dans le nucléoplasme jusqu'à leur réassociation dans le cytoplasme après la maturation finale (Heuer et al., 2017; Pelletier et al., 2018; Thomson et al., 2013).

Comme mon projet de thèse est principalement focalisé sur la maturation de la petite SU, je m'attacherai donc à décrire les événements d'assemblage de la petite SU mais il existe des revues qui décrivent le processus de maturation de la grande SU (Chaker-Margot and Klinge, 2019; Konikkat and Woolford, 2017).

## 2. La maturation de la petite SU

La maturation nucléaire de la petite SU se fait en parallèle avec la formation du pré-90S. En effet, du fait que la transcription s'effectue dans le sens 5' → 3', le premier fragment à être synthétisé est donc le précurseur de l'ARNr 18S qui est mûri de manière co-transcriptionnelle (Barandun et al., 2018). Contrairement à la grande SU où les intermédiaires d'assemblage nucléaires sont bien caractérisés, ceux de la petite SU restent méconnus. D'ailleurs la transition

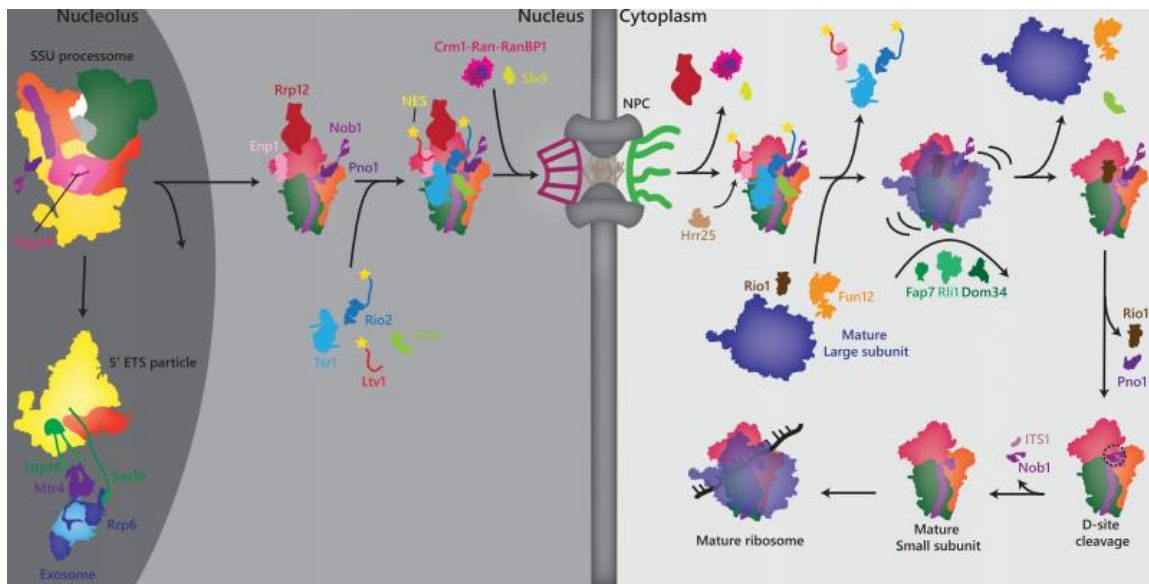
de la particule 90S vers le pré-40S n'est pas bien caractérisée et jusqu'à ce jour, aucune structure de l'intermédiaire nucléaire (pré-43S) n'a été reportée. Malgré l'identification d'un nombre important de facteurs ainsi que leur ordre d'action, comment les étapes d'assemblage cytoplasmiques et nucléaires sont coordonnées restent donc à déterminer (Schütz et al., 2014). Les données disponibles peuvent toutefois indiquer que la transition vers la particule 40S est reliée à la dissociation des modules composant le SSU processome (la particule 5' ETS) et cette étape nécessite les activités de certains enzymes (Chaker-Margot, 2018). Des études ont également montré que l'hélicase Dhr1 joue un rôle dans la transition 90S vers l'intermédiaire pré-40S (Cheng et al., 2017; Sardana et al., 2015). Le recrutement de la protéine UTP14 va entraîner l'activation de Dhr1. La fonction hélicase de cette dernière permet ensuite de dissocier le SnoARN U3 de la séquence du pré-ARNr (Sturm et al., 2017). Il existe aussi des données montrant que cette transition est corrélée à la dégradation de l'extrémité 5' ETS par l'exosome (Panse and Johnson, 2010; Kornprobst et al., 2016).

### 3. Export nucléaire du pré-40S

La coupure au niveau du site A<sub>2</sub> entraîne la dissociation des deux précurseurs (LSU et SSU) qui vont chacun continuer leur maturation le long de la cellule. Dans le cytoplasme, les deux SU vont effectuer leur maturation finale et enfin se réassocier pour former le ribosome mature (Gerhardy et al., 2014). Les analyses des compositions de l'intermédiaire pré-40S ont montré que cette particule contient l'ARN précurseur 20S et quelques AFs. Les facteurs observés sont principalement associés au pré-ribosome 40S ce qui suggère que la transition de la particule précoce vers le pré-40S, est probablement marquée par de nombreux échanges de facteurs d'assemblage (Schäfer et al., 2003). Les RPs constituant le domaine majeur 3' sont également recrutées.

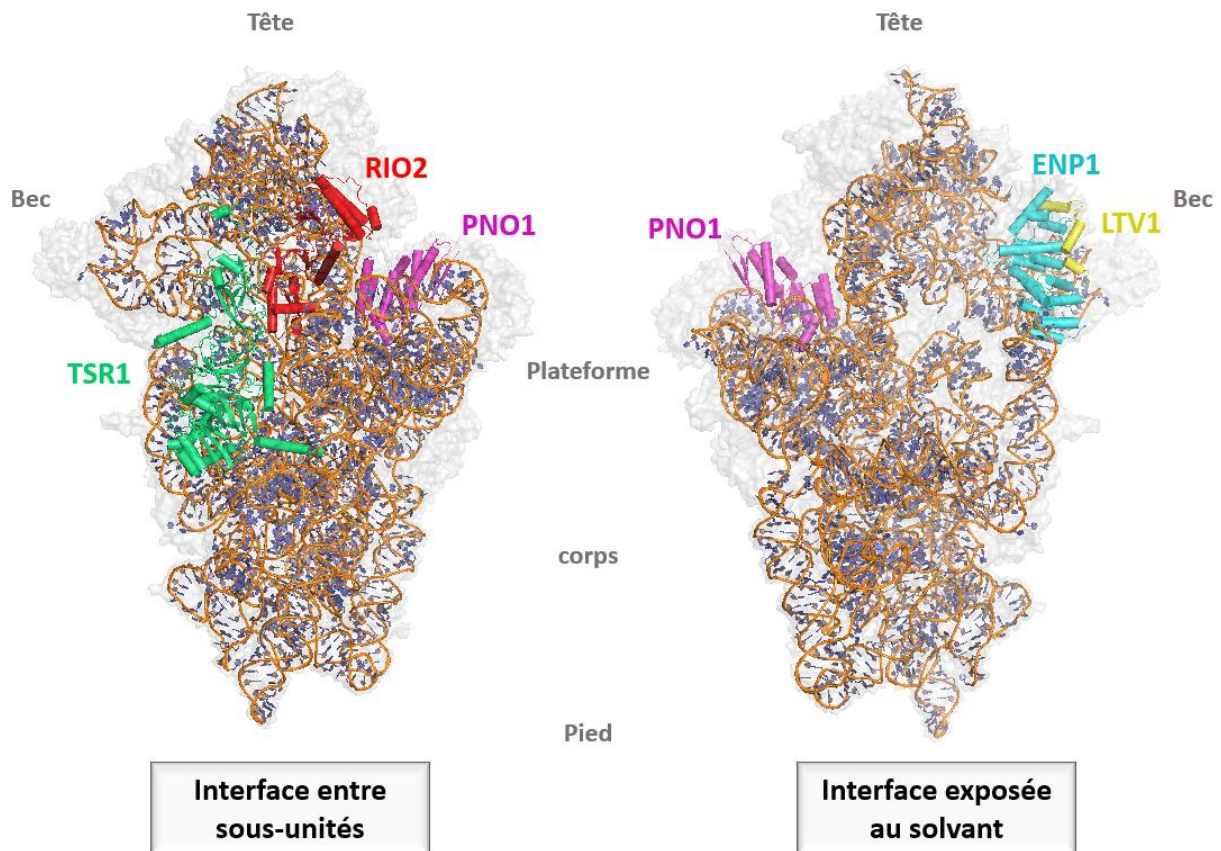
Les pré-40S vont rapidement migrer dans le cytoplasme à travers des NPC pour terminer leur maturation. L'export cytoplasmique est bien régulé puisque seules les particules arrivées à un stade de maturation suffisant c'est à dire celles qui possèdent les couples de RPs RPS15/RPS18 (us19/us13) et RPS5/RPS28 (es25/es28) vont être transportées dans le cytoplasme (Ban et al., 2014; Ferreira-Cerca et al., 2005; Léger-Silvestre et al., 2004). La migration vers le cytoplasme nécessite également l'association de multiples facteurs d'export qui vont faciliter la translocation du pré-40S. Les séquences NES (Nuclear Export Signals) présentes dans les AFs sont reconnues par des exportines (Crm1/Xpo1 pour Chromosome region maintenance 1 ou

exportin 1) et l'export se fait par le biais des RAN-GTPases (Monecke et al., 2014; Sloan et al., 2016b ; Nerurkar et al., 2015) (Figure 11).



**Figure 11 : Représentation de la voie de maturation de la petite SU ribosomique chez les eucaryotes d'après (Margot-Chaker et al., 2018).** La maturation commence dans le nucléole avec la formation du SSU processome. La particule pré-40S continue sa maturation dans le noyau puis sa translocation dans le cytoplasme est assurée par des facteurs d'export au travers des pores nucléaires (NPC). Après la dissociation de nombreux facteurs dans le cytoplasme, la particule pseudo-80S est formée puis la dissociation des deux particules (LSU et pré-40S) entraîne la coupure du site D aboutissant à la formation de la petite SU (40S)

Les particules pré-40S cytoplasmiques contiennent six AFs tardifs. Des analyses structurales ont montré que la future interface d'interaction à la grande SU contient les facteurs Tsr1, Nob1, Pno1, Dim1 et Rio2 qui sont localisés exactement entre les deux domaines connectant le corps avec la tête de la petite SU. Dans la surface exposée au solvant, les facteurs Ltv1 et Enp1 vont eux se positionner au niveau du bec (Figure 12). La maturation cytoplasmique est liée à la dissociation séquentielle des AFs tardifs et les premiers facteurs relâchés correspondent à Ltv1 et Enp1 tandis que Nob1 et Pno1 vont rester et seront rejoints par la kinase Rio1 pour assurer la maturation finale de l'ARNr 18S (Ghalei et al., 2015; Hector et al., 2014; Strunk et al., 2012).



**Figure 12 : Position relative de certains facteurs d'assemblage (AFs) cytoplasmique dans l'architecture du pré-40S chez la levure (PDB ID 6FAI (Scaiola et al., 2018)).** TSR1 (Vert) se lie à la particule pré-40S au niveau du futur site occupé par les facteurs de la traduction, RIO2 (Rouge) se trouve entre les deux régions formant la tête et le corps, PNO1 (Rose) se localise au niveau de la plateforme, ENP1 (cyan) interagit directement avec un fragment de LTV1 (jaune). Les deux facteurs se localisent au niveau du bec. Le pré-ARN 18S est représenté en orange

## VI. Situation du sujet

### 1. La maturation finale de l'ARNr 18S

Les évènements de maturation cytoplasmique concernent principalement la région 3' du pré-ARNr 18S. Les remaniements structuraux vont être coordonnés avec l'incorporation des dernières RPs et la coupure de l'extrémité 3' du précurseur de l'ARNr 18S aboutissant à sa forme mature (Panse, 2011; Panse and Johnson, 2010). Cette dernière est catalysée par l'endonucléase Nob1 au niveau du site D (site 3 chez l'homme) (Fatica et al., 2003; 2004;

Lamanna and Karbstein, 2009, 2011). Bien que des spécificités existent chez les organismes eucaryotes supérieurs, la coupure du site D est un mécanisme conservé. C'est une coupure séquence spécifique où Nob1 va reconnaître une partie de la région 3' pour ensuite effectuer sa fonction. La coupure se fait après l'adénosine située en position 1800 de l'ARNr 18S et précédées par une uridine.

Les données disponibles ont montré que des facteurs tels que Prp43, Rio2, Ril1, Fap7, Rio1 et Pno1 sont impliqués dans l'étape de coupure (Geerlings et al., 2003; Granneman et al., 2005; Hellmich et al., 2013; Pertschy et al., 2009; Strunk et al., 2012; Vanrobays et al., 2003). Les RPs RPS14 (uS11) et RPS26 (uS26) sont également impliquées dans la maturation finale de l'ARNr 18S. Des études ont aussi montré que Nob1 n'est activé que lorsque les deux SU vont s'associer pour former un complexe pseudo-80S (qui est dépourvu de tous facteurs de la traduction et sert de contrôle qualité) (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012).

Parmi les facteurs/RPs impliqués dans la coupure, certains d'entre eux ont été utilisés dans mon projet de thèse et la partie suivante correspond donc à la description de ces protéines : Rio1, RPS14, RPS26, Cinap, Nob1 et Pno1.

## 2. Les acteurs de la maturation très tardive de l'ARNr 18S

### a) *Rio1 kinase (Rio pour Right Open reading frame one)*

Rio1 appartient à une famille atypique de kinase qui regroupe trois autres sous familles : Rio2, Rio3 et RioB (Ferreira-Cerca et al., 2014; Kubiński and Masłyk, 2017). Les quatre membres de la famille des kinases Rio sont conservés durant l'évolution et présents dans les trois règnes du vivant (Esser and Siebers, 2013; LaRonde, 2014; LaRonde-LeBlanc and Wlodawer, 2005)

Concernant l'aspect fonctionnel, Rio1 est impliquée dans différents processus cellulaires dont la maintenance des chromosomes, la progression du cycle cellulaire ou encore la prolifération ce qui inclut la biogénèse du ribosome. En effet, Rio1 est nécessaire pour la maturation cytoplasmique tardive de la petite SU. Celle-ci est impliquée dans la maturation de l'ARNr 18S. Des études effectuées chez la levure ont montré que la déplétion de cette kinase entraîne

une forte accumulation du précurseur 20S et par conséquent une diminution importante du taux d'ARNr 18S mature conduisant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire (Vanrobays et al., 2001).

Cette protéine intervient donc tardivement dans la voie d'assemblage du ribosome. Son arrivée déclenche la dissociation des deux facteurs Ltv1 et Rio2 de la particule pré-ribosomique. En effet, il y a un encombrement stérique entre Rio1 et le positionnement des protéines Ltv1 et Rio2 sur les particules pré-40S tardives. Ceci explique pourquoi seule la présence de Rio1 est suffisante pour dissocier les deux autres facteurs (Widmann et al., 2012).

Du point de vue de son organisation dans l'architecture du pré-40S, Rio1 est recrutée sur la particule pré-ribosomique via sa partie C-terminale qui va lui permettre de former des interactions avec les différents hélices h27, h44 et h45 du l'ARNr 18S. Le même site d'interaction est préalablement occupé par le facteur Ltv1 puis ultérieurement par la protéine ribosomale RPL41 (eL41) dans le ribosome mature (Widmann et al., 2012). D'ailleurs dans la structure du pré-40S humain, la position des deux facteurs Pno1 et Rio1 qui seront déplacés respectivement par les protéines ribosomales eS26 et eL41 entraîne un décalage de l'extrémité 3' de l'ARN 18S mais aussi un état non mature de l'hélice h44 (Ameismeier et al., 2018).

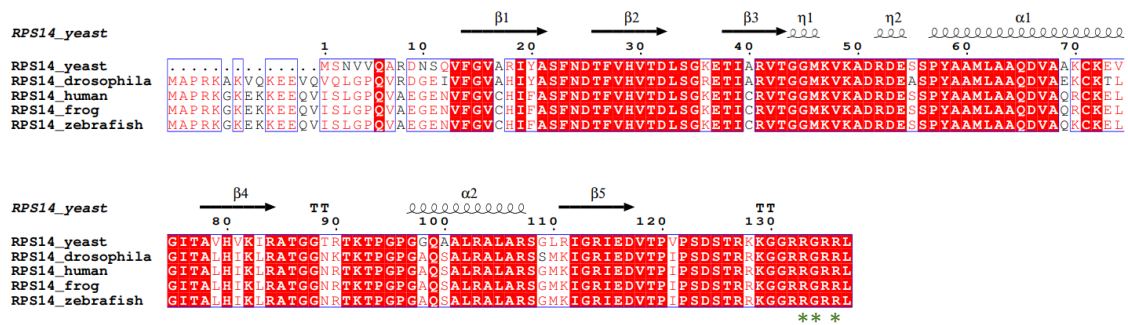
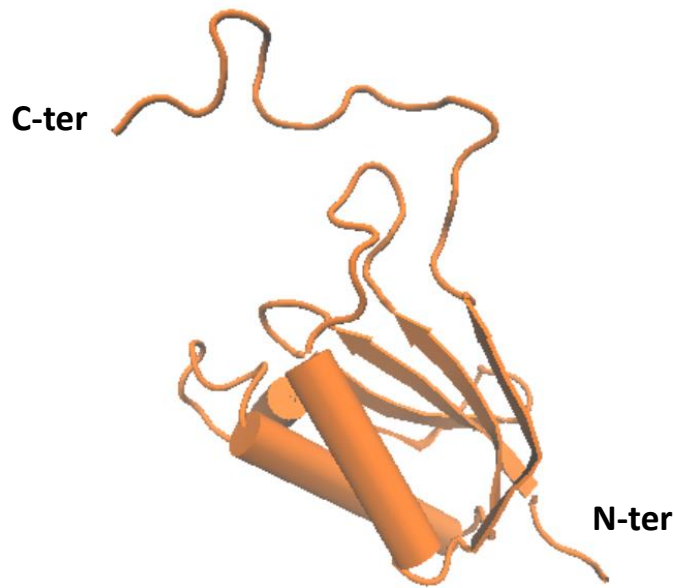
La kinase Rio1 fait partie des derniers facteurs à s'associer à la particule pré-ribosomique. En effet, elle fait partie des facteurs qui s'associent à la structure pseudo-80S avec le complexe Nob1/Pno1. Rio1 est une kinase atypique, chez l'homme son activité kinase est essentielle pour le recyclage de l'endonucléase Nob1 et de son partenaire Pno1 de la particule pré-40S cytoplasmique ainsi que de leur translocation dans le noyau (Widmann et al., 2012). Son activité ATPase quant à elle est importante pour son recrutement à la particule pré-ribosomique ainsi que pour la stimulation de la coupure au niveau du site D (Ferreira-Cerca et al., 2014; Turowski et al., 2014). Des études effectuées chez la levure ont également montré que la déplétion de celle-ci pouvait empêcher la dissociation des facteurs Tsr1, Nob1, son partenaire Pno1 ainsi que de l'homologue de Cinap (Fap7) dans la particule ribosomique pseudo-80S (Ferreira-Cerca et al., 2014).

## b) RPS14 (pour Ribosomal protein Small 14)

RPS14 (us11) est une protéine ribosomique composante de la petite SU. C'est une protéine relativement petite d'environ 15 kDa qui est riche en résidus basiques, une caractéristique des RPs permettant de mieux accommoder des interactions avec les groupements phosphates des nucléotides constituant les ARNr. RPS14 est co-purifiée avec les particules pré-90S mais aussi avec le pré-40S (Dragon et al., 2002; Schäfer et al., 2003). Elle est impliquée dans la maturation du ribosome. Lorsque la synthèse de RPS14 est stoppée, les protéines destinées à constituer la petite SU sont synthétisées mais directement dégradées. Le précurseur pré-35S est transcrit cependant la transition pré-20S vers un ARNr 18S mature ne peut pas s'effectuer et les ARNr sont rapidement dégradés sans pour autant affecter le processus de maturation de la grande SU (Moritz et al., 1990). Les mutations de certains résidus (R134A, G135A, et R137A) dans la partie carboxy-terminale de RPS14 entraînent une accumulation de l'intermédiaire pré-ARNr 20S (Figure 13) (Granneman et al., 2005).

Dans l'architecture du ribosome, la partie globulaire de RPS14 se lie à l'ARNr 18S en reconnaissant l'hélice 23 et sa partie carboxy-terminale interagit avec l'hélice 45 qui est proche de l'extrémité 3' du 18S (Ben-Shem et al., 2011; Rabl et al., 2011). Dans le cadre des particules pré-ribosomiques, RPS14 est localisée au niveau de la plateforme, elle est complètement enfouie et reconnaît la tige boucle de l'hélice 23 tandis que 6 des 7 résidus basiques de sa partie C-terminale forment des ponts salins avec les groupements phosphates présents dans les hélices 24 et 45 proches du site de coupure de Nob1 (Sturm et al., 2017).

Dans la particule pré-90S, celle-ci est localisée proche de Krr1 au niveau de la future plateforme. Dans la particule tardive, Krr1 est remplacée par Pno1 et l'on peut retrouver RPS14 associée à Pno1 (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018; Sturm et al., 2017). Si ces interactions sont principalement observées dans des particules pré-ribosomiques, des expériences d'interaction *in vitro* ont également montré l'existence d'une interaction entre RPS14 et l'endonucléase Nob1 (Campbell and Karbstein, 2011). Elle est aussi capable de lier la protéine Cinap (ou Fap7) et l'interface de reconnaissance entre ces deux protéines est très similaire à la surface d'interaction de RPS14 avec l'ARNr 18S (Bai et al., 2016; Hellmich et al., 2013; Loch et al., 2014). Cette protéine stimule l'activité ATPase de Cinap et est impliquée dans le recrutement de RPS26 (Peña et al., 2016).



**Figure 13 : La protéine RPS14 (uS11).** (Haut) Modèle de la protéine RPS14 d'après la structure du ribosome eucaryote (PDB ID : 4V7R (Ben-Shem et al., 2010)). (Bas) Conservation de séquence de la protéine RPS14 chez les eucaryotes montrant un domaine structuré « corps » et une région C-terminale désordonnée. Les résidus (R134, G135 et R137) sont représentés par un (\*)

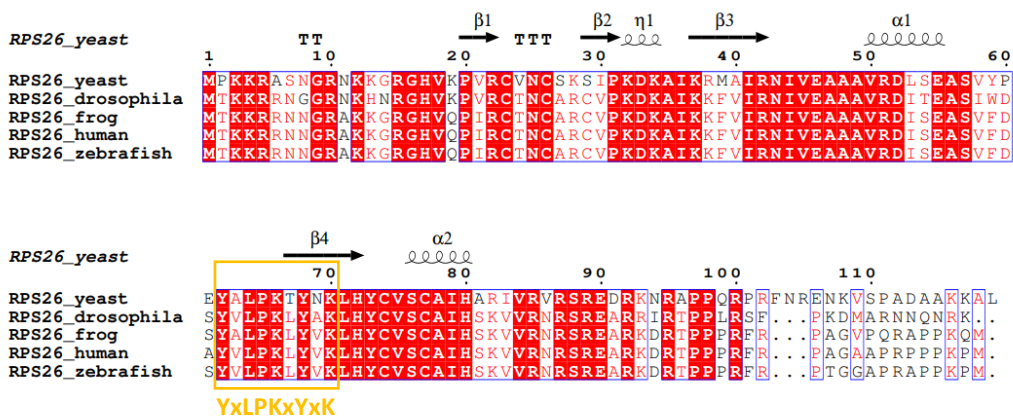
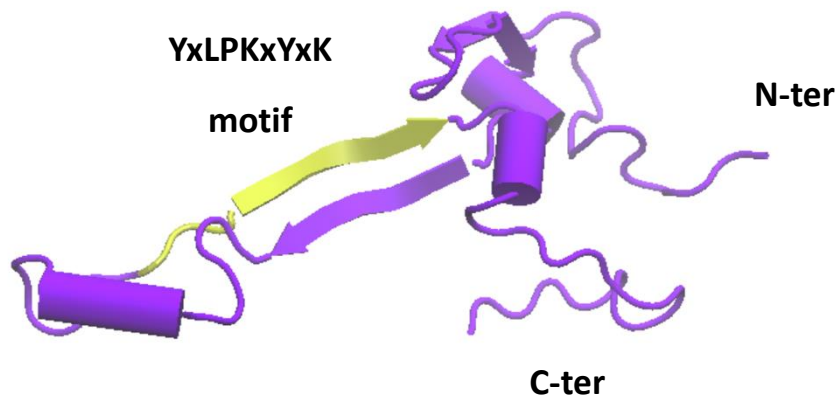
### c) *RPS26 (pour Ribosomal protein Small 26)*

RPS26 (ou es26) est une composante de la petite SU qui fait environ 14 kDa, très riche en résidus basiques. Les analyses de séquences ont montré que la protéine RPS26 possède un motif conservé appelé « Y62-K70 » (fragment qui s'étend du résidu 62 à 70), spécifique aux eucaryotes. Ce motif est localisé dans un feuillet  $\beta$  antiparallèle (*Figure 14*). De plus ce motif est important pour la reconnaissance de l'ARNm lors de la traduction mais aussi pour l'assemblage des deux SU. Chez les eucaryotes, la mutation d'une Alanine localisée dans ce segment affecte la croissance cellulaire et l'accumulation des deux SU sous forme libre (Belyy et al., 2016).

Chez la levure, il existe deux copies de la protéine RPS26 (a et b) qui sont respectivement localisées au niveau des chromosomes 7 et 5. Ces deux isoformes diffèrent dans leur partie carboxy-terminale par deux résidus E106 et D113 qui sont respectivement mutés en Aspartate et Alanine dans la protéine RPS26b.

Cette protéine intervient tardivement dans la maturation du ribosome. On peut d'ailleurs observer un co-enrichissement de celle-ci à partir de particule pré-ribosomiques purifiées avec la kinase Rio1 (Ferreira-Cerca et al., 2014). En effet son recrutement se fait dans le cytoplasme et elle se localise au niveau du site précédemment occupé par Pno1 dans la particule pré-40S. Ceci pourrait donc suggérer que son incorporation dans le pré-ribosome nécessite la dissociation du facteur Pno1. Sa partie C-terminale se lie à l'extrémité 3' de l'ARNr 18S exactement au niveau du site du coupure de Nob1 (Schütz et al., 2014). Des études ont également montré que la déplétion de RPS26 entraîne une accumulation de la forme pré-ARNr 20S qui démontre que la particule pré-40S n'est pas capable d'effectuer correctement sa maturation vers un ARNr 18S.

Dans la structure du 80S, RPS26 est localisée au niveau de la plateforme proche des protéines RPS1, RPS5 RPS14 et RPS26 (Ben-Shem et al., 2011; Rabl et al., 2011) et elle interagit directement avec les protéines RPS1 et RPS14 (Rabl et al., 2011). Des études ont également montré la possibilité d'une incorporation précoce de RPS26 au niveau du pré-40S. En effet, elle est importée dans le noyau et se retrouve associée à une chaperonne Tsr2 (Schütz et al., 2014). Cette dernière permet le transport de RPS26 dans le noyau tout en empêchant sa dégradation. L'incorporation de RPS26 est également dépendante du complexe formé par RPS14 et Cinap ainsi que de l'activité ATPase de cette dernière (Peña et al., 2016)



**Figure 14 : La protéine RPS26 (eS26).** (Haut) Modèle de RPS26 chez la levure d'après la structure du ribosome 4V7R (Ben-Shem et al., 2010), (Bas) Conservation de la protéine RPS26 entre les organismes eucaryotes : alignement de séquences multiples montrant la conservation entre les organismes le motif conservé « Y62-K70 » spécifique aux eucaryotes est encadré en jaune.

**d) Cinap/AK6 (Coilin Interacting nuclear ATPase Protein/ Adenylate Kinase 6 ou Factor Activating Pos9 (Fap7))**

Cette protéine accessoire de 20 kDa participe à la maturation mais n'est pas considérée comme un AF. Elle appartient à la famille des adénylates kinases (AK) qui regroupe 5 autres isoformes (Drakou et al., 2012). Structuralement, les AK sont des protéines  $\alpha/\beta$  qui partagent une architecture commune : un domaine cœur constitué d'un feuillet  $\beta$  qui porte une boucle d'interaction au phosphate (P-loop pour phosphate binding loop) et deux domaines mobiles appelés « LID » et « NMP binding domain » (Schulz, 1992).

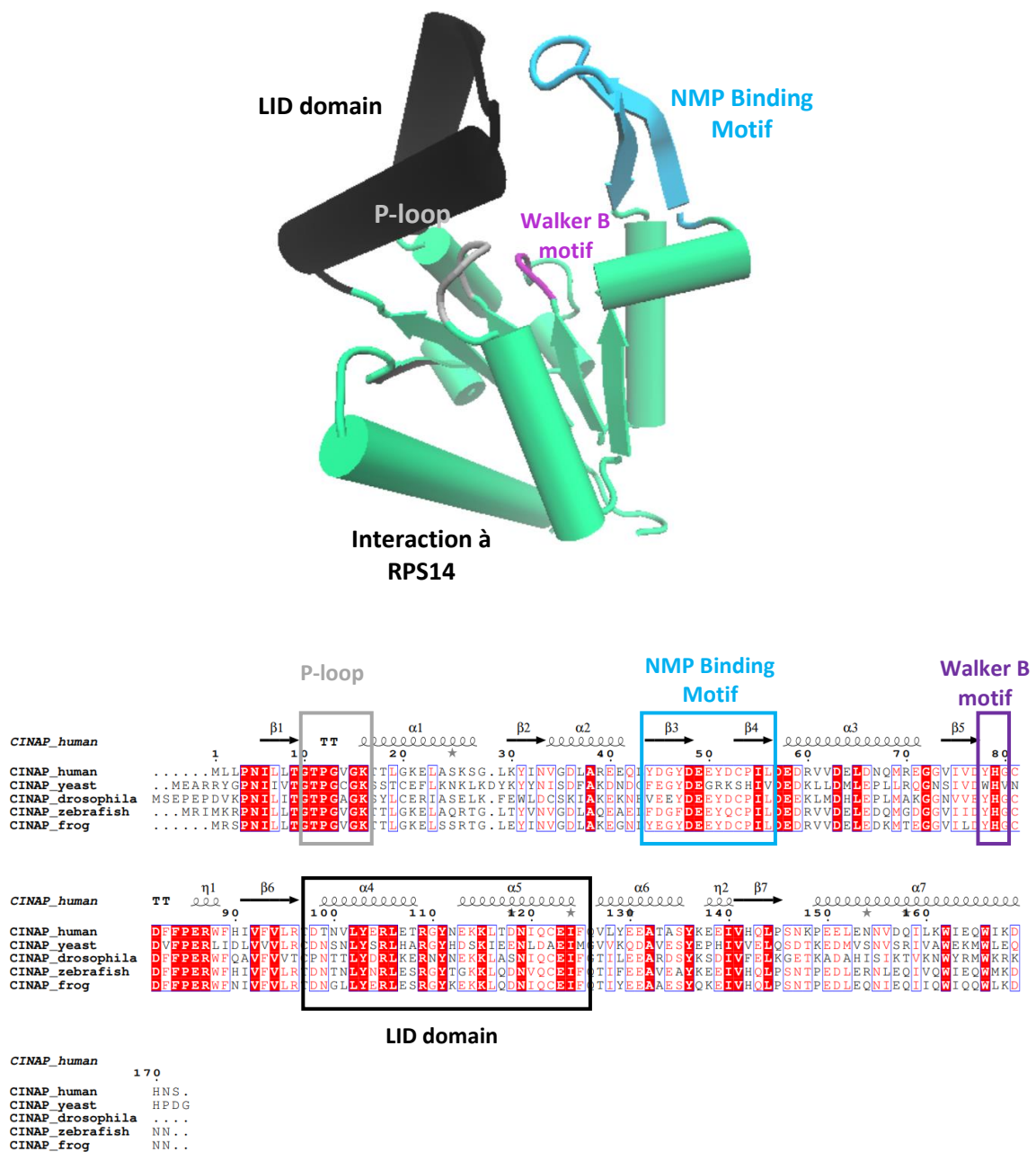
Cinap est une protéine à double fonction puisque celle-ci appartient à la famille des AK et elle possède également des motifs de reconnaissances à l'ATP « walker B » qui lui confère un rôle ATPase (*Figure 15*).

Dans le cadre de la maturation du ribosome, son homologue chez la levure est un partenaire de la protéine RPS14. Cette reconnaissance implique la partie C-terminale non conservée de l'enzyme. (Loc'h et al., 2014), Cinap a pour fonction de protéger la protéine RPS14 très basique de son interaction prématurée et non spécifique à l'ARN dans la cellule. Cette interaction peut également prévenir une dénaturation thermique de RPS14 et sa dégradation à cause de sa partie C-terminale désordonnée sensible à des dégradations par les protéases cellulaires. La déplétion de celle-ci entraîne une accumulation des AFs tardifs sur le précurseur de la petite SU à l'exception de Rio2 et Ltv1 (Belhabich-Baumas et al., 2017). Des études ont également montré que la déplétion de Cinap chez la levure entraîne une accumulation de ces particules pseudo-80S associées à Pno1 mais sans RPS26 (Rabl et al., 2011; Strunk et al., 2011).

La mutation du motif walker empêche la dissociation du pseudo complexe 80S qui est une forme de contrôle qualité adoptée par le ribosome dans le cytoplasme. (Strunk et al., 2012). Chez la levure, Cinap est responsable de la dissociation de la méthylase Dim1 du pseudo-80S (Ghalei et al., 2017).

Dans le contexte du 90S, des expériences de co-expression ont montré que Cinap est également un partenaire du facteur Krr1 (Sturm et al., 2017).

Dans le cadre de la maturation cytoplasmique, Cinap est capable de moduler de multiples interactions ARN / protéine chez la levure, Cinap est impliquée dans la maturation finale de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Strunk et al., 2012; Granneman et al., 2005). Son implication dans la coupure au site D a également été récemment étudiée chez l'homme montrant une reconnaissance par l'endonucléase Nob1 pour stimuler l'activité de celui-ci et la coupure de son substrat le pré-ARNr 18S (Bai et al., 2016). Chez l'homme, son activité catalytique est aussi impliquée dans l'assemblage des Cajal bodies (Drakou et al., 2012; Santama et al., 2005). Son partenaire RPS14 stimule son activité ATPase et non l'activité adénylate kinase. La partie carboxy-terminale de RPS14 influence ce processus (Hellmich et al., 2013).



**Figure 15 : La protéine Cinap (Fap7).** (Haut) Modèle de Cinap humaine d'après la structure cristalline 3IJ (Drakou et al., 2012). Les différents éléments /domaines caractéristiques sont indiqués par des boîtes (en gris : la boucle P ou P-loop, en bleu : le motif de liaison aux NMP, en violet : le motif Walker B et noir : le domaine LID dans les alignements de séquence (Bas). Les régions correspondant à ces éléments sont représentées avec les mêmes codes couleurs dans le modèle de Cinap représenté ci-dessus.

## Le complexe Nob1/Pno1

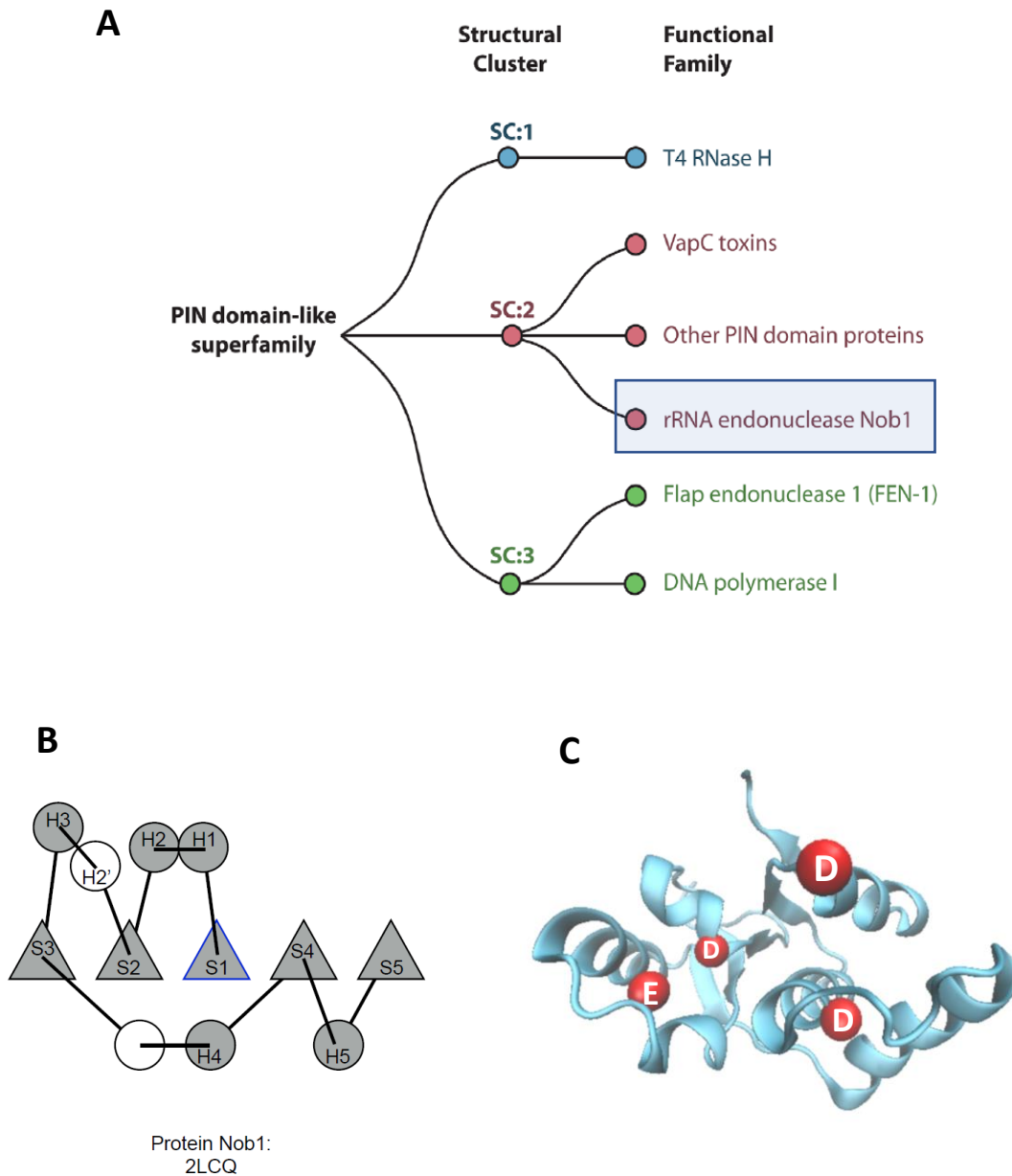
### e) *Nob1 (Nin one Binding protein)*

Nob1 est un facteur impliqué dans la maturation du pré-40S. Il a été identifié comme l'endonucléase responsable de la maturation finale de l'ARNr 18S (Fatica et al., 2003; 2004; Lamanna and Karbstein, 2009; Pertschy et al., 2009). Ce mécanisme est conservé chez la levure mais aussi les eucaryotes supérieurs comme l'homme et enfin chez les archaebactéries. Nob1 a été initialement isolée chez la levure par des expériences de criblage en double hybride avec la protéine Rnp12 qui est une composante de la machinerie de dégradation (protéasome) (Zhang et al., 2005).

Chez un individu adulte, cette protéine est exprimée dans tous les types cellulaires mais en plus grande quantité dans les tissus pulmonaires, le foie et la rate. Nob1 est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme (Zhang et al., 2005). C'est une protéine de 46 kDa et son ORF est localisée au niveau du chromosome 16q22.1 qui est constituée de 9 exons et de 8 introns.

Nob1 appartient à la famille des protéines à domaines PIN qui contient différents types de nucléase (Matelska et al., 2017; Senissar et al., 2017). En effet Nob1 est une endonucléase qui reconnaît un ARN simple brin (Lamanna and Karbstein, 2009). Par analyse bioinformatique, il est possible d'identifier deux domaines protéiques au sein de la séquence de Nob1 : un domaine PIN (pour Pilt N-terminus) qui porte l'activité catalytique la qualifiant ainsi d'endonucléase et un autre domaine « Zinc ribbon » qui est une sous-famille des doigts de Zinc. Différentes structures de domaines PIN ont été déjà publiées et des classifications structurales ont été effectuées sur la base de la conservation de la séquence primaire mais également de la structure secondaire des domaines PIN. La fonction de ces endonucléases est également dépendante de l'ion divalent que l'enzyme reconnaît ( $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ ) (Garforth et al., 2001).

On peut distinguer trois classes des domaines PIN qui sont organisées en fonction de leur rôle. Nob1 appartient à la classe structurale SC2 et celle-ci est caractérisée par une topologie contenant 5 brins  $\beta$  entourés par des hélices  $\alpha$ . Le site catalytique est constitué de 4 résidus acides (DEDD) (*Figure 16*) (Bunker et al., 2008; Matelska et al., 2017; Mueser et al., 1996; Senissar et al., 2017).



**Figure 16 : Description du domaine catalytique de Nob1** A) Classification des domaines PIN, B) Structure secondaire du domaine PIN chez l'archaea *P. horikoshii* (S : strand ou brin  $\beta$  et H : helix ou hélice  $\alpha$ ), C) Représentation des résidus constituant le site catalytique du domaine PIN de Nob1 (adapté de Senissar et al., 2017 ; Matleska et al., 2016).

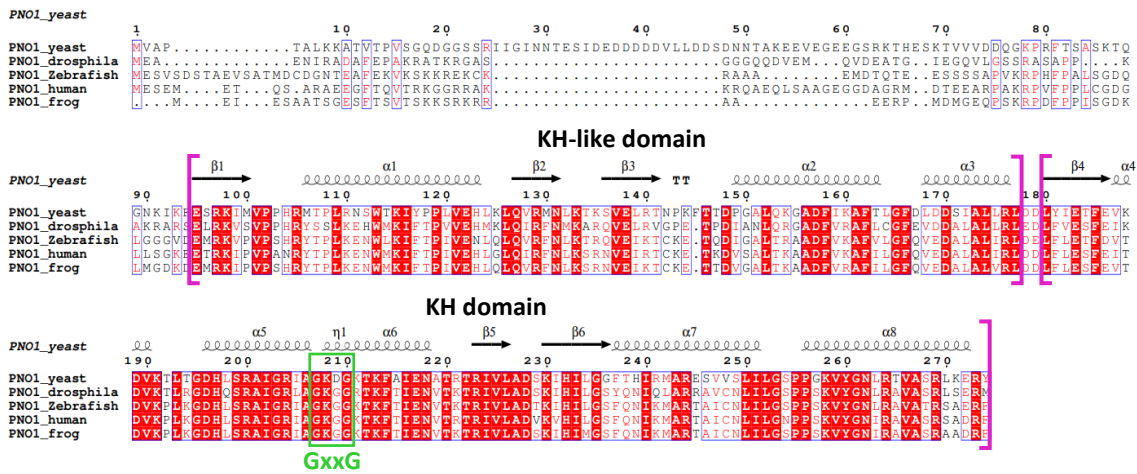
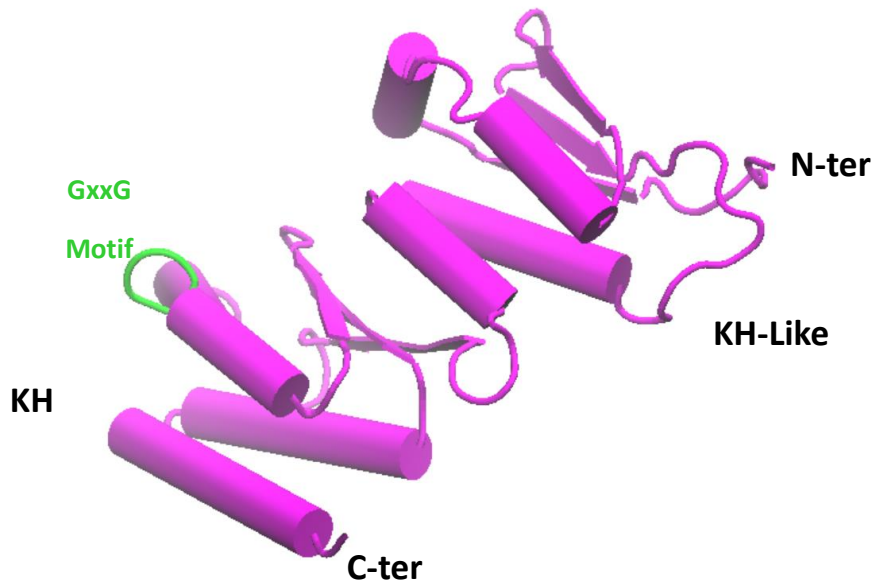
### f) *Pno1 (Protein associated to Nob1)*

Comme cité précédemment, Pno1 est un facteur d'assemblage impliqué dans la maturation précoce et tardive de la petite SU. En effet, cette protéine est recrutée très tôt dans les particules pré-ribosomiques. Son rôle a beaucoup été étudié dans la régulation de la maturation de l'ARNr 18S. Ce facteur est également impliqué dans la coupure centrale au niveau du site A<sub>2</sub> mais aussi du site A<sub>1</sub> chez la levure (Senapin et al., 2003).

Sa position dans les particules pré-ribosomiques varie également pendant la maturation. Dans la particule pré-90S, Pno1 se retrouve proche des modules UTP, puis elle va être déplacée vers la plateforme qui sera son site de localisation dans le cytoplasme. Ce site est préalablement occupé par un facteur de la maturation précoce Krr1 (Sturm et al., 2017). Le facteur Pno1 joue un rôle dans la transition de la particule précoce (pré-90S) vers le pré-40S. Les études effectuées par le groupe de E. Hurt ont d'ailleurs montré l'existence d'un lien fonctionnel entre les deux protéines Pno1 et UTP14 qui est le co-activateur de l'activité hélicase Dhr1. Dans ce cas de figure, l'activation de Dhr1 induit la dissociation de complexe U3 snoRNP de son site d'interaction avec le pré-ARNr en déroulant l'hétéroduplexe d'ARN. Ceci a pour conséquence la transition fonctionnelle de la particule 90S vers les particules pré-40S et pré-60S qui s'accompagne de la coupure au niveau du site A<sub>2</sub> (Gerhardy et al., 2014). Pno1 est également impliquée dans l'export cytoplasmique de la particule pré-40S (Vanrobays et al., 2008).

Sur la base des conservations, Pno1 appartient à la famille des protéines à domaine KH. Ce sont généralement des domaines de liaison à des ARN simple brin. La reconnaissance de l'ARN nécessite un motif conservé GxxG qui est présent uniquement dans le second domaine KH de cette famille de protéines (*Figure 17*) (Woolls et al., 2011; Zheng et al., 2014).

Chez la levure, Pno1 va s'associer à la particule pré-40S durant son transport du noyau vers le cytoplasme où la coupure au niveau du site D est effectuée. Cependant sa localisation dépend de la phase de croissance cellulaire : elle est détectée dans les deux compartiments de la cellule en phase logarithmique précoce puis est progressivement réduite dans le cytoplasme du cytoplasme et concentrée dans le noyau durant la phase exponentielle. Enfin, celle-ci est seulement détectée dans le noyau pendant la phase stationnaire (Vanrobays et al., 2004).



**Figure 17 : Organisation des domaines modulaires de Pno1.** (Haut) Modèle de Pno1 chez la levure. Les deux domaines KH et KH-like : le domaine KH constitué d'un feuillet  $\beta$  constitué de trois brins antiparallèles empaquetés contre trois hélice  $\alpha$ . La surface d'interaction avec l'ARN est fournie par 4 résidus conservés formant une boucle (en vert) entre deux hélices  $\alpha$ . Le domaine KH-like est similaire au domaine KH mais il ne possède pas le motif d'interaction à l'ARN. (Bas) Alignement de séquence montrant la conservation des deux domaines structurés chez les eucaryotes. Le motif d'interaction à l'ARN « GxxG » est encadré en vert

## VII. Problématique et projet de thèse

Comme indiqué dans les paragraphes précédents, les informations disponibles concernant la maturation du ribosome résultent de plusieurs décennies d'études. Si le processus d'assemblage global est maintenant bien établi, des informations précises concernant les différentes connexions entre chaque étape restent à déterminer. Un des processus le mieux caractérisé est la voie de maturation des ARNr (18S, 5.8S et 28S) qui résultent de plusieurs séries de réactions de coupure endo et exonucléolytiques. La maturation finale de l'ARNr 18S s'effectue dans le cytoplasme où l'ARNr précurseur va subir une coupure endonucléolytique pour éliminer le reste de la séquence correspondant à l'ITS1 au niveau du site D (site 3 chez l'homme). Cette réaction est catalysée par l'endonucléase Nob1 qui est un facteur d'assemblage conservé chez les eucaryotes mais aussi chez les archées (Fatica et al., 2003; 2004; Lamanna and Karbstein, 2009; Veith et al., 2012).

Avec l'évolution apportée par la microscopie électronique qui s'avère être un outil puissant pour étudier la structure de grands complexes macromoléculaires tels que les ribosomes, différents intermédiaires de la biogénèse du ribosome ont pu être visualisés bien que leur existence cellulaire ne soit que transitoire (Klinge and Woolford, 2019 ; Baßler and Hurt, 2019). L'obtention de ces différentes structures a permis de positionner des facteurs impliqués dans la maturation et donc de mieux comprendre le mécanisme d'assemblage. Néanmoins des informations précises sur les différentes connexions existantes entre chaque étape sont encore manquantes.

Au début du projet, des structures à basse résolution du pré-40S humain et levure ont permis d'avoir une idée globale de l'organisation des AFs dans la particule pré-40S (Johnson et al., 2017; Larburu et al., 2016). Depuis, d'autres structures ont été obtenues avec une grande amélioration de la résolution qui ont permis de visualiser l'architecture plus détaillée du pré-40S et de localiser la position de la plupart des AFs à l'exception de Nob1 malgré son utilisation comme protéine de purification (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018). Lors de mon projet de thèse, je me suis focalisée sur des aspects de la maturation cytoplasmique tardive de la petite SU. L'objectif de notre étude était donc d'apporter des informations plus précises sur les mécanismes d'échange et/ou de reconnaissance entre les AFs et les RPs impliqués dans la coupure au niveau du site D. Ces informations vont contribuer à mieux comprendre la maturation de l'ARNr 18S.

Nous avons donc orienté nos travaux sur les facteurs qui soit n'étaient pas présents ou observables dans ces reconstructions, soit ceux pour lesquels les informations fonctionnelles étaient encore partielles ou manquantes.

De ce fait, nous avons décidé de travailler avec un modèle plus simple et de se focaliser sur le complexe Nob1/Pno1 par deux principales approches :

1. Une approche structurale pour répondre aux questions telles que l'organisation du complexe, le mode de reconnaissance de l'endonucléase Nob1 avec son partenaire Pno1, comment le pré-ARNr est-il reconnu ;

2. Une approche fonctionnelle biochimique pour mieux comprendre le rôle du complexe Nob1/Pno1 dans la maturation.

La réponse à ces questions a entraîné l'établissement d'autres hypothèses puisque durant ma thèse la structure du pré-40S humain a été publiée et dans cette structure, il fut possible d'observer la structure atomique du complexe Nob1/Pno1. Les résultats publiés sont cohérents avec nos propres données et la deuxième partie de mon projet fut donc caractériser les facteurs accessoires qui pouvaient être impliqués dans les étapes suivant l'accrochage du complexe Nob1 / Pno1 et ainsi permettre la maturation finale du pré-40S.

3. Pour cela, j'ai réalisé des études d'interaction *in vitro* avec les protéines citées précédemment comme acteurs de la maturation très tardive du pré-40S qui sont RPS14 (uS11), RPS26 (eS26), Rio1, Cinap et le complexe Nob1/Pno1 pour ensuite proposer un mécanisme réactionnel permettant à Nob1 d'accéder à son site de coupure. Ces informations contribuent globalement à mieux comprendre la maturation cytoplasmique de la petite SU (40S).



# RESULTATS



# I. Etude du mode de reconnaissance entre l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1

## 1. Organisation de l'endonucléase Nob1 et cartographie des interactions du complexe Nob1/Pno1 chez l'homme

Lors de ma thèse, j'ai étudié le mode de reconnaissance entre l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1 pour définir la surface d'interaction entre ces deux facteurs. De plus, malgré les différentes informations concernant le rôle de Nob1 dans la maturation du ribosome ou encore sa localisation dans les différentes étapes de la maturation, des informations concernant l'organisation de son domaine endonucléase au sein du pré-40S restait à déterminer. Dans cet objectif, nous avons montré dans la publication intitulée « Domain definition and interaction mapping of the endonuclease complexe hNob1/hPno1 » que le domaine catalytique de Nob1 était constitué de deux fragments séparés par une boucle interne de taille variable qui servait d'interface de reconnaissance à son partenaire Pno1. Nous avons également montré que la partie C-terminale de la boucle est nécessaire et suffisante pour former une interaction stable avec Pno1 et qu'un résidu tryptophane présent dans la partie C-terminale de cette boucle et conservé chez tous les organismes eucaryotes était fondamental pour la stabilité du complexe (Raoelijaona et al., 2018). Les données biochimiques présentées dans notre publication ont été d'ailleurs confirmées par les données structurales obtenues sur la particule pré-40S cytoplasmique humaine (Ameismeier et al., 2018). De même, nous avons également montré que le domaine KH-like de Pno1 était impliqué dans la formation du complexe, ce qui confirme les résultats effectués chez la levure concernant la cartographie de l'interaction de Pno1 avec Nob1 (Woolls et al., 2011).

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/327414436>

# Domain definition and interaction mapping for the endonuclease complex hNob1/hPno1

Article in RNA Biology · September 2018

DOI: 10.1080/15476286.2018.1517013

---

CITATION

1

---

READS

35

## 3 authors:



**Finaritra Raelijaona**

French Institute of Health and Medical Research

2 PUBLICATIONS 1 CITATION

SEE PROFILE



**Stéphane Thore**

French Institute of Health and Medical Research

55 PUBLICATIONS 1,058 CITATIONS

SEE PROFILE



**Sébastien Fribourg**

French Institute of Health and Medical Research

75 PUBLICATIONS 2,091 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Early events of ribosome biogenesis in eukaryotes. [View project](#)



Leukodystrophies [View project](#)

## **Domain definition and interaction mapping for the endonuclease complex hNob1/hPno1**

Finaritra Raelijaona, Stéphane Thore\* and Sébastien Fribourg

INSERM U1212, CNRS UMR5320, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076  
Bordeaux

\* Corresponding author: [stephane.thore@inserm.fr](mailto:stephane.thore@inserm.fr)

short title: endonuclease complex hNob1/hPno1 interaction

keywords: ribosome biogenesis, endonuclease, pre-rRNA, KH domain, PIN domain, zinc ribbon.

**Abstract:**

Ribosome biogenesis requires a variety of trans-acting factors in order to produce functional ribosomal subunits. In human cells, the complex formed by the proteins hNob1 and hPno1 is crucial to the site 3 cleavage occurring at the 3'-end of 18S pre-rRNA. However, the properties and activity of this complex are still poorly understood. We present here a detailed characterization of hNob1 organization and its interaction with hPno1. We redefine the boundaries of the endonuclease PIN domain present in hNob1 and we further delineate the precise interacting modules required for complex formation in hNob1 and hPno1. Altogether, our data contributes to a better understanding of the complex biology required during the site 3 cleavage step in ribosome biogenesis.

## Introduction

Ribosome biogenesis is one of the most complex pathway existing in eukaryotic cells. This is due to the high number of factors involved and to the variety of the enzymatic reactions occurring along the entire pathway [1]. In addition, the pathway is physically segregated between the nucleus and the cytoplasm by the nuclear membrane, which acts as a natural checkpoint. In recent years, a number of studies have revealed with atomic details the architecture of pre-ribosomal particles such as the 90S, the pre-60S and the pre-40S ribosomes prior or after their export to the cytoplasm [2][3][4][5][6][7][8][9]. It is noteworthy that most studies have been performed using fungal pre-ribosomal particles, and therefore may differ from the situation encountered in human cells. The study of human ribosome biogenesis is directly relevant for understanding the set of mammalian diseases affecting this pathway and collectively referred to as ribosomopathies [10]. In this context, dedicated studies of the structure and function of the mammalian factors are highly relevant.

The recent structural studies on fungal ribosome biogenesis revealed the location of numerous trans-acting factors on the pre-ribosomal particles allowing for a comprehensive understanding of their biological role [11]. However, some critical factors are only partially visible or even absent from these snapshot images of the ribosome assembly process. For example, comprehensive structural data is lacking for Rrp5, a protein involved in both the pre-40S and the pre-60S synthesis pathway and for human Nob1 (hereafter hNob1), the endonuclease required for the cleavage at site 3 during the last step of pre-40S maturation. hNob1 is often associated with its natural protein partner hPno1/hDim2, which in turn regulates Nob1's catalytic activity [12]. The position of the yeast Pno1 protein on late pre-ribosome particles has been recently identified [5], but Nob1's location on the ribosomal particle in any organism was until very recently unknown [13]. In addition, it appears that functional differences exist for Nob1 depending on the organism

and thus studies on orthologues are of specific interest. As an example, the protein Fap7 has been shown to inhibit Nob1's endonuclease activity in *Pyrococcus horikoshii* [14], while the Fap7 protein promotes the same endonucleolytic activity in human [15]. The hNob1 is therefore a paradigm of an essential trans-acting protein for which limited molecular information is available.

The structure of the Nob1 protein from *P. horikoshii* is available, but does not allow for full modelling of the mammalian protein due to various large sequence insertions, which do not exist in the archaeal protein [16]. hNob1 harbors a similar organization to the archaeal orthologue and consists of PIN (PiIT N terminus) endonuclease and zinc ribbon domains, separated by linker region that is poorly conserved with the exception of its last C-terminal residues [16], [17]. In lower eukaryotic species, the linker has a minimal length of ~15 residues while it exceeds ~100 residues in human. The conserved C-terminal linker region was shown to be critical for the Nob1/Pno1 complex formation in *Chaetomium thermophilum* [18]. The presence of an active PIN domain required to cleave the pre-rRNA was demonstrated via structure prediction and mutational studies more than a decade ago while the precise function of the zinc ribbon is unknown [19]. A recent review classifying the PIN domain-like superfamily [20] defined the folding landscape of PIN domains as always adopting a prototypical  $\beta_1$ - $\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\beta_2$ - $\alpha_3$ - $\beta_3$ - $\alpha_4$ - $\beta_4$ - $\alpha_5$ - $\beta_5$  topology [20]. Their overall structure forms a five-stranded  $\beta$ -sheet packed by five  $\alpha$ -helices with possible additional secondary structure elements although these extra elements do not change the global organization [20]. Moreover, the four active site residues in the majority of the cases are located in the secondary structure element  $\beta_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  and  $\beta_4$ . Surprisingly, one of the amino acid predicted to be essential for the yeast Nob1 PIN domain activity, Asp110, appeared dispensable in yeast complementation experiments [19]. In addition, PIN domains generally display low affinity for their target RNA, leading to the hypothesis that hNob1 requires additional stabilization upon interacting with its cleavage site on ribosomal rRNA. This hypothesis would explain the inability to reconstitute the

cleavage reaction *in vitro* with hNob1 only [21]. Even if the zinc ribbon may be involved in stabilizing pre-rRNA contacts, one likely candidate for this role is the hNob1 partner hPno1. hPno1 contains two hnRNP K-homology (KH) domains and these domains are known to possess RNA-binding ability [22]. Additional proteins such as CINAP/Fap7 could also be implicated in this multi-factor reaction [14].

Here, we present a detailed molecular analysis of the interaction between the human trans-acting factor hNob1 and its binding partner hPno1. We revisit and propose a new delineation for the hNob1 PIN domain on the basis of biochemical data. We further demonstrate that the interaction between hNob1 and hPno1 requires the conserved sequence in hNob1 that precedes the second half of the PIN domain, along with the KH-like domain of hPno1. A single amino acid substitution abrogates the complex formation, supporting our finding that we have described the minimal interaction surface between the two proteins. We also observe that the non-conserved extensions found in hNob1 C-terminus and hPno1 N-terminus are, in our *in vitro* conditions, dispensable.

## Results

In the last two decades, a number of studies have contributed to our understanding of Nob1's function in ribosome biogenesis. Most of our knowledge comes from seminal research performed by the group of D. Tollervey using the yeast protein [17]. Based on sequence alignment of the Nob1 protein family, it was proposed that Nob1 would contain a PIN domain and a zinc ribbon separated by a linker of variable length [17]. Almost a decade later, the NMR structure of the orthologous Nob1 protein from *P. horikoshii* was solved and the atomic data confirmed the presence of a PIN domain and of a zinc ribbon domain separated by a unstructured linker [16].

Careful analysis of the Nob1 sequence alignment, 3D-structural modelling using the web server PHYRE2 [23] and recent PIN superfamily definition [20] consistently suggest that the PIN domain present in the hNob1 protein (and likely in yeast) must be redefined. The domain should rather be divided in two pieces separated by a long linker (Figure 1A) [16]. The first “half” would contain the required secondary structure elements  $\beta_1-\alpha_1-\alpha_2-\beta_2-\alpha_3-\beta_3-\alpha_4$  ( $\beta_1-\alpha_1-\alpha_2-\beta_2-\alpha_3-\alpha_4-\beta_3-\alpha_5-\alpha_6$  according to the predicted secondary structure elements present in the human sequence). The second part would cover the last elements  $\beta_4-\alpha_5-\beta_5$ , the missing elements required to form a functional PIN domain according to the recent classification ( $\beta_4-\alpha_7-\beta_5$  according to our prediction; Figure 1A).

Interestingly, such a split organization changes the identity of the putative active site residues. When the PIN domain was defined with the yeast sequence, residues D15, E43, D84, D92 and D110 (residues D10, E36, D75, D83 and S101 in the human sequence) were proposed as conserved acidic residues possibly important for the enzymatic activity [17][19]. Since then, several studies have experimentally validated Asp15, Glu43 and Asp92 as critical for the yeast Nob1 activity, while Asp84 and Asp110 were apparently not required [19], [24]. Our predicted hNob1 PIN domain model fits the secondary structure requirements for a functional PIN domain of the VapC PIN superfamily (Figure 1B). According to our new definition, the residues D75 and S101 (corresponding to residues D84 and D110 in the yeast protein) are not predicted to be located in the active site (Figure 1B). This is likely the reason why the growth of *S. cerevisiae* cells was unaffected by the Nob1 D110N mutation [19]. Based on our secondary structure prediction and sequence alignment, we predicted the  $\beta_4-\alpha_5-\beta_5$  secondary structure elements between residues 234 and 255 (Figure 1A, labelled  $\beta_4-\alpha_7-\beta_5$  in hNob1). With this revised arrangement, the fourth active

site residues would correspond to D238 (D271 in the yeast protein, Figure 1A and B). Therefore, this model explains the published biochemical data (Figure 1B).

We next validated this computational prediction using co-expression experiments with multiple hNob1 constructs (Figure 1C). We first demonstrate that hNob1 fragment encompassing residues 1-134 can form a stable complex with hNob1 (206-314; Figure 1D). However, such a complex cannot be formed if we remove the stretch from residues 206 to 249, strongly suggesting that the interaction surface between the two proposed “halves” are located between residues 1 to 134 and the protein fragment 206 to 249 (Figure 1D). In order to challenge our hypothesis, we generated point mutations to destabilize the bi-partite PIN domain. Hence, D83K, L87S and Y91A point mutants targeting the interface between the two proposed PIN domain fragments were introduced based on the predicted model (Figure 1B and 1E). hNob1 (1-134) carrying the mutation L87S is unable to form a stable complex with the hNob1 fragment 206-314 (Figure 1E) whereas D83K or Y91A mutations do not affect the complex formation. We thus show that the PIN domain of hNob1 is formed by two “halves” separated by a dispensable loop. Such a modular organization has been very recently confirmed by the cryo-EM based structural analysis of human pre-40S particles [13].

To gain further insight into the human Nob1 and Pno1 interaction, we decided to precisely map the recognition surface. We performed co-expression experiments using full-length hPno1 with various truncations of hNob1. We initiated the experiment using the full-length proteins and showed an efficient and stable interaction despite limited degradation of hNob1 (Figure 2A). As a negative control, we also verified that untagged hPno1 alone did not show nonspecific binding to Ni-NTA beads (data not shown). Since the C-terminal part of hNob1 is predicted to be disordered

and is not conserved through evolution (Figure 1A), we supposed that the observed degradation of the full-length (FL) protein occurred within this region. We next deleted the entire region that follows the zinc ribbon and reassessed the impact of this deletion on the stability of the complex. The binding to hPno1 was unaffected by the truncation (construct 1-314, Figure 2A). Next, we further shortened the protein by removing the zinc ribbon domain (resulting in a construct from residues 1 to 255) and showed that it had no effect on hPno1 association (Figure 2A). Thus, the entire C-terminal region including the zinc ribbon is dispensable *in vitro* for complex formation. We attempted to use the construct encompassing the first half of hNob1 PIN domain but we could not obtain the protein (data not shown). Instead, we used a construct containing only the linker located inside the PIN domain (construct 104-230) and co-expressed it with hPno1. Co-purification was observed for this construct, indicating that the interaction between hNob1 and hPno1 is at least partially mediated by the linker (Figure 2A).

We then turned our interest towards the binding site of hNob1 on hPno1. Pno1 is a conserved protein, which contains two KH domains [25]. The first KH domain of hPno1 is termed “KH-like” in the literature because it does not contain the critical GXXG motif known to mediate ssRNA association [26]. Over the years, several studies performed in yeast have looked into the association of Nob1 and Pno1 [18], [26]. In particular, Nob1 binding sites on the Pno1 protein were identified on the KH-like domain [26]. Several mutations located at different places on the KH-like domain including the  $3_{10}$ -helix fragment normally devoted to RNA association have been shown to modulate or abolish Nob1 association [26]. We performed similar experiments with the human proteins by testing the capacity of the full-length hPno1 protein (hPno1 construct 1-252) to bind to hNob1 fragment encompassing the PIN domain (hNob1 construct 1-255; Figure 2B). In absence of pre-rRNA, the two proteins can form a stable complex (Figure 2B). We further tested the importance of the N-terminal non-conserved extension present in the hPno1 protein (residues

1 to 73) and showed that its deletion does not impair complex formation (Figure 2B). Similarly to hNob1, the evolutionary non-conserved region of hPno1 is dispensable for complex formation. Finally, we truncated hPno1 to the KH-like domain (residues 73-155) and showed that it is sufficient to observe near WT-level of interaction with hNob1 (Figure 2B).

To map as precisely as possible the site of interaction between the two proteins, we decided to find the responsible residues on each protein. We previously observed that the internal loop present in the PIN domain is necessary and sufficient for a stable association of hPno1 (construct 104-230, Figure 2A). The loop was artificially divided in two fragments based on sequence composition (Figure 1A) and used to test hPno1 association by pull-down experiments (Figure 3). The fragment from 104 to 179 is highly enriched in charged residues and poorly conserved in evolution, while the sequence of the fragment 180 to 220 is highly conserved through evolution (Figure 1A). To facilitate the stable expression of the linker sequences, we fused these two sequences to a glutathione S-transferase tag. After purification of the GST-fused sequences, we incubated them with the N-terminal deleted hPno1 construct (Figure 3B). The C-terminal part of the linker (residues 180-220) is able to retain hPno1 on the beads while the fragment 104-179 fails to interact (Figure 3B). These data therefore suggest that the PIN domain, the zinc ribbon and the large unstructured C-terminal region are dispensable for the interaction with hPno1. Based on sequence conservation (Figure 1A), we mutated the W208 in the core of the highly-conserved linker region and reassessed complex formation by co-expression of the mutated hNob1 together with hPno1. Mutant protein was readily expressed but did not stably bind to hPno1 (Figure 3C). We thus concluded that the formation of the human complex relies on a short sequence motif found in the loop present between the bipartite PIN domain, a situation reminiscent to the one recently identified in the fungal complex (Figure 3) [18].

Finally, we turned to hPno1 and using a sequence conservation mapping performed by the ConSurf server [27] identified a hot spot of conservation located between residues 105 to 110 (data not shown). Unfortunately, point mutations in this region led to poor stability of solubility of hPno1, which prevented us from testing the capacity of the mutated hPno1 protein to bind to hNob1. Recently, the same peptide was shown to mediate numerous contacts with hNob1 [13].

## **Discussion**

Nob1/Pno1 is the key complex responsible for the final maturation step of the 18S pre-rRNA. Despite numerous studies on the yeast proteins, information is still lacking on their exact function and on the formation of the complex especially within the context of human ribosome biogenesis. With the aim to fill this lack of knowledge, we first observed that the boundaries of the PIN domain defined a decade ago for hNob1 should be modified to reflect the published biochemical data [16], [19]. We demonstrate that the PIN domain extends further into the hNob1 primary sequence by using bioinformatics and biochemical methods (Figure 1). With this new organization of the PIN domain, a long partially conserved sequence has now become an internal loop of the PIN domain corresponding to approximately residues 96 to 232. However, the unstructured loop may not be a simple “separator” between the newly defined bi-partite PIN domain.

We then set out to define the determinant of the interaction within the hNob1 / hPno1 complex by using co-expression and pull-down assays. Several deletion or point mutation constructs were generated and used to characterize *in vitro* the minimal protein fragments compulsory to observe a stable complex. Using this approach, the region of contact between the two proteins could be reduced to a short linear fragment located between residues 206 and 220 for

hNob1 and to the KH-like domain of hPno1. Further fine mapping of hPno1 was precluded by an inability to obtain stable mutant protein using our experimental setup.

By redefining the limits of the PIN domain of hNob1 and the location of the interaction surface with hPno1, we now postulate that hPno1 may regulate the endonuclease activity of hNob1. It is possible that the binding of Pno1 sterically hinders the PIN domain active site or modulates the accessibility of the PIN domain for its substrate 18S pre-rRNA. Recent data obtained with the *C. thermophilum* Nob1 and Pno1 proteins demonstrate that co-expressing ctPno1 with two ctNob1 constructs encompassing residues 1-169 and 250-354 can form a stable complex [18]. The two ctNob1 constructs can be found in the same complex either by sandwiching ctPno1 or via a direct interaction between them. These constructs correspond to residues 1-115 and 188-291 in hNob1. According to our experiments, the construct 1-115 covers the first half of the PIN domain, thus insufficient to bind stably to hPno1 *in vitro* (Figure 3B). The second construct, i.e. residues 188-291, contains the other half of the PIN domain and the zinc ribbon. Taken together, our data help explain why ctNob1/ctPno1 tri-partite complex has been reconstituted by Sturm and colleagues [18]. Their ctNob1 constructs effectively covered the two halves of the PIN domain, an observation undetected at that time.

In our hands, the zinc ribbon does not interact stably with the first half of the PIN domain (Figure 1D). Although we did not observe any decrease in complex formation when deleting this region from hNob1 *in vitro* (Figure 2A), it is possible that *in vivo*, the zinc ribbon and/or the C-terminal region participate in complex formation with Pno1. In addition to potentially helping the interaction with hPno1, the close proximity between the zinc ribbon and the active site of the PIN domain makes us suggest that the zinc ribbon could be important to regulate the hNob1 endonucleolytic activity.

In conclusion, the human protein hPno1 binds to hNob1 using a similar surface as compared to the yeast counterpart [26]. hNob1 contacts hPno1 using residues between 206 and 220, where the key amino acid W208 is located [18], suggesting highly conserved mechanism between species even though each organism presents some specificities due to sequence evolution. During the preparation of this manuscript, Ameismeier and colleagues reported the cryo-EM based model of several late stage pre-40S particles either purified from native source or reconstituted where they validate the present conclusion on the interaction between hNob1 and hPno1 [13].

A key question remains regarding hNob1's activity on the 18S pre-rRNA. Indeed, information on hNob1 recognition and cleavage of 18S pre-rRNA are missing since hNob1's active site is located at more than 30 Å away from the newly defined PIN domain active site [13]. The role of individual components in 18S pre-rRNA cleavage may in future be provided by additional structures of pre-40S intermediates or by individual protein complexes together with their target RNA. Alternatively, one cannot exclude that additional players such as the CINAP/Fap7 protein, may be required to induce the obligatory local rearrangements leading to the close proximity between hNob1 PIN domain active site and pre-rRNA allowing the direct observation of the site 3 cleavage configuration. More data will therefore be necessary to fully comprehend the role of the Nob1/Pno1 complex during this critical step of ribosome production.

## **Materials and Methods**

### *PCR amplification and cloning*

Plasmids expressing hNob1 and hPno1 were built by inserting the PCR-amplified sequences of hNob1 or hPno1 into modified pET vectors allowing for coexpression and with or

without an N-terminal hexa-Histidine or Glutathione S-Transferase (GST) Tag. Cloning was performed with a modified sequence ligation independent cloning (LIC) protocol and plasmids were verified by DNA sequencing.

#### Protein expression and purification

hNob1 and hPno1 constructs were individually transformed or cotransformed into *Escherichia coli* BL21 Rosetta 2 cells. Bacteria were cultured in TB medium at 37 °C and protein expression was induced with 0.2 mM isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside overnight at 15 °C. Cells were pelleted down by centrifugation and resuspended with 1 mL of ice cold Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 0.1 % Triton X100, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 10 % glycerol w/v). Cells were lysed by sonication. The soluble fraction was separated from the crude extract by centrifugation at 14,000 rpm for 30 min at 4 °C. Cleared lysate was incubated with 50  $\mu$ L Ni-NTA beads SIGMA (H0537) for 2 h at 4 °C on a rotating wheel. Beads were spun down to remove the unbound material and washed five times with Wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 10 % glycerol w/v). His-tagged proteins were eluted by competition with Elution buffer (Wash buffer plus 250 mM imidazole). Eluted samples were analyzed by SDS PAGE and stained with Coomassie blue. GST-fused proteins were purified on GST beads SIGMA (G4510) following same purification protocol with the exception that the Wash buffer did not contain imidazole. Protein elution was carried out with Wash buffer supplemented with 20 mM reduced glutathione.

#### Pull down assay

Proteins were purified as indicated above. Histidine-tagged full length hPno1 and a construct from residues 73-252 were subjected to a cleavage step with TEV protease during an

overnight incubation at 16 °C. Cleaved tag, TEV proteases and undigested proteins were removed by reloading the sample on Ni-NTA and collecting the flow-through fraction. Tagged hNob1 constructs were added to hPno1 in a 1:1 molar ratio. The mixture volume was adjusted to 1 mL with binding buffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol and 10 % glycerol w/v). Samples were incubated at 4 °C for 1 h and afterwards 30 μL of NiNTA beads was added to the mixture and further incubated on a rotating wheel for 1 h at 4 °C. Unbound material (flow-through) was collected after centrifugation for 30 s at 2,000 g. Beads were washed five times with Wash buffer 2 (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 5 mM β-Mercaptoethanol and 10 % glycerol w/v) before elution with 30 μL of Elution buffer 2 (Wash buffer 2 supplemented with 250 mM imidazole). Input and bound fractions were analyzed by SDS PAGE and stained with Coomassie blue. GST pull-downs were performed similarly except that buffers did not contain imidazole and the elution buffer was supplemented with 20 mM of reduced glutathione.

#### Bioinformatics analysis of hNob1 or hPno1

Protein sequences for hNob1 (UniProt entry Q9ULX3) and hPno1 (UniProt entry Q9NRX1) were uploaded to the online server PHYRE2 for structure prediction [23] and to the ConSurf server for sequence conservation prediction [27].

The structural model obtained for hNob1 was used to prepare the panel B from Figure 1 and subsequently design the truncation/point mutation boundaries. The most closely related model found by PHYRE is the atomic structure of Nob1 from *P. horikoshii* (PDB code 2LCQ) [16].

The sequence conservation score within the Pno1 protein family was calculated using 150 sequences from homologous proteins taken in the UniRef90. The conservation score was then mapped onto the surface of the archaeal Pno1 structure from *P. horikoshii* (PDB code 2E3U) [28].

## Acknowledgements

We thank Cameron Mackereth and Fabien Darfeuille for critical reading of the manuscript. We further acknowledge Lucile Maleuvre and Manon Coursières for participation to the experiments. This work was funded by ANR grant (ANR Blanc 2010 grant RIBOPRE40S (ANR-10-BLAN-1224) and RIBOMAN ANR-16-CE11-0029 to S.F.), the INSERM and the University of Bordeaux.

## References

- [1] Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S. Assembly and structure of the SSU processome-a nucleolar precursor of the small ribosomal subunit. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018; vol. 49, pp. 85–93.
- [2] Scaiola, A., Peña, C., Weisser, M., et al. Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit. *EMBO J.* 2018; vol. 37, no. 7, p. e98499.
- [3] Kater, L., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., et al. Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell* 2017; vol. 171, no. 7, p. 1599–1610.e14.
- [4] Ma, C., Wu, S., Li, N., et al. Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017; vol. 24, no. 3, pp. 214–220.
- [5] Heuer, A., Thomson, E., Schmidt, C., et al. Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Elife* 2017; vol. 6.
- [6] Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., et al. Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell* 2016; vol. 166, no. 2, pp.

380–393.

- [7] Sun, Q., Zhu, X., Qi, J., et al. Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *Elife* 2017; vol. 6.
- [8] Barandun, J., Chaker-Margot, M., Hunziker, M., et al. The complete structure of the small-subunit processome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017; vol. 24, no. 11, pp. 944–953.
- [9] Sanghai, Z. A., Miller, L., Molloy, K. R., et al. Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit. *Nature* 2018; vol. 556, no. 7699, pp. 126–129.
- [10] Narla, A. and Ebert, B. L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 2010; vol. 115, no. 16, pp. 3196–205.
- [11] Peña, C., Hurt, E., and Panse, V. G. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control, *Nature Structural and Molecular Biology*. 2017.
- [12] Tone, Y. and Toh-E, A. Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 2002; vol. 16, no. 24, pp. 3142–57.
- [13] Ameismeier, M., Cheng, J., Berninghausen, O., et al. Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature* 2018; vol. 558, no. 7709, pp. 249–253.
- [14] Hellmich, U. A., Weis, B. L., Lioutikov, A., et al. Essential ribosome assembly factor Fap7 regulates a hierarchy of RNA-protein interactions during small ribosomal subunit biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; vol. 110, no. 38, pp. 15253–8.
- [15] Bai, D., Zhang, J., Li, T., et al. The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth. *Nat. Commun.* 2016; vol. 7, p. 12310.
- [16] Veith, T., Martin, R., Wurm, J. P., et al. Structural and functional analysis of the archaeal endonuclease Nob1. *Nucleic Acids Res.* 2012; vol. 40, no. 7, pp. 3259–74.
- [17] Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakić, M., et al. Nob1p is required for cleavage of the 3' end of

- 18S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 2003; vol. 23, no. 5, pp. 1798–807.
- [18] Sturm, M., Cheng, J., Baßler, J., et al. Interdependent action of KH domain proteins Krr1 and Dim2 drive the 40S platform assembly. *Nat. Commun.* 2017; vol. 8, no. 1.
- [19] Fatica, A., Tollervey, D., and Dlakić, M. PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA. *RNA* 2004; vol. 10, no. 11, pp. 1698–701.
- [20] Matelska, D., Steczkiewicz, K., and Ginalski, K. Comprehensive classification of the PIN domain-like superfamily. *Nucleic Acids Res.* 2017; vol. 45, no. 12, pp. 6995–7020.
- [21] Lamanna, A. C. and Karbstein, K. Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; vol. 106, no. 34, pp. 14259–64.
- [22] Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. Structure and function of KH domains. *FEBS J.* 2008; vol. 275, no. 11, pp. 2712–26.
- [23] Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 2015; vol. 10, no. 6, pp. 845–58.
- [24] Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., et al. RNA Helicase Prp43 and Its Co-factor Pfa1 Promote 20 to 18 S rRNA Processing Catalyzed by the Endonuclease Nob1. *J. Biol. Chem.* 2009; vol. 284, no. 50, pp. 35079–35091.
- [25] Nicastro, G., Taylor, I. A., and Ramos, A. KH-RNA interactions: back in the groove. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015; vol. 30, pp. 63–70.
- [26] Woolls, H. A., Lamanna, A. C., and Karbstein, K. Roles of Dim2 in ribosome assembly. *J. Biol. Chem.* 2011; vol. 286, no. 4, pp. 2578–86.
- [27] Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res* 2016; vol. 44, no. W1, pp. W344-50.

- [28] Jia, M. Z., Ohtsuka, J., Lee, W. C., et al. Crystal structure of Dim2p: a preribosomal RNA processing factor, from *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 2.30 Å. *Proteins* 2007; vol. 69, no. 2, pp. 428–32.
- [29] Robert, X. and Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 2014; vol. 42, no. W1, pp. W320–W324.

### Figure legends.

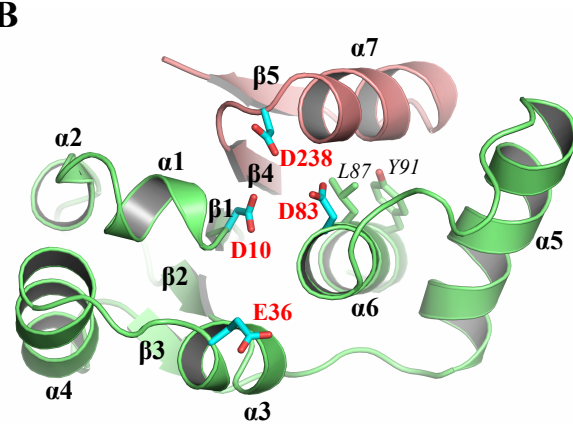
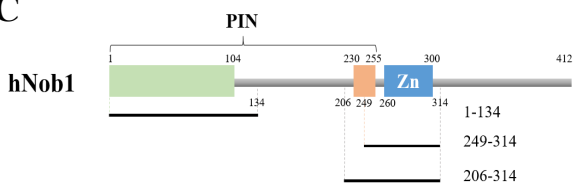
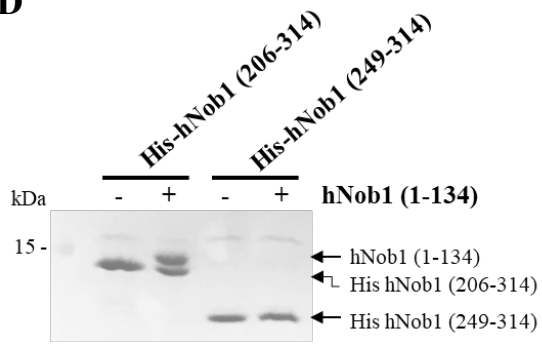
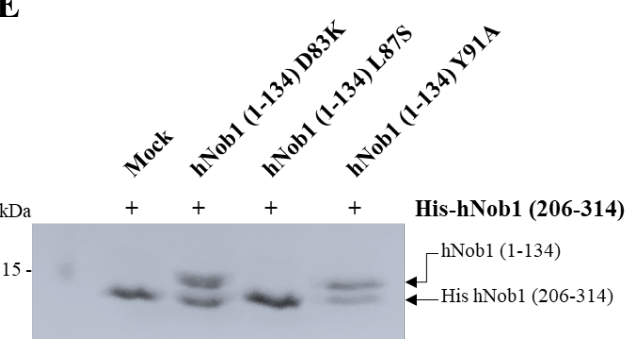
Figure 1. Human Nob1 domain organization. A) Sequence alignment and secondary structure prediction of Nob1 homologues from major clades showing conservation along the protein sequence performed with ESPript [29]. Coloring scheme is as follow: Fully conserved residues have a red background, partially conserved amino acids are shown as bold letters over a yellow box. The alignment has the following UniProt entries: human, Q9ULX3; mouse, Q8BW10; zebrafish, F1R4C1; african clawed frog, Q6VEU0; fruit fly, Q9W2Y4; baker's yeast, Q08444; *C. thermophilum*, G0S762 and *P. horikoshii*, O58440. The first 79 amino acids of *C. thermophilum* sequence have been removed due to non-conservation with the other homologues and space limitation. Secondary structure element prediction from PHYRE is indicated above the alignment and numbered. The sequence corresponding to the proposed first and second half of the PIN domain is boxed in green and salmon, respectively. The proposed PIN domain active site are indicated by red dots while the other residues reported to be involved in the active site are indicated by blue stars. Three black asterisk indicate the mutated residues in panel E. The zinc ribbon domain is outlined in dark blue. B) PIN domain structural prediction is shown in cartoon representation and colored in green and salmon according to domain limits defined in panel A. Individual secondary structure elements are labelled. Active site residues are shown as colored sticks (cyan, carbon; red,

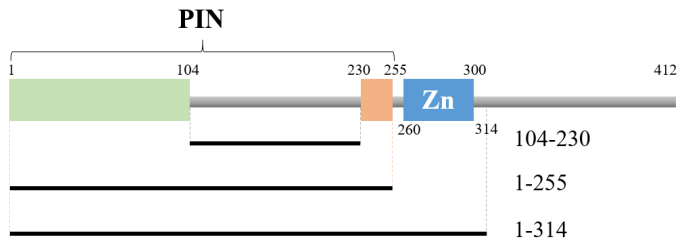
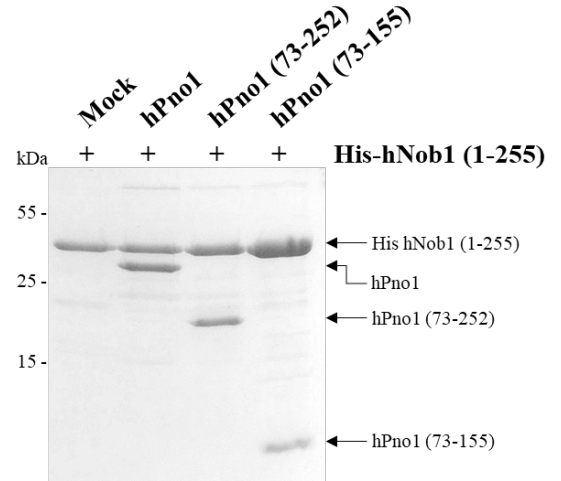
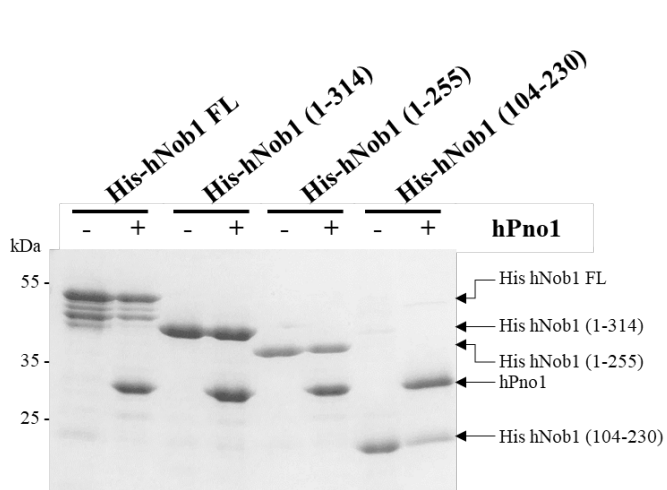
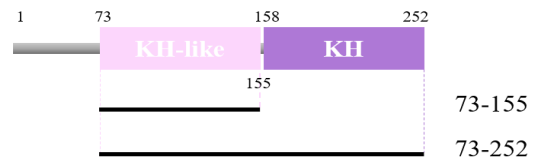
oxygen) and labelled. Mutated residues are shown as sticks and labelled in italic. C) Schematic view of the endonuclease hNob1 domain organization colored as in panel A. The different hNob1 fragments used for domain boundary definition are shown below. D) The two halves of the PIN domain interact together. Ni-NTA purification of lysate from cells co-expressing two Nob1 fragments showing complex formation between fragment 1-134 and 206-314. This complex is not observed between fragments 1-134 and 249-314, thus excluding a stable interaction between the zinc ribbon and the first half of the PIN domain. E) Interface mutations affect PIN domain formation. Ni-NTA purification of lysate from cells co-expressing two Nob1 fragments. The non-histidine tagged fragments was carrying the mutation D83K, L87S or Y91A. Mutation of hNob1 (1-134) L87S abolishes interaction with the fragment 206-314.

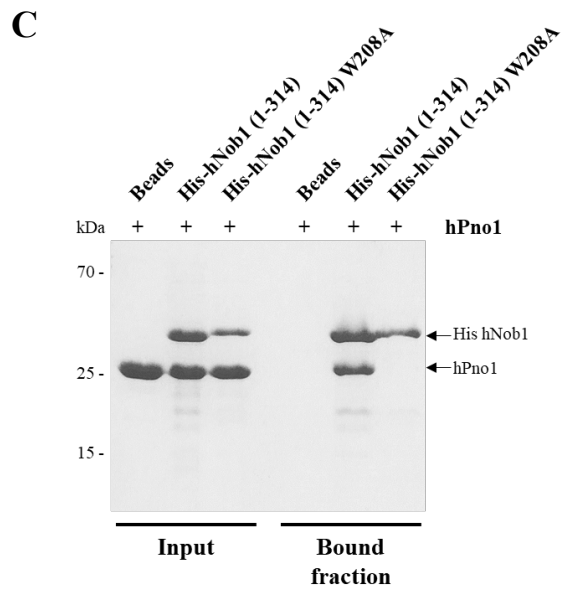
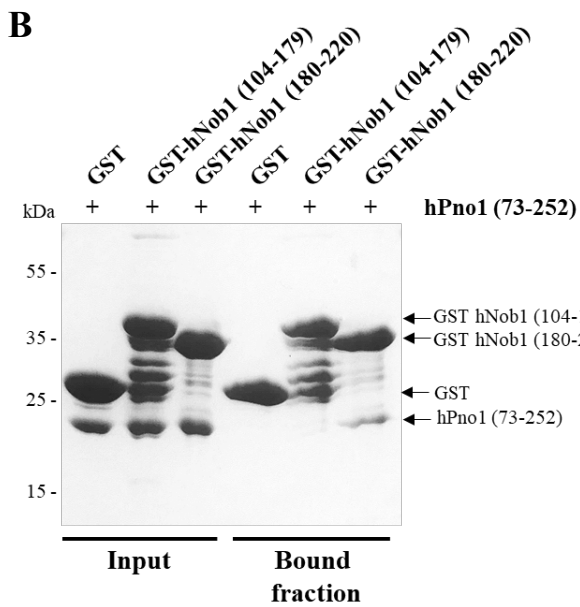
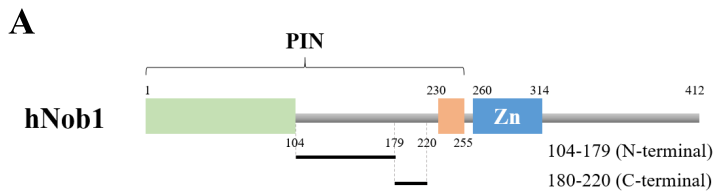
Figure 2. Definition of the minimal fragment of hNob1 or hPno1 required for complex formation. A) Schematic view of hNob1 fragments (upper part) used for the mapping of the interaction. Co-expression of the indicated hNob1 constructs with or without untagged hPno1 (bottom part). Protein are identified next to the SDS-PAGE. B) Schematic view of hPno1 fragments (upper part) used for the mapping of the interaction. Co-expression of the indicated untagged hPno1 constructs with histidine-tagged hNob1 (bottom part). Small scale Ni-NTA purifications are described in Material and Methods.

Figure 3. hNob1 interaction with hPno1 depends on the tryptophan at position 208 in hNob1 and on the KH-like domain of hPno1. A) Schematic view of the different parts of the hNob1 internal loop used to define the minimal region of interaction with hPno1. B) Pull-down assay of GST-tagged hNob1 linker constructs with hPno1 showing that the C-terminal part of the linker is sufficient for association. C) Pull down assay of His-tagged hNob1 (1-314) with or without the

mutation W208A. Pull-down experiments shown in panel B and C were performed as described in Material and Methods.

**A****B****C****D****E**

**A****B**



## a) *Données supplémentaires*

La structure du pré-40S humain qui a été publiée concomitamment à notre publication nous a confirmé les données biochimiques concernant la caractérisation des interactions entre le complexe Nob1/Pno1. En effet, l'organisation du complexe Nob1/Pno1 au sein du pré-40S montre que l'interface d'interaction de l'endonucléase avec son partenaire nécessite les deux régions flexibles de Nob1 (*Figure 18*). Deux résidus de la boucle interne de l'endonucléase sont directement en interaction avec la protéine Pno1. Une phénylalanine (F128) reconnaît deux résidus aromatiques (W92 et F109) de Pno1 localisés au niveau du coude formant une structure de type hélice-coude-hélice du domaine KH like (*Figure 19A*). Le tryptophane (W208) quant à lui vient s'insérer dans la cavité formée par quatre acides aminés de Pno1 (Q106, R108, E117 et R119) localisés au niveau de deux brins  $\beta$  antiparallèles du domaine KH like (*Figure 19B*). L'extension C-terminale de Nob1 vient s'insérer dans la région hydrophobe connectant les deux domaines KH de Pno1. D'une part, le phénylalanine (F373) de Nob1 établit un lien direct avec deux leucines en position 158 et 212. D'autre part, l'arginine (R376) va reconnaître un acide aminé aliphatique (L201) et un résidu aromatique (F192) de Pno1 (Ameismeier et al., 2018).

Les données structurales obtenues par le groupe de Beckmann ont ainsi permis de confirmer nos données biochimiques et les auteurs ont également identifié des résidus additionnels impliqués dans la reconnaissance entre l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1. Les autres interactions rapportées sont des reconnaissances secondaires puisque dans le cadre du pré-ribosome, les deux protéines sont contraintes à adopter une conformation préférentielle de manière à éviter les encombrements ou « clashes » stériques. En effet, nous avons montré par nos expériences de pull down que la mutation du résidu W208 entraînait une perte de la formation du complexe Nob1/Pno1. La dissociation du complexe formé par ces deux facteurs est très bien expliquée par les données structurales puisque lorsque l'on mute le tryptophane (W208) en alanine, ce dernier n'est pas capable d'établir des interactions avec la poche formée par les quatre résidus polaires du facteur Pno1 (Q106, R108, E117 et R119). En outre si les autres résidus (F128, F383 et R376) semblent importants pour la reconnaissance avec Pno1 dans le cadre de la particule pré-40S, nos données biochimiques montrent que l'absence de ces résidus n'affecte pas la formation du complexe Nob1/Pno1. D'une part, nos expériences de pull down nous ont montré que la partie N-terminale de la boucle qui correspond au fragment 104-179 (contenant le résidu F128) n'est pas capable de reconnaître Pno1 contrairement à la partie

C-terminale de la boucle (180-220) qui elle, est suffisante et nécessaire pour la formation du complexe Nob1/Pno1 (Raoelijaona et al., 2018). Ces mêmes caractéristiques ont été observées chez *Chaetomium thermophilum* puisque l'homologue ctNob1 délété du fragment contenant le motif WIT n'arrive pas non plus à retenir son partenaire ctPno1 (Sturm et al., 2017). De plus, nous avons montré par des expériences de co-expression que l'absence de la partie C-terminale de Nob1 (après le résidu 314) n'interfère pas avec la stabilité du complexe, puisque Pno1 est toujours co-purifiée avec l'endonucléase Nob1 (Raoelijaona et al., 2018).

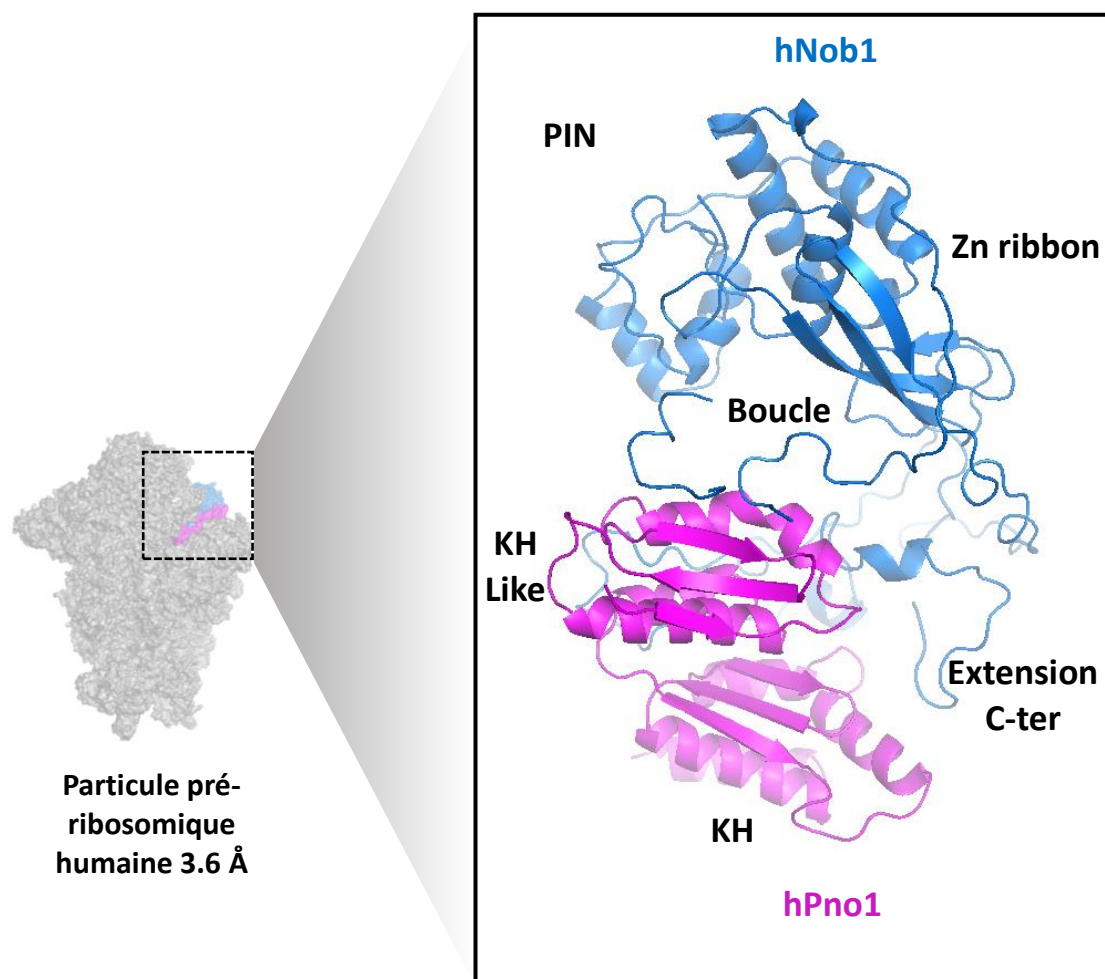
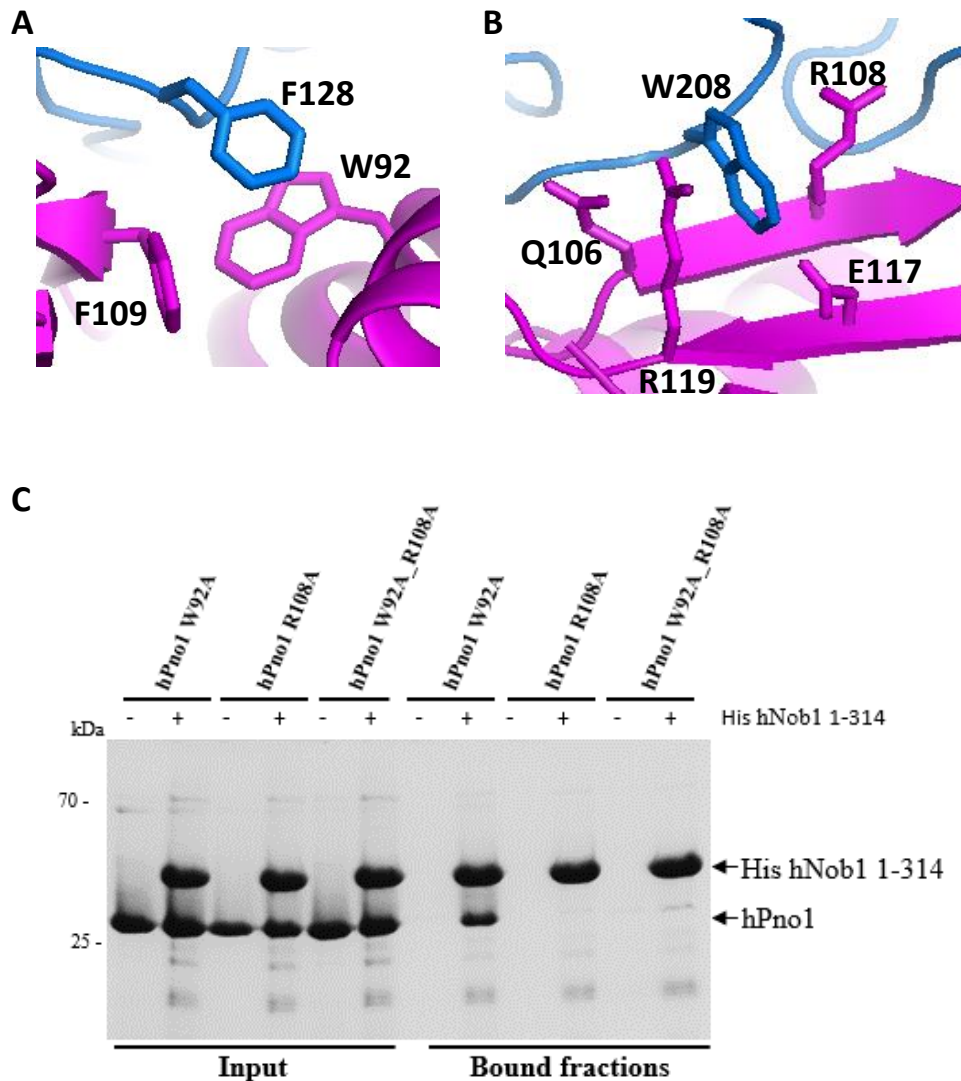


Figure 18 : Organisation du complexe Nob1/Pno1 au sein de la particule pré-40S humaine (d'après la structure obtenue par cryo-microscopie électronique PDB ID : 6g18 (Ameismeier et al., 2018)). Structure du complexe Nob1/Pno1 avec les domaines caractéristiques de deux facteurs : Nob1 (bleu) et Pno1 (rose). L'interface de reconnaissance entre l'endonucléase et son partenaire Pno1 nécessite les deux régions flexibles de Nob1 : la boucle interne et la partie C-terminale ou extension C-ter.

Pendant ma thèse, j'ai également étudié l'importance de certains résidus de Pno1 sur la formation du complexe Nob1/Pno1. Pour ce faire, nous nous sommes basés d'une part sur les études de cartographie de la protéine Pno1 effectuées chez la levure où les auteurs ont montré que la reconnaissance de celle-ci avec Nob1 faisait intervenir son domaine KH like. Les auteurs ont également montré que le motif NWST qui correspond au coude de la structure hélice-coude-hélice était impliqué dans la reconnaissance de Pno1 avec l'endonucléase Nob1 (Woolls et al., 2011). Nous avons ainsi décidé de muter le tryptophane en position 92 chez l'homme (W113 chez la levure) et étudier l'effet de cette mutation sur la stabilité du complexe Nob1/Pno1. Nos expériences de pull down nous ont montré que cette mutation n'affecte pas l'interaction entre les deux facteurs puisque la construction mutée de Pno1 (W92A) est toujours co-purifiée avec l'endonucléase. D'autre part, l'analyse de l'organisation de Pno1 au sein de la particule pré-ribosomique 40S de la levure nous a montré que d'autres résidus sont exposés au solvant ce qui leur permet d'accommoder d'autre interaction. Parmi ces résidus, nous avons décidé de se focaliser sur les acides aminés suivants : une glutamine (Q106), une arginine (R108) et une asparagine (N110). Nous avons donc décidé de générer une construction de Pno1 contenant une triple mutation des trois résidus polaires cités précédemment. Cette construction correspond ainsi à Pno1<sup>Q106A-R108S-N110A</sup> qui malheureusement ne s'est pas exprimée et par conséquent nous a empêchés de tester l'effet de ces mutations. Enfin, nous avons combiné les informations structurales disponibles chez la levure et chez l'homme concernant l'organisation de Pno1 au sein de la particule pré-40S nous permettant de nous focaliser sur l'arginine (R108) (Scaiola et al., 2018 ; Ameismeier et al., 2018). Dans le cadre de la particule pré-ribosomique tardive humaine, ce résidu fait partie des quatre acides aminés qui forme la cavité où vient s'insérer le tryptophane W208 de Nob1. Nous avons donc généré la construction Pno1<sup>R108A</sup> et étudié l'effet de la mutation sur la stabilité du complexe. Les résultats des expériences de pull down nous ont montré que la mutation conduit à la perte de l'interaction avec l'endonucléase Nob1. En effet, comme l'arginine R108 est impliquée dans la formation de la poche permettant de piéger la chaîne latérale du tryptophane W208 de Nob1, la mutation R108A va donc perturber l'interface nécessaire pour former la cavité et par conséquent celle-ci affecte la stabilité du complexe Nob1/Pno1. De la même façon, lorsque l'on combine les mutations W92A et R108A, la construction Pno1<sup>W92A-R108A</sup> n'est plus capable reconnaître l'endonucléase Nob1 (*Figure 19C*).

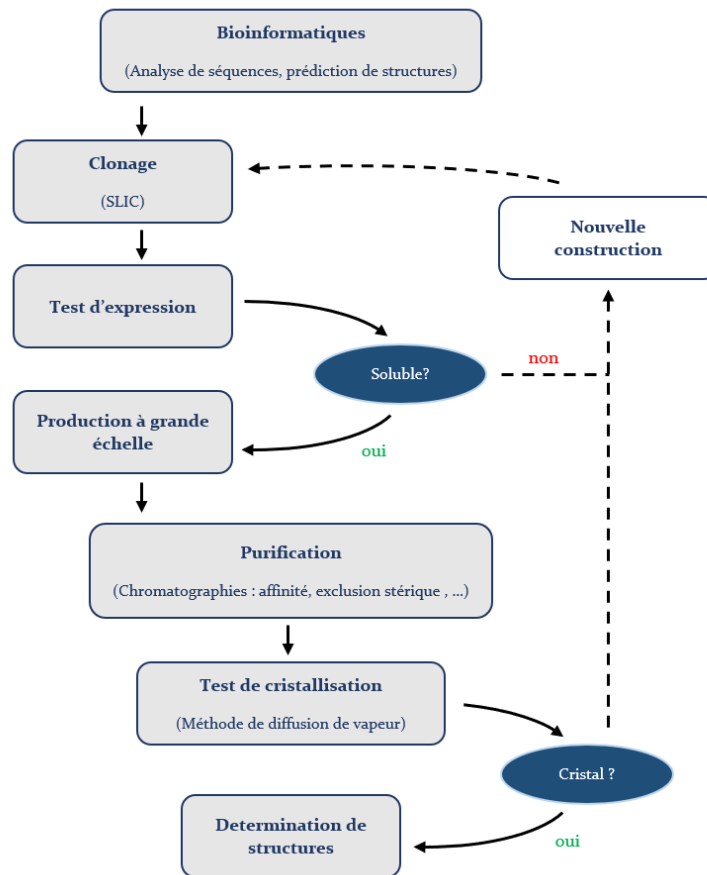


**Figure 19:** Les différents résidus impliqués dans la formation du complexe **Nob1/Pno1**. Vue détaillée de l'interface d'interaction entre Nob1 (bleu) et Pno1 (Rose) (modèle adaptée de la structure cryo-microscopique de la particule pré-40S humaine PDB ID : 6G18 (Ameismeier et al., 2018)) : A) Interaction du résidu F128 de la boucle interne de Nob1 avec les deux chaînes latérales des deux acides aminés du partenaire Pno1 (W92 et F109); B) Reconnaissance entre le W208 de Nob1 et la cavité formée par les quatre résidus polaires de Pno1 (Q106, R108, E117 et R119). C) Pull down entre l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1 pour étudier l'effet des mutations hPno1<sup>W92A</sup>, hPno1<sup>R108A</sup> et hPno1<sup>W92A\_R108A</sup> sur la stabilité du complexe protéique.

## 2. Cristallisation

En parallèle des expériences biochimiques pour cartographier l'interaction entre l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1. Nous nous sommes aussi intéressés à des approches structurales. En effet, les données biochimiques nous ont permis d'obtenir des informations sur les interfaces de reconnaissance entre le complexe protéique que nous avons voulu valider par des informations à l'échelle atomique et ainsi obtenir des données plus précises. Pour ce faire, nos études ont été orientées vers une approche structurale par la méthode de cristallographie aux rayons X. Cette partie suit les différentes procédures pour une étude structurale qui peut être illustrée par le schéma suivant (*Figure 20*).

Nous nous sommes basés sur les études de cartographie effectuées dans le chapitre 1 pour générer des constructions de chaque protéine d'intérêt. Le clonage des gènes d'intérêts a été effectué par l'utilisation de la méthode SLIC puis des tests d'expression et de solubilité ont été réalisés pour déterminer les conditions optimales de surexpression et de production à grande échelle. Ensuite, les protéines seules ou en complexe ont été purifiées et celles qui sont stables ont été amenées à la cristallisation puis dans le cas d'obtention des cristaux, on peut procéder à la diffraction et la détermination de structure. L'étape limitante de la cristallisation est l'obtention de cristaux lorsque l'on n'arrivait pas à produire des protéines solubles, une optimisation des constructions et/ou de la cristallisation étaient réalisées.



**Figure 20 : Workflow représentant les étapes d'une étude structurale suivies dans notre projet**

**a) Purification et cristallisation du complexe Nob1/Pno1 chez l'homme**

Sur la base des résultats obtenus à partir des tests d'expression effectués sur les protéines (Nob1 ou Pno1), leurs domaines isolés ou leurs complexes, nous avons effectué des expressions suivies d'expériences de purification à grande échelle. En effet, la cristallisation nécessite une quantité importante de protéines avec une très grande pureté (~ 99%). Les principaux critères étaient d'avoir des échantillons homogènes, solubles et stables. Dans ce projet, nous avons réussi à produire plusieurs constructions de Nob1 et de Pno1. Le tableau suivant résume les différentes constructions utilisées pour nos études structurales ainsi que les combinaisons de celles-ci (*Tableau 1*).

PROTEINES	[mg/mL]	SCREENS	8°C	20°C	Hits
<i>Homo sapiens</i>					
hNob1 1-314/hPno1 FL	2, 14	MCSG (1,2,3,4), NDEX, Pro complex		x	
hNob1 104-230/hPno1 FL	10, 11, 12, 14	MCSG (1,2,3,4), SALT, PEG ion, INDEX, PACT, Pro complex	x	x	x
hPno1 65-252	16, 20, 22	INDEX, Anion suite, SALT, Cation, Pro complex, Cryo I & II, Proplex I & II, MIDAS, CLASSICs, MCSG (1,2,3,4),	x	x	
GST-His_hPno1 65-252	23	MCSG (1,2,3,4), INDEX, CLASSICs	x	x	x
hPno1 73-252	15	MCSG (1,2,3,4), JCSG+, PACT, INDEX, PEGs suites	x	x	
GST-His hNob1 180-220 / hPno1 65-252	16, 22	MCSG (1,2,3,4), NDEX, PACT, CLASSICs, PEGs suites, MORPHEUS	x	x	
hPno1 73-155/hNob1 104-230	15, 20	MCSG (1,2,3,4)	x	x	
hNob1 1-255 Δ (115-202)	7.5, 10, 15	MCSG (1,2,3,4)	x	x	
hNob1 1-255 Δ (115-202) /hPno1 73-252	12	MCSG (1,2,3,4), PACT, Pro complex, PEGs suite	x	x	
hNob1 1-255 Δ (115-202) /hPno1 73-155	7.5, 12	MCSG (1,2,3,4), JCSG +	x	x	
His_GST_hNob1 1-314 Δ (115-202) D238N	14	MCSG (1, 2), PACT, INDEX, JCSG +, Cryo I & II	x	x	x
<i>Encephalotizoon cuniculi</i>					
His ecNob1 1-125/ecPno1 1-183	4, 11	MCSG (1, 2, 3, 4), PACT, INDEX, MIDAS, WIZARD/Natrix, Cryo I & II	x	x	x
His ecNob1 1-125	4, 10	MCSG (1,2,3,4), Cryo I & II, INDEX, JCSG+, WIZARD/Natrix, Crystal screen, Cations suites, PEGs suites	x	x	x
His-GST ecNob1	6	MCSG (1,2,3,4), Cryo I & II, Crystal screen, Cations suites, PEGs suites	x	x	x
His ecCinap/ecPno1 1-183	4.5	MCSG (1,2,3,4), Cryo I & II, MIDAS, PEGs suites	x	x	

Tableau 1 : Résumé des différentes combinaisons de protéines purifiées et testées en cristallisation

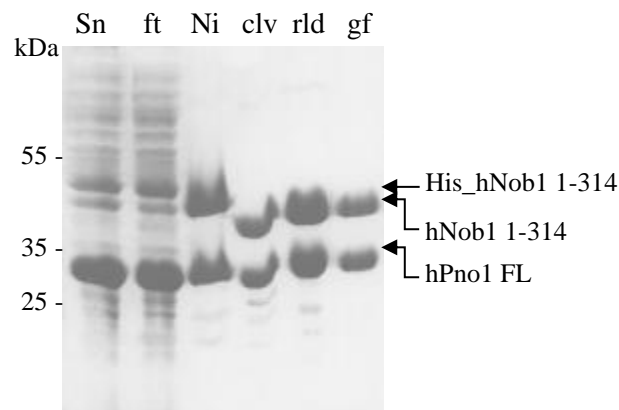
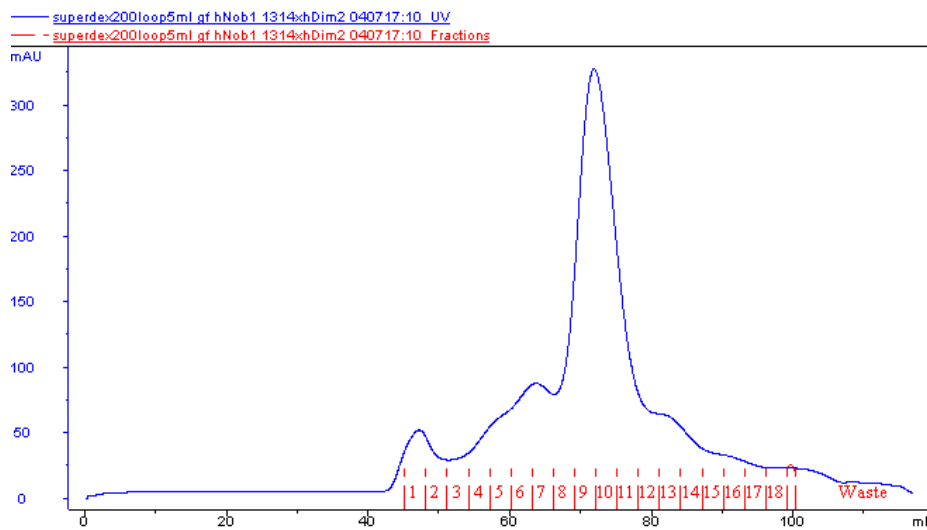
Dans un premier temps nous nous sommes surtout focalisés sur le complexe Nob1 1-314/Pno1 car la protéine Nob1 entière était difficile à travailler d'une part par ce que celle-ci n'était pas stable et d'autre part, parce qu'elle était sujette à une dégradation. La construction 1-314 a donc été choisie pour rester dans des conditions proches de la forme sauvage.

Beaucoup de difficultés ont été rencontrés lors de cette étape et les problèmes ont été principalement liés à la purification du complexe. Après avoir effectué différentes optimisations de nos conditions de purifications initiales, nos tests nous ont permis de travailler avec un tampon à haut sel ( $\geq 300$  mM). Ainsi, nous avons standardisé notre protocole de purification comme suit : une première étape de chromatographie d'affinité avec l'utilisation d'un tampon à pH 7.5 avec une concentration de sel à 300 mM (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 5 mM  $\beta$ -Mercapto ethanol) où la protéine d'intérêt est éluée par compétition avec une concentration élevée en imidazole (200 mM). L'étiquette Histidine de la protéine de fusion est ensuite éliminée par une réaction de clivage avec la protéase TEV. La condition optimale pour les protéines humaines était une incubation à 16°C sur la nuit. L'échantillon d'intérêt a ensuite été récupéré et repassé sur une colonne d'affinité Nickel. Cette étape permet de séparer la fraction contenant le complexe d'intérêt dépourvu de l'étiquette d'affinité de la protéase. En effet, la protéase TEV porte une étiquette poly-Histidine qui va permettre sa rétention sur la colonne avec le complexe non clivé. Enfin, une chromatographie d'exclusion stérique qui permet de séparer les protéines en fonction de leur taille, le but de cette étape étant de ne garder que le complexe protéique. Cette dernière sert également à faire un échange de tampon dans lequel la protéine sera conservée pour les tests de cristallisation. L'utilisation d'un tampon contenant 10% (v/v) de glycérol a permis de stabiliser le complexe et ainsi de faciliter la concentration de la protéine.

La figure ci-dessous (*figure 21*) montre le chromatogramme correspondant à l'étape de gel filtration où l'on a principalement un pic à une absorbance  $A_{280}$  d'environ 350 mAU. Le gel SDS page ci-dessous résume nos étapes de purification où l'on peut observer dans la fraction correspondant aux extraits solubles (piste sn : surnageant) plusieurs bandes qui correspondent aux différentes protéines de la bactérie. On peut également constater que deux bandes sont plus intenses : une première bande entre 25 et 35 kDa qui correspond à Pno1 puisque son poids moléculaire théorique est de 27 kDa. Une autre bande entre 35 et 55 kDa, qui cette fois-ci va correspondre au fragment 1-314 de Nob1 qui fait 37 kDa. Le même profil est observé dans le second piste correspondant au matériel non retenu sur la colonne d'affinité. La présence des bandes correspondant à Nob1 et Pno1 pourrait indiquer que la matrice est saturée et donc les

excès de protéines vont se retrouver dans la fraction ft (piste ft). Après élution, qui correspond à la piste Ni, on peut constater que la fraction contient principalement nos deux protéines d'intérêt. On a donc un enrichissement du complexe d'intérêt. Suite au clivage à la protéase Tev (piste clv), on peut observer un léger décalage de la bande correspondant à Nob1. En effet, celui-ci porte l'étiquette d'affinité poly-histidine et donc une fois que celle-ci est clivée, on va avoir une protéine de plus faible poids moléculaire. Comme l'étiquette ne fait que 2 kDa, la différence entre la protéine étiquetée et celle-ci clivée n'est pas très importante ce qui explique le léger décalage observé pendant la migration. Dans la fraction rld (reload : la protéine dépourvue de son étiquette d'affinité), qui correspond au complexe avant l'étape de chargement sur la colonne de gel filtration (piste rld), on peut observer des bandes contaminantes en dessous de 25 kDa. Ces bandes ne sont pas présentes dans la dernière étape de purification où l'on a que les deux bandes de nos protéines d'intérêt (piste gf). Avec ces conditions, nous avons donc pu purifier les différents complexes, et en particulier le complexe Nob1 1-314/Pno1 avec une concentration d'environ 14 mg/ml pour les tests de cristallisation (*figure 21*).

L'utilisation du complexe Nob1 (1-314) /Pno1 fut très vite abandonnée puisqu'aucun des cribles testés n'a permis d'obtenir de cristaux ni aucune condition initiale qui pourrait indiquer un évènement de nucléation. Par conséquent, nous sommes repartis sur la production d'une nouvelle construction et sur la base des résultats de nos tests d'expression, nous nous sommes focalisés sur une région plus courte de Nob1 qui correspond à une construction de la boucle interne (hNob1 104-230), suffisante pour la formation du complexe protéique.



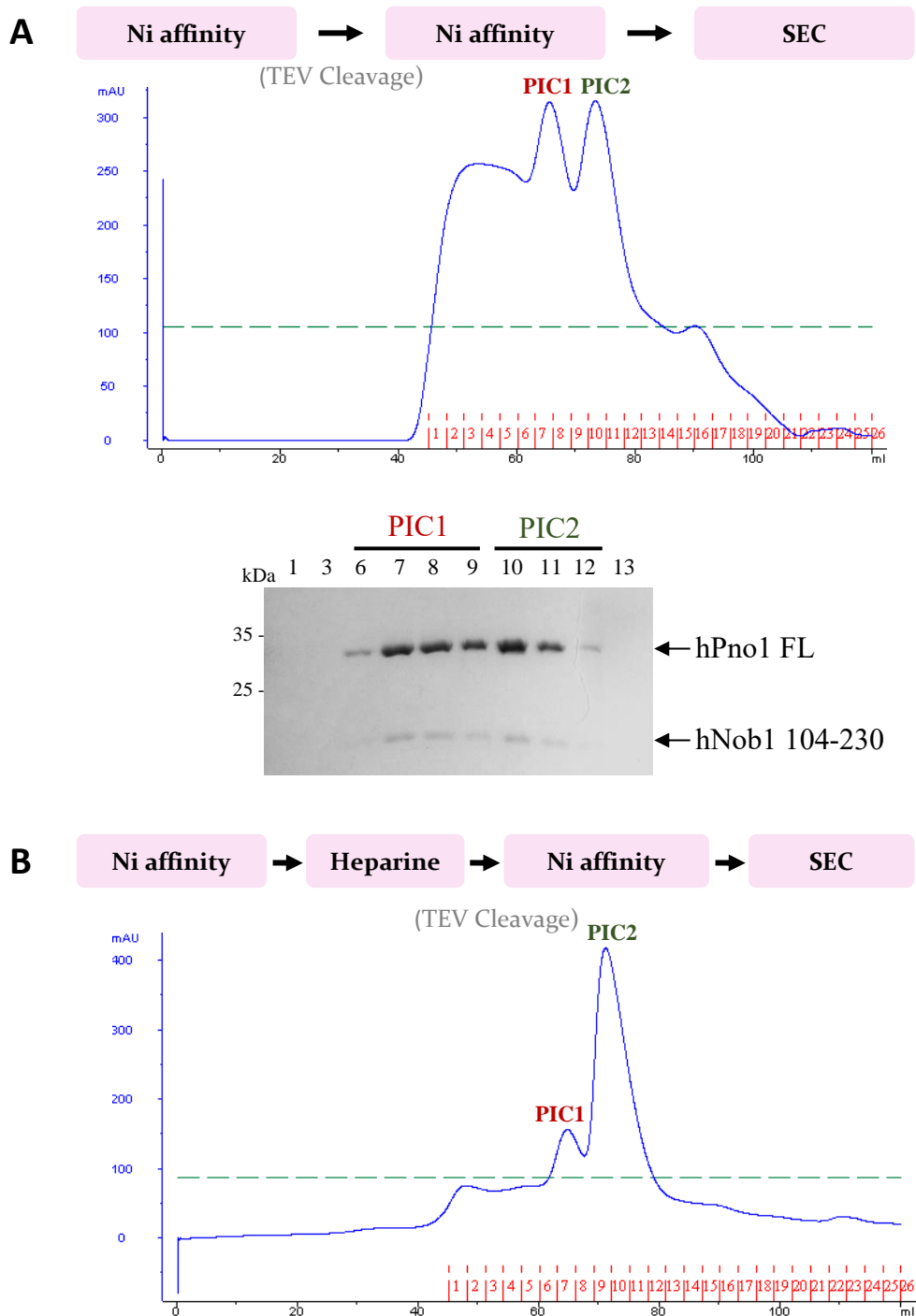
**Figure 21 : Purification du complexe Nob1 (1-314) /Pno1 chez l'homme.** (Haut) Chromatogramme de la dernière étape de purification du complexe Nob1/Pno1 montrant la présence d'un pic absorbant à 350 mAU. (Bas) Résumé des étapes de purification du complexe sur gel SDS PAGE 12.5% montrant la diminution des bandes correspondant aux contaminants de la bactérie *E. coli*, suivant les différentes étapes de purification on voit un enrichissement des deux protéines d'intérêts qui représentent le pic du chromatogramme. **Sn** : surnageant ou fraction soluble ; **ft** : flowthrough, correspond au matériel non fixé sur la colonne ; **Ni** : fraction protéique après la chromatographie d'affinité au Nickel ; **clv** : clivage, échantillon après la digestion à la protéase Tev ; **rld** : reload, fraction protéique après la seconde chromatographie d'affinité au Nickel ; **gf** : gel filtration, fraction après la dernière étape de purification qui correspond à une chromatographie d'exclusion stérique.

Avec l'utilisation des mêmes conditions de purification décrites précédemment, nous avons réussi à purifier le complexe Nob1 (104-230)/Pno1. Cependant, lors de l'étape de gel filtration, nous avons constaté la présence de deux pics à des volumes d'élution ( $V_e$ ) différents : un  $V_e$  de 50 mL pour le premier pic (PIC1) et un  $V_e$  de 60 mL pour le second pic (PIC2) (Figure 22A). Ces résultats pourraient indiquer la présence de deux populations qui correspondraient par conséquent à deux types de conformation adoptée par le complexe d'intérêt. Les fractions ont donc été analysées sur gel SDS PAGE et la figure ci-dessous nous montre que l'on peut observer la présence de deux bandes protéiques. Une première bande qui migre aux alentours de 15 kDa, celle-ci correspond au fragment de Nob1 (104-230) qui fait environ 13 kDa. La deuxième bande correspond à la protéine Pno1, qui va migrer entre 25 et 35 kDa comme ce que l'on a pu observer lors de la purification du complexe Nob1 (1-314) /Pno1. Etant donné le fait que l'on ne trouve aucune différence de composition lors de l'électrophorèse sur gel SDS-PAGE entre les deux fractions éluées, nous avons décidé de garder les échantillons correspondant à chaque pic et de les cristalliser séparément. En parallèle, nous avons optimisé nos conditions de purification de manière à obtenir un complexe protéique homogène. Pour ce faire, l'ajout d'une colonne héparine après la première étape d'affinité suffit pour obtenir majoritairement le second pic (PIC2) que l'on observe précédemment (Figure 22B).

Les tests de cristallisations pour la fraction correspondant au deuxième pic nous ont permis d'obtenir des petits cristaux. Ceci nous a donné un résultat plutôt encourageant puisque le PIC2 qui correspondait *a priori* à un complexe plus compact et au poids moléculaire attendu du fait que le complexe est globulaire. En effet, ce volume d'élution correspondrait à une élution caractéristique d'une protéine globulaire d'un poids moléculaire situé entre 30 et 44 kDa. La condition de cristallisation initiale a donc été optimisée (12 mg/mL à une température de 8°C avec la condition F1 du screen MCSG2 qui contient : 200 mM NaCl, 100 mM Imidazole pH 8 et 1000 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) notamment en variant des paramètres tels que le pH ou la concentration des sels présents en tant que composant de la solution de cristallisation. Cependant, la cristallisation n'a pas été reproduite. Par conséquent, nous sommes passés à un complexe encore plus réduit puisque l'on a suspecté que la boucle interne (104-230) était trop flexible et que cela pouvait être défavorable à la formation d'un précipitant ordonné qui pouvait aboutir à la formation de cristaux.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la partie C-terminale de la boucle (180-220). En effet, dans le chapitre précédent, cette région est nécessaire et suffisante pour la formation du

complexe d'intérêt. Ce petit fragment de 40 résidus a donc été produit et purifié en grande quantité. De même pour la protéine Pno1, nous avons amélioré la construction utilisée.



**Figure 22 : Purification du complexe Nob1 (104-230) / Pno1 chez l'homme.** A) Profil d'élution du complexe hNob1 (104-230) /hPno1 FL où l'on peut voir deux pics de la même intensité qui sont élués à deux volumes différents (haut). Analyse sur gel SDS PAGE des fractions contenues dans chaque montrant la présence des deux bandes : une entre 25 et 35 kDa qui correspond à Pno1 (27 kDa) et une bande plus faible qui est celle de la boucle interne de Nob1 (14 kDa) (Bas). B) optimisation de la purification pour avoir un pic homogène.

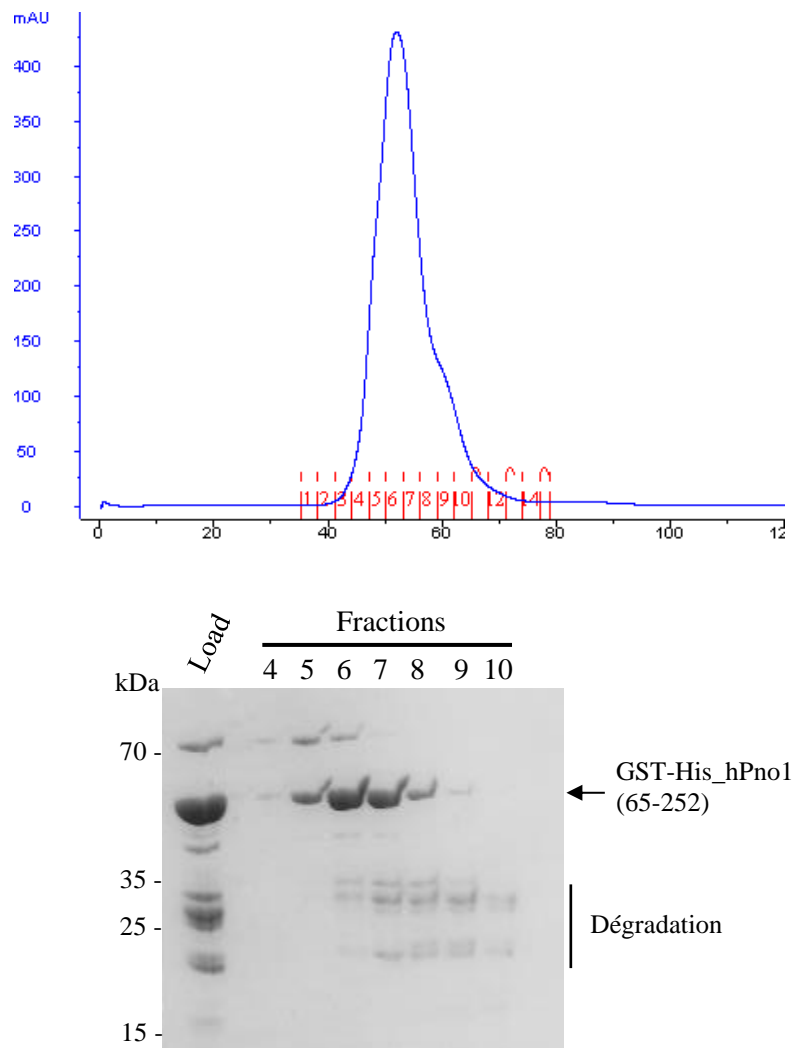
En effet d'après les données de conservation de séquence, la partie N-terminale de ce facteur n'est pas conservée au cours de l'évolution et cette région de la protéine est prédite comme étant désordonnée. Par conséquent, nous avons décidé de travailler avec une construction plus courte de la protéine Pno1 qui correspond au fragment (65-252). Les deux protéines ont été purifiées séparément puis le complexe (Nob1-Boucle/Pno1) a été reconstitué en faisant un mélange équimolaire. Le complexe a été séparé des protéines libres sur une colonne d'exclusion stérique Hiloal 16/600 Superdex S75 pg prepgrad. En utilisant cette méthode, nous avons réussi à obtenir une quantité suffisante du complexe d'intérêt pour effectuer des tests de cristallisation qui sont résumés dans le tableau précédent (*Tableau 1*). Malheureusement, cette stratégie n'a pas donné de résultat encourageant malgré le fait de varier certaines conditions comme : la température, la concentration du complexe ou encore la préparation du complexe (différentes conditions d'incubation).

N'ayant pas obtenu de résultats probants avec le complexe préformé, nous avons considéré une autre stratégie qui consistait à cristalliser une des deux protéines puis à rajouter le deuxième partenaire en fonction de l'espace disponible dans le cristal. D'après la littérature, des données structurales sont disponibles pour le facteur Pno1. En effet, cette protéine possède un homologue chez les archées (aDim2) et celle-ci a déjà été cristallisée. A disposition, nous avions des constructions de Pno1 qui étaient solubles et pouvaient être purifiées séparément en quantité très importante. Nous avons donc décidé de produire le fragment dépourvu de la partie N-ter (65-252) et de tester la cristallisation de ce dernier. Pour ce faire, nous avons ajouté des critères additionnels pour augmenter la probabilité d'obtenir des cristaux. En effet, pour la purification de la construction correspondant à Pno1 (65-252) nous avons ajusté notre pH à 8 et utilisé des conditions similaires à celle de l'archée (Jia et al., 2006, 2010). Les informations obtenues d'après des outils de bioinformatiques concernant les paramètres de la protéine Pno1 nous ont permis de déterminer calculer le point isoélectrique (pI) du fragment (65-252). Le pI du facteur Pno1 correspond à 9.86, ainsi travailler avec les conditions similaires à la protéine homologue de l'archée n'affecte pas la charge nette de la protéine. Cependant, malgré une bonne expression, une pureté et un rendement élevé de l'échantillon protéique, aucun cristal n'a été obtenu. Par conséquent, nous avons essayé de remédier à ces problèmes cette fois-ci en changeant l'étiquette de purification et opter pour la protéine glutathionne-S-transférase (GST) comme celle-ci est connue pour bien cristalliser, nous avons voulu prendre avantage de cet aspect et utiliser l'étiquette d'affinité comme chaperonne de cristallisation. La construction de Pno1 (65-252) fut alors reclonée dans un vecteur pST31 (cf mat et meth). Nous avons généré

une construction qui était organisée comme suit : GST\_ 6xHis\_site-TEV\_Pno1(65-252). La méthode de purification utilisé nous a permis de produire la protéine de fusion en grande quantité. La figure ci-dessous (*Figure 23*), nous montre le chromatogramme correspondant à l'étape de gel filtration où l'on a un grand pic qui est élué dans le volume mort ( $V_0$ ) de la colonne. Ensuite, on peut observer un épaulement qui est élué avec un  $V_e$  de 45 mL. Les fractions d'intérêt ont également été analysées sur gel SDS PAGE et la révélation des bandes par coloration au bleu de coomassie nous montre la présence plusieurs bandes dans l'échantillon avant chargement sur la colonne (piste load). On peut observer une bande à 70 kDa qui correspondrait à un contaminant bactérien, la chaperonne Hsp70 qui est exprimée dans les souche d'*E. coli*. De plus on a une deuxième bande qui est aux alentours de 55 kDa. Celle-ci correspond à notre protéine d'intérêt fusionnée la GST. En effet, notre construction fait une taille d'environ 49 kDa (qui correspond à la somme des poids moléculaires de l'étiquette d'affinité GST (28 kDa) et du fragment de Pno1 (21 kDa)). Enfin, on observe plusieurs bandes à plus faible poids moléculaire qui indiqueraient une dégradation de la protéine d'intérêt.

Concernant la fraction éluée après la chromatographie d'exclusion stérique, les deux pistes 4 et 5 correspondent au  $V_0$  de la colonne et donc on peut constater la présence des bandes à 55 et 70 kDa qui vont respectivement correspondre à la protéine de fusion et la chaperonne. Le fait que l'on retrouve une partie de la protéine éluée dans le volume mort de la colonne pourrait s'expliquer par le comportement de celle-ci favorisant à la formation des agrégats. Ainsi une partie de l'échantillon va directement passer à travers la colonne et n'entrera pas dans la phase stationnaire. Les pistes 6, 7 et 8, contiennent majoritairement la bande à 50 kDa qui est notre protéine de fusion. En tenant compte de la masse moléculaire (MW) théorique de celle-ci ainsi que le fait que cette protéine soit globulaire, on s'attendrait à ce que le facteur Pno1 soit élué entre 55 et 65 mL. C'est d'ailleurs cette fraction qui nous intéresse et nous avons réussi à l'amener jusqu'au test de cristallisation avec une concentration supérieure à 10 mg/mL. L'étiquette d'affinité GST n'a donc pas été clivée puisque nous nous sommes servis de celle-ci comme chaperonne de cristallisation. Enfin dans les pistes 9 et 10, on peut observer la présence des bandes qui correspondent à la dégradation de la protéine d'intérêt (*Figure 23*). Ces différentes astuces nous ont permis d'obtenir des « Hits » dans lesquels nous avons principalement trouvé de fines aiguilles qui peuvent être un bon départ pour l'optimisation vers un cristal exploitable pour des études structurales. Malgré les différentes conditions d'optimisation testées (la température, le pH, le sel, le précipitant ou encore la concentration de la protéine) nous n'avons pas pu reproduire les conditions initiales (MCSG2 D10 : 200 mM

tri-lithium citrate, 20% v/v PEG 3350). Les aiguilles trouvées dans les premiers cribles étaient très fragiles et nous ont limité dans leur utilisation pour les étapes suivantes.

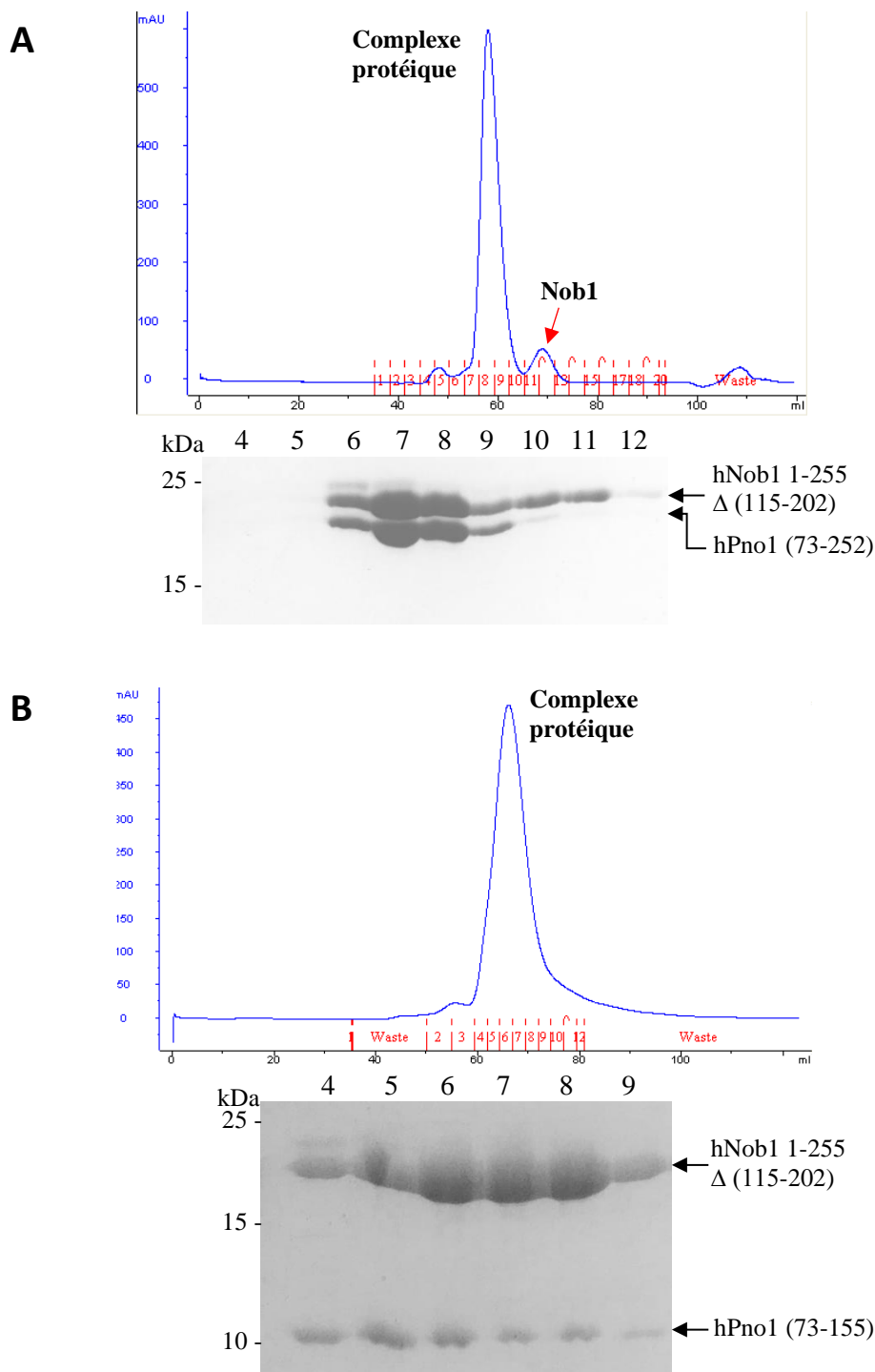


**Figure 23 : Purification du facteur Pno1 chez l'homme.** (Haut) Chromatogramme de l'élution de la construction (65-252) de Pno1 après passage sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique (Hiload 16/600 superdex S75 pg prepgrad) où l'on observe un grand pic avec une absorbance  $A_{280}$  correspondant à 400 mAU. Le pic élué n'est pas symétrique avec la présence d'un épaulement qui est élué vers 55 mL. (Bas) Analyse sur gel SDS PAGE 12.5% des fractions éluées après la dernière étape de purification (gel filtration) où l'on peut observer la bande protéique à 50 kDa correspondant à la protéine de fusion (GST\_His\_tev\_Pno1 (65-252)) mais également la présence de plusieurs bandes à plus faibles poids moléculaires qui pourraient indiquer de probable dégradation de celle-ci.

Nous sommes revenus au point de départ et nous avons essayé d'optimiser la construction. Une version plus courte de Pno1 a été utilisée suite à une expérience de digestion partielle à la trypsine qui a montré un fragment de Pno1 plutôt stable. Nous avons donc généré un nouveau fragment de Pno1 (73-252) qui contient les deux domaines KH. Au vu des résultats négatifs, nous avons reconsidéré la co-cristallisation du complexe. Par conséquent, une co-expression d'autres fragments de la boucle de Nob1 avec le domaine KH like de Pno1 a été testée sans grand succès (*Tableau 1*).

Enfin, les différentes données disponibles nous ont servi à produire une construction « super-optimisée » du domaine catalytique de Nob1. En effet, nous avons généré un fragment qui contenait principalement la région structurée du domaine PIN. De ce fait, la partie non conservée de la boucle a été enlevée et seule la partie C-ter contenant le motif WIT a été gardée (petit fragment suffisant pour la reconnaissance avec son partenaire Pno1). Ainsi, nous avons généré la construction de Nob1 1-255  $\Delta$  (115-202). Les tests de co-expression effectués avec les domaines de Pno1 nous ont montré que ce fragment était à la fois capable de former un complexe avec les deux domaines KH de Pno1 mais aussi avec le premier domaine KH (73-155).

Par conséquent, nous avons produit ces deux complexes en grande quantité pour ensuite les purifier dans le but d'obtenir le matériel nécessaire pour les tests de cristallisation. Pour le cas du complexe Nob1 1-255  $\Delta$  (115-202)/Pno1 (73-252), le chromatogramme ci-dessous nous montre que l'on a principalement un pic élué entre 55 et 65 mL. Notre complexe d'intérêt fait environ 40 kDa et en supposant que le complexe protéique formé est globulaire, le profil d'éluion correspondrait donc à la formation du complexe Nob1 1-255  $\Delta$  (115-202) / Pno1 (73-252). De plus, l'analyse sur gel SDS PAGE confirme bien la présence de deux bandes protéiques qui migrent aux alentours de 20 kDa. On peut également constater que les deux bandes observées sont très proche en termes de poids moléculaire (piste 7, 8, 9 et 10). Le fragment (73-252) de la protéine Pno1 fait 20 kDa, celle-ci correspond donc à la bande de plus faible poids moléculaire tandis que la bande au-dessus correspond à la construction de Nob1 qui fait environ 22 kDa. On peut également observer dans les pistes 11, 12 et 13, la bande correspondant à Nob1 qui pourrait indiquer l'excès de cette protéine par rapport au complexe d'intérêt qui correspond au petit pic élué plutôt avec un  $V_e$  de 55 mL (*Figure 24A*). Le complexe protéique a donc été concentré puis testé en cristallisation avec les différentes conditions résumées dans le tableau 1. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à aller au-delà de cette étape malgré un bon comportement du complexe protéique.



**Figure 24 : Purification du complexe Nob1/Pno1 humain.** A) Chromatogramme du complexe Nob1 1-255  $\Delta$  (115-202) / Pno1 (73-252) montrant la présence d'un grand pic avec une absorbance  $A_{280}$  de 600 mAU correspondant au complexe protéique avec un volume d'élution de 50 mL puis un second pic qui correspond à l'excès de Nob1 (haut) et analyse sur gel SDS PAGE 15% des fractions protéiques après l'étape de chromatographie d'exclusion stérique (bas). B) Chromatogramme du complexe Nob1 1-255  $\Delta$  (115-202) /Pno1(73-155) où l'on peut observer la présence d'un pic plus large par rapport au complexe formé avec les deux domaines KH de Pno1 (haut) et estimation de la pureté de l'échantillon par analyse sur gel SDS PAGE 15% où l'on peut observer la présence des deux bandes protéiques à 10 et 20 kDa et qui correspondent respectivement à Pno1 et Nob1(bas).

En parallèle, nous avons également purifié le second complexe formé (Nob1 1-255 Δ (115-202) / Pno1 (73-155)). Comme les résultats précédents, on peut observer un grand pic avec une absorbance  $A_{280}$  d'environ 600 mAU. Le profil d'élution est décalé entre 60 et 80 mL puisque notre complexe protéique est plus petit (environ 30 kDa). Le pic observé est également plus large par rapport à celui du complexe Nob1 1-255 Δ (115-202) / Pno1 (73-252). Les fractions ont donc été analysées sur gel SDS PAGE et la figure ci-dessus (*Figure 24 B*) nous indique la présence de deux bandes. Une première bande à 10 kDa qui correspond au domaine KH-like de Pno1 (le fragment 73-155) qui fait environ 9 kDa. On retrouve également la bande à 20 kDa caractéristique de Nob1. Le complexe Nob1 1-255 Δ (115-202) / Pno1 (73-252) a donc été produit à une quantité suffisante pour les tests de cristallisation (*Tableau 1*) et avec les conditions testées, nous avons réussi à trouver des hits qui nous ont servi de point de départ pour les optimisations effectuées à partir des « grid screen ». Malheureusement, ces optimisations ne nous ont pas permis de débloquent la partie obtention d'un cristal exploitable pour des études structurales.

### ***b) Purification et cristallisation du complexe Nob1/Pno1 chez d'autre organisme***

Au vu des difficultés rencontrées pour la cristallisation du complexe Nob1/Pno1 humain. L'alternative choisie était de travailler avec les protéines homologues provenant d'autres organismes eucaryotes. En effet pour la cristallisation, deux types de stratégies peuvent être utilisées : 1. la technique d'optimisation des fragments (notre stratégie initiale qui a été effectuée principalement chez l'homme, malheureusement sans grand succès) ou 2. l'utilisation des constructions équivalentes provenant d'autres organismes. En effet, si deux protéines partagent une identité de séquence supérieure ou égale à 30 %, la structure tridimensionnelle ainsi que la fonction de celles-ci seront probablement conservées. Nous avons donc répertorié les différents organismes contenant des protéines homologues de Nob1 et Pno1 dont le laboratoire possède de l'ADN génomique permettant leur clonage. Parmi ceux disponibles, nous avons recensé cinq organismes : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Encephalotizoon cuniculi*, *Tetrahymena thermophyla* et enfin *Drosophila melanogaster*. Nous avons donc cloné les séquences codant pour ces protéines puis effectué des expériences de co-expression (en purifiant le complexe soit par Nob1 ou Pno1). Pour les trois derniers organismes cités ci-dessus, nous avons réussi à former le complexe Nob1/Pno1 (*Figure 25*).

Organisme	1	2	3	4	5
Nob1 porte l'étiquette					
Pno1 porte l'étiquette					
Complexe Nob1/Pno1			☑	☑	☑

■ Après élution seule la protéine portant l'étiquette est observée

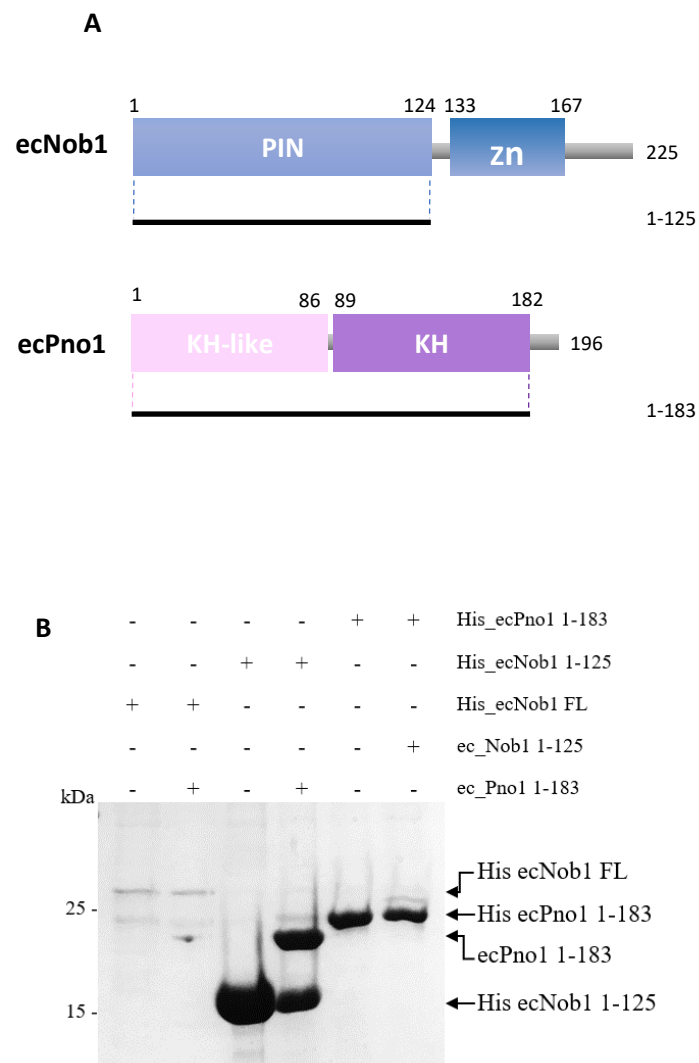
■ Après élution le complexe Nob1/Pno1 est formé

Figure 25 : Résumé des différentes combinaisons des tests de co-expression effectués dans d'autres organismes disponibles au laboratoire. Les organismes testés sont les suivants : *S. cerevisiae* (1), *K. lactis* (2), *E. cuniculi* (3), *T. thermophila* (4) et *D. melanogaster* (5)

### c) Le complexe protéique Nob1/Pno1 chez *E. cuniculi*

Suite à ces données, nous nous sommes focalisés sur les protéines orthologues de *E. cuniculi*. En effet, cet organisme a un génome compact ce qui aboutit à la production de protéine généralement plus courte comparé aux homologues présents dans les autres organismes. Chez *E. cuniculi*, l'endonucléase ecNob1 fait 225 résidus tandis que le partenaire lui est composé de 196 acides aminés. Seuls les domaines structurés ont été conservés au cours de l'évolution ce qui aboutit à une protéine plus compacte qui est illustrée par les alignements par paire avec les homologues humains. Par conséquent, nous avons choisi de travailler avec l'homologue de Nob1 de *E. cuniculi* (ecNob1) et cloner la séquence codante pour le domaine PIN qui correspond au fragment protéique (1-125). La boucle variable qui sépare les deux fragments du domaine catalytique est très courte (environ 15 résidus) ce qui pourrait réduire l'effet de flexibilité induite par la partie désordonnée de la protéine et donc empêcher la formation de cristaux. La construction de Pno1 a également été affinée, nous avons enlevé la partie C-terminale qui n'est pas conservée et utilisé un fragment plus court qui fait 183 résidus (ecPno1 1-183) (Figure 26A). Chaque fragment a été cloné dans les vecteurs pET-MCN\_His, pET-

MCN\_Kan ou pCDF-MCN (cf matériels et méthodes). Les résultats des tests d'expressions nous ont permis de nous focaliser sur la combinaison His\_ecNob1 (1-125) x Kan ecPno1 (1-183). En effet, lorsque l'on co-exprime ces deux fragments, on peut reconstituer le complexe ecNob1/ecPno1 comme le résume la figure ci-dessous (*Figure 26B*).



**Figure 26 : Le complexe Nob1/Pno1 chez *E. cuniculi*.** A) Organisation des domaines de ecNob1 et ecPno1 avec les différents fragments utilisés pour les tests d'expression. B) Analyse sur gel SDS PAGE 15% des co-expressions du complexe ecNob1/ecPno1 où dans les différentes combinaisons testées, le domaine PIN de Nob1 forme un complexe avec Pno1 tronquée de quelques résidus dans la partie C-ter.

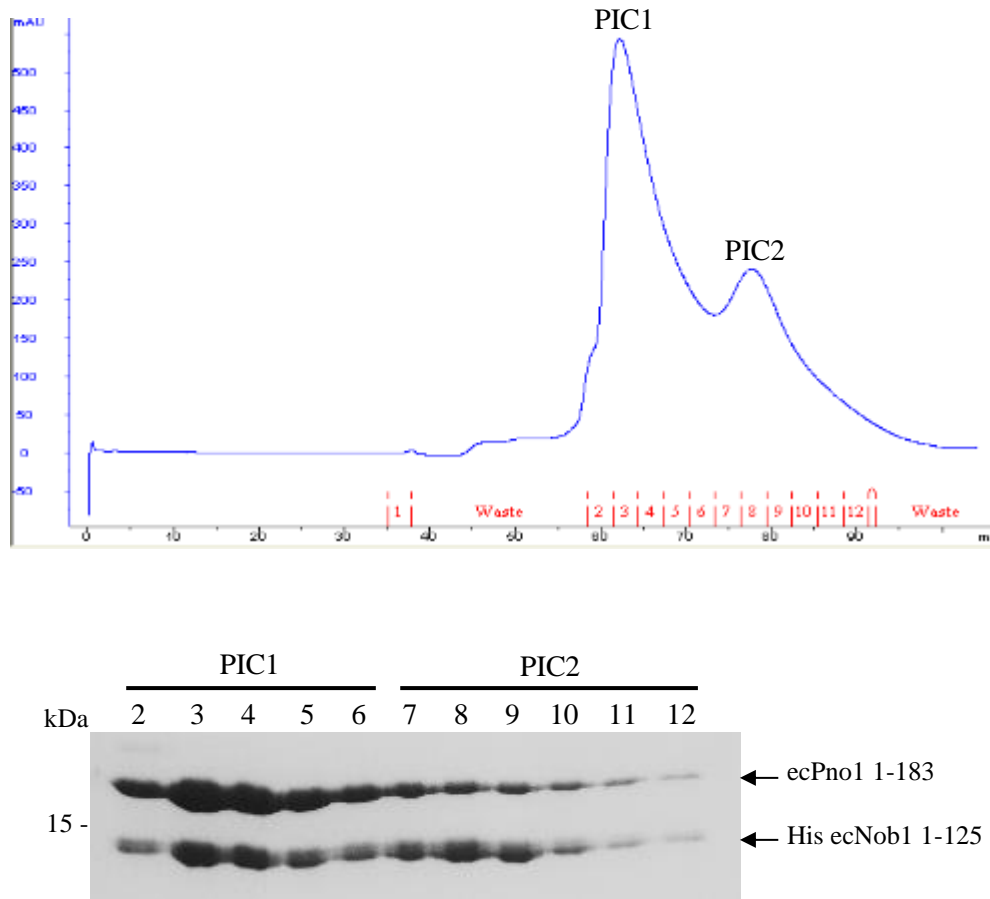
Nous avons donc pu reconstituer le complexe en co-exprimant une construction codant pour His-ecNob1 (1-125) avec son partenaire ecPno1 (1-183) sans étiquette.

Le complexe protéique a été produit à grande échelle puis purifié selon le protocole utilisé pour les protéines homologues humaines. Le chromatogramme ci-dessous correspond à la dernière étape de purification qui est une chromatographie d'exclusion stérique où l'on peut observer la présence de deux pics. D'une part, un grand pic à 600 mAU qui est éluée entre 60 et 70 mL puis un second pic entre 75 et 85 mL avec une absorbance  $A_{280}$  plus faible. Les fractions ont été récupérées puis analysées sur gel SDS PAGE et l'on peut constater la présence de deux bandes qui migrent aux alentours de 15 kDa. Au vu de la taille des deux protéines, ecPno1 (1-183) et le domaine catalytique de Nob1 (1-125) qui fond respectivement 20 kDa et 14 kDa, la bande observée à plus faible poids moléculaire correspond donc à Nob1 et celle qui migre au-dessus à Pno1. Le premier pic (PIC1) correspond donc au complexe protéique qui lui fait environ 30 kDa. En outre, la présence des deux bandes dans le second pic (PIC2) pourrait indiquer l'existence de protéines libres qui ne sont pas en complexe et comme la taille des deux facteurs sont assez proche, ces deux fragments auront donc un volume d'éluion similaire (*Figure 27*). Comme, notre étude porte sur le complexe formé par Nob1 et son partenaire, nous avons donc récupéré les fractions correspondantes au premier pic pour effectuer les tests de cristallisation.

Pour cette étape, nous avons tiré avantage des optimisations effectuées avec les protéines homologues humaines pour les protéines humaines non seulement pour les conditions de purification mais aussi pour les conditions de cristallisation. Ceci nous a permis d'ajouter dès les premiers tests l'ion divalent  $Mn^{2+}$ . Différentes concentrations de protéines que l'on a déterminé auparavant par l'utilisation du kit PCT (cf mat et meth) ont donc été testées. La concentration du complexe protéique où l'on a réussi à obtenir des hits correspondait à 5mg/mL avec la condition commerciale MCSG4 (A10 : 100 mM MES pH6, 200 mM  $Zn(CH_3CO_2)_2$ , 15 % (v/v) Ethanol) à 8°C. Nous avons également trouvé des cristaux dans les conditions suivantes : cryo I & II (D8 : 40% v/v Ethylène glycol, 100 mM MES pH6, 200 mM  $Zn(CH_3CO_2)_2$ ; G2 : 500% v/v PEG200, 100 mM cacodylate pH6.5, 200 mM  $Zn(CH_3CO_2)_2$ ).

Nous avons donc obtenu des cristaux qui étaient sous forme de « cluster » et qui ne sont pas directement exploitables pour la diffraction mais une bonne base pour démarrer l'optimisation. Par conséquent, nous avons décidé de tourner autour de ces conditions et le comportement de l'échantillon nous a indiqué que le Zinc est également important pour la cristallisation de ces protéines. Lors de notre optimisation, la structure de la particule pré-40S humaine a été publiée

avec une résolution globale de 3.6 Å montrant non seulement l'architecture du pré-ribosome mais aussi la présence du complexe Nob1/Pno1 au niveau de la plateforme où les auteurs ont pu identifier les différents points d'ancrage entre les deux protéines (Ameismeier et al., 2018). L'utilisation de ce complexe fut donc abandonnée néanmoins, le mode de reconnaissance entre l'endonucléase Nob1 avec son substrat (le site de clivage D) reste à étudier.



**Figure 27 : Purification du complexe ecNob1/ecPno1.** (Haut) chromatogramme après la chromatographie d'exclusion stérique du complexe ecNob1 (1-125)/ecPno1 (1-183) montrant la présence de deux pics : un premier pic qui correspond au complexe et un second pic qui correspond probablement aux deux protéines libres comme la taille des deux protéines est relativement similaire, celles-ci co-eluent en un seul pic. (Bas) analyse sur gel SDS PAGE du contenu de chaque pic, on peut observer les deux bandes qui sont relativement proches une au-dessus de 15 kDa : le fragment 1-183 de ecPno1 et une bande en dessous de 15 kDa qui correspond au domaine PIN ecNob1 (1-125)

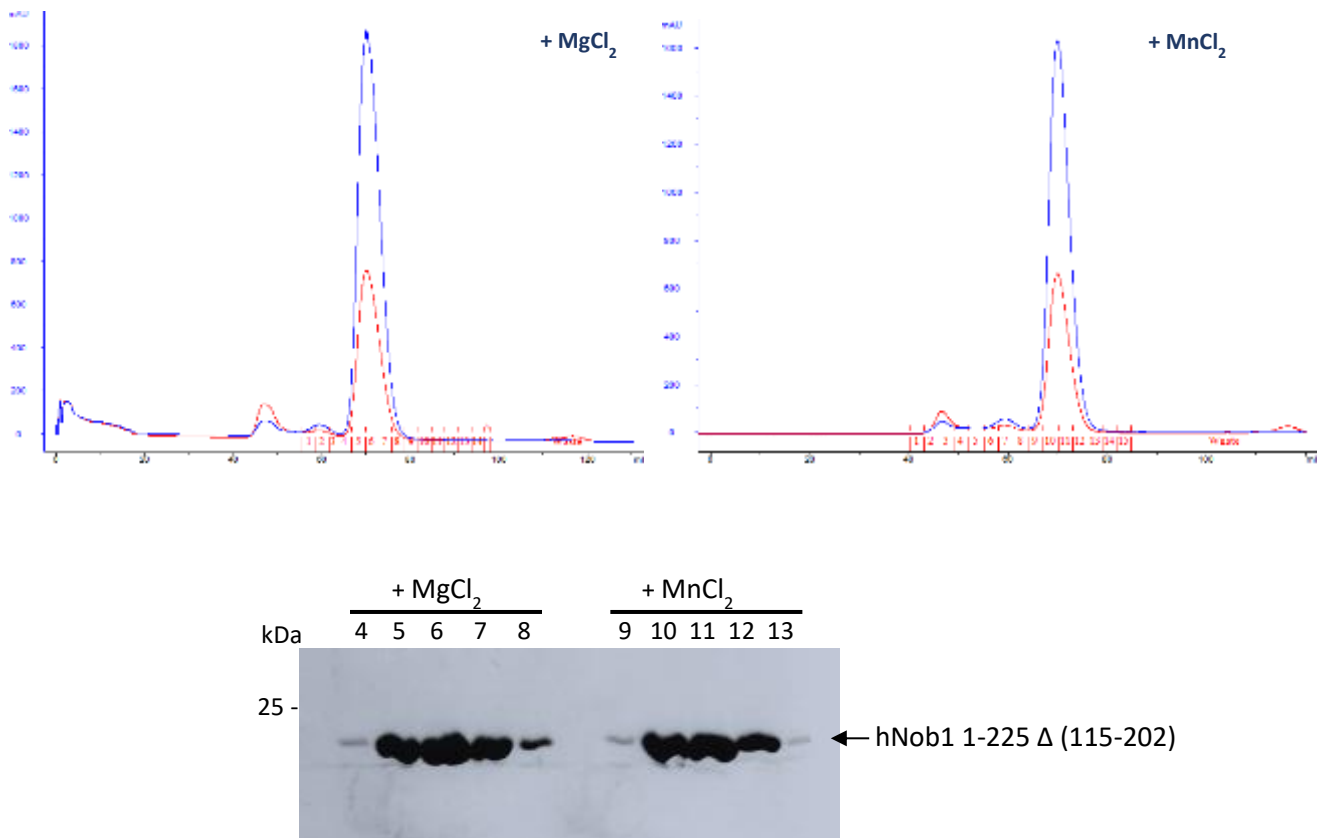
## d) Purification et cristallisation du domaine PIN

### i. Chez l'homme

Au vu des nouvelles données structurales disponibles, nous avons décidé de changer de perspectives et d'orienter notre étude structurale vers un complexe protéine/ARN. Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur le domaine catalytique de Nob1. Les conditions de purifications utilisées sont très similaires à celles du complexe et au vu des caractéristiques des domaines PIN, leur fonction nécessite des ions divalents qui peuvent être de deux types :  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ . Dans la littérature, l'activité endonucléolytique de Nob1 ne dépend que de l'ion divalent  $Mn^{2+}$ . Pour les études structurales, nous avons décidé de tester lequel de ces deux ions divalents pourraient influencer le comportement en solution de notre protéine d'intérêt pour éventuellement permettre la formation de cristaux.

Par conséquent, nous avons purifié le domaine catalytique de Nob1 humain puis lors de la dernière étape de chromatographie d'exclusion stérique, le domaine PIN est élué avec deux tampons SEC différents (20 mM Hepes pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 mM  $MnCl_2$  ou 1 mM  $MgCl_2$ ). Les deux fractions ont été testées en cristallisation dans les mêmes conditions (concentrations, température) (*Tableau 1*). D'après le chromatogramme ci-dessous (*Figure 28*), on peut constater que l'ajout des ions divalents  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  n'affecte pas le comportement en solution du domaine catalytique. En effet les profils d'éluion de la protéine d'intérêt dans les deux conditions sont très similaires avec la présence d'un seul pic élué à 65 mL. Ces résultats peuvent également nous informer sur l'homogénéité de l'échantillon protéique puisque nous avons principalement un pic d'absorbance à 280 nm. L'analyse sur gel SDS nous montre bien la présence d'une seule bande qui migre au poids moléculaire attendu pour le domaine PIN qui est d'environ 25 kDa (*Figure 28*). Lors de l'étape de concentration nous avons réussi à amener l'échantillon d'intérêt à une concentration supérieure à 10 mg/mL appropriée pour la cristallogénèse. L'absence de précipité lors de la concentration nous a également indiqué que la protéine d'intérêt est bien stable à une concentration élevée. Les tests de cristallisation nous ont donné une idée plus claire sur l'effet de l'ajout des ions  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  sur le comportement de la protéine. L'échantillon testé avec du  $MgCl_2$  n'a pas abouti à des observations prometteuses tandis que celui testé en présence de manganèse nous a permis d'observer des sphérulites qui ont donc été optimisées (MCSG2 C3 : 200 mM  $CH_3COONH_4$ , 100 mM Hepes pH 7.5, 25 (w/v) PEG 3350 ; F9 100 mM Hepes pH 7, 10% (w/v) PEG 6000).

De plus, la température a eu un effet significatif puisque ces comportements ont été observés uniquement à 8°C et non à 20°C.



**Figure 28 : Purification du domaine PIN de l'endonucléase Nob1 humain.** (Haut) chromatogramme du domaine catalytique de Nob1 en testant différent tampon (gauche) tampon  $MgCl_2$  et (droite) tampon  $MnCl_2$ . Même profil d'éluion du fragment dans les deux conditions testées. La protéine d'intérêt est éluée vers 65 mL dans une colonne de gel filtration Hiload 16/600 superdex S75 pg prepgrad qui pourrait correspondre à un dimère de domaine PIN puisque celle-ci fait environ 20 kDa et le profil de migration correspondrait à celui d'un complexe à 40 kDa. Ce phénomène est expliqué par le fait les domaines PIN peuvent adopter différents états oligomériques (tétramère, dimère, ...). (Bas) Analyse sur gel SDS PAGE 15% de la contenu de chaque pic montrant la présence d'une seule bande à 20 kDa qui correspond à notre protéine d'intérêt.

Comme le domaine PIN se comporte bien et peut atteindre une concentration très élevée (20 mg/mL), nous avons voulu tester la co-cristallisation avec l'ARN afin d'étudier le mode de reconnaissance entre celui-ci et l'endonucléase pour éventuellement déterminer la conformation dite « active » adoptée par Nob1 pour assurer la maturation de l'ARNr 18S. D'après la littérature, nous savons que le domaine catalytique de Nob1 coupe l'extrémité 3' du précurseur de l'ARNr 18S qui est sous forme d'ARN simple brin. De plus, la formation du complexe entre l'endonucléase et son ARN cible est une reconnaissance séquence spécifique au niveau du site de clivage D (ou site 3 chez l'homme) qui correspond à un triplet de nucléotide UAA (Arcus et al., 2011; Lamanna and Karbstein, 2009).

Ainsi, nous avons synthétisé un ARN de 12 nucléotides qui correspond à la séquence suivante 5'-GAUCAUUAACGG-3'. Cet ARN a été modifié au niveau de la liaison phosphodiester présente entre les deux adénosines pour prévenir la coupure par l'endonucléase. Nous avons grâce au remplacement d'un atome d'oxygène par un atome de soufre formé un groupement phosphorothioate qui est connu pour bloquer les activités des nucléases. Nous avons testé une mise en complexe du domaine PIN avec l'ARN en utilisant différent ratio protéine/ARN (un excès d'ARN, un excès de protéines et un mélange équimolaire). Nos tests ont directement affecté le comportement de la protéine puisque dans les différentes conditions, nous avons Pour éviter la formation de précipité, nous avons décidé de diminuer la concentration de nos échantillons d'un facteur deux puis d'un facteur quatre de manière à améliorer le comportement du complexe. Malheureusement, le complexe a continué de précipiter de façon graduelle et donc ce comportement nous a empêché d'effectuer des tests de cristallisation. Des tests de biophysique afin de mieux caractériser l'affinité du domaine PIN à l'ARN auraient pu être considérés avant de s'engager dans la formation du complexe. Nous avons donc testé par des expériences de retard sur gel l'interaction entre le domaine PIN de ecNob1 et sa cible ARN pour affiner nos conditions mais nous n'avons pas réussi à obtenir un retard de migration qui indiquerait la formation de complexe. Ce résultat indique que l'affinité du domaine PIN pour son site est probablement trop limitée pour établir un complexe stable.

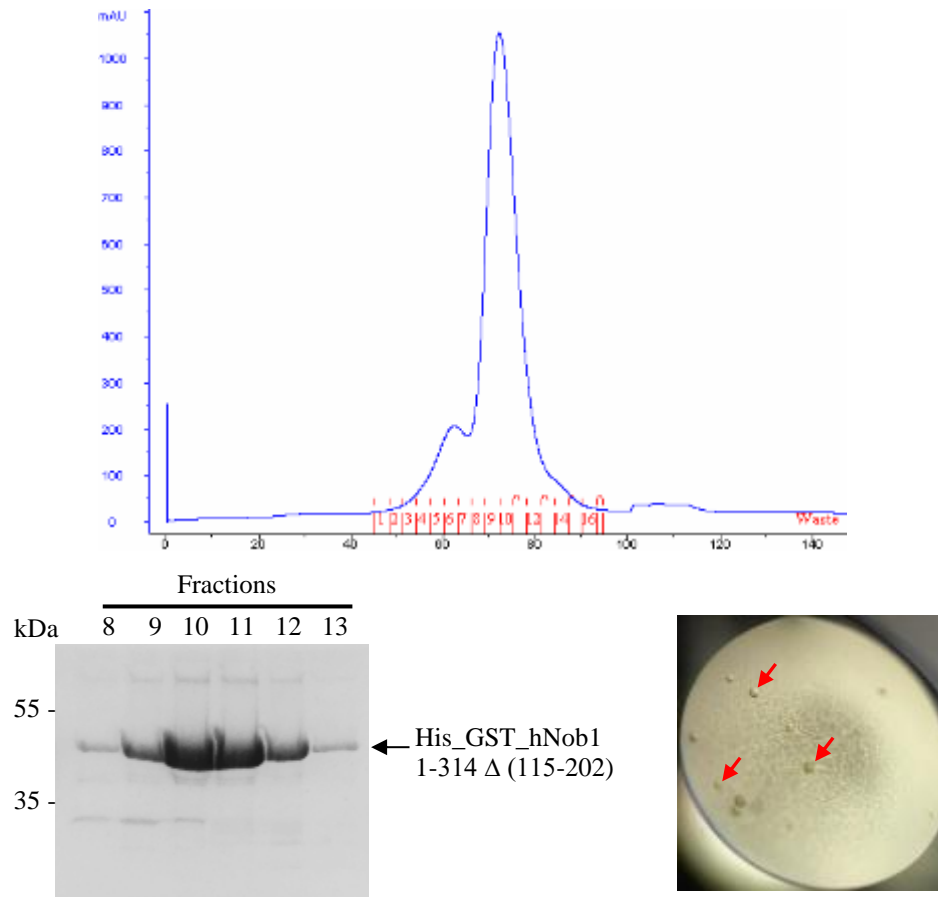
D'après la structure du pré-40S, l'organisation de l'endonucléase que nous avons également montrée est telle que les deux domaines structurés composant cette protéine se retrouvent relativement proches dans l'espace et forment un « core ». Le second domaine qui correspond au domaine doigt de Zinc dans le pré-ribosome est en interaction avec des protéines ribosomales. Or les domaines en doigt de Zinc sont des domaines de reconnaissance aux acides

nucléiques. Notre hypothèse a donc été que l'ajout de ce domaine pourrait influencer la reconnaissance ARN-protéine. Nous avons donc généré un dernier fragment de Nob1 qui correspond à la construction 1-314 Δ (115-202). Celui-ci a été cloné dans un vecteur pET-MCN-HIS\_GST, l'avantage de ce vecteur est que la protéine porte deux étiquettes d'affinité et que la GST peut aussi être utilisée comme chaperonne de cristallisation comme dans les tests effectués précédemment avec la construction de Pno1 (65-252). Nous avons donc produit le fragment 1-314 Δ (115-202) chez la bactérie puis purifié la protéine par deux séries de chromatographie d'affinité : une première au Nickel puis une seconde sur colonne GST. Ensuite, l'échantillon d'intérêt a directement été chargé sur une colonne d'exclusion stérique Hiload 16/600 superdex S75 pg prepgrad et la protéine est éluée avec un tampon contenant l'ion divalent  $Mn^{2+}$ .

Le chromatogramme après gel filtration ci-dessous (*Figure 29*) montre deux pics qui sont respectivement élués à 55 et 65 mL. Nous nous sommes intéressés au second pic qui a une absorbance plus importante. En effet l'analyse sur gel SDS PAGE des fractions correspondant à ce grand pic montre que l'on a majoritairement une bande qui migre entre 35 et 55 kDa. Comme la protéine de fusion fait environ 50 kDa, la bande observée est donc celle de la construction His-GST-hNob1 1-314 Δ (115-202). On peut aussi observer d'autres bandes qui peuvent correspondre à des contaminants (*Figure 29*). Comme l'intensité de la bande de notre protéine d'intérêt est plus élevée la quantité des contaminants peut être négligeable. Ainsi les fractions contenant la protéine de fusion ont été récupérées puis nous avons effectué des tests de cristallisation de ce fragment. Si ce dernier cristallisait, on pourrait ajouter notre ARN synthétique aux éventuels cristaux formés. Cette méthode est plus connue sous le nom de « soaking » ; le principe est que le cristal est formé d'un arrangement ordonné de molécules et qu'il va contenir du solvant qui forme des canaux permettant ainsi à des molécules plus petites de diffuser librement au sein du cristal. Si leur site d'interaction se situe en bordure des canaux, ces petites molécules pourront ainsi se lier par simple diffusion dans le cristal.

Nous avons également ajouté d'autres critères à notre test de cristallisation et recensé certaines conditions commerciales qui ont permis de cristalliser des endonucléases et qui sont disponibles au laboratoire. Ces investigations ont porté leurs fruits puisque nous avons pu obtenir des conditions dites prometteuses pour les conditions suivantes (JCSG + D3 200 mM NaCl, 100 mM Na/K Buffer pH 6.2, 50% v/v PEG200 ; CRYO I & II C1 200 mM  $(NH_4)_2HPO_4$ , 100 mM Tris pH 8, 30% v/v PEG200) à 20°C. Ces deux conditions ont été

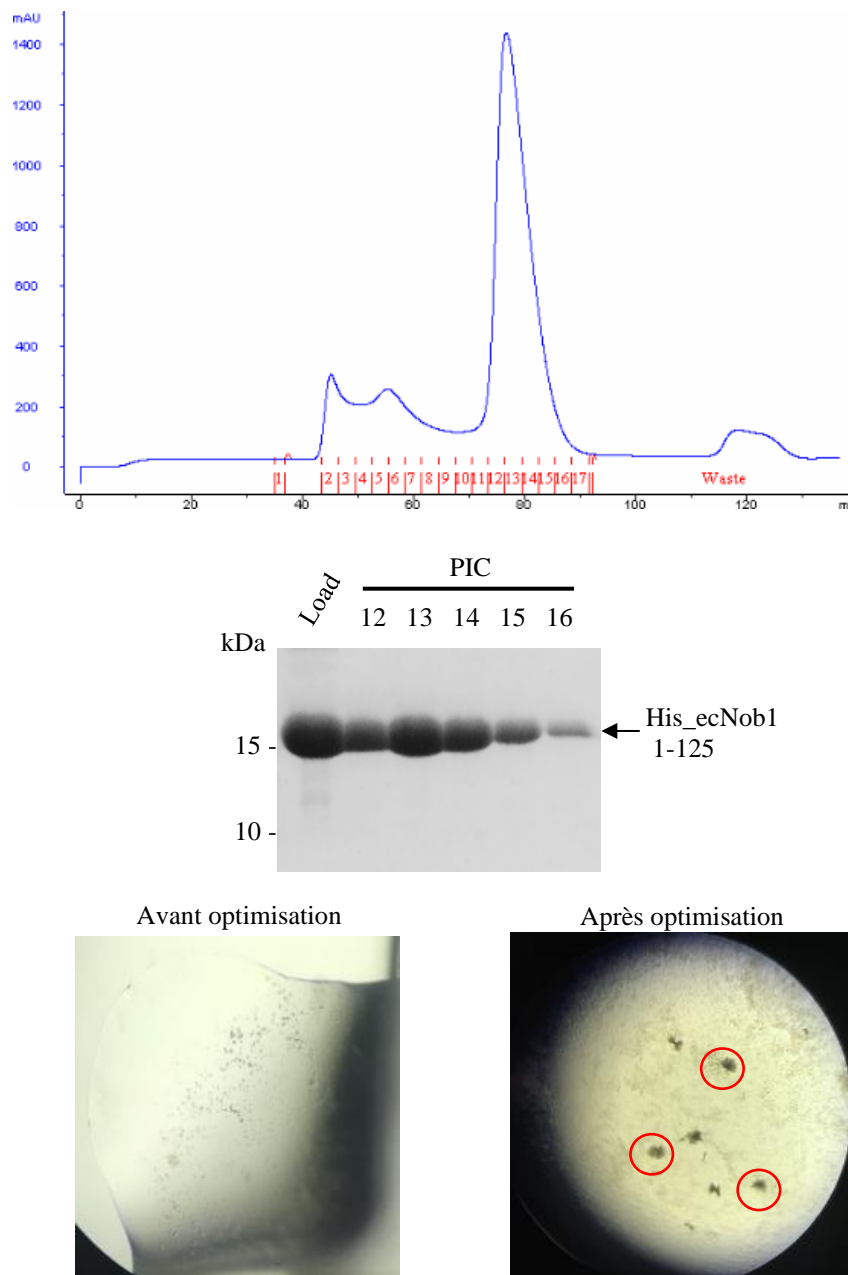
optimisées en variant soit le pH ou encore la concentration du précipitant. Le meilleur résultat obtenu étant des sphérulites après optimisation (*Figure 29*).



**Figure 29 : Purification de la construction hNob1 1-314 Δ (115-202).** (Haut) chromatogramme de l'étape de gel filtration du fragment His\_GST\_hNob1 1-314 Δ (115-202) qui montre un état monomérique de la protéine d'intérêt qui fait environ 50 kDa. (Bas) Analyse sur gel SDS PAGE 15% de chaque fraction montrant que l'on a la bande correspondant à la protéine d'intérêt mais aussi d'autre bandes contaminantes : pistes 8 et 9, une bande caractéristique de la migration de l'étiquette GST (28 kDa) et la bande de la protéine de fusion (50 kDa) ; pistes 10 à 12, une grande bande à 50 kDa qui correspond au fragment de Nob1 humain ainsi que la bande qui migre au-dessus de 55 kDa. Celle-ci correspondrait à une chaperonne de chez *E. coli* ; piste 13, la protéine d'intérêt (gauche). Des sphérulites de goutte correspondant à la condition optimisée (30% (v/v) PEG 200, 100 mM Na/K Buffer pH6.2, 200 mM NaCl (agrandissement 4x)) pour celui on l'on a trouvé un hit (droite)

En parallèle des tests de cristallisation effectués avec la protéine humaine, nous avons aussi essayer les constructions équivalentes de *E. cuniculi*. On avait à disposition deux constructions du domaine catalytique de Nob1 : un fragment portant une étiquette poly-histidine et un second fragment qui avait en plus de cette étiquette la protéine GST. D'après la littérature, les domaines PIN sont souvent cristallisés à pH acide et en présence des ions divalents  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  (Glavan et al., 2006; Lu et al., 2013; Yokogawa et al., 2016). Les deux constructions ont donc été produites et purifiées en testant deux tampons de purification contenant du  $MgCl_2$  ou du  $MnCl_2$  de plus le pH a été ajusté à 6.8.

Nous avons également décidé de garder l'étiquette et la purification de la construction d'intérêt a été effectuée en deux étapes : une colonne d'affinité suivi directement d'une chromatographie d'exclusion stérique. Après cette dernière étape de purification (*Figure 30*), on peut constater que ces protéines sont éluées tardivement avec un volume d'élution de 70 mL. Au vu de la taille de la protéine d'intérêt (environ 15 kDa) et en considérant le fait que celle-ci soit globulaire, on s'attendrait donc à ce que le grand pic observé contienne le fragment de Nob1 1-125. Ainsi, les fractions correspondantes ont été analysées sur gel SDS PAGE et les bandes protéiques ont été révélées par une coloration au bleu de Coomassie (*Figure 30*). D'après nos résultats, on peut observer dans le premier piste (load) une bande protéique avec un poids moléculaire de 15 kDa qui est également présente dans les fractions éluées (12 à 16) Tout comme le comportement observé avec les protéines homologues humaines, le fait de tester les deux ions divalents ne semble pas affecter le comportement en solution du domaine catalytique. En effet, dans les conditions testées, on retrouve le même profil d'absorption. Enfin, les deux échantillons ont été testés en cristallisation avec une concentration de 5 mg/ml à deux températures différentes (8 °C et 20 °C). D'après les résultats obtenus, on pouvait observer de tous petits cristaux dans une des conditions commerciales testées à 20°C (PEG suites) et seulement en présence de  $Mn^{2+}$  (*Figure 30*). Nous nous sommes donc focalisés sur cette condition qui est un bon début pour les optimisations. En variant des paramètres comme le pourcentage de précipitant ou encore la concentration de sel, le meilleur résultat obtenu était des aiguilles formant des « oursins » qui sont apparus après deux mois d'optimisation (*Figure 30*).



**Figure 30 : Le domaine catalytique de Nob1 de *E. cuniculi*.** (Haut) Profil d'éluion du domaine PIN de *E. cuniculi* où l'on peut observer un pic avec un volume d'éluion ( $V_e$ ) de 70 mL, les fractions correspondantes ont été analysées sur gel SDS PAGE 18% où l'on peut observer une bande avec un poids moléculaire de 15 kDa, caractéristique du fragment ecNob1 (1-125). (Bas) Image de la goutte correspondant à la condition PEG (gauche) où l'on a pu trouver des cristaux microscopiques. La condition initiale a été optimisée (droite) où l'on peut observer la formation de petites aiguilles toute fines sortant du même point de nucléation (agrandissement x10).

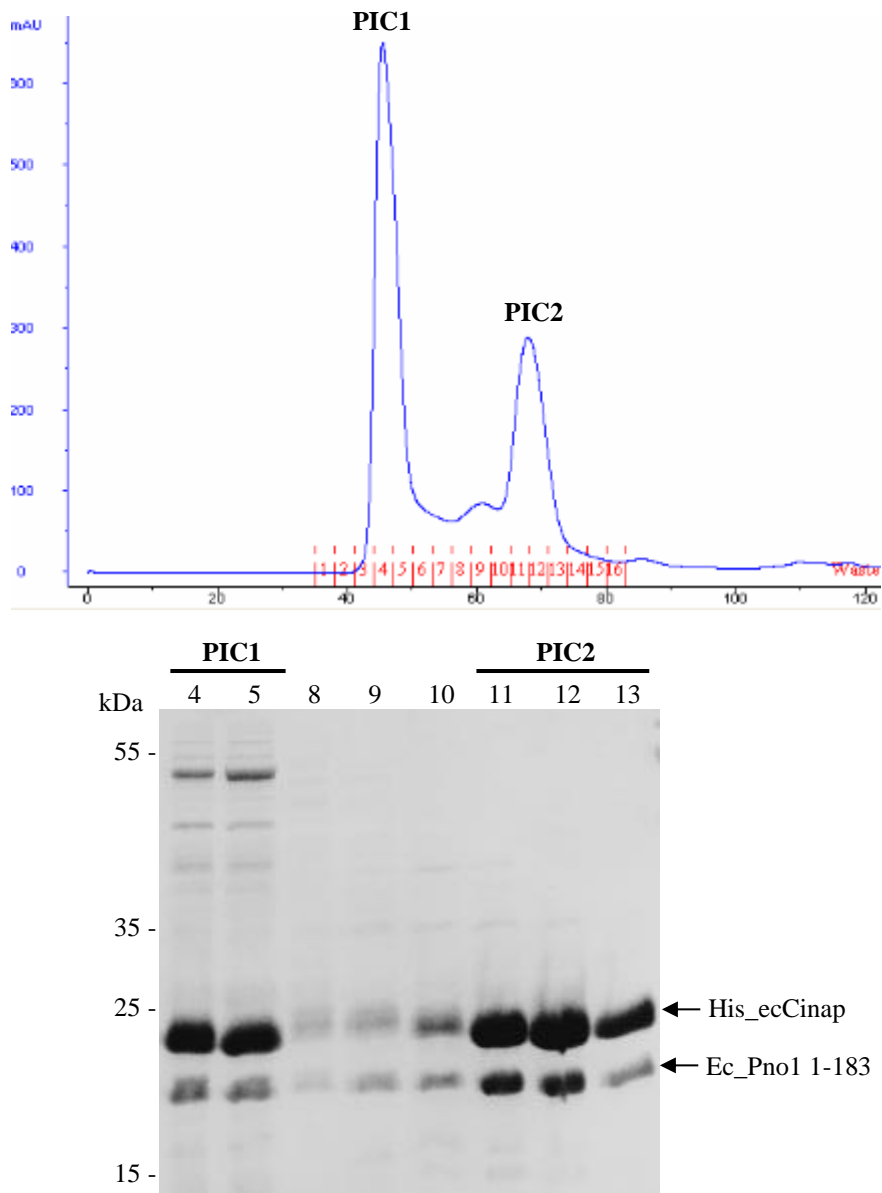
### e) *Purification et cristallisation du complexe Cinap et Pno1 de E. cuniculi*

Les données structurales disponibles dans la littérature montrent que Pno1 est proche de la protéine RPS14 dans le ribosome pré-mature et le recrutement de cette dernière au niveau de la particule pré-ribosomique est dépendant d'un autre facteur appelé « Cinap » (Ameismeier et al., 2018 ; Scaiola et al., 2018 ; Heuer et al., 2017). Une caractérisation des interactions formées par ces protéines nous a montré que le complexe Cinap/Pno1 peut être formé et l'interface de reconnaissance entre ces deux protéines n'est pas encore définie (cf section résultats III). Par conséquent, nous avons décidé de produire ce complexe à grande échelle pour essayer d'étudier le mode de reconnaissance de Cinap avec Pno1 à l'échelle atomique. En effet, la seule interaction reportée dans la littérature est celle de Cinap avec la protéine Krr1 qui est un facteur d'assemblage participant à la maturation précoce de la petite SU (Sturm et al., 2017). Les auteurs ont également montré que krr1 occupait le futur site de localisation de Pno1 lors de la maturation tardive. On ne peut donc pas exclure la possibilité d'un échange entre Pno1 et Krr1 qui est assurée par Cinap. Par conséquent, la formation du complexe Cinap/Pno1 serait intéressant pour des études structurales.

Ainsi, nous avons voulu tester la pertinence de notre hypothèse par des expériences de co-expressions des constructions de Pno1 et Cinap de différents organismes homologues à disposition (humain, levure et *E. cuniculi*) dans la bactérie *E. coli*. Les résultats obtenus nous ont montré que le complexe Cinap/Pno1 peut être reformé avec les constructions équivalentes des autres organismes testés. Nous avons d'ailleurs validé l'existence d'un lien direct entre ces deux protéines par des expériences de pull down (cf section résultats III). Les résultats obtenus nous ont également indiqué que l'interaction entre Cinap et Pno1 est transitoire. De plus, le complexe protéique formé n'est pas stœchiométrique. Néanmoins, en utilisant Pno1 comme protéine appât, Cinap est co-purifié avec cette dernière. De la même façon, lorsque Cinap porte l'étiquette d'affinité pour purifier Pno1, le complexe formé par ces composants est également observé. Toutes ces raisons nous ont par conséquent incité à produire et à purifier le complexe ecCinap/ecPno1 pour effectuer des tests de cristallisation.

Les conditions de purification adoptées ont été basées sur les protocoles utilisés pour le complexe Nob1/Pno1, la différence était de travailler avec un tampon de conservation à 8. En effet, les conditions de cristallisation de l'homologue de Cinap chez l'homme (Bai et al., 2016; Drakou et al., 2012) ou encore celui de Pno1 chez l'archée (Jia et al., 2006, 2010) ont été obtenues avec l'utilisation d'un tampon de conservation à pH 8 et une concentration de sel équivalent à 150 mM. D'après les résultats obtenus, la dernière étape de chromatographie nous indique la présence de deux pics bien distincts : un grand pic avec une absorbance  $A_{280}$  de 600 mAU qui est élué dans le volume mort de la colonne puis un deuxième pic avec une absorbance deux fois plus faible et un volume d'élution de 65 mL (*Figure 31*). Nous avons analysé ces fractions sur gel où l'on peut observer la présence de deux bandes qui migrent à des poids moléculaires entre 15 et 25 kDa (la bande en dessous correspond à Pno1 qui fait environ 20 kDa et la bande au-dessus à Cinap qui a un poids moléculaire de 22 kDa). La fraction (PIC1) non retenue dans la phase stationnaire pourrait indiquer la formation d'agrégat (*Figure 31*).

En effet, d'après le gel ci-dessus (*Figure 31*) les fractions qui correspondent au premier pic contiennent non seulement les deux bandes de Cinap et Pno1 mais aussi d'autres bandes protéiques à des poids moléculaires plus élevés. Ces dernières peuvent être des protéines contaminantes provenant de notre système d'expression. Le second pic quant à lui est intéressant pour nos tests de cristallisation. En effet, au vu de la taille du complexe qui fait environ à 40 kDa, le profil d'élution de celui-ci correspondrait donc au complexe ecCinap/ecPno1 (en considérant que le complexe formé soit globulaire). Ceci est d'ailleurs confirmé par l'analyse sur gel des fractions 11, 12 et 13 qui correspondent au second pic où l'on retrouve principalement les deux bandes à 20 kDa qui correspondent à nos deux protéines : ecCinap et ecPno1 (*Figure 31*). Nous nous sommes donc focalisés sur celui-ci et après avoir concentré le complexe, nous avons pu effectuer des tests de cristallisation avec une concentration de 4.5 mg/ml (*Tableau 1*). Cependant les différentes conditions de cristallisation que nous avons testées n'ont pas abouti à l'observation de « hits » prometteurs.



**Figure 31 : Purification du complexe Cinap/Pno1 chez *Encephalotiozoon cuniculi*.** (Haut) Profil d'élution du complexe ecCinap/ecPno1 lors de la chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Hiloal 16/600 superdex s75 pg prepgrad où l'on peut observer la présence de deux pics distincts. Un premier pic (PIC1) élué dans le volume mort ( $V_0$ ) de la colonne avec une absorbance A280 de 600 mAU. Le complexe protéique (PIC2) quant à lui est élué à 65 mL Avec un absorbance deux fois plus faible par rapport au premier pic. (Bas) Analyse des fractions éluées sur gel SDS PAGE 15% montrant la composition de chaque fraction. Le premier contient les bandes protéiques correspondantes à Pno1 (20 kDa) et à Cinap (22 kDa) mais également d'autres bandes contaminants tandis que le deuxième (PIC2) contient principalement les bandes appartenant complexe Cinap/Pno1

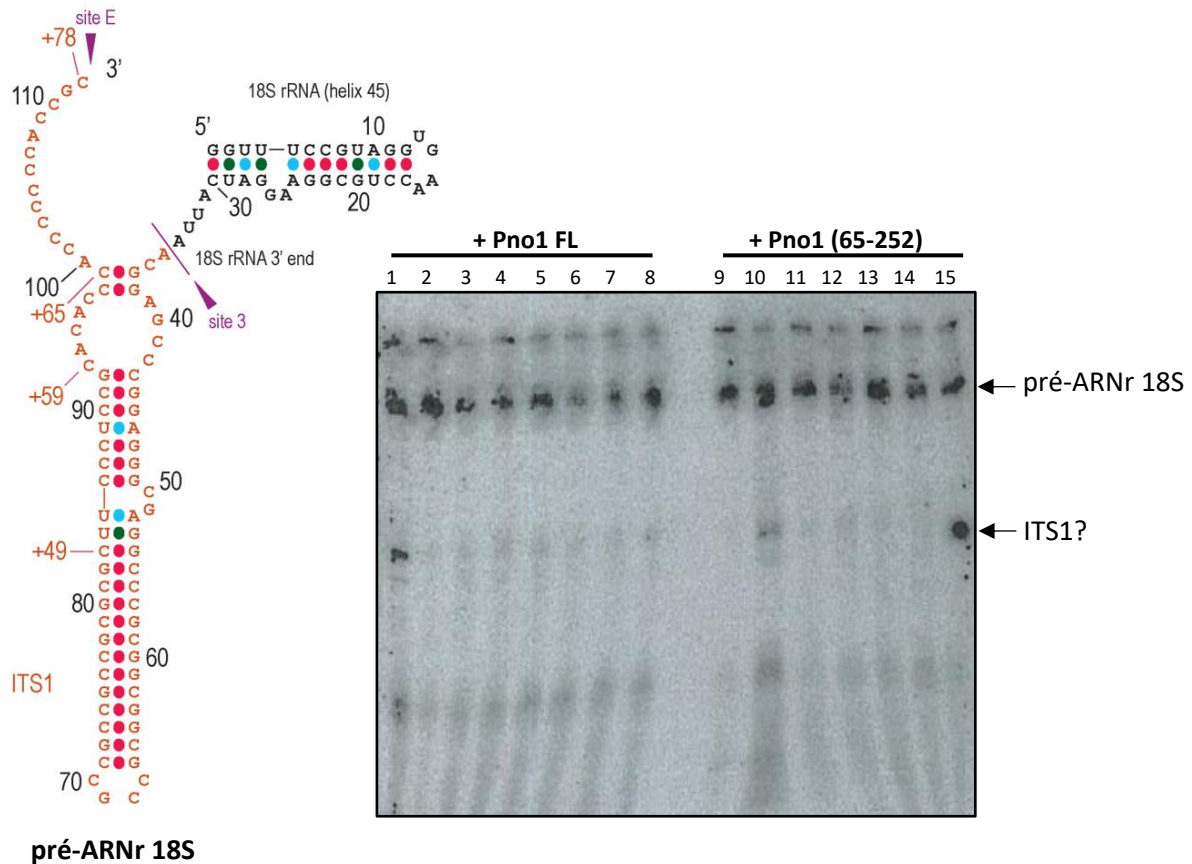
## II. Etudes fonctionnelles et validation chez la levure

### 1. Mécanisme de reconnaissance entre Nob1 et Pno1 conservé chez la levure

Ayant à disposition les mutants de Nob1 humains, nous avons donc procédé à des tests de coupure pour étudier l'effet de ces mutants sur l'activité endonucléolotique de Nob1 mais également le rôle de Pno1 dans la régulation de la coupure. Pour ce faire, nous avons utilisé une séquence d'ARN reportée dans la littérature pour les études effectuées chez la ribonucléase PARN (Montellese et al., 2017). La séquence correspond à un ARN de 112 nucléotides contenant l'hélice 45 de l'ARNr 18S et une extension de l'ITS1 jusqu'à la position distale du site E (*Figure 32*).

Nous avons utilisé des constructions de Nob1 tronquée en partie C-terminale (fragment 1-314) avec d'une part la mutation W208 et une autre qui est le D10N qui est l'équivalent du Nob1 D15N chez la levure. Nous avons également voulu tester si la partie N-terminale désordonnée de Pno1 pouvait avoir un rôle dans la coupure et donc tester soit la protéine sauvage (1-252) soit la forme tronquée (65-252). D'après la figure, dans les différentes conditions que nous avons testées, nous n'observons pas de coupure. Nous avons donc émis les hypothèses suivantes : i) le site de coupure n'est pas accessible dû à un repliement particulier de l'ARN, ii) le fragment de Nob1 utilisé dans nos expériences n'est pas compétent pour la coupure indiquant que la partie C-terminale serait nécessaire pour l'activité catalytique. Nous avons donc répété nos tests d'activité nucléolytique de Nob1 avec cette fois-ci la protéine sauvage et ce bien que nous observions cette dégradation sur gel SDS-PAGE. Mais nous n'avons pas observé de coupure non plus (*Figure 32*). Nos conditions semblent donc suboptimales pour la coupure. Nous avons alors décidé d'utiliser l'homologue de levure yNob1 et yPno1 (Dim2). En termes de conservation, la séquence de yNob1 présente 27 % d'identité de séquence avec hNob1 avec une couverture de 125 résidus sur les 459 acides aminés et pour Pno1 64 %. Malgré ce faible pourcentage de conservation des protéines Nob1, les zones conservées sont principalement situées sur les deux domaines structurés, à savoir le domaine PIN et le domaine en doigt de Zinc. Nous avons donc cloné les gènes de Nob1 de la levure dans les plasmides pET-MCN-His. Puis les protéines ont été exprimées et purifiées. Des études d'activité ont été également réalisées avec la protéine de levure, en particulier pour valider les résidus présents au niveau du site actif du domaine PIN. Ces expériences ont démontré que le quatrième résidu

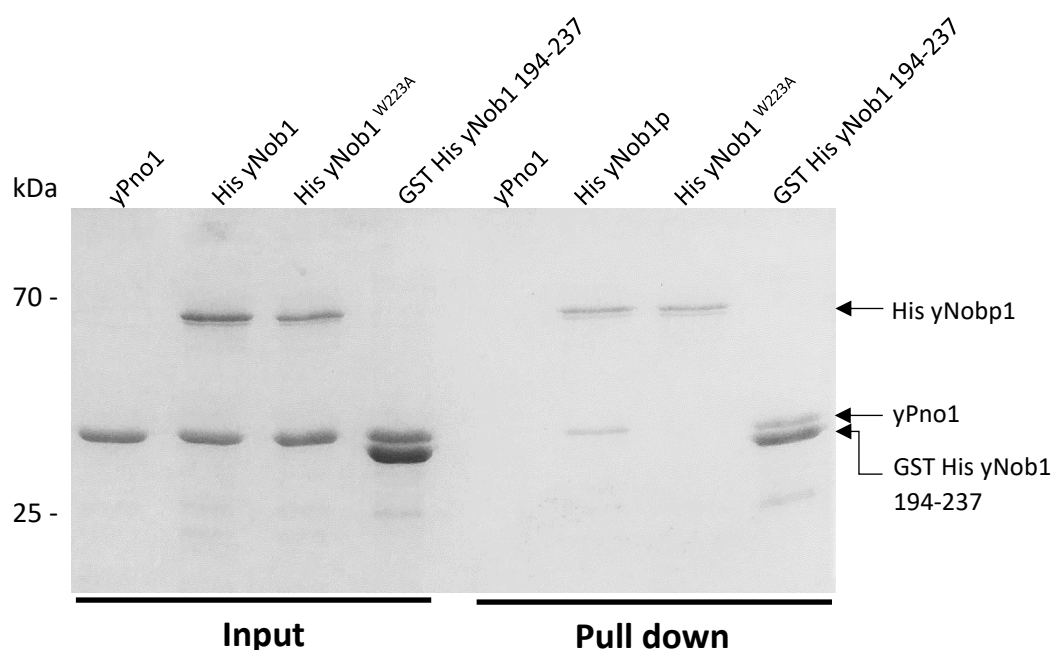
du site actif était l'aspartate en position 271 et non pas l'aspartate 110 comme initialement proposé (Fatica et al., 2004; Sturm et al., 2017).



**Figure 32 : Effets des mutants de Nob1 et rôle de Pno1 sur la fonction endonucléolytique de Nob1.** (Gauche) Structure secondaire de l'ARN pré-18S chez l'homme utilisé pour les tests d'activité de l'endonucléase Nob1 (Montellese et al., 2017). (Droite) analyse sur gel des clivages des produits de clivage. Les lignes 1, 2 et 9 correspondent respectivement au pré-ARNr, Pno1 FL et Pno1 (65-252) qui sont des contrôles. Test d'activité avec Pno1 FL : les lignes 3 et 4 correspondent à Nob1 (1-314) sans et avec Pno1, les lignes 5 et 6 à Nob1 (1-314<sup>D10N</sup>) seul et avec Pno1 puis 7 et 8 à Nob1 (1-314<sup>W208A</sup>) en absence et présence de Pno1 et 9 correspondent à Nob1 (1-314) seul, les lignes 3 et 10 correspondent à Nob1 (1-314) avec respectivement Pno1 FL et Pno1 (65-252) Test d'activité avec Pno1 65-252 : les lignes 10 et 11 correspondent à Nob1 (1-314) sans et avec Pno1, les lignes 12 et 13 à Nob1 (1-314<sup>D10N</sup>) seul et avec Pno1 puis 14 et 15 à Nob1 (1-314<sup>W208A</sup>).

### Et chez la levure ?

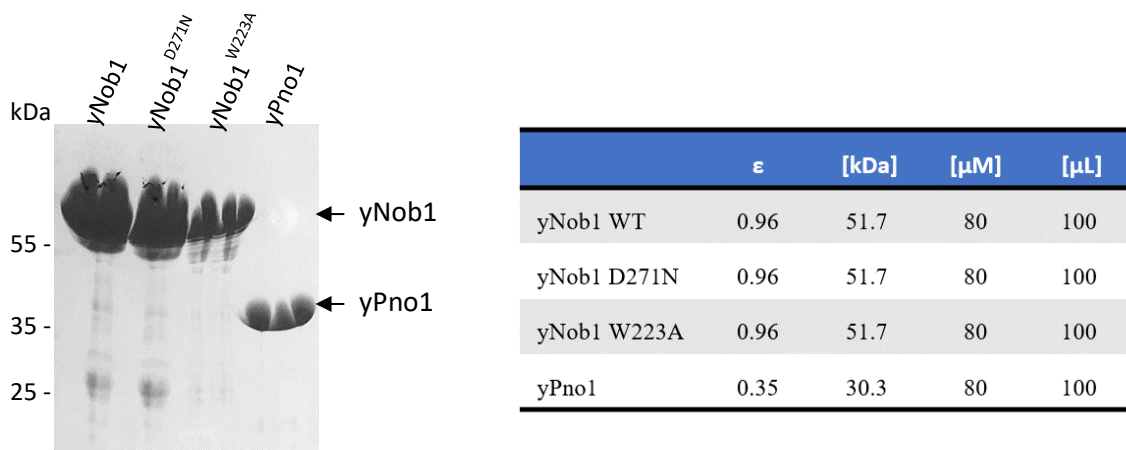
Afin d'étudier si le mode de reconnaissance entre le complexe Nob1/Pno1 était conservé chez la levure, nous avons testé par expérience de pull down les interactions entre l'endonucléase et son partenaire (Dim2 l'homologue de Pno1 chez la levure). Les mutants équivalents à ceux de la protéine humaine ont été générés : le mutant catalytique yNob1<sup>D271N</sup> (l'équivalent du hNob1<sup>D238N</sup>) et le résidu critique pour la formation du complexe Nob1/Pno1, e.g. le mutant yNob1<sup>W223A</sup> (hNob1<sup>W208A</sup>) et enfin la partie c-terminale de la boucle interne qui correspond au fragment yNob1 (194-237 ; chez l'homme hNob1 180-220) qui suffit pour la reconstitution du complexe protéique. On retrouve les mêmes résultats que l'on observe chez l'humain, la mutation yNob1<sup>W223A</sup> déstabilise le complexe Nob1/Pno1 et on arrive toujours à reconstituer le complexe yNob1/yPno1 avec la boucle contenant le motif WIT (*Figure 33*). On peut donc déduire que le mécanisme de reconnaissance entre ces deux protéines est conservé chez la levure. Nous avons tiré avantage de ces conservations pour tester l'effet de ces mutants sur l'activité endonucléolytique de l'endonucléase Nob1.



**Figure 33 : Validation des tests d'interaction entre Nob1 et Pno1 chez la levure.** Analyse sur gel SDS PAGE 12.5% de la formation du complexe Nob1/Pno1 avec les protéines homologues de levure où l'endonucléase Nob1 a été utilisé comme protéine appât pour purifier Pno1. Avec la protéine sauvage ou la construction de la boucle, on peut constater la présence de la bande correspondant à Pno1 qui est absent lorsque l'on mute le résidu W223. Input : fraction avant le chargement sur les billes de Nickel ; Pull down : fraction retenue sur les billes.

## 2. Effet des mutants de Nob1 sur l'activité endonucléolytique et Rôle de Pno1 dans la régulation de l'activité enzymatique de Nob1 chez la levure

Ayant préalablement testé la maturation *in-vitro* de l'ARN 18S chez l'homme, nous n'avions pas réussi à observer une activité de l'endonucléase avec les protéines homologues humaines. Nous avons alors décidé d'étudier l'effet des mutants sur l'activité de l'endonucléase en utilisant les protéines de la levure. Cette fois-ci, nous avons utilisé un ARN pré-18S qui a été préalablement utilisé dans la littérature pour tester l'activité endonucléase de Nob1 (Lebaron et al., 2012). L'ARN utilisé dans cette étude correspond au fragment -200 nt jusqu'au site A2 du pré-ARNr 18S (Figure 35A).



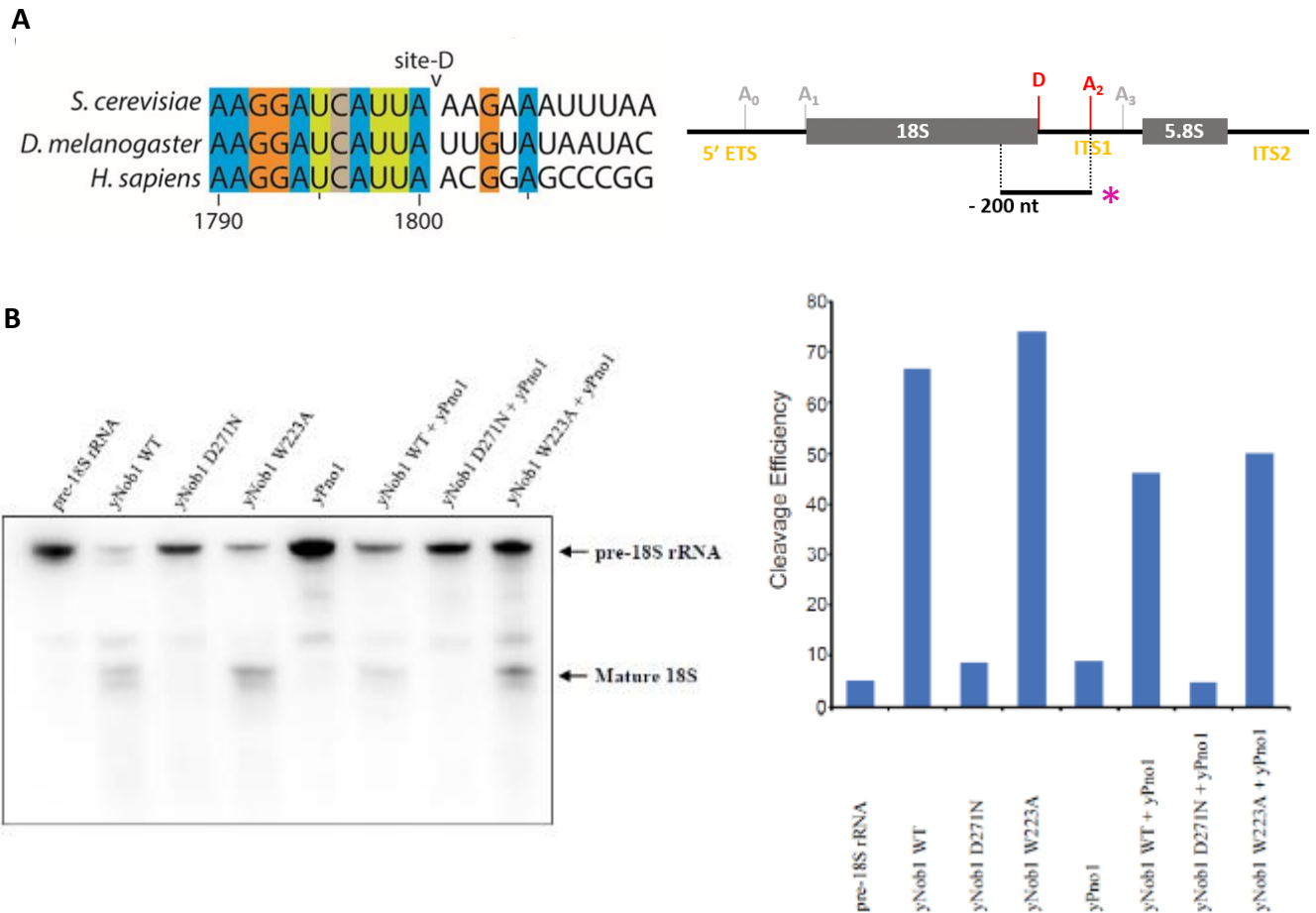
**Figure 34 : Résumé de la purification des homologues de Nob1 et Pno1 chez la levure (yNob1, yNob1<sup>D271N</sup>, yNob1<sup>W223A</sup> et yPno1).** A) Analyse sur gel SDS PAGE 12,5% de la pureté des échantillons protéiques après la purification. Les différentes constructions de Nob1 ont un poids moléculaire de 51 kDa et vont migrer aux alentours de 55 kDa tandis que yPno1 va migrer vers 35 kDa pour un poids moléculaire de 30 kDa. B) Tableau descriptif des protéines yNob1 et yPno1 pour les tests d'activité ( $\epsilon$  : coefficient d'extinction, kDa : le poids moléculaire,  $\mu$ M : concentration finale de protéine et  $\mu$ l : le volume des aliquotes protéiques).

Les différentes constructions de Nob1 ont été purifiées selon la méthode de purification à grande échelle (une affinité Nickel, un clivage à la protéase TEV et une chromatographie

d'exclusion stérique). La chromatographie d'affinité a été effectuée avec un lavage à haut sel (1M NaCl) afin d'éviter ou de minimiser les contaminations par des enzymes de types RNases. Enfin, les protéines ont été stockées dans du tampon de conservation à pH 7.5 (25 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP) à une concentration correspondant à 80  $\mu$ M (*Figure 34*).

Les tests d'activité ont été effectués selon le protocole déjà publié (Lebaron et al., 2012). D'après les résultats obtenus et comme attendu, on observe une coupure pour la protéine sauvage mais également pour la protéine mutée pour l'interaction à Pno1. Cela nous indique donc que la liaison entre Nob1 et Pno1 ne semble pas moduler la capacité de Nob1 à couper son ARN cible. De plus, on n'observe pas de coupure lorsque le résidu D271 est muté ce qui montre bien que l'activité endonucléolytique de Nob1 est altérée, confirmant ainsi que le dernier résidu du site actif correspond bien à celui proposé (Raelijaona et al., 2018 et non à celui proposé précédemment (Fatica et al., 2004; Sturm et al., 2017; Woolls et al., 2011). Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés par le groupe de Hurt où il a été testé *in vivo* la perturbation de la formation du complexe Nob1/Pno1. De plus, les études de l'équipe de Hurt ont aussi montré que cette mutation n'affecte pas la croissance ni l'interaction de Nob1 avec le pré-ribosome puisque l'endonucléase est toujours co-purifiée avec la particule pré-40S. Enfin, cette mutation ne semble pas avoir d'effet spécifique dans la maturation de l'ARNr du 18S (Sturm et al., 2017). Nous avons ensuite ajouté Pno1 à nos tests d'activité avec la forme sauvage ou les versions mutées de Nob1. D'après les résultats obtenus, Pno1, ne porte pas d'activité enzymatique ce qui est montré par l'absence de coupure lorsque celle-ci est testée seule avec l'ARN pré-18S. Cependant lorsque l'on ajoute Pno1 avec Nob1, on peut observer une diminution de la coupure aussi bien avec Nob1 sauvage qu'avec Nob1 portant la mutation W223A (mutée pour l'interaction avec Pno1) (*Figure 35B*). Ces résultats suggèrent donc que l'ajout de Pno1 inhibe l'activité de Nob1 non pas directement par un effet sur l'endonucléase elle-même mais plutôt indirectement via une liaison compétitive avec l'ARN. En effet, même si le complexe Nob1/Pno1 n'est pas formé (le cas du mutant W223A), on observe quand même une baisse de l'activité. Ces résultats sont cohérents avec ce que l'on observe de la structure du pré-40S humain (Ameismeier et al., 2018) où Pno1 est en interaction avec le site de coupure de Nob1 sur le pré-ARNr, tenant ainsi Nob1 dans une conformation où l'endonucléase ne peut pas effectuer sa coupure (le site actif est bien trop loin de son substrat). Ces conclusions sont également évoquées par des tests *in-vitro* des régions d'interaction de Nob1 et Pno1 sur le pré-18S. En effet les travaux effectués par (Sloan et al., 2019; Turowski et al., 2014) ont montré

que les sites d'interaction de Nob1 et de Pno1 au pré-ARNr 18S se chevauchait au niveau de l'hélice 45 qui contient le site de clivage.



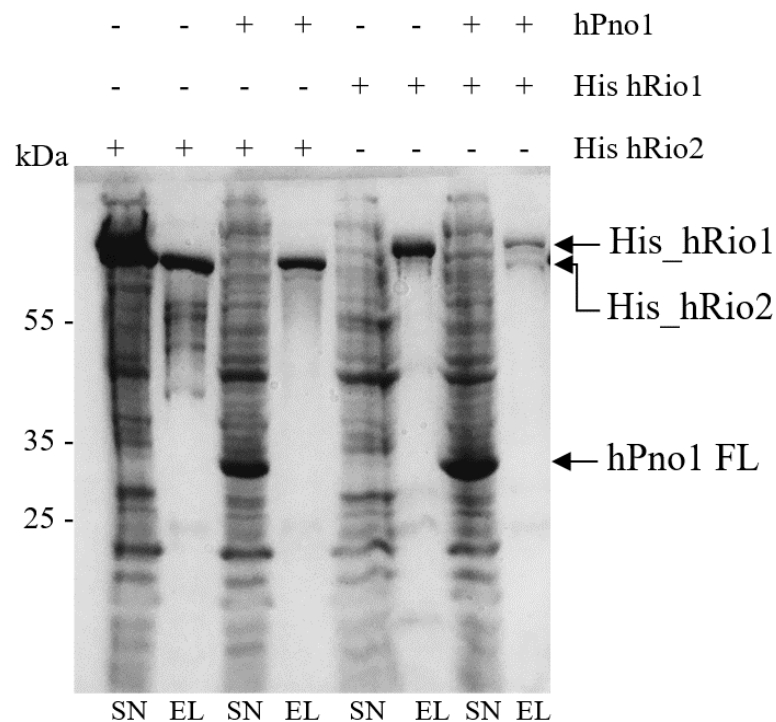
**Figure 35 : Effet des mutants de Nob1 sur l'activité endonucléolytique et rôle de Pno1 dans la maturation du 18S chez la levure.** A) Zoom sur l'extrémité 3' de l'ARNr 18S contenant le site de clivage « Site-D », le clivage s'effectue entre le pair de nucléotides AA précédés d'un uracile adapté de (Heuer et al., 2017). B) Choix de l'ARN pour les tests *in vitro*, schémas d'une partie du pré-5.8S contenant les ARNr 18S et 5.8S avec les différents sites de clivages. Le pré-ARNr utilisé pour les tests d'activité chez la levure est indiqué par un astérisque. C) Analyse sur gel des produits de clivage du pré-ARNr chez la levure gauche). Histogramme de quantification de l'efficacité du clivage des différentes constructions de Nob1 en présence ou en absence de son partenaire Pno1 (droite).

### III. Identification des autres facteurs accessoires impliqués dans la maturation du 18S

#### 1. Rio kinase permettant de déplacer Pno1

Les résultats obtenus lors des tests d'activité ainsi que les données structurales montrant que Pno1 bloquerait Nob1 dans une conformation inactive qui l'empêche d'effectuer son activité nous ont incité à identifier des partenaires qui pourraient déplacer Pno1 et ainsi rendre le site accessible pour la maturation. Dans la littérature, différents facteurs ont été rapportés comme étant impliqués dans la maturation de l'ARNr 18S. Parmi ces facteurs, les deux protéines kinases Rio1 et Rio2 appartiennent à la même famille mais participent à deux fonctions distinctes durant la maturation cytoplasmique du pré-40S. Rio1 est un facteur cytoplasmique qui s'associe avec le pré-40S, est également impliqué dans la maturation de l'ARN 18S et enfin participe au recyclage des deux facteurs Nob1 et Pno1 (Widmann et al., 2012). De l'autre, Rio2 intervient dans l'export cytoplasmique de la particule pré-40S et participe également à la maturation du 18S. Cependant, chez la levure, la déplétion de ces kinases induit une accumulation du pré-ARNr 20S et une diminution de la quantité d'ARNr 18S mature (Vanrobays et al., 2001; Widmann et al., 2012). Au vu des différentes informations disponibles, nous avons voulu tester s'il existait une interaction entre les protéines humaines correspondants à ces facteurs puisque chez la levure, les différents tests d'interaction entre des AFs ont montrés une reconnaissance entre Nob1 et Rio2 (Campbell and Karbstein, 2011). Par conséquent, nous avons effectué des expériences de co-expression de hPno1 avec les deux kinases hRio1 ou hRio2 (qui portent l'étiquette d'affinité). D'après les analyses sur gel, d'une part pour les fractions solubles (SN), dans le cas de hRio2 on peut observer une bande surexprimée qui migre à 60 kDa. Comme la kinase Rio2 humaine fait 63 kDa, celle-ci correspond bien à la taille attendue pour cette bande. On retrouve la même bande lorsque l'on effectue une co expression de hRio2 avec hPno1. Nous pouvons également observer une seconde bande surexprimée avec un poids moléculaire de 30 kDa qui est la bande caractéristique de hPno1. De ce fait, les deux protéines (Rio2 et Pno1) sont bien exprimées. Cependant, dans les fractions qui correspondent aux éluions (EL), en expression simple ou avec hPno1, on n'observe que la bande à 63 kDa de la kinase hRio2. Par conséquent, ces résultats nous indiquent qu'il n'y a pas reconnaissance directe entre ces deux facteurs. D'autre part, pour la co-expression de la kinase hRio1 avec hPno1, on retrouve les mêmes

comportements observés précédemment. En effet, lorsque l'on effectue une simple expression du facteur hRio1, on voit une bande qui migre à une taille plus élevée que celle de hRio2 qui est tout à fait cohérent puisque le poids moléculaire de cette protéine est de 65 kDa. On retrouve également la même bande correspondant à hPno1 lors de la co-expression avec hRio1. Les deux protéines sont donc exprimées cependant dans les fractions après élution, on n'observe que la bande de hRio1 (Figure 36). D'après ces résultats, on peut donc déduire qu'il n'y a pas de lien direct entre hPno1 et hRio1. Ceux-ci pourraient donc nous indiquer que d'autres facteurs ou protéines accessoires qui pourraient également être impliqués dans la maturation de l'ARNr 18S.



**Figure 36 : Test de co-expression entre la protéine hPno1 avec les kinases hRio1 ou hRio2.** Analyse sur gel SDS PAGE 12.5% des résultats de la co-expression entre hRio2 et hPno1 ou hRio1 et hPno1 en utilisant les kinases Rio comme protéines appâts pour co-purifier hPno1. SN : correspond à la fraction chargée sur la résine d'affinité et EL correspond à l'élution après décrochage de la protéine recombinante par compétition avec l'imidazole.

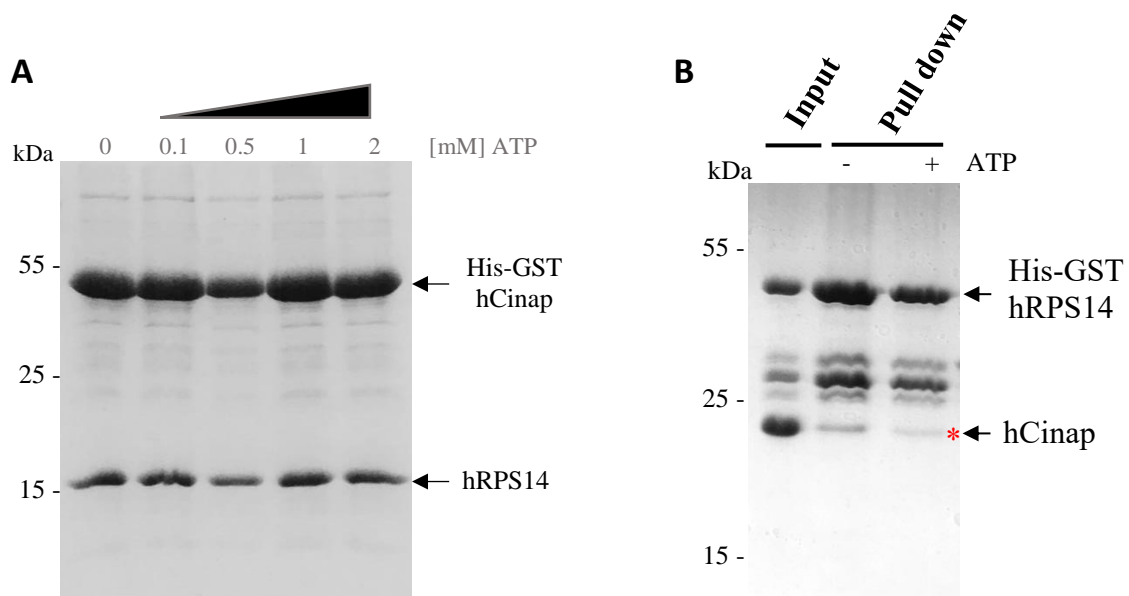
## 2. Cinap comme facteur accessoire impliqué dans le déplacement de Pno1

### *a) Effet de l'ATP sur la dissociation du complexe Cinap/RPS14*

Le recrutement de la protéine RPS14 au sein de la particule pré-ribosomique est dépendant de Cinap. Ce facteur sert de chaperonne et elle assure le transport ainsi que le relargage de RPS14 au niveau de son site de localisation dans le pré-40S. Des études ont également montré que Cinap est un facteur qui participe à la maturation du ribosome mais celui-ci n'interagit pas directement avec la particule pré-ribosomique (Granneman et al., 2005). Chez la levure, le mécanisme de dissociation du complexe RPS14/Cinap est dépendant de la fonction ATPase de celle-ci (Hellmich et al., 2013; Loc'h et al., 2014).

Pour vérifier que le même mécanisme est conservé chez l'homme, nous avons cloné les gènes codants respectivement pour Cinap et RPS14 dans les vecteurs utilisés pour les études précédentes (cf mat et meth). En raison des problèmes de stabilité de l'expression simple de la protéine RPS14, nous avons choisi de générer un bi-cistron. Ainsi nous avons réussi à copurifier le complexe hRPS14/hCinap ce qui est observé dans la figure ci-dessous (*Figure 37*) où l'on peut distinguer deux bandes de poids moléculaire différent à 15 kDa et 40 kDa qui correspondent respectivement à RPS14 et Cinap (Cinap ayant été fusionnée à une double étiquette d'affinité Histidine et GST a une MW théorique de 48 kDa et RPS14 de 16 kDa).

Afin d'étudier l'effet de l'ATP sur la stabilité du complexe, les fractions purifiées ont été incubées en présence de concentrations croissantes d'ATP (0,1 ; 0.5 ; 1 et 2 mM). L'activation de Cinap nécessite une incubation à température ambiante et notamment la présence de Magnésium (Loc'h et al., 2014). Cependant les résultats obtenus sont contradictoires avec les données publiées pour le cas de la levure puisque l'on n'observe pas de dissociation du complexe formé par RPS14 et Cinap. En effet, dans les différentes conditions que nous avons testées on retrouve toujours les deux bandes sans aucune diminution de RPS14 même avec une concentration d'ATP à 2 mM (*Figure 37A*). Ces résultats indiqueraient que RPS14 régule l'activité ATPase de Cinap/Fap7 et que la conformation du complexe par co-expression rend le site ATPase inaccessible, empêchant ainsi la dissociation de ces deux protéines. En effet des expériences avec les homologues de ces protéines chez l'archée montrent des résultats identiques (Hellmich et al., 2013).



**Figure 37 : Le complexe hCinap/hRPS14.** A) Analyse sur gel SDS PAGE 12.5% des fractions co-purifiées du complexe hRPS14/hCinap (Fap7), l'ajout d'une concentration croissante d'ATP n'influence pas la stabilité du complexe et dans les différentes pistes, on retrouve un profil de migration du complexe similaire à celle de la fraction en absence d'ATP. B) Expérience de pull down en utilisant hRPS14 comme protéine appât pour co-purifier son partenaire Cinap (Input correspond à la fraction chargée sur bille et pull down correspond aux protéines retenues). Dans les deux cas, le complexe peut être reformer mais en présence d'ATP on peut observer une légère diminution de la bande à 20 KDa qui correspond à hCinap/Fap7.

Afin de vérifier la fonction ATPase de Cinap, nous avons donc procédé d'une manière différente, puisque dans les travaux effectués chez la levure les deux protéines étaient purifiées séparément ensuite les auteurs ont procédé à une reconstitution du complexe. Par conséquent, nous avons généré une construction de RPS14 fusionnée avec la double étiquette d'affinité (6xHis\_GST) qui a permis d'améliorer la stabilité de cette protéine. En effet, la construction de RPS14 s'exprime malgré le fait que l'échantillon ne soit pas très pur. En effet, nous avons une bande à 45 kDa qui correspond à la protéine avec l'étiquette GST (poids moléculaire de la protéine de fusion His-GST\_hRPS14 = 44 kDa) mais aussi la présence de bandes contaminantes au-delà de 25 kDa. Ces résultats pourraient indiquer que la protéine de fusion est sujette à une dégradation de celle-ci mais aussi une fuite d'expression qui pourrait correspondre à la GST possède un poids moléculaire de 28 kDa (Figure 37B). Cette pureté est néanmoins suffisante pour nos tests de pull down et comme la taille de Cinap est de 20 kDa, on s'attendrait donc à voir la migration d'une bande en dessous de 25 kDa.

Après avoir utilisé un tampon KCl en reproduisant des conditions similaires à celles des expériences de pull down effectuées chez la levure, les quantités produites furent suffisantes pour effectuer nos expériences et nous avons pu tester l'effet de l'ATP sur l'association ou la dissociation du complexe. Nous avons observé un complexe RPS14/Cinap mais pas de dissociation avec ajout d'ATP. Ce n'est qu'après avoir pré-incubé Cinap avec de l'ATP avant de tester son interaction avec RPS14 par expériences de pull down que nous avons réussi à reproduire une diminution de l'association de Cinap/Fap7 avec son partenaire RPS14 (*Figure 37B*) (Peña et al., 2016).

Nous avons donc réussi à obtenir les mêmes résultats observés chez la levure et ainsi d'effectuer des tests d'interaction avec les différentes protéines localisées au niveau de la plateforme, c'est-à-dire Pno1, Nob1 et RPS26.

### **b) Cinap/Fap7 reconnaît Nob1 et Pno1**

D'après l'architecture des particules pré-ribosomique tardive (pré-40S) de levure et de l'humain, la protéine RPS14 est localisée au niveau de la plateforme et proche de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Ameismeier et al., 2018; Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018). Dans la structure cryo-EM de la particule pré-40S humaine, celle-ci se trouve proche du complexe formé par l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1 (*Figure 38A*). Nous avons d'ailleurs remarqué la proximité entre RPS14 et Pno1 qui pourrait indiquer que ces protéines interagissent entre-elles.

Nous avons validé l'existence de cette interaction *in vitro* par des expériences de co-expression utilisant Pno1 comme protéine appât pour co-purifier RPS14. En effet, la figure ci-dessous (*Figure 38B*) nous montre que lorsque l'on co-exprime RPS14 avec Pno1, on peut observer la présence d'une bande additionnelle qui migre aux alentours de 15 kDa. Par contre, cette bande n'est pas présente lorsque l'on effectue une simple expression du facteur Pno1 qui migre aux alentours de 35 kDa. Comme RPS14 a un poids moléculaire théorique de 14 kDa, la bande supplémentaire observée aux alentours de 15 kDa dans la co-expression des deux protéines correspondrait ainsi à la protéine ribosomale. Par conséquent, ces résultats confirment l'existence d'un lien direct entre la RPS14 et le facteur Pno1 (*Figure 38B*).

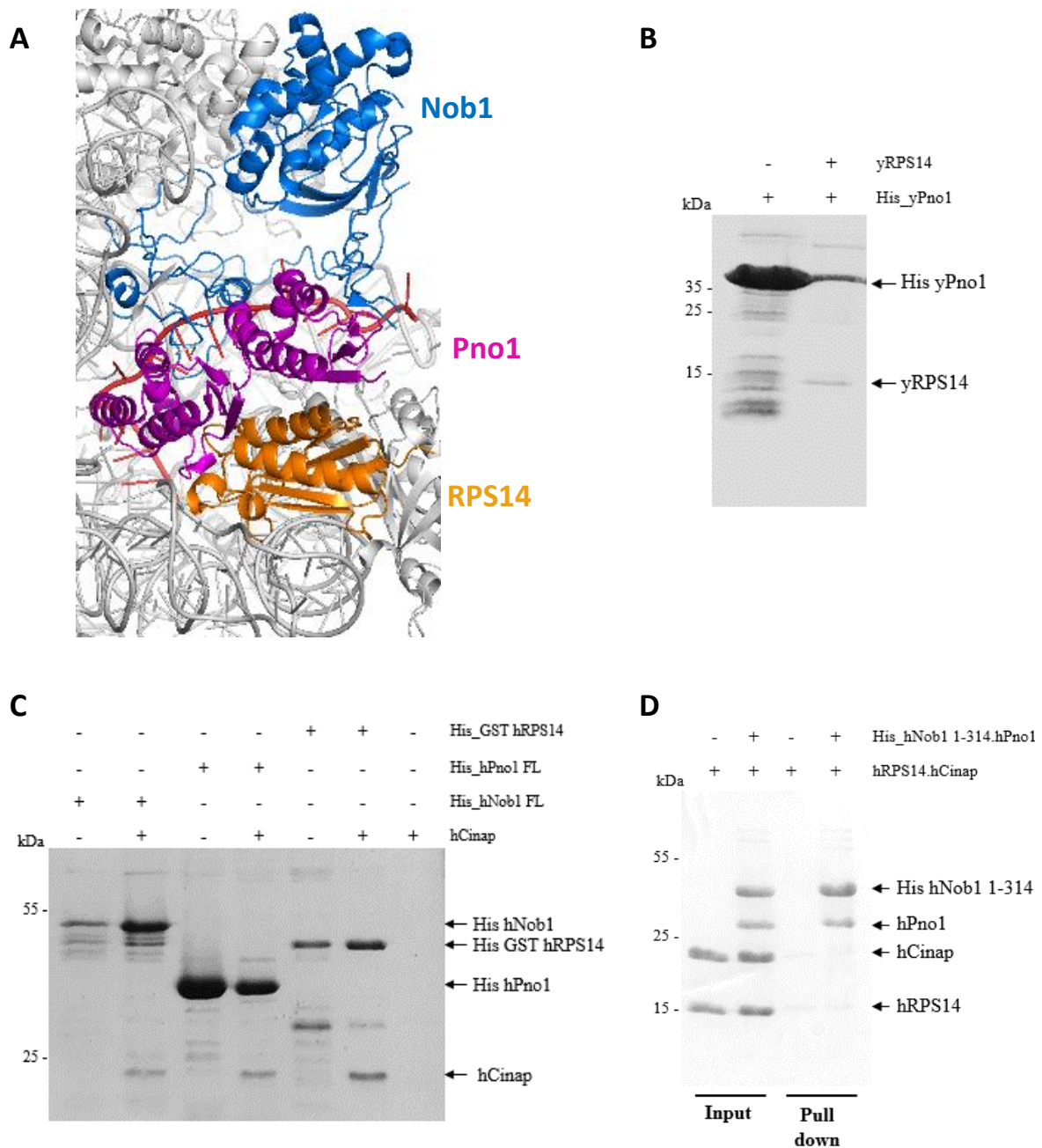
Nous savons également que la déposition de RPS14 au niveau de la plateforme nécessite son partenaire Cinap. Ceci pourrait donc indiquer que Cinap serait également localisée aux

alentours de cette région. D'autres études effectuées chez les archées ainsi que l'homme ont aussi montré que la protéine Cinap pouvait former un complexe avec l'endonucléase Nob1 (Bai et al., 2016; Hellmich et al., 2013) . Comme ces différentes protéines (à savoir RPS14, Nob1 et son partenaire Pno1) sont toutes localisées au niveau de la plateforme, ces informations nous ont incité à affiner la région de reconnaissance entre Cinap avec les facteurs d'assemblage Nob1 et Pno1 mais aussi son partenaire RPS14.

D'après les résultats de co-expression, on peut constater que lorsque l'on co-exprime l'endonucléase Nob1 avec Cinap, on a une bande additionnelle à 20 kDa qui correspond à la taille attendue pour celle-ci. Cette bande est également présente lorsque l'on co-exprime Cinap avec Pno1 ou RPS14 (*Figure 38C*). Par conséquent, nous pouvons déduire que l'on peut reformer les complexes entre Nob1 et Cinap, RPS14 et Cinap et enfin Pno1 et Cinap. Les résultats obtenus sont cohérents avec les données disponibles en particulier pour Nob1 et RPS14 (Bai et al., 2016).

Par contre l'interaction entre Pno1 et Cinap est totalement nouvelle puisqu'aucune donnée expérimentale n'a montré que les deux protéines pouvaient interagir. Nous avons donc testé si en pré-formant le complexe RPS14/Cinap, celui-ci pouvait reconnaître le complexe Nob1/Pno1 et ainsi former un complexe tétramérique. Pour ce faire, nous avons effectué des expériences de pull down en co-purifiant le complexe Nob1/Pno1 qui a ensuite été mélangé au complexe RPS14 /Cinap pré-purifié de RPS14/Cinap.

Les résultats obtenus nous montrent que seule la protéine Pno1 est retenue (*Figure 38D*). Ces résultats peuvent clairement indiquer que l'interaction entre ces quatre protéines est exclusive. En effet, ces observations sont tout à fait cohérentes avec les données disponibles puisque l'affinité de Cinap pour RPS14 est très élevée (de l'ordre du picomolaire chez les archées (Hellmich et al., 2013). Ceci indique également que Cinap (Fap7) doit être dissociée de RPS14 pour pouvoir s'engager dans des interactions avec d'autres facteurs. De plus l'interaction de Cinap avec RPS14 n'est pas compatible avec une interaction au ribosome puisque le site d'interaction entre Cinap et RPS14 est le même que celui entre RPS14 et l'hélice 23 de l'ARN 18S. Les interactions que l'on observe sont donc des événements de reconnaissances secondaires ayant lieu après que Cinap ait effectué son rôle de transporteur et déposé RPS14 sur le pré-ribosome (Hellmich et al., 2013; Loc'h et al., 2014).



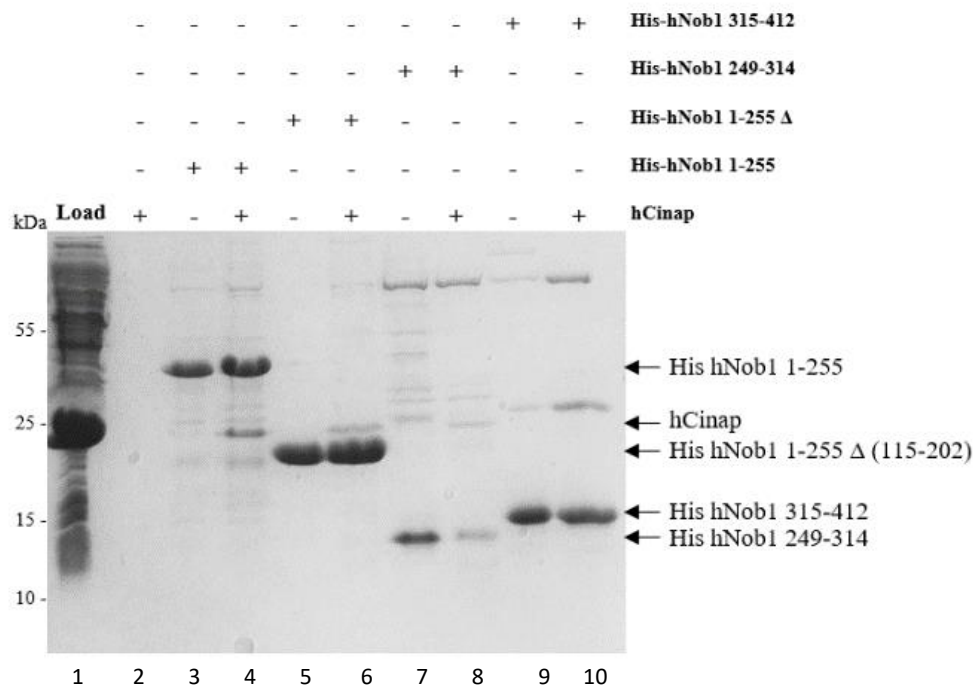
**Figure 38 : Test d'interaction entre hCinap, hNob1, hPno1 et hRPS14.** A) Localisation des protéines hNob1, hPno1 et hRPS14 dans l'architecture de la particule pré-40S humaine (PDB ID : 6G4S, d'après Ameismeier et al., 2018). B) La co-expression de hRPS14 avec hPno1 montre que les deux protéines peuvent interagir. C) Expérience de co-expression de l'ATPase hCinap (Fap7) avec différentes protéines de la plateforme. D) Expérience de pull down en utilisant le complexe préformé hNob1/hPno1 pour co-purifier le complexe hRPS14/hCinap (l'endonucléase Nob1 est la protéine qui porte l'étiquette d'affinité poly-histidine permettant la rétention sur les billes de Nickel).

D'après ces résultats nous avons émis l'hypothèse suivante : Cinap serait impliquée dans la maturation de l'ARNr 18S (Bai et al., 2016; Granneman et al., 2005). Suite à la déposition de RPS14, Cinap pourrait reconnaître Pno1 et/ou Nob1 et induire un changement de conformation permettant au domaine catalytique de Nob1 d'atteindre le site D et ainsi assurer la maturation du pré-ARNr 18S.

### c) *Affinement de la reconnaissance entre Nob1 et Cinap*

Des études d'interactions entre Nob1 et Cinap chez l'homme ont montré que la reconnaissance entre ces deux protéines se fait au moins partiellement par le domaine Zinc de l'endonucléase (res 105-412) (Bai et al., 2016). En effet, les auteurs ont utilisé l'ancienne délimitation basée sur l'organisation de Nob1 où le domaine PIN correspondait à la partie N-terminale de la protéine (res 1-105).

Par conséquent, nous avons décidé de cartographier l'interaction entre l'endonucléase Nob1 et Cinap par des expériences de co-expression de cette dernière avec les différents fragments de Nob1 que nous avons à disposition. L'endonucléase a été disséquée comme suit : le domaine catalytique ou domaine PIN (1-255), le domaine PIN dépourvu de la boucle interne (1-255  $\Delta$  (115-202)), le domaine Zinc ribbon qui correspond au fragment (249-314) et enfin l'extension C-terminale (315-412). Dans nos résultats de co-expression entre les fragments de Nob1 et Cinap (Fap7), on peut observer une bande additionnelle à 20 kDa caractéristique de la migration de Cinap. Cette bande est présente dans la plupart des co-expression sauf pour celle réalisée avec l'extension C-terminale (construction 315-412). Dans ce cas précis, Cinap (Fap7) n'est pas co-purifiée avec le fragment de Nob1 étiqueté. On peut également constater que la bande correspondant à Cinap (Fap7) est très faible par rapport à celle de Nob1. Ceci indique que le complexe formé n'est pas stœchiométrique (*Figure 39*). Les résultats obtenus nous montrent aussi que Cinap peut se lier aux fragments de Nob1, ce qui nous permet de déduire que l'interaction de l'endonucléase Nob1 avec Cinap se fait par ses deux domaines structurés (domaine PIN et domaine Zinc ribbon). Nos données biochimiques sont d'ailleurs en accord avec les résultats obtenus pour les protéines équivalentes de l'archée. En effet, les auteurs ont effectué des expériences de titration en RMN pour identifier des résidus impliqués dans la reconnaissance entre l'endonucléase et Cinap qui correspondent principalement à des les résidus localisés dans les deux domaines conservés de Nob1 (Hellmich et al., 2013).



**Figure 39 : Cartographie de l'interaction entre les protéines Cinap (Fap7) et Nob1 humaines : hNob1 a été disséquée en différents fragments selon la nouvelle délimitation de l'organisation du domaine protéique.** Les différents fragments ont été co-exprimés avec hCinap puis les résultats de co-expression ont été analysés sur gel SDS PAGE 15%. 1) surexpression de la protéine hCinap; 2) contrôle , hCinap seule avec les billes NiNTA; 3) expression du domaine catalytique de hNob1 (1-255); 4) co-expression de la construction hNob1 (1-255) avec hCinap; 5) expression du fragment (1-255(115-202)); 6) co-expression de hNob1 (1-255(115-202)) avec hCinap; 7) expression du domaine Zinc ribbon de hNob1 (249-314); 8) co-expression du domaine Zinc ribbon avec hCinap; 9) expression de l'extension C-terminale de hNob1 (315-412); 10) co-expression du fragment (315-412) avec hCinap.

**d) Effet de l'ATP dans la reconnaissance entre Cinap/Nob1 et Pno1**

Afin d'étudier le rôle éventuel de l'activité ATPase de Cinap dans la maturation ainsi que la reconnaissance avec Nob1 et/ou Pno1, nous avons effectué des expériences de pull down du complexe Cinap/Pno1, Cinap/Nob1 ou encore Cinap/Nob1/Pno1 en présence ou en absence d'ATP.

Les résultats de co-expression que nous avons effectué dans le paragraphe précédent (b. Cinap/Fap7 reconnaît Nob1 et Pno1) nous ont montré que l'on peut reconstituer le complexe

Cinap/Pno1 (*Figure 38*). Ces observations sont également validées par nos expériences de pull down ci-dessous (*Figure 40A*) où l'on peut constater que dans les pistes correspondantes aux fractions retenues sur billes de Nickel (Bound fractions), on retrouve les deux bandes caractéristiques de Cinap (20 kDa) et Pno1 (27 kDa). Ces résultats sont cohérents ceux de la co-expression de ces protéines qui nous confirment l'existence d'un lien direct entre les deux facteurs. Nous pouvons également constater que la bande de Cinap est plus faible en présence d'ATP. Ainsi, l'ajout d'ATP pourrait influencer la stabilité du complexe Cinap/Pno1. D'ailleurs, des études ont déjà montré que l'hydrolyse de l'ATP entraîne la dissociation du complexe formé par Cinap et RPS14 (Loc'h et al., 2014).

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'ATP sur la formation du complexe Nob1/Cinap. La figure ci-dessous nous montre que Cinap est présente mais très faiblement lorsque l'on co-purifie celui-ci en utilisant Nob1 comme protéine appât (*Figure 40B piste 3*). Ces résultats sont cohérents avec les expériences de co-expression des différentes constructions de Nob1 pour cartographier l'interaction de l'endonucléase avec Cinap (*Figure 39*). En effet, le complexe formé par Nob1 avec Cinap n'est pas stœchiométrique et la quantité de Cinap qui se lie à Nob1 est très faible. En présence d'ATP, la bande correspondant à Cinap est très légère et le profil de migration observé pour le complexe Nob1/Cinap est similaire à la condition sans ATP (*Figure 40B piste 4*). Par conséquent, ces résultats peuvent nous indiquer que l'interaction entre Nob1 et Cinap est transitoire et que les tests *in vitro* que nous avons effectués limitent les conditions de formation d'un complexe stable. Après cela, nous avons ajouté Pno1 dans nos expériences de pull down, et l'on peut constater que l'utilisation de Nob1 comme protéine appât permet de co-purifier à la fois Pno1 et Cinap. Ainsi, nous pouvons reconstituer un complexe formé par Nob1/Pno1/Cinap bien que la bande correspondante soit plus faible. Cependant, comparé au pull down entre l'endonucléase et Cinap, l'intensité de cette dernière est plus importante (*Figure 40B piste 5*). Par ailleurs, l'ajout d'ATP n'affecte pas le comportement du complexe puisque le profil de migration est similaire aux résultats précédents (*Figure 40B piste 6*). Néanmoins, nous pouvons suggérer que la formation du complexe Nob1/Pno1/Cinap est médiée par Pno1. Ce rôle de pontage entre deux protéines est bien connu chez Pno1 puisque dans le cadre de la maturation précoce (pré-90S) où celle-ci intervient dans la coupure du grand précurseur au niveau du site A<sub>2</sub>, l'homologue de la levure, Dim2, peut former un complexe trimérique avec Dhr1 et son régulateur UTP14 (Sturm et al., 2017).

Enfin, nous avons voulu valider l'implication de Pno1 dans la formation du complexe Nob1/Pno1/Cinap. Pour ce faire, nous avons utilisé la construction mutée de Nob1 (W208A)

qui empêche son interaction avec Pno1 (Raoelijaona et al., 2018). D'après la figure ci-dessous (*Figure 40B piste 7 et 8*), nous pouvons retrouver les mêmes résultats observés dans les expériences de pull down dans le cas de l'endonucléase non mutée (Nob1 1-314). Par conséquent, la mutation W208A n'a pas d'effet sur la reconnaissance de Nob1 avec Cinap. La version mutée de Nob1 n'a donc pas d'influence sur la reconnaissance avec Cinap. La figure ci-dessous (*Figure 40B piste 9*), nous montre que les trois bandes correspondantes aux trois facteurs étudiés sont présentes lorsque l'on ajoute Pno1 dans nos expériences de pull down. En absence d'ATP, les bandes correspondant à Cinap et Pno1 sont faibles et elles ont les mêmes intensités (*Figure 40B piste 9*). Cependant, dans la dernière piste (*Figure 40B piste 10*), on peut observer une augmentation de l'intensité des bandes correspondant à Cinap et Pno1. Ces résultats suggèrent donc que l'ajout d'ATP influence la stabilité du complexe tripartite.

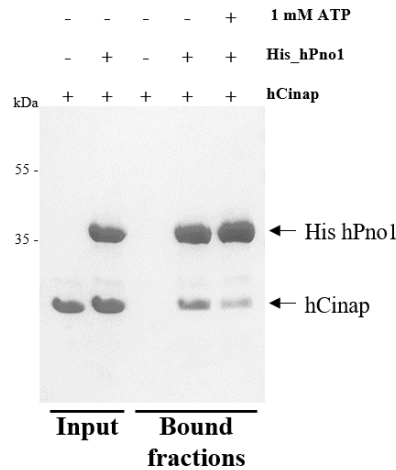
Les résultats obtenus sont très intéressants puisque même lorsque l'endonucléase Nob1 (mutant W208A) n'est plus capable de se lier à son partenaire Pno1, nous pouvons toujours à former le complexe Nob1/Pno1/Cinap. Dans ce cas particulier, Nob1 n'est pas capable de se lier à Pno1 et donc seul Cinap peut servir de connecteur entre l'endonucléase et son partenaire. Ces résultats confirment ainsi la reconnaissance entre Nob1 et Cinap. On peut aussi clairement postuler que l'endonucléase Nob1 reconnaît Cinap. Cette dernière est capable de reconnaître à la fois Nob1 et Pno1 ce qui implique que Cinap possède au moins deux interfaces de reconnaissance différentes pour ces deux facteurs d'assemblage. De plus, ces résultats suggèrent que la reconnaissance entre Nob1 et Cinap pourrait être régulée par la protéine Pno1.

En effet, pour que Cinap puisse reconnaître l'endonucléase, son interaction avec Pno1 est nécessaire. Ainsi, Pno1 aiderait Cinap à adopter une conformation qui est requise pour faciliter la reconnaissance avec Nob1. D'où la formation du complexe Nob1/Pno1/Cinap et cette reconnaissance est stimulée par l'ATP puisque l'ajout de celui-ci permet d'obtenir un complexe équimolaire dans le cas de Nob1 mutée (*Figure 40B piste 10*). Globalement, les données sont cohérentes avec la dissociation de RPS14 par Cinap en présence d'ATP et ainsi la libération de Cinap/Fap7 pour effectuer d'autres fonctions, potentiellement une interaction avec d'autres facteurs de maturation du ribosome.

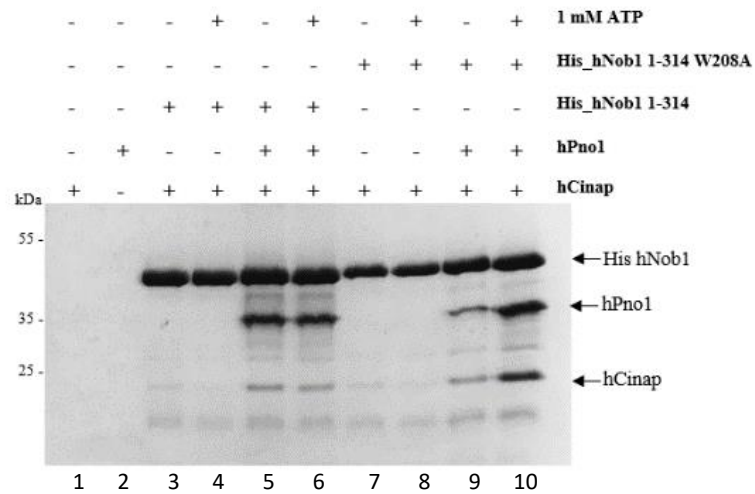
Nos données nous ont donc permis de montrer qu'il y aurait une reconnaissance entre ces différentes protéines et le fait que celles-ci soient localisées au niveau de la plateforme confirmerait bien la pertinence des résultats que l'on observe dans nos expériences de pull down. Cependant, cela n'explique pas totalement comment Cinap/Fap7 participerait

directement à la maturation du 18S comme le suggère les travaux effectués par Bai et al., 2018. En effet, ils ont montré *in vivo* et *in vitro* que Cinap (Fap7) pouvait interagir avec le précurseur de l'ARN 18S sans pour autant avoir des motifs d'interaction à l'ARN et que celui-ci induit l'activité endonucléolytique de Nob1 et ainsi la maturation du précurseur.

**A**



**B**



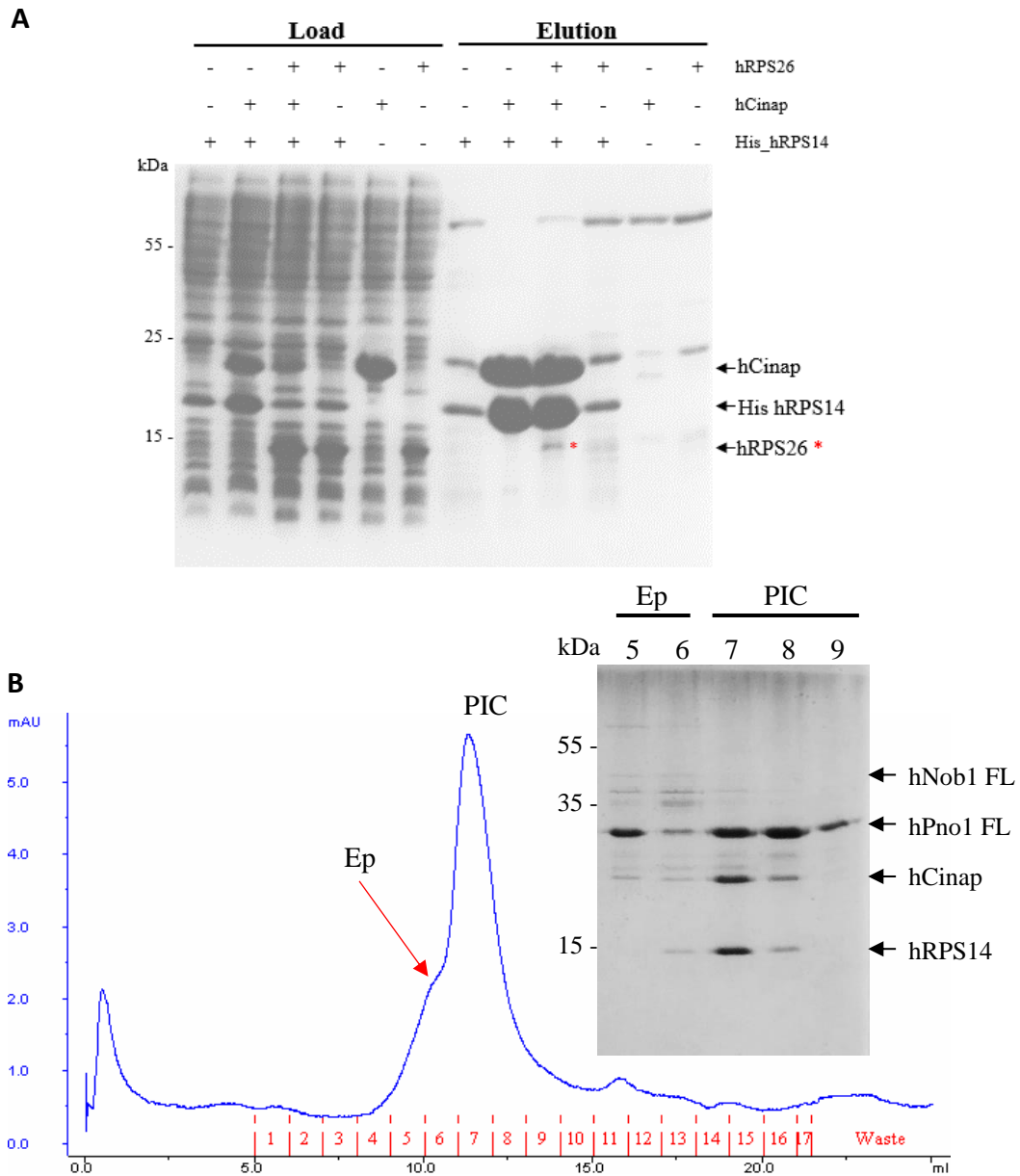
**Figure 40 : Expériences de pull down pour étudier rôle de l'ATP dans la reconnaissance entre Cinap, Nob1 et son partenaire Pno1.** A) Pull down entre Cinap et Pno1 avec ou sans d'ATP (le facteur Pno1 porte l'étiquette d'affinité), B) Pull down entre Cinap et les deux constructions de Nob1 (1-314 et 1-314<sup>W208A</sup>) avec et sans le partenaire Pno1 et en présence ou en absence d'ATP. Les panels 1 et 2 correspondent respectivement aux contrôles Cinap et Pno1 avec les billes NiNTA ; 3 et 4 Nob1 (1-314) avec Cinap en absence et en présence d'ATP, 5 et 6 Nob1 (1-314) avec Cinap et Pno1 en absence ou en présence d'ATP ; 7 et 8 Nob1 (1-314<sup>W208A</sup>) avec Cinap en absence et en présence d'ATP, 9 et 10 Nob1 (1-314<sup>W208A</sup>) avec Cinap et Pno1 en absence et en présence d'ATP.

### e) *Cinap/Fap7 comme facteur d'échange entre RPS26 et Pno1*

Un autre facteur impliqué dans la maturation de l'ARN 18S est la protéine RPS26 qui est une composante structurale de la petite SU 40S. Celle-ci intervient tardivement dans le processus d'assemblage et elle est localisée au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN 18S proche de RPS14. Précisément, RPS26 se localise au niveau du site précédemment occupé par Pno1 dans le pré-ribosome (Ferreira-Cerca et al., 2007; Heuer et al., 2017; Rabl et al., 2011; Sturm et al., 2017). La structure récente de pré-40S montre que Pno1 est positionnée de manière à empêcher l'hélice 28 d'adopter sa conformation mature et donc bloque l'interaction entre celle-ci et RPS26 (Heuer et al., 2017). Des études effectuées chez la levure ont montré l'implication de l'homologue de Cinap, la protéine Fap7, dans le recrutement et la déposition de RPS26 dans la particule pré-40S (Peña et al., 2016).

Dans notre cas, nous avons également observé une interaction entre RPS14, Cinap et RPS26. En effet, lorsque l'on co-exprime ces trois protéines, nous pouvons observer une bande de 15 kDa qui correspond à RPS26 (115 résidus). Nos résultats nous insinuent également que la formation du complexe Cinap/RPS14/RPS26 dépend de Cinap/Fap7 puisque RPS26 n'est pas co-purifié avec RPS14 en absence de Cinap/Fap7 (Figure 41A). En effet, les analyses sur gel SDS PAGE montrent que RPS26 est bien exprimée et nous pouvons observer la bande à 15 kDa dans les extraits solubles (Load). Ces résultats sont également cohérents avec les études d'interaction entre les protéines homologues de la levure où la reconnaissance entre ces trois protéines est dépendante de Cinap/Fap7 (Peña et al., 2016).

Enfin, nous avons voulu étudier le lien entre le déplacement de Pno1 et l'arrivée de RPS26. Nos données suggèrent fortement l'implication de Cinap/Fap7 qui ferait le lien entre ces différents mécanismes de reconnaissance. En effet, dans la particule pré-40S, RPS14 et Pno1 sont directement en contact et nous avons montré précédemment par des expériences de co-expression l'existence de cette interaction *in vitro*. Nous avons donc voulu tester si un lien physique pouvait exister entre RPS14, Cinap/Fap7 et Pno1 qui pourrait mimer le complexe formé par Cinap, RPS14 et RPS26.



**Figure 41 : Interaction entre Cinap et les différents protéines (RPS et AFs) de la plateforme.** A) Test de co-expression, reconstitution du complexe RPS14/RPS26/Cinap/Fap7. B) Profil d'éluion des protéines Nob1, Pno1, RPS14 et Cinap pour étudier le mécanisme d'échange entre ces différents facteurs. Un seul pic majoritaire observé et l'analyse sur gel SDS PAGE montre que que les quatres protéines testées co-éluent dans la même gamme de volume d'éluion. (Ep : épaulement).

Pour ce faire, nous avons tester par la méthode de chromatographie d'exclusion stérique la formation des différents complexes intermédiaires. Les quatres protéines suivantes (Nob1, Pno1 et le complexe RPS14-Cinap) ont ainsi été mélangée puis chargées sur colonne de gel filtration Superdex™ 75 10/300 GL (GE heathcare). Malheureusement, les résultats obtenus ne sont pas concluants puisque le chrommatogramme ci-dessus nous indique que l'on a principalement un pic asymétrique avec un épaulement et l'analyse sur gel SDS PAGE nous montrent que les différentes protéines sont toutes éluées dans la même gamme de volume d'éluion (*Figure 41B*). Ces problèmes sont probablement dus à la résolution de la colonne qui ne permet pas de séparer les différents complexes intermédiaires formés.



# DISCUSSION



# I. Reconstitution du complexe Nob1/Pno1 en vue d'une étude structurale

La maturation cytoplasmique de la petite SU implique la maturation de l'ARNr 18S qui est assurée par l'endonucléase Nob1, l'enzyme responsable du clivage au niveau site D (site 3 chez l'homme) libérant ainsi la séquence correspondant à l'ITS1 et la formation de l'extrémité 3' mature de l'ARNr 18S. Pendant mon projet de thèse, j'ai pu reconstituer le complexe Nob1/Pno1 *in vitro* non seulement pour les protéines humaines mais aussi pour les protéines homologues d'autres organismes. Cette capacité implique forcément que les mécanismes de maturation sont conservés à travers les espèces. Avec la visualisation de différents intermédiaires du processus d'assemblage par la microscopie électronique, des informations structurales concernant les étapes de la biogénèse sont à présent disponibles. En effet, des études structurales effectuées chez *Saccharomyces cerevisiae* ou encore *Chaetomium thermophilum* ont permis de visualiser les intermédiaires comme le 90S, le SSU processome ou encore les modules UTPs (Barandun et al., 2017, 2018; Cheng et al., 2017; Kornprobst et al., 2016). Au début du projet, des structures de la particule pré-ribosomique tardive (pré-40S) de la levure étaient également disponibles et une des particularités de ces structures était l'absence de l'endonucléase Nob1 malgré la présence du partenaire Pno1 ou encore l'utilisation de cette protéine Nob1 comme ancre de purification des particules pré-ribosomiques (Heuer et al., 2017; Scaiola et al., 2018). Néanmoins des structures à basse résolution des particules pré-ribosomiques de l'homme ou encore de la levure ont permis de positionner l'endonucléase Nob1, localisée au niveau de la plateforme (Johnson et al., 2017; Larburu et al., 2016). Ces informations sont importantes pour comprendre le mécanisme d'assemblage global mais aussi pour avoir des informations plus précises (à l'échelle atomique) concernant les différents intermédiaires entre les événements de maturation. Des études structurales des deux facteurs Nob1 et Pno1 restaient très intéressantes et comme mon projet de thèse était initialement orienté vers ces perspectives, la majorité de mon travail s'est principalement focalisée sur l'obtention des cristaux afin de déterminer leur structure atomique. Au vu de la taille des protéines d'intérêts (trop petite pour la microscopie électronique et trop grande pour la RMN), une étude par diffraction aux rayons X semblait être l'approche la plus appropriée pour mon projet.

Une telle étude implique une production importante d'échantillon qui doit respecter certains critères comme la solubilité, la stabilité mais aussi l'homogénéité. Ces critères nous ont obligé à produire et à purifier les protéines recombinantes dans des systèmes d'expression adaptés, ce que nous avons effectué en surexprimant les protéines d'intérêts chez la bactérie *E. coli*. Des difficultés dans la production de l'endonucléase Nob1 sous sa forme entière nous ont incité à avoir recours à des troncatures dans sa séquence codante qui aboutissaient à la production de versions plus courtes mais surtout plus stable de l'enzyme. Une des étapes limitantes de l'approche par diffraction aux rayons X est l'obtention de cristaux. Nous avons essayé de surpasser ces difficultés en utilisant des méthodes d'optimisation de constructions couplées à l'utilisation de séquences de divers organismes eucaryotes. D'après les données de conservation, l'organisation modulaire de Nob1 montrait que ce facteur contenait des régions flexibles qui pourraient potentiellement empêcher la formation de cristaux. N'ayant pas obtenu de résultats prometteurs en utilisant l'optimisation de construction, nous avons aussi eu recours à l'utilisation de constructions équivalentes chez d'autres organismes. Malheureusement, ces différentes stratégies n'ont pas eu de très grand succès malgré leur combinaison avec l'utilisation de la protéolyse ménagée.

## 1. Organisation du complexe Nob1/Pno1

La seule structure disponible de Nob1 au début du projet est celle de son orthologue PhNob1 chez l'archaea *Pyrococcus horikoshii* où le domaine catalytique PIN est relié au domaine doigt de Zinc (Zn ribbon) par une région centrale flexible (Veith et al., 2012). En parallèle de la cristallisation du complexe Nob1/Pno1, j'ai effectué des études *in vitro* pour valider nos hypothèses de travail sur la base de la conservation des séquences codantes ainsi que sur les prédictions de structures tridimensionnelles. Ces travaux nous ont montré que chez les eucaryotes le domaine catalytique de Nob1 est séparé en deux fragments. En effet, la mutation de la leucine en position 87 localisée entre deux hélices permettant le contact entre les deux fragments du domaine PIN pouvait déstabiliser l'organisation de celui-ci (Raoelijaona et al., 2018). Comparé à l'organisation de Nob1 chez les archées, les deux fragments constituant le domaine catalytique sont connectés par une région flexible de taille variable « la boucle interne » chez les eucaryotes. De même les deux régions structurées : PIN et Zinc ribbon sont relativement proches contrairement à son homologue PhNob1. Une des différences observées entre les eucaryotes et les archées est la présence d'une extension C-terminale qui n'a pas été

conservée au cours de l'évolution. Cette nouvelle délimitation de Nob1 nous a ensuite permis d'étudier le mode de reconnaissance avec son partenaire Pno1. Les résultats de la cartographie des interactions entre le complexe Nob1/Pno1 ont montré que la boucle interne spécifiquement acquise aux cours de l'évolution est nécessaire et suffisante pour reconnaître Pno1 *in vitro*. Ces données ont donc fait l'objet d'une publication qui est complémentaire des résultats de cryo-EM récemment publiés sur l'architecture de la particule pré-40S humaine à 3.6 Å de résolution (résultats, section I. étude du mode de reconnaissance entre l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1 : *Figure 18*) (Ameismeier et al., 2018). Si dans les différentes structures du pré-40S, Nob1 est absente, Ameismeier et al., eux, ont réussi à positionner l'endonucléase mais également à construire un modèle permettant de décrire l'organisation de Nob1, modèle qui est cohérent avec nos données biochimiques. En général, les observations structurales et nos données *in vitro* sont tout à fait cohérentes puisque pour la reconnaissance avec Pno1, ce même groupe a aussi montré que l'interaction entre Nob1 et Pno1 impliquait la boucle interne qui est appelée insertion dans la structure du pré-40S (Ameismeier et al., 2018). La visualisation de la structure de pré-40S humaine a également apporté des informations additionnelles concernant l'implication de la partie C-terminale de Nob1 dans sa reconnaissance avec Pno1 mais aussi avec le pré-ARNr. D'ailleurs des résidus directement impliqués dans la formation du complexe ont été identifiés dont notamment le tryptophane 208 (W208) localisé dans le motif conservé de la partie C-terminale de la boucle interne (ou insertion). Nous avons montré que l'acide aminé W208 était un résidu critique pour la stabilité du complexe formé par Nob1 et son partenaire Pno1. La mutation de la position équivalente ( $\gamma$ Nob1<sup>W223A</sup>) chez la levure confirme également ces résultats. Finalement, des études de cartographies sur le complexe Nob1/Pno1 chez *Chaetomium thermophilum* renforcent ces résultats (Sturm et al., 2017). Les résidus additionnels identifiés dans l'architecture du pré-40S chez l'homme sont donc des interactions secondaires adoptées par le complexe Nob1/Pno1 dues probablement à des contraintes spatiales pour éviter les encombrements stériques et/ou impliquées dans la régulation du positionnement du complexe Nob1/Pno1 par rapport au site de coupure sur le pré-ARNr.

D'après cette structure, la reconnaissance de Pno1 par Nob1 se fait principalement sur son domaine KH-like, ce que nous avons également montré par des expériences biochimiques. Nos études nous ont aussi permis de former un complexe stable avec seulement la boucle interne et le domaine KH-like de Pno1 (cf tableau 1 résultats). Si des études effectuées avec les protéines homologues de la levure ont montré que la boucle non conservée contenant le motif NWST dans le domaine KH-like était critique pour la formation du complexe Nob1/Pno1, la mutation

du résidu tryptophane en position 92 du facteur Pno1, qui a aussi été identifiée dans la structure du pré-40S humain, ne supporte pas les mêmes données (Woolls et al., 2011). En effet, la mutation de ce résidu n'altère pas la formation du complexe Nob1/Pno1 suggérant donc que c'est la mutation de la boucle entière qui entraîne la dissociation du complexe. Nous avons également montré que la mutation de l'arginine en position 108 abolit la formation du complexe et ceci est très bien illustré dans la structure du complexe Nob1/Pno1 puisque l'arginine en question fait partie des résidus formant une poche où le tryptophane 208 de Nob1 vient s'insérer (résultats, section I. étude du mode de reconnaissance entre l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1 : *Figure 19*).

Sans pour autant connaître la structure du complexe nous avons réussi à définir le rôle de la boucle interne et les données sont complémentaires et cohérentes avec les informations disponibles concernant la structure du complexe Nob1/Pno1 et les tests d'interaction *in vitro* effectués avec d'autres orthologues (Ameismeier et al., 2018; Sturm et al., 2017; Woolls et al., 2011).

Si la région C-terminale de la boucle de Nob1 est importante pour sa reconnaissance avec Pno1, cette région contient également une séquence RxxLxxI qui est considérée comme une boîte de destruction. Ces régions sont localisées dans de nombreuses protéines tumorigéniques, des protéines de liaison à l'ARN et des protéines régulatrices Sérine-Thréonine (Bashir et al., 2004). Comme Nob1 est un biomarqueur dans certains types de cancer, la boucle pourrait alors être importante pour l'effet oncogénique de l'endonucléase.

## 2. Orientation des études structurales vers un complexe ARN/protéine

L'architecture du pré-40S chez l'homme a donc permis de visualiser la reconnaissance entre le complexe Nob/Pno1. Cependant, comment Nob1 est-elle activée ou comment celle-ci reconnaît son ARN substrat reste méconnu. Par conséquent, nous avons décidé d'orienter nos études structurales vers un modèle ARN/protéine. Les études que nous avons souhaité entreprendre pourraient apporter des informations permettant de mieux comprendre la maturation de l'ARNr 18S mais aussi pour étudier la reconnaissance entre un domaine PIN et un ARN. En effet, à notre connaissance aucune structure d'un complexe ARN/domaine PIN n'a été rapportée.

Ceci rend donc cette étude plus intéressante et pour cela, nous nous sommes focalisés sur le domaine catalytique de Nob1 qui a été testé en co-cristallisation avec une séquence d'ARN simple brin qui correspondait au site D (site 3 chez l'homme). Nous avons utilisé un ARN modifié afin de bloquer la réaction de coupure par Nob1 et ainsi essayer de bloquer les complexes dans une conformation homogène. Malheureusement, des difficultés ont été rencontrées pendant la formation du complexe ARN/protéine qui aboutissait à des précipités non réversibles. Par conséquent, des optimisations pourraient être développées afin de mieux déterminer les conditions optimales pour la formation d'un complexe ARN/protéine stable. En effet, des méthodes de caractérisation biophysique comme la SPR (surface plasmon resonance), le BLI (Bio-layer interferometry) ou encore l'ITC (Iso-thermal calorimetry) qui sont des techniques pour mesurer des interactions entre des macromolécules, auraient pu nous aider à mieux estimer l'affinité de l'endonucléase Nob1 pour son substrat et ainsi avoir des informations pertinentes sur le comportement du complexe. Malheureusement cet aspect n'a pas été abordé faute de temps. Pour déterminer la constante d'affinité entre l'endonucléase et son substrat, nous avons effectué des essais de retard sur gel (EMSA pour electrophoretic mobility shift assay) en utilisant des ARN de longueurs différentes afin d'améliorer l'hydrophilicité. Les résultats n'ont pas été concluants puisque les expériences de retard sur gel ont été effectuées avec de l'ARN non marqué et la coloration au bleu de toluidine n'est pas très sensible pour observer un retard de migration indiquant la formation de complexe.

Cet aspect aurait donc pu être exploité. Cependant, dans notre étude nous avons choisi de procéder à une autre alternative que l'on appelle méthode de « soaking ». Pour ce faire nous nous sommes focalisés sur des tests de cristallisation du domaine PIN en utilisant des constructions « super optimisées » de Nob1 qui sont les fragments : 1-255  $\Delta$  (115-202) ou encore 1-314  $\Delta$  (115-202). Ces derniers correspondent principalement aux domaines structurés de l'endonucléase. Malheureusement les meilleurs résultats obtenus jusqu'à présent sont des sphérulites qui ne sont pas exploitables pour la diffraction. De même pour la construction équivalente chez *E. cuniculi* (1-125) où après optimisation le meilleur résultat obtenu était de multiples très fines aiguilles qui n'ont pas pu être optimisées.

Dans mon cas, le fait de tester plusieurs choses en même temps pourrait être un facteur limitant pour les études structurales. En effet j'aurais dû me focaliser sur une construction, mieux étudier son comportement puis travailler directement avec des protéines homologues d'autres organismes, ce qui aurait probablement favorisé l'obtention de cristaux. Nos données indiquent également que les constructions humaines ne semblent pas être les meilleurs outils à utiliser

pour les tests de cristallisation. D'ailleurs de nouvelles méthodes ont été développées pour favoriser la cristallisation de telles protéines. L'utilisation des nanobodies aurait pu être une option à considérer. Cette méthode s'avère être prometteuse pour induire la cristallisation de protéines dites « difficiles » et des structures résolues par cette approche sont déjà disponibles (Desmyter et al., 2015; Durand et al., 2015; Ereño-Orbea et al., 2018). Pour la méthode de cristallisation induite, le coût important que cela représente nous limite dans les approches à effectuer. Nous avons aussi essayé d'ajouter des étiquettes (la protéine GST) qui peuvent servir de chaperonnes favorisant la cristallisation, mais sans succès.

### 3. Le complexe Cinap/Pno1

Nous avons également essayé de cristalliser le complexe Cinap/Pno1 qui est un nouveau complexe pas encore rapporté dans la littérature. Ce complexe peut être reconstitué en utilisant les protéines homologues de la levure ou encore de *E. cuniculi* et les bases moléculaires de sa formation peuvent donc être intéressantes à étudier. De plus, l'existence de cette interaction est pertinente dans le contexte de la maturation puisque les données du groupe Hurt ont montré qu'il existait une reconnaissance entre le facteur Krr1 et Cinap (Sturm et al., 2017). Dans le cadre de la maturation, Krr1 se positionne au niveau du futur site de localisation de Pno1 lors de la transition vers la particule pré-40S ce qui implique l'existence d'un échange entre les deux protéines Krr1 et Pno1, échange qui pourrait potentiellement dépendre de la protéine Cinap (Sturm et al., 2017). Dans ce cas de figure, nos données peuvent être cohérentes. En effet, Cinap est le partenaire de RPS14 et dépose celle-ci sur le pré-ribosome. Spatialement, Cinap sera localisée aux alentours de la plateforme, site de liaison de la protéine RPS14. Nous avons donc essayé de cristalliser le complexe Cinap/Pno1 mais nos conditions ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats intéressants. Néanmoins, ces études peuvent être exploitées plus profondément puisque dans mon cas je n'ai pas pris en compte les caractéristiques fonctionnelles de Cinap. En effet, celle-ci appartient à la famille des adénylates kinases et elle a également une fonction ATPase, il aurait donc pu être intéressant d'ajouter soit de l'ATP ou encore de l'ADP dans notre échantillon pour peut-être pouvoir obtenir des résultats plus prometteurs. Dans l'étude rapportant la cristallisation du complexe Cinap/RPS14 ou de la protéine seule, les auteurs ont rajouté ces éléments dans leur préparation (Drakou et al., 2012; Loc'h et al., 2014). Il se pourrait que l'ajout du substrat favorise la formation de cristaux. Cette partie nécessite donc une meilleure optimisation des conditions de cristallisation.

## II. Compréhension de la maturation de l'ARNr 18S

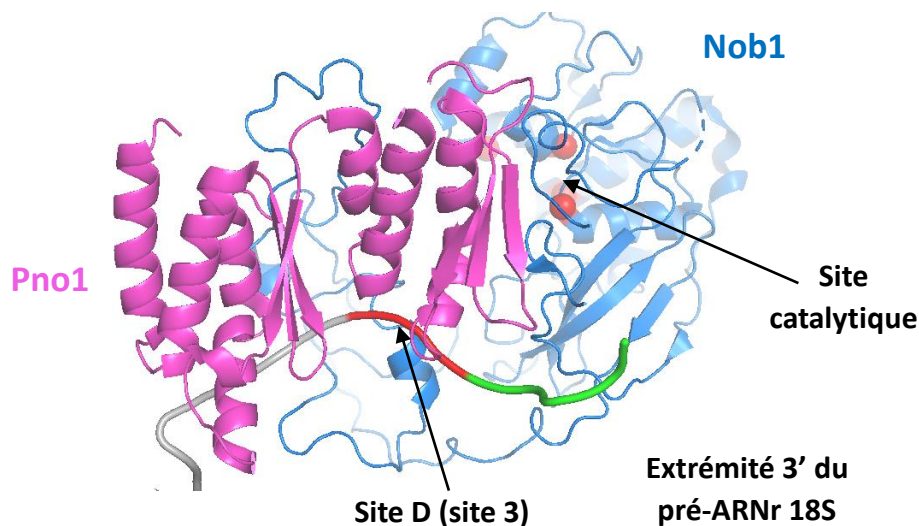
### 1. Rôle de Pno1 dans la régulation de la coupure par Nob1

Nous ne nous sommes pas seulement focalisés sur l'aspect structural puisque la cartographie des interactions entre Nob1 et Pno1 nous a permis d'identifier des résidus intéressants pour des études fonctionnelles. Nous avons aussi testé l'influence de la présence de Pno1 sur l'activité nucléase de Nob1 chez l'homme et chez la levure. Nos conditions pour les tests d'activité de Nob1 avec les protéines humaines ne nous ont malheureusement pas permis de mesurer une coupure par l'enzyme. En effet, pour nos études de coupure, nous avons utilisé une construction de Nob1 tronquée qui correspond au fragment 1-314. L'absence de clivage après les tests d'activité effectués avec la construction hNob1 (1-314) nous ont donc fait suspecter que la partie C-terminale de Nob1 pouvait être nécessaire pour sa fonction endonucléolytique. Des résidus dans la partie C-terminale de Nob1 sont directement impliqués dans une interaction avec l'ARN. Par conséquent, cette reconnaissance pourrait s'avérer être utile pour la coupure du site D (site 3 chez l'homme) (Ameismeier et al., 2018). Nous avons alors essayé nos tests de digestion avec la protéine sauvage (1-412) bien que celle-ci soit sujette à de la dégradation. Nous n'avons pas réussi à mesurer l'activité nucléase de notre protéine d'intérêt. Contrairement à Nob1 de la levure, la protéine orthologue humaine ne semble pas avoir d'activité endonucléolytique indépendamment du pré-ribosome ou du moins, si elle existe, nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis de la reproduire *in vitro*.

Par conséquent, nous avons eu recours à la protéine Nob1 de la levure. L'avantage de la protéine homologue de la levure est que celle-ci possède une activité nucléase indépendante du contexte du pré-ribosome et donc mesurable *in vitro* (Lebaron et al., 2012). Nous avons ainsi confirmé que le dernier résidu formant le site catalytique correspondait bien à l'acide aminé D271 Aspartate en position 271 chez la levure et non le résidu D110 (respectivement D238 et S101 chez l'homme) comme l'avaient indiqué les études de maturation *in vivo* effectuées par le groupe de Tollervey (Fatica et al., 2004). Ceci explique donc pourquoi la mutation du résidu D110 chez la levure n'affectait pas la maturation de l'ARNr 18S (Fatica et al., 2004). Nos études fonctionnelles nous ont également permis de mieux comprendre le rôle de Pno1 dans sa régulation de l'activité endonucléolytique. En effet, nous avons montré que Pno1 est toujours capable d'inhiber l'activité endonucléolytique de Nob1, même si nous utilisons une protéine

Nob1 incapable de reconnaître Pno1 (le mutant W223A chez la levure ou W208A chez l'homme). Notre hypothèse est que Pno1 entre en compétition avec Nob1 pour son interaction avec l'ARN.

Une fois de plus, ce phénomène est très bien illustré par l'architecture de la particule pré-40S. En effet, Pno1 est capable d'interagir avec une région de l'ARNr 18S qui chevauche la séquence correspondant au site D (site 3 chez l'homme) (Figure 42). Cette interaction entre Pno1 et l'ARNr 18S empêche donc Nob1 de reconnaître son site de coupure mais l'oblige aussi à adopter une conformation inactive où le domaine catalytique se retrouve loin du site D (Ameismeier et al., 2018).



**Figure 42 : L'endonulase Nob1 adopte une conformation inactive dans la particule pré-40S tardive humaine (PDB ID : 6G18, d'après Ameismeier et al., 2018).** Organisation du complexe Nob1/Pno1 au niveau de l'extrémité 3' du pré-ARNr. Le partenaire Pno1 (rose) interagit avec le pré-ARNr et masque le site de clivage de Nob1 « site D » (ou site 3 en rouge). L'endonulase Nob1 (bleu) est bloquée dans une conformation inactive puisque son actif (sphère rouge) est localisé loin de son substrat.

Les données fonctionnelles sont par conséquent complémentaires avec les observations structurales et il est important de noter qu'avec un simple modèle *in vitro* nous pouvons reproduire le même phénomène observé en dehors de la particule pré-ribosomique. Par ailleurs, cette proposition de régulation de l'activité de Nob1 par Pno1 pourrait être spécifique à certains organismes eucaryotes puisque des études ont montré que, chez *Trypanosoma brucei*, un

parasite responsable de la maladie du sommeil, Pno1 était nécessaire pour assurer la spécificité de la coupure par Nob1 et que la maturation de l'ARNr 18S est favorisée par la présence de son partenaire Pno1, ce qui n'est pas le cas chez la levure (Kala et al., 2017).

## 2. Pno1 impliquée dans la régulation de l'activité endonucléolytique de Nob1 mais aussi dans son recrutement au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S

Si, dans nos études, nous nous sommes surtout focalisés sur le domaine catalytique de Nob1, le domaine doigt de Zinc (Zinc ribbon) a également son importance. En effet, les études d'interaction effectuées chez *P. horikoshii* a montré que le Zinc ribbon interagit avec l'hélice 40 de l'ARNr 18S (Veith et al., 2012). Chez la levure, il a été suggéré que l'hélice 40 servait de point d'ancrage à Nob1 tandis que son association à l'extrémité 3' de l'ARNr n'est que transitoire pour assurer la coupure du site D (Granneman et al., 2010). Récemment, Sloan et al ont confirmé que cette reconnaissance est aussi conservée chez l'homme. En effet, la perturbation du domaine Zinc ribbon abolit son interaction avec le pré-ARNr 18S. En combinant ces données avec nos données fonctionnelles, ces informations indiquent que le domaine catalytique de Nob1 est nécessaire pour la formation de l'ARN 18S mature et que son domaine Zinc ribbon est, quant à lui, nécessaire pour son association au pré-ribosome (Sloan et al., 2019).

Pno1 est recruté très tôt dans le pré-ribosome, ce facteur est associé à la particule précoce 90S tandis que Nob1 n'intervient que dans le nucléoplasme qui est caractérisé par la transition du 90S vers la particule pré-40S. On peut alors suggérer sur la base de ces observations que le recrutement de Nob1 dans la particule pré-ribosomique nécessite le déplacement de Pno1 au niveau de la plateforme. Dans un premier temps le facteur Pno1 se retrouve associé aux modules UTP qui vont replier le domaine central et l'extrémité 5' de l'ARNr 18S puis dans un second temps, elle va se déplacer vers la plateforme proche de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S. Les études structurales ont montré que la transition 90S vers la particule 40S consiste principalement en la maturation de deux domaines cités précédemment et au commencement du repliement de la région 3'. Le fait que cette région ne soit pas encore maturée peut donc favoriser le recrutement de Nob1 par l'hélice 40 au niveau du pré-ribosome puis sa

reconnaissance par Pno1 pourrait lui permettre de se retrouver proche de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S.

### 3. Proposition d'un modèle de maturation

Nous avons enfin essayé d'identifier des facteurs impliqués dans la maturation finale de l'ARNr 18S, c'est-à-dire dans la régulation de la coupure induite par Nob1. Dans la littérature, Nob1 est activé dans une conformation pseudo 80S qui est formée suite à une première interaction des deux SU (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012). Parmi les AFs tardifs, on peut retrouver la kinase Rio1 qui est impliquée dans la maturation de l'ARNr 18S. Nos tests d'interaction entre Rio1 et Pno1 nous ont indiqué qu'il n'y a pas de lien direct entre ces deux protéines puisque nous n'avons pas observé de reconnaissance, au moins indépendamment du pré-40S. Récemment, des données d'interaction ont montré que la kinase Rio1 est capable de reconnaître le complexe Nob1/Pno1 mais pas les protéines seules (Parker et al., 2019). Ces résultats sont donc cohérents avec nos résultats de co-expression de Pno1 avec Rio1. Les auteurs ont également indiqué que Rio1 était impliquée dans la dissociation du complexe Nob1/Pno1 permettant ainsi d'assurer la formation d'une SU compétente pour la traduction. On pourrait alors suspecter que la reconnaissance par Rio1 favoriserait une conformation où l'interaction de Pno1 avec l'ARN 18S serait déstabilisée entraînant donc l'activation de Nob1 et par conséquent la coupure au site D. D'ailleurs des études ont déjà montré l'implication de Rio1 dans la maturation de l'ARN 18S, supportant le fait que la particule pré-40S compétente pour la coupure est associée aux facteurs Rio1, Pno1 et Nob1 (Turowski et al., 2014).

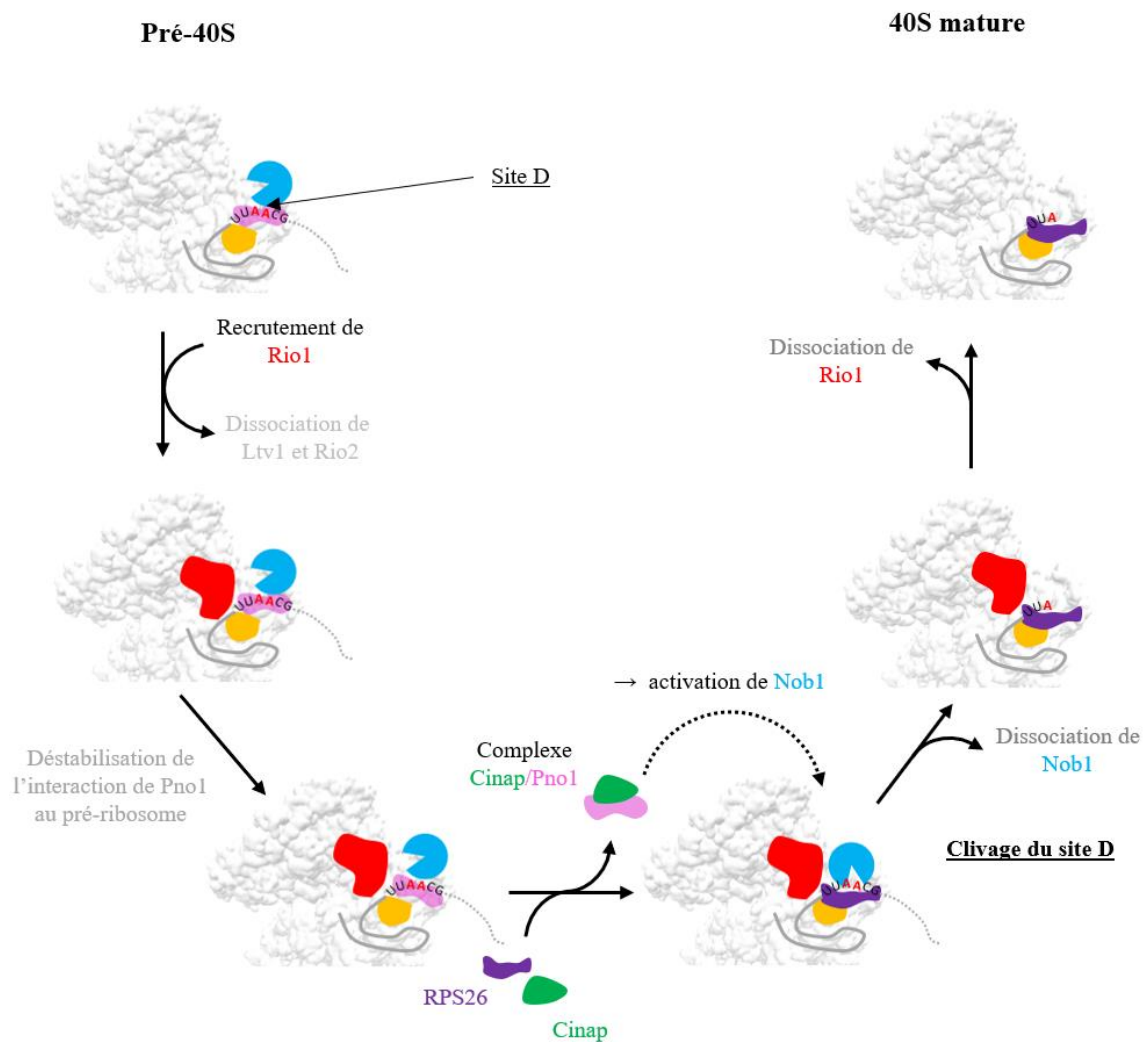
D'un point de vue structural, on peut principalement observer deux états conformationnels du pré-40S : une particule associée au complexe Nob1/Pno1 et une autre où l'on peut observer la kinase Rio1 et RPS26. On ne peut donc pas exclure l'implication de Rio1 dans le recrutement de RPS26. D'une part si Pno1 est associée au pré-40S, sa présence bloque l'activité de Nob1 et lorsque les deux protéines sont absentes l'extrémité 3' mature est générée. La transition entre les deux états pourrait être assurée par Cinap (Fap7) (Bai et al., 2016). Nous avons d'ailleurs étudié la reconnaissance de Cinap avec le complexe Nob1/Pno1. Celle-ci peut reconnaître Pno1 et aussi Nob1 de manière indépendante et nos données nous ont aussi fait suspecter que le partenaire Pno1 est impliqué dans la régulation de l'interaction entre Cinap et Nob1. Cette régulation pourrait impliquer l'activité ATPase de Cinap ce qui serait cohérent avec le modèle

de coupure proposé par Bai et ses collègues. De même, nous avons également montré l'existence d'un complexe RPS14/Cinap/RPS26 chez l'homme qui a déjà été observé chez la levure où les auteurs ont indiqué que le recrutement de RPS26 est dépendant du complexe Cinap/RPS14 (Peña et al., 2016). Nos études nous ont permis de montrer que Cinap pouvait médier différentes interactions protéiques et ceci suggère fortement que Cinap pourrait effectuer le lien entre la transition pré-40S associée au complexe Pno1/Nob1 et pré-40S associé à Rio1. Ces données pourraient donc éclaircir le mécanisme de maturation même si des liens entre les différentes étapes restent encore à démontrer.

Par conséquent, on pourrait proposer le mécanisme de maturation de l'ARNr 18S suivant : dans un premier temps, Nob1 adopte une conformation inactive bloquée par Pno1. L'arrivée de la kinase Rio1 entraîne la dissociation des facteurs Ltv1 et Rio2, ce phénomène entraîne un réarrangement structural qui va destabiliser l'interaction de Pno1 avec l'ARN, permettant ainsi le chargement de RPS26 au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S qui est dépendant de Cinap et RPS14. On aurait donc un échange RPS26/Cinap en Pno1/Cinap. Dans ce cas de figure, Pno1 pourrait réguler la fonction ATPase de Cinap ce qui lui permettrait de reconnaître Nob1 induisant un changement de conformation et donc l'activation de sa fonction endonucléolytique pour assurer la coupure du site D et finalement la maturation de l'ARNr 18S (*Figure 43*).

Néanmoins, le modèle proposé reste à valider puisque si des interactions directes entre Cinap et Nob1 ont été rapportées dans la littérature, nos expériences de pull down ou de co-expression ne sont pas très concluantes. En effet, si on observe une interaction entre Nob1 et Cinap en co-expression, ces mêmes résultats ne sont pas observés dans les tests de pull down. Nous n'avons pas non plus réussi à étudier la relation entre l'ensemble de ces différentes protéines (Nob1, Pno1, Cinap, RPS14 et RPS26).

La principale difficulté vient du fait que les RPs sont connues pour avoir besoin d'un partenaire comme leur chaperonne pour stabiliser leur expression. C'est effectivement le cas de la protéine RPS14 qui se comporte mieux lorsqu'elle est co-exprimée avec Cinap. Cependant, le modèle proposé nécessite d'avoir les protéines seules pour effectuer les contrôles. Ces derniers sont importants pour voir si les protéines RPS26 ou RPS14 peuvent déplacer Pno1 de l'ARNr dans des expériences de retard sur gel. On peut aussi penser que l'ajout de ces facteurs dans les tests d'activités endonucléolytiques pourrait nous apporter des informations plus pertinentes concernant l'activité de Nob1, ce qui *in fine*, pourraient soutenir ou infirmer le modèle de maturation proposé.



**Figure 43 : Proposition d'un modèle de la maturation de l'ARNr 18S : activation de l'endonucléase Nob1.** Les protéines Nob1 (bleu), Pno1 (rose) et RPS14 (orange). L'endonucléase adopte une conformation « inactive ». L'arrivée de la kinase Rio1 (rouge) entraîne le départ des AFs : Ltv1 et Rio2, le recrutement de Rio1 déstabilise l'interaction de Pno1 au pré-ribosome qui permet le recrutement de Rps26 (violet) dépendant de Cinap (Vert) qui va l'échanger avec Pno1. Le complexe formé (Cinap/Pno1) induit un changement de conformation de Nob1 entraînant son activation et par conséquent le clivage du site D.

### III. Conclusions et perspectives

Chez les procaryotes, la maturation du ribosome semble déterminée et conduite par les propriétés intrinsèques des ARNr ainsi que des RPs et suit une chaîne de montage bien établie. Par contre chez les eucaryotes, ce processus est plus complexe et plus ou moins bien caractérisé. Mon projet de thèse s'est focalisé sur la maturation tardive de la petite SU 40S pour essayer de mieux comprendre comment l'endonucléase Nob1 était activée pour assurer la coupure de l'extrémité 3' du précurseur de l'ARNr 18S au niveau du site D, aboutissant ainsi à la formation de l'ARNr 18S mature. Cette étape fait partie des derniers événements de la maturation de la petite SU.

Ces études nous ont donc permis de montrer que le domaine catalytique de Nob1 adoptait une conformation atypique : deux fragments séparés par une large boucle interne qui est importante pour son recrutement/interaction avec son partenaire la protéine Pno1. Sur la base de nos études fonctionnelles, la protéine Pno1 peut donc fonctionner comme une chaperonne qui réprime l'activité de Nob1 jusqu'au moment où la coupure de l'extrémité 3' doit se produire. Pour que Nob1 puisse assurer sa fonction, il a donc été proposé que Pno1 se dissociait du pré-ribosome ce qui impliquait la participation d'autres facteurs. Nous avons essayé de montrer que la protéine Cinap assure le lien entre les échanges qui s'effectuent lors des dernières étapes de la maturation et favorise la transition vers la particule 40S mature. Bien que nous n'ayons pas pu étudier le mécanisme d'échange sur l'ensemble des protéines localisées au niveau de la plateforme, nos données suggèrent fortement que la protéine Cinap est impliquée dans le recrutement de RPS26, la dissociation de Pno1 et l'activation de Nob1. Ces résultats sont tout à fait complémentaires et supportent donc le modèle très dynamique de l'assemblage du ribosome où le recrutement séquentiel, l'activation et la dissociation de nombreux facteurs permettent la maturation précise et efficace de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S. Pour déchiffrer la chaîne de montage du ribosome eucaryote, la combinaison des études fonctionnelles et des approches structurales seront donc des avantages pour mieux comprendre les maladies associées aux ribosomes.



# MATERIELS & METHODES



# I. Générations des clones pour le projet

Les plasmides contenant les protéines sauvages ont été déjà disponibles au laboratoire, ceux-ci ont été utilisés comme matrice pour générer les autres constructions testées dans ce projet.

## 1. Amplification des gènes d'intérêts

### a) La méthode PCR (pour Polymerization chain reaction)

Pour un volume final de 50  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel : dans un tube PCR, une quantité de 50 ng de matrice est ajoutée au mélange contenant 0.5  $\mu\text{L}$  d'oligonucléotide 5' (stock 100 pmol/ $\mu\text{L}$  Eurofin genomics), 0.5  $\mu\text{L}$  d'oligonucléotide 3' (stock 100 pmol/ $\mu\text{L}$  Eurofin genomics), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (stock 10 mM) et 10  $\mu\text{L}$  de tampon GC green (stock 5x thermofisher). Un volume de 0.25  $\mu\text{L}$  de polymérase à ADN (Phusion) est ajouté à la réaction (2000 U/mL New England Biolab). Enfin, le volume total est ajusté avec de l'eau (qsp 50  $\mu\text{L}$ ).

### b) Conditions PCR

Une première dénaturation à 98°C pendant 5 min est effectuée qui est suivie par un premier cycle avec une dénaturation (1 min à 98°C). Cette étape est suivie d'une hybridation pendant 30 sec avec un gradient de température (de 40 à 60 °C). L'élongation se fait à 72 °C, le temps d'élongation nécessaire est ajusté en fonction de la taille du fragment à amplifier en général entre 1 à 2 min (activité de la polymérase Phusion 500 pnb pour 30 sec). Le cycle est répété 25 fois puis la réaction est maintenue à 72°C pendant 10 min et enfin à 20°C (Figure 44).

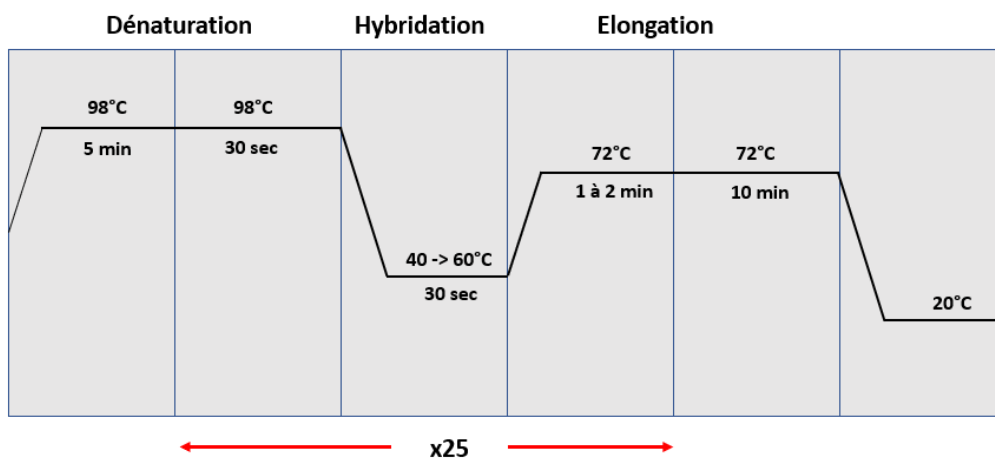


Figure 44 : Les étapes de la réaction PCR

Les fragments amplifiés sont ensuite analysés sur gel d'agarose 1x en présence de BET (2.5 µL pour 50 mL) La migration se fait pendant 20 min à 230V dans le tampon TBE 0.5x. Les bandes sont ensuite révélées sous UV. Les réactions positives sont de nouveau chargées sur gel d'agarose 1x en présence de Sybr Green (5 µL pour 50 mL) avec les mêmes paramètres de migration cités auparavant puis les bandes d'intérêts sont coupées puis purifiées utilisant un kit d'extraction commercial (Qia prep Gel extraction Qiagen). Enfin, la concentration La concentration de l'amplicon est déterminée en mesurant l'absorbance  $A_{260}$  avec un spectrophotomètre Denovix DS-11+.

## 2. Linéarisation des vecteurs pour le clonage

Pour le projet on utilise principalement les vecteurs suivants :

- pET-MCN-His,
- pET-MCN-His-GST
- pET-MCN-kan,
- pCDF-MCN
- pST31-GST-His

Les vecteurs utilisés pour ce projet sont des vecteurs dérivés du plasmide pET-28a (Romier et al., 2006) à l'exception du vecteur pST31-GST-His qui est un vecteur dérivé du plasmide pET-15b. Les cartes de chaque vecteur sont représentées dans la section ANNEXES (*Figure 49 & 50*).

### *a) Digestion à la française*

Pour chaque vecteur, le mélange réactionnel suivant est préparé :

Dans un tube eppendorf 1.5 mL une quantité d'ADN d'environ 2 µg est resuspendue dans un volume de 5 µL de tampon Cutsmart 10x (New england biolabs). Le volume est ensuite ajusté à 45 µL avec de l'eau. Sur glace, trois tubes annotés A, B, et C contiennent respectivement un volume de 2.25 µL de l'enzyme 1 ; 2.25 µL de l'enzyme 2 et enfin 0.5 µL d'eau. Le mélange initial contenant le vecteur à linéariser est ensuite dispatcher dans les trois tubes annotés précédemment (A : 20.25 µL, B : 20.25 µL et C : 4.5 µL). Sur glace, on prépare de nouveau

trois tubes annotés : CD<sub>1</sub> (pour contrôle de la digestion 1), CD<sub>2</sub> (pour contrôle de la digestion 2) et DD (pour la double digestion).

Dans le tube CD<sub>1</sub> on mélange 2.5µL de la réaction A avec 2.5 µL de la réaction C, les mêmes volumes sont ajoutés dans le tube CD<sub>2</sub> mais cette fois ci avec les réactions B et C. Enfin les restes de volumes des réactions A et B sont mélangés dans le tube DD. La digestion enzymatique est effectuée à 37°C pendant 2h suivi d'une migration sur gel d'agarose 1x qui permet de vérifier la digestion (*Figure 45*).

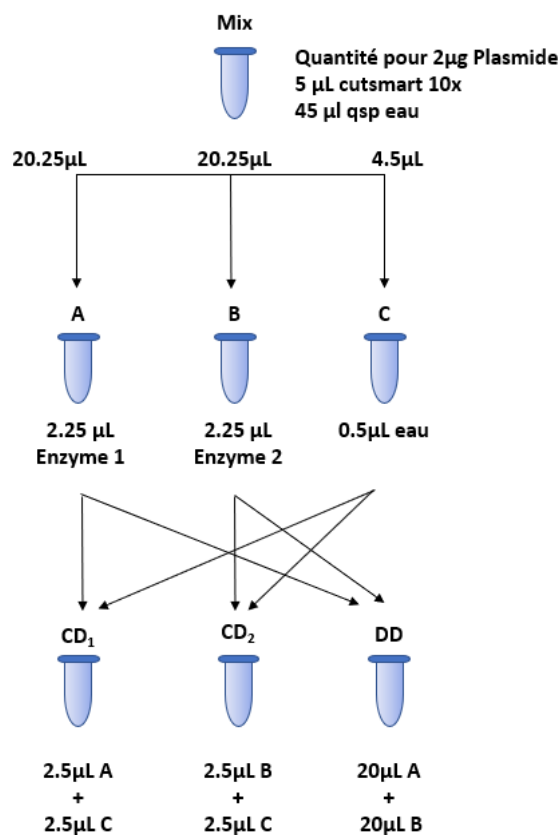


Figure 45 : Digestion à la française

### b) Déphosphorylation de l'extrémité 5' et 3' phosphate

Les vecteurs linéarisés sont ensuite traités à la phosphatase rSAP. Un volume de 1µL (stock 500 U new england biolabs) de phosphatase est ajouté à la réaction de double digestion (DD), le mélange est de nouveau incubé à 37°C pendant 1h puis l'échantillon est migré sur gel d'agarose 1x en présence de syBR GREEN. Le fragment correspondant au vecteur linéarisé est

ensuite extrait et purifié en utilisant les colonnes Qiagen selon le protocole fournis dans le kit commercial (Qiaprep gel extraction). La quantité d'ADN obtenue est mesurée au spectrophotomètre Denovix DS-11+

Le clonage des fragments de protéines est fait la méthode SLIC.

### 3. Clonage SLIC (Sequence and Ligation Independent Cloning)

Cette méthode est basée sur l'utilisation de l'activité exonucléolytique ( $3' \rightarrow 5'$ ) de l'ADN polymérase T4 qui va générer des extrémités simples brins flanquants dans le vecteur d'expression et l'insert. Par complémentarité des séquences simples brins, les deux fragments linéarisés vont s'apparier et le tout sera réparé par une transformation chez la bactérie *E. coli*. Pour notre réaction de clonage, nous avons travaillé avec le ratio (1:3) qui correspond à une quantité de vecteur pour trois quantités d'insert.

Pour une réaction de 10  $\mu$ L on procède au mélange suivant : 1  $\mu$ L de BSA (stock 10mg/ml), 1  $\mu$ L de tampon NEB 2 (stock 10x New England Biolab), une quantité pour 100 ng de vecteur, une quantité pour 300 ng d'insert, 0.5  $\mu$ L d'enzyme T4 DNA polymerase (new england biolabs stock 3000 U/ml), qsp pour 10  $\mu$ L d'eau.

La réaction est ensuite incubée à température ambiante pendant 10 min puis une transformation chimiocompétente est effectuée :

### 4. Transformation chimiocompétente

Un volume de 5  $\mu$ L de la réaction de clonage est transformé dans 50  $\mu$ L de bactéries compétentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . Le mélange est incubé sur glace pendant 30 min puis un choc thermique de 45 sec à 42°C permet perméabiliser les membranes bactériennes. Le mélange est de nouveau incubé sur glace pendant 5 min puis un volume de 300  $\mu$ L de milieu 2yt est ajouté. Les bactéries sont ensuite incubées à 37°C sous agitation pendant 1h et étalées sur boîte de pétri contenant les antibiotiques correspondants. Celles-ci sont enfin incubées sur la nuit à 37°C.

## 5. Vérification de la présence de colonies positives

### *a) PCR colonie*

Les colonies issues de la transformation sont vérifiées par la méthode de PCR colonie qui peut s'organiser comme suit :

En générale, on teste 4 à 5 colonies et chaque colonie est inoculée dans 50  $\mu\text{L}$  de milieu 2yt puis incubée pendant 2 h à 37°C. On prépare ensuite le mélange appelé « master mix » de 50  $\mu\text{L}$  contenant 0.5  $\mu\text{L}$  primer 5' (stock 100 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  primer 3' (stock 100 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  dNTP (stock 10 mM), 0.25  $\mu\text{L}$  Phusion polymerase New England biolab (2000 U/ml), 10  $\mu\text{L}$  GC green Buffer thermofisher (stock 5x) and qsp d'eau.

Dans des tubes PCR, on ajoute 0.6  $\mu\text{L}$  qui a été prélevé de chaque la culture incubée à 37°C puis 9.6  $\mu\text{L}$  du mix commun. On procède ensuite à la réaction comme précédemment mais pour l'hybridation on se met à une température constante qui est de 50°C. Les fragments PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose 1x en présence de BET et les colonies qui présentent le fragment d'intérêt sont inoculées dans un volume de 5mL de milieu 2yt puis la culture est incubée sur la nuit à 37°C.

### *b) Extraction du plasmide*

Les cultures sont centrifugées à 20°C pendant 10 min puis le culot est récupéré. L'ADN plasmidique contenant le gène d'intérêt est extrait à partir de la biomasse bactérienne en utilisant un kit commercial (kit miniprep Qiagen). La concentration du plasmide d'intérêt est ensuite mesurée avec le dénovix.

### *c) Double digestion enzymatique*

Une double digestion enzymatique NdeI/BamHI (New england biolabs) est effectuée selon le protocole suivant :

pour 10  $\mu\text{l}$  on ajout 5  $\mu\text{L}$  d'ADN plasmidique (150-200 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de tampon cutsmart 10, 0.5  $\mu\text{L}$  de chaque enzyme de restriction (20000U/ml) , et 3  $\mu\text{L}$  d'eau. La réaction est ensuite incubée à 37°C pendant 1h puis on rajoute 2  $\mu\text{L}$  de tampon de charge (6x DNA loading dye thermofisher). L'échantillon est ensuite chargé sur gel d'agarose 1x en présence de BET. La migration se fait pendant 20 min à 230V puis les fragments sont révélés sous UV.

Les plasmides contenant le fragment d'intérêt sont ensuite envoyés à séquencer puis gardés à -20°C pour les tests d'expression.

## II. Production et purification des protéines et/ou complexes

### 1. Transformation électrocompétente

Pour l'expression des protéines, on utilise des bactéries électrocompétentes *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2. Une quantité de 100 ng de plasmide d'intérêt est transformée dans un aliquote de 50 µL de cellules compétentes, le tout est transvasé dans une cuve d'électroporation. On procède ensuite à la perméabilisation de la membrane plasmique par électroporation (Biorad MicroPulser™). Cette étape est effectuée en appliquant un pulse qui correspond à un champ électrique de 1700V. Les bactéries sont resuspendues dans un volume de 300 µL de milieu 2yt puis incubé à 37°C sous agitation pendant 1h avant l'étalement sur boîte de Pétri. Les boîtes sont enfin incubées à 37°C sur la nuit.

### 2. Test d'expression et de solubilité

#### a) *Production et expression protéique*

Le tapis bactérien est resuspendu avec 2mL de milieu TB puis 200 µL est inoculé dans 20 mL de milieu contenant les antibiotiques correspondants. Les cellules sont incubées à 37 °C jusqu'à ce la densité optique OD<sub>600</sub> atteigne environ 1.5. Les bactéries sont ensuite transférées à 15 °C et l'expression protéique se fait par induction avec 0.1 mM d'IPTG (Stock 1M) sur la nuit. Les cultures bactériennes sont récupérées puis centrifugées à 4000 rpm pendant 10 min.

#### b) *Mini-test*

Le culot bactérien est resuspendu à froid dans un tampon de lyse pH7.5 (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 0.1% (v/v) Triton x100, 5 mM β-mercaptoethanol). La lyse cellulaire est effectuée par sonication pendant 30 sec (puissance 3W). La clarification se fait par centrifugation à 4°C pendant 20 min à 14500 rpm. Ensuite, le surnageant est récupéré et incubé avec 25 µL de la résine de Nickel (Ni-High Select Sigma) à 4°C sous agitation. Après 2h d'incubation, les billes sont centrifugées à 4 °C pour 1 min à 2000 rpm puis lavées quatre fois avec du tampon de lavage pH 7.5 (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300

mM NaCl, 20 mM Imidazole, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). Les protéines sont ensuite éluées avec deux volumes de billes avec du tampon d'éluion pH 7.5 (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol).

### 3. Electrophorèse sur gel SDS PAGE

Un volume de 5  $\mu\text{L}$  de bleu de Laemli (stock 3x) est ajouté dans 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon. L'échantillon est ensuite chargé sur gel SDS PAGE. Le pourcentage de gel utilisé est déterminé en fonction de la taille de la protéine d'intérêt. La migration se fait pendant 45 min à 220 V avec un tampon de migration SDS dans des cuves d'électrophorèse connectés à une générateur PowerPack<sup>TM</sup> (BIORAD). Les bandes protéiques sont révélées par coloration au bleu de Coomassie.

### 4. Production à grande échelle

Une fois que les conditions optimales d'expression sont déterminées, on procède à la production à grande échelle qui consiste à répéter les étapes de transformation bactériennes par électroporation et la production qui cette fois se fera avec un volume plus important de milieu TB (1 à 6 L). Les cultures bactériennes sont ensuite centrifugées pendant 20 min à 4000 rpm (Beckman coulter Avanti J-25) puis le culot est récupéré et gardé à  $-20^\circ\text{C}$  pour la purification à grande échelle.

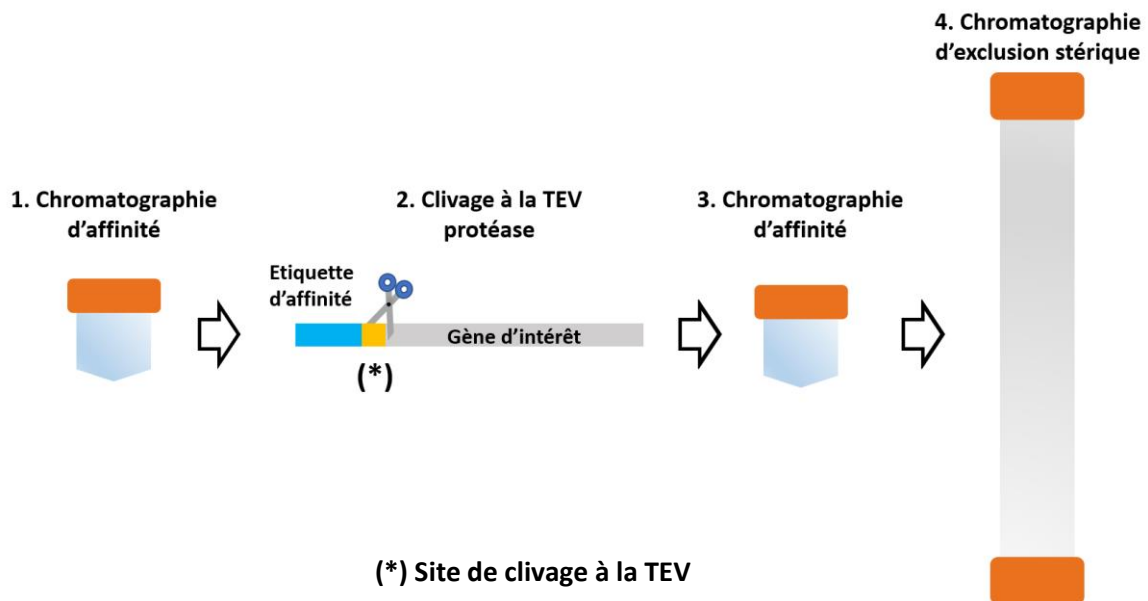
### 5. Purification des protéines recombinants

#### *a) Lyse cellulaire*

Les cellules sont resuspendues dans du tampon de lyse pH 7.5 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 0.1% (v/v) Triton x100, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) en fonction du volume de culture pour la production à grande échelle. Une fois que le mélange est homogène, l'échantillon d'intérêt est passé 3 fois sur l'emulsiflex (2 à 4 Bar, oscillation max 10000 psi). Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 1h à  $4^\circ\text{C}$  pour une vitesse de 30000g. Le surnageant est enfin récupéré et chargé sur une colonne de chromatographie correspondante.

Différentes étapes de chromatographie ont été réalisées afin de purifier la protéine d'intérêt. Elles peuvent s'organiser comme suit : une première chromatographie d'affinité (en fonction de l'étiquette d'affinité portée par le gène d'intérêt soit une double étiquette hexahistidine

(HIS<sub>6</sub>) et GST), une seconde chromatographie d'affinité Nickel suite au clivage à la protéase TEV et enfin une dernière chromatographie d'exclusion stérique (*Figure 46*).



**Figure 46 : Représentation schématique des étapes de purification.** En général l'échantillon protéique est passé sur trois colonnes : 1) une colonne d'affinité qui peut être soit une colonne Ni ou GST, 2) élimination de l'étiquette par une digestion à la protéase TEV, 3) une seconde colonne Ni et 4) une colonne de gel filtration pour un polissage de l'échantillon

## b) Chromatographie d'affinité

### i. Chromatographie d'affinité sur ion métallique immobilisé (IMAC)

La chromatographie d'affinité est basée sur l'adsorption spécifique qui consiste à retenir la protéine d'intérêt par son ligand immobilisé, dans notre cas l'ion Nickel qui va former des interactions avec l'étiquette poly-Histidine. La protéine d'intérêt est ensuite éluée par compétition avec une concentration élevée d'imidazole.

La fraction soluble est chargée sur une colonne His-Trap FF crude 5mL (GE healthcare) qui est connectée à un appareil de purification FPLC, ÄKTA purifier (GE healthcare). La méthode est constituée de trois étapes. Le chargement qui consiste à fixer la protéine de fusion sur la résine. On procède ensuite à plusieurs lavage (20 CV) avec un tampon A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 à 40 mM d'imidazole, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) pour éliminer les

interactions non spécifiques. Enfin, la protéine d'intérêt est éluée avec un volume de 7 CV de tampon B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 250 mM d'imidazole, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol).

Les fractions contenant la protéine ou le complexe d'intérêt est ensuite récupéré et la pureté de l'échantillon est estimée par analyse sur gel SDS PAGE. Les bandes protéiques sont révélées par coloration au bleu de Coomassie.

#### ii. Chromatographie d'affinité à la protéine GST

Dans ce cas de figure nous utilisons l'étiquette GST en N-ter de la protéine de fusion qui va reconnaître son ligand le glutathion attaché à la matrice. L'éluion se fait par ajout de glutathion dans le tampon d'éluion qui permet de décrocher la protéine de fusion puisque l'affinité de la GST pour le glutathion libre est supérieure à celui immobilisé à la matrice.

La fraction soluble est chargée sur une colonne GST Trap 4B (GE healthcare) qui est connectée à un système de purification ÄKTA purifier. Le lavage s'effectue avec un tampon tampon GST pH 8 (50 mM Tris-HCl, 300 Mm NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) et l'éluion se fait avec 20 mM de glutathion réduit (GSH). Les fractions contenant les protéines d'intérêt sont ensuite analysées sur gel SDS PAGE, puis les bandes protéiques révélées par coloration au bleu de Coomassie.

#### c) *Clivage à la TEV*

Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont mélangées puis la concentration de l'échantillon est estimée à l'aide d'un spectrophotomètre Denovix DS-11+ en mesurant l'absorbance à 280 nm. La construction d'intérêt contient un site de reconnaissance à la TEV protéase qui permet donc d'enlever l'étiquette d'affinité. Après les différents tests de clivage la condition optimale était une incubation à 16 °C sur la nuit. La quantité de TEV protéase utilisée correspond au ratio 1:50 (m/m) qui est ajouté au mélange.

#### d) *Affinité inverse : Chromatographie d'affinité Nickel*

Cette étape consiste à séparer l'échantillon dépourvu de l'étiquette d'affinité de la fraction non clivée ainsi que de la TEV protéase qui porte également une étiquette poly-histidine. Comme

la protéine est dépourvue de son étiquette celle-ci ne sera donc pas retenue sur la colonne et se retrouvera dans la fraction « flowthrough ».

L'échantillon d'intérêt est dilué dans du tampon A sans imidazole puis repassé sur une colonne His-Trap FF crude 5mL (GE healthcare) préalablement équilibré avec le tampon A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 à 40 mM d'imidazole, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). Les mêmes conditions de lavage et d'élution que ceux de la première chromatographie d'affinité au Nickel sont utilisées. La fraction correspondant au flowthrough est donc récupérée puis analysé sur gel SDS PAGE puis coloré au bleu de Coomassie pour estimer la pureté de l'échantillon.

La concentration protéique est estimée par son absorbance à 280 nm qui est mesurée au spectrophotomètre Denovix DS-11+.

#### *e) Concentration de la protéine*

La protéine d'intérêt est ensuite concentrée en utilisant les membranes amicon ultraconc (Millipore) avec le seuil d'exclusion stérique correspondant. La concentration se fait par plusieurs cycles de centrifugation à une vitesse de 4000g à 4°C pendant 15 min. Le volume est resuspendu entre les cycles pour éviter la formation de gradient de concentration. Lorsque l'on obtient la concentration protéique voulue, l'échantillon est récupéré puis on peut procéder à la dernière étape de chromatographie.

#### *f) Chromatographie d'exclusion stérique*

Cette méthode appelée également tamisage moléculaire permet de séparer les molécules en fonctions de leur taille et de leur forme ou encombrement. En fonction du poids moléculaire du complexe ou de la protéine d'intérêt, deux types de colonne peuvent être utilisés. La colonne HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg prepgrad (GE Healthcare) a été utilisée pour les complexes natifs ou protéines sauvages tandis que la colonne HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg prepgrad (GE Healthcare) est-elle utilisée pour les formes tronquées.

L'échantillon d'intérêt est chargé sur la colonne correspondante qui a été préalablement équilibré au tampon de gel filtration pH 7.5 (20 mM Hepes, 150 ou 300 mM NaCl, 2 mM TCEP avec ou sans 10% (v/v) de glycérol). La protéine est éluée avec un volume de 120 mL (1 CV) de tampon de gel filtration. Enfin, le pic correspondant à la protéine d'intérêt est récupéré puis analysée et les fractions sont analysées sur gel SDS PAGE suivi d'une coloration au bleu de

Coomassie pour révéler les bandes protéiques. La concentration de la protéine est mesurée au spectrophotomètre Denovix DS-11+.

### III. Test de cristallisation

La cristallisation consiste à amener la solution protéique à un état de supersaturation qui permet donc le changement de phase conduisant à un état solide ordonné. Plusieurs paramètres peuvent influencer le processus de cristallisation comme par exemple la concentration de la protéine, la température, le pH ou encore la concentration et la nature des agents précipitants. Ces paramètres sont déterminés expérimentalement d'où l'utilisation de crible commerciale (cf ANNEXES 4) pour multiplier les chances d'obtenir des conditions dites « prometteuses ».

Les protéines ainsi que les complexes amenés à une concentration suffisante (~10 mg/mL) ont été testés en cristallisation par la méthode de diffusion de vapeur sur goutte assise. Afin de déterminer la concentration favorable à la cristallisation un kit commercial appelé PCT (pre-crystallization test Hampton research) a été utilisé. Les boîtes de cristallisation 96 puits (Greiner Bio-1) ont été préparées comme suit : un volume de 70 µL d'agent cristallisant est déposé dans le dans le réservoir, le puit contient un volume 0.25µL de la solution protéique d'intérêt et 0.25 µL de la même solution du réservoir (*Figure 47*). Ce type de micro volume est dispensé à l'aide d'un robot de cristallisation appelé « mosquito » (TPP Labtech). Les boîtes de cristallisation sont ensuite scellées à l'aide de film transparent, ces dernières sont enfin gardées à 8 et/ou à 20 °C. L'observation des gouttes se fait à l'aide d'une binoculaire puis les conditions où l'on trouve des « Hits » ont été optimisées en tournant autour de la condition de départ (par exemple la variation du pH, de la concentration en précipitant, l'ajout d'additif ...) en utilisant des boîtes de cristallisation 24 puits.

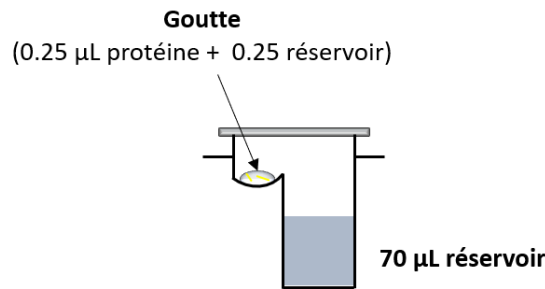


Figure 47 : Méthode de cristallisation par diffusion de vapeur sur goutte assise

## IV. Test fonctionnel

### 1. Expérience de Pull down avec Cinap

Un volume de 25 µL de chaque protéine purifiée est mélangé dans un tube eppendorf, nous avons ensuite ajouté un volume nécessaire de tampon KCl pH 7.4 (50 mM Hepes, 250 mM KCl, 40 mM Imidazole, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton x100, 5 mM β-mercaptoethanol) pour atteindre un volume final de 500 µL. Le mix est incubé sur glace pendant 30 min puis 20µL de résine NiNTA (préalablement équilibré au tampon KCl). Une incubation à 4 °C sous rotation est effectuée pendant 1h. Pour tester l'effet de l'ATP à l'interaction de Cinap avec les autres protéines, Cinap a été brièvement pré-incubé avec 1 mM d'ATP, puis les autres facteurs ont été rajoutés. Après l'incubation à 4°C, l'activation de Cinap se fait par une incubation du mix à 30 °C pendant 30 min. Les billes sont ensuite lavées avec 1 mL de tampon KCl. Le lavage est répété trois fois puis les billes sont éluées avec 250 mM d'imidazole. Les fractions après élution sont finalement analysées sur gel SDS PAGE et les bandes correspondant aux complexes d'intérêts sont révélées par coloration au bleu de Coomassie.

### 2. Test d'activité

Les tests fonctionnels ont été effectués selon le protocole des tests de coupure effectués chez la levure (Lebaron et al., 2012)

# REFERENCES



- Ameismeier, M., Cheng, J., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2018). Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature* 1.
- Anger, A.M., Armache, J.-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* 497, 80–85.
- Arcus, V.L., McKenzie, J.L., Robson, J., and Cook, G.M. (2011). The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin–antitoxin array. *Protein Eng Des Sel* 24, 33–40.
- Bai, D., Zhang, J., Li, T., Hang, R., Liu, Y., Tian, Y., Huang, D., Qu, L., Cao, X., Ji, J., et al. (2016). The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth. *Nat Commun* 7, 12310.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., et al. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 24, 165–169.
- Barandun, J., Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Molloy, K.R., Chait, B.T., and Klinge, S. (2017). The complete structure of the small-subunit processome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 944–953.
- Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S. (2018). Assembly and structure of the SSU processome - a nucleolar precursor of the small ribosomal subunit. *Curr Opin Struct Biol* 49, 85–93.
- Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2004). Control of the SCF Skp2–Cks1 ubiquitin ligase by the APC/C Cdh1 ubiquitin ligase. *Nature* 428, 190–193.
- Baßler, J., and Hurt, E. (2019). Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 88, null.
- Belhabich-Baumas, K., Joret, C., Jády, B.E., Plisson-Chastang, C., Shayan, R., Klopp, C., Henras, A.K., Henry, Y., and Mougín, A. (2017). The Rio1p ATPase hinders premature entry into translation of late pre-40S pre-ribosomal particles. *Nucleic Acids Res* 45, 10824–10836.
- Beltrame, M., and Tollervey, D. (1992). Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* 11, 1531–1542
- Beltrame, M., 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.
- Belyy, A., Levanova, N., Tabakova, I., Rospert, S., and Belyi, Y. (2016). Ribosomal Protein Rps26 Influences 80S Ribosome Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *MSphere* 1.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 1524–1529.
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science* 330, 1203–1209.
- Bernstein, K.A., Gallagher, J.E.G., Mitchell, B.M., Granneman, S., and Baserga, S.J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryotic Cell* 3, 1619–1626.
- Biedka, S., Micic, J., Wilson, D., Brown, H., Diorio-Toth, L., and Woolford, J.L. (2018). Hierarchical recruitment of ribosomal proteins and assembly factors remodels nucleolar pre-60S ribosomes. *J. Cell Biol.* 217, 2503–2518.
- Bohnsack, K.E., and Bohnsack, M.T. (2019). Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease. *EMBO J.* e100278.

- Bunker, R.D., McKenzie, J.L., Baker, E.N., and Arcus, V.L. (2008). Crystal structure of PAE0151 from *Pyrobaculum aerophilum*, a PIN-domain (VapC) protein from a toxin-antitoxin operon. *Proteins* 72, 510–518.
- Bursać, S., Brdovčak, M.C., Pfannkuchen, M., Orsolić, I., Golomb, L., Zhu, Y., Katz, C., Daftuar, L., Grabušić, K., Vukelić, I., et al. (2012). Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 20467–20472.
- Bywater, M.J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K., et al. (2012). Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53. *Cancer Cell* 22, 51.
- Calo, E., Flynn, R.A., Martin, L., Spitale, R.C., Chang, H.Y., and Wysocka, J. (2015). RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature* 518, 249–253.
- Campbell, M.G., and Karbstein, K. (2011). Protein-Protein Interactions within Late Pre-40S Ribosomes. *PLoS One* 6.
- Carlile, T.M., Rojas-Duran, M.F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K.M., and Gilbert, W.V. (2014). Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature* 515, 143–146.
- Chaker-Margot, M. (2018). Assembly of the small ribosomal subunit in yeast: mechanism and regulation. *RNA* 24, 881–891.
- Chaker-Margot, M., and Klinge, S. (2019). Assembly and early maturation of large subunit precursors. *RNA* 25, 465–471.
- Chaker-Margot, M., Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S. (2017). Architecture of the yeast small subunit processome. *Science* 355.
- Cheng, J., Baßler, J., Fischer, P., Lau, B., Kellner, N., Kunze, R., Griesel, S., Kallas, M., Berninghausen, O., Strauss, D., et al. (2019). Thermophile 90S Pre-ribosome Structures Reveal the Reverse Order of Co-transcriptional 18S rRNA Subdomain Integration. *Mol. Cell*.
- Cheng, J., Kellner, N., Berninghausen, O., Hurt, E., and Beckmann, R. (2017). 3.2-Å-resolution structure of the 90S preribosome before A1 pre-rRNA cleavage. *Nature Structural & Molecular Biology* 24, 954–964.
- Choudhury, P., Hackert, P., Memet, I., Sloan, K.E., and Bohnsack, M.T. (2019). The human RNA helicase DHX37 is required for release of the U3 snoRNP from pre-ribosomal particles. *RNA Biol* 16, 54–68.
- Chu, S., Archer, R.H., Zengel, J.M., and Lindahl, L. (1994). The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 659–663.
- Dauwerse, J.G., Dixon, J., Seland, S., Ruivenkamp, C.A.L., van Haeringen, A., Hoefsloot, L.H., Peters, D.J.M., Boers, A.C., Daumer-Haas, C., Maiwald, R., et al. (2011). Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. *Nat. Genet.* 43, 20–22.
- de la Cruz, J., Karbstein, K., and Woolford, J.L. (2015). Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo. *Annu Rev Biochem* 84, 93–129.
- Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* 27, 344–351.

- Desmyter, A., Spinelli, S., Roussel, A., and Cambillau, C. (2015). Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 32, 1–8.
- Donati, G., Peddigari, S., Mercer, C.A., and Thomas, G. (2013). 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell Rep* 4, 87–98.
- Dragon, F., Gallagher, J.E.G., 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.
- Drakou, C.E., Malekkou, A., Hayes, J.M., Lederer, C.W., Leonidas, D.D., Oikonomakos, N.G., Lamond, A.I., Santama, N., and Zographos, S.E. (2012). hCINAP is an atypical mammalian nuclear adenylate kinase with an ATPase motif: Structural and functional studies. *Proteins* 80.
- Drygin, D., Rice, W.G., and Grummt, I. (2010). The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 131–156.
- Durand, E., Nguyen, V.S., Zoued, A., Logger, L., Péhau-Arnaudet, G., Aschtgen, M.-S., Spinelli, S., Desmyter, A., Bardiaux, B., Dujeancourt, A., et al. (2015). Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature* 523, 555–560.
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., et al. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335–339.
- Ereño-Orbea, J., Sicard, T., Cui, H., Carson, J., Hermans, P., and Julien, J.-P. (2018). Structural Basis of Enhanced Crystallizability Induced by a Molecular Chaperone for Antibody Antigen-Binding Fragments. *Journal of Molecular Biology* 430, 322–336.
- Esser, D., and Siebers, B. (2013). Atypical protein kinases of the RIO family in archaea. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 399–404.
- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 313–318.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakić, M., and Tollervey, D. (2003). Nob1p Is Required for Cleavage of the 3' End of 18S rRNA. *Molecular and Cellular Biology* 23, 1798–1807.
- Fatica, A., Tollervey, D., and Dlakić, M. (2004). PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA. *RNA* 10, 1698–1701.
- Ferreira-Cerca, S., Kiburu, I., Thomson, E., LaRonde, N., and Hurt, E. (2014). Dominant Rio1 kinase/ATPase catalytic mutant induces trapping of late pre-40S biogenesis factors in 80S-like ribosomes. *Nucleic Acids Res* 42, 8635–8647.
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P.-E., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol. Cell* 20, 263–275.
- Finch, A.J., Hilcenko, C., Basse, N., Drynan, L.F., Goyenechea, B., Menne, T.F., González Fernández, A., Simpson, P., D'Santos, C.S., Arends, M.J., et al. (2011). Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* 25, 917–929.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17–42.

- Fumagalli, S., Ivanenkov, V.V., Teng, T., and Thomas, G. (2012). Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev.* 26, 1028–1040.
- Gallagher, J.E.G., Dunbar, D.A., Granneman, S., Mitchell, B.M., Osheim, Y., Beyer, A.L., and Baserga, S.J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev.* 18, 2506–2517.
- Garforth, S.J., Patel, D., Feng, M., and Sayers, J.R. (2001). Unusually wide co-factor tolerance in a metalloenzyme; divalent metal ions modulate endo-exonuclease activity in T5 exonuclease. *Nucleic Acids Res.* 29, 2772–2779.
- Gasse, L., Flemming, D., and Hurt, E. (2015). Coordinated Ribosomal ITS2 RNA Processing by the Las1 Complex Integrating Endonuclease, Polynucleotide Kinase, and Exonuclease Activities. *Mol. Cell* 60, 808–815.
- Geerlings, T.H., Faber, A.W., Bister, M.D., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2003). Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 22537–22545.
- Geerlings, T.H., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2000). The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA* 6, 1698–1703.
- Gerhardy, S., Menet, A.M., Peña, C., Petkowski, J.J., and Panse, V.G. (2014). Assembly and nuclear export of pre-ribosomal particles in budding yeast. *Chromosoma* 123, 327–344.
- Ghalei, H., Schaub, F.X., Doherty, J.R., Noguchi, Y., Roush, W.R., Cleveland, J.L., Stroupe, M.E., and Karbstein, K. (2015). Hrr25/CK1δ-directed release of Ltv1 from pre-40S ribosomes is necessary for ribosome assembly and cell growth. *J Cell Biol* 208, 745–759.
- Ghalei, H., Trepreau, J., Collins, T.C, Bhaskaran, H., Strun, B.S, and Karbstein, K. (2017). The ATPase Fap7 Tests the Ability to Carry Out Translocation-like Conformational Changes and Releases Dim1 during 40S Ribosome Maturation. *Mol. Cell* 67, 990-1000.e3.
- Glavan, F., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., and Conti, E. (2006). Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *EMBO J* 25, 5117–5125.
- Goldfarb, K.C., and Cech, T.R. (2017). Targeted CRISPR disruption reveals a role for RNase MRP RNA in human preribosomal RNA processing. *Genes Dev.* 31, 59–71.
- Golomb, L., Volarevic, S., and Oren, M. (2014). p53 and ribosome biogenesis stress: the essentials. *FEBS Lett.* 588, 2571–2579.
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervy, D., et al. (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell* 10, 105–115.
- Granneman, S., Gallagher, J.E.G., Vogelzangs, J., Horstman, W., van Venrooij, W.J., Baserga, S.J., and Pruijn, G.J.M. (2003). The human Imp3 and Imp4 proteins form a ternary complex with hMpp10, which only interacts with the U3 snoRNA in 60-80S ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* 31, 1877–1887.
- Granneman, S., Nandineni, M.R., and Baserga, S.J. (2005). The Putative NTPase Fap7 Mediates Cytoplasmic 20S Pre-rRNA Processing through a Direct Interaction with Rps14. *Mol Cell Biol* 25, 10352–10364.

- Granneman, S., Petfalski, E., Swiatkowska, A., and Tollervey, D. (2010). Cracking pre-40S ribosomal subunit structure by systematic analyses of RNA–protein cross-linking. *The EMBO Journal* 29, 2026–2036.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296–299.
- Hector, R.D., Burlacu, E., Aitken, S., Bihan, T.L., Tuijtel, M., Zaplatina, A., Cook, A.G., and Granneman, S. (2014). Snapshots of pre-rRNA structural flexibility reveal eukaryotic 40S assembly dynamics at nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res* 42, 12138–12154.
- Heiss, N.S., Knight, S.W., Vulliamy, T.J., Klauck, S.M., Wiemann, S., Mason, P.J., Poustka, A., and Dokal, I. (1998). X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat. Genet.* 19, 32–38.
- Hellmich, U.A., Weis, B.L., Lioutikov, A., Wurm, J.P., Kaiser, M., Christ, N.A., Hantke, K., Kötter, P., Entian, K.-D., Schleiff, E., et al. (2013). Essential ribosome assembly factor Fap7 regulates a hierarchy of RNA–protein interactions during small ribosomal subunit biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15253–15258.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O’Donohue, M.-F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.-E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6, 225–242.
- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., Kearsy, S., and Tollervey, D. (1994). The 5’ end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* 13, 2452–2463.
- Heuer, A., Thomson, E., Schmidt, C., Berninghausen, O., Becker, T., Hurt, E., and Beckmann, R. (2017). Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Elife* 6.
- Hock, A.K., and Vousden, K.H. (2014). The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 137–149.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters* 420, 25–27.
- Hughes, J.M., and Ares, M. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5’ external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *The EMBO Journal* 10, 4231–4239.
- Hunziker, M., Barandun, J., Petfalski, E., Tan, D., Delan-Forino, C., Molloy, K.R., Kim, K.H., Dunn-Davies, H., Shi, Y., Chaker-Margot, M., et al. (2016). UtpA and UtpB chaperone nascent pre-ribosomal RNA and U3 snoRNA to initiate eukaryotic ribosome assembly. *Nat Commun* 7, 12090
- Jia, M.Z., Horita, S., Nagata, K., and Tanokura, M. (2010). An archaeal Dim2-like protein, aDim2p, forms a ternary complex with a/eIF2 alpha and the 3’ end fragment of 16S rRNA. *J. Mol. Biol.* 398, 774–785.
- Jia, M.Z., Ohtsuka, J., Lee, W.C., Nagata, K., and Tanokura, M. (2006). Crystallization and preliminary X-ray analysis of PH1566, a putative ribosomal RNA-processing factor from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62, 47–48.
- Johnson, M.C., Ghalei, H., Doxtader, K.A., Karbstein, K., and Stroupe, M.E. (2017). Structural Heterogeneity in Pre-40S Ribosomes. *Structure* 25, 329–340.

- Kala, S., Mehta, V., Yip, C.W., Moshiri, H., Najafabadi, H.S., Ma, R., Nikpour, N., Zimmer, S.L., and Salavati, R. (2017). The interaction of a *Trypanosoma brucei* KH-domain protein with a ribonuclease is implicated in ribosome processing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 211, 94–103.
- Kampen, K.R., Sulima, S.O., Vereecke, S., and De Keersmaecker, K. (2019). Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Research* gkz637.
- Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., and Klaholz, B.P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature* 520, 640–645.
- Klinge, S., and Woolford, J.L. (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 116–131.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., and Ban, N. (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in Biochemical Sciences* 37, 189–198.
- Konikkat, S., and Woolford, J.L. (2017). Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochem. J.* 474, 195–214.
- Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Koš-Braun, I., Koš, M., Thoms, M., Berninghausen, O., Beckmann, R., et al. (2016). Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell* 166, 380–393.
- Kressler, D., Bange, G., Ogawa, Y., Stjepanovic, G., Bradatsch, B., Pratte, D., Amlacher, S., Strauß, D., Yoneda, Y., Katahira, J., et al. (2012). Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science* 338, 666–671.
- Kressler, D., Hurt, E., and Baßler, J. (2017). A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem. Sci.* 42, 640–654.
- Kressler, D., Hurt, E., and Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1803, 673–683.
- Krogan, N.J., Peng, W.-T., Cagney, G., Robinson, M.D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D.P., et al. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol. Cell* 13, 225–239.
- Krogh, N., Jansson, M.D., Häfner, S.J., Tehler, D., Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Lund, A.H., and Nielsen, H. (2016). Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* 44, 7884–7895.
- Kubiński, K., and Maslyk, M. (2017). The Link between Protein Kinase CK2 and Atypical Kinase Rio1. *Pharmaceuticals (Basel)* 10.
- 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.
- Lake, J.A. (1976). Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *Journal of Molecular Biology* 105, 131–159.
- Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., and Andersen, J.S. (2007). Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr. Biol.* 17, 749–760.
- Lamanna, A.C., and Karbstein, K. (2009). Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14259–14264.

- Lamanna, A.C., and Karbstein, K. (2011). An RNA conformational switch regulates pre-18S rRNA cleavage. *J. Mol. Biol.* 405, 3–17.
- Lapeyre, B., and Purushothaman, S.K. (2004). Spb1p-directed formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Mol. Cell* 16, 663–669.
- Larburu, N., Montellese, C., O'Donohue, M.-F., Kutay, U., Gleizes, P.-E., and Plisson-Chastang, C. (2016). Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 44, 8465–8478.
- LaRonde, N.A. (2014). The ancient microbial RIO kinases. *J. Biol. Chem.* 289, 9488–9492.
- LaRonde-LeBlanc, N., and Wlodawer, A. (2005). A family portrait of the RIO kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 37297–37300.
- Lazdins, I.B., Delannoy, M., and Sollner-Webb, B. (1997). Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma* 105, 481–495.
- Lebaron, S., Schneider, C., van Nues, R.W., Swiatkowska, A., Walsh, D., Böttcher, B., Granneman, S., Watkins, N.J., and Tollervey, D. (2012). Proof reading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat Struct Mol Biol* 19, 744–753.
- Léger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J.-C., Choemmel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., and Gleizes, P.-E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J.* 23, 2336–2347.
- Lempiäinen, H., and Shore, D. (2009). Growth control and ribosome biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 855–863.
- Lin, M.-L., Fukukawa, C., Park, J.-H., Naito, K., Kijima, K., Shimo, A., Ajiro, M., Nishidate, T., Nakamura, Y., and Katagiri, T. (2009). Involvement of G-patch domain containing 2 overexpression in breast carcinogenesis. *Cancer Science* 100, 1443–1450.
- Lin, Y., Peng, S., Yu, H., Teng, H., and Cui, M. (2012). RNAi-mediated downregulation of NOB1 suppresses the growth and colony-formation ability of human ovarian cancer cells. *Med. Oncol.* 29, 311–317.
- Lindahl, L., Archer, R.H., and Zengel, J.M. (1992). A new rRNA processing mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 20, 295–301.
- Liu, K., Chen, H., You, Q., Ye, Q., Wang, F., Wang, S., Zhang, S., Yu, K., Li, W., and Gu, M. (2018). miR-145 inhibits human non-small-cell lung cancer growth by dual-targeting RIOK2 and NOB1. *Int. J. Oncol.* 53, 257–265.
- Loc'h, J., Blaud, M., Réty, S., Lebaron, S., Deschamps, P., Bareille, J., Jombart, J., Robert-Paganin, J., Delbos, L., Chardon, F., et al. (2014). RNA mimicry by the *fap7* adenylate kinase in ribosome biogenesis. *PLoS Biol.* 12, e1001860.
- Lu, J., Sun, M., and Ye, K. (2013). Structural and functional analysis of Utp23, a yeast ribosome synthesis factor with degenerate PIN domain. *RNA* 19, 1815–1824.
- Lu, P.-J., Zhou, X.Z., Shen, M., and Lu, K.P. (1999). Function of WW Domains as Phosphoserine- or Phosphothreonine-Binding Modules. *Science* 283, 1325–1328.
- Lu, Z., Guo, Q., Shi, A., Xie, F., and Lu, Q. (2012). Downregulation of NIN/RPN12 binding protein inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Biol. Rep.* 39, 501–507.

- Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D., and Séraphin, B. (1996). Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science* 272, 268–270.
- Martin, R., Straub, A.U., Doebele, C., and Bohnsack, M.T. (2013). DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. *RNA Biol* 10, 4–18.
- Matelska, D., Steczkiewicz, K., and Ginalski, K. (2017). Comprehensive classification of the PIN domain-like superfamily. *Nucleic Acids Res* 45, 6995–7020.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 560–567.
- Michael, D., and Oren, M. (2003). The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* 13, 49–58.
- Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969). Visualization of Nucleolar Genes. *Science* 164, 955–957.
- Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1996). The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes Dev.* 10, 502–513.
- Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., and Adjei, A.A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* 83, 584–594.
- Monecke, T., Dickmanns, A., and Ficner, R. (2014). Allosteric control of the exportin CRM1 unraveled by crystal structure analysis. *FEBS J* 281, 4179–4194.
- Montellese, C., Montel-Lehry, N., Henras, A.K., Kutay, U., Gleizes, P.-E., and O'Donohue, M.-F. (2017). Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic Acids Res* 45, 6822–6836.
- Morello, L.G., Coltri, P.P., Quaresma, A.J.C., Simabuco, F.M., Silva, T.C.L., Singh, G., Nickerson, J.A., Oliveira, C.C., Moore, M.J., and Zanchin, N.I.T. (2011). The human nucleolar protein FTSJ3 associates with NIP7 and functions in pre-rRNA processing. *PLoS ONE* 6, e29174.
- Moritz, M., Paulovich, A.G., Tsay, Y.F., and Woolford, J.L. (1990). Depletion of yeast ribosomal proteins L16 or rp59 disrupts ribosome assembly. *J. Cell Biol.* 111, 2261–2274.
- Mueser, T.C., Nossal, N.G., and Hyde, C.C. (1996). Structure of bacteriophage T4 RNase H, a 5' to 3' RNA-DNA and DNA-DNA exonuclease with sequence similarity to the RAD2 family of eukaryotic proteins. *Cell* 85, 1101–1112.
- Narla, A., and Ebert, B.L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115, 3196–3205.
- Natchiar, S.K., Myasnikov, A.G., Kratzat, H., Hazemann, I., and Klaholz, B.P. (2017). Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature* 551, 472–477.
- Nerurkar, P., Altvater, M., Gerhardy, S., Schütz, S., Fischer, U., Weirich, C., and Panse, V.G. (2015). Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. *Int Rev Cell Mol Biol* 319, 107–140.
- Oeffinger, M., Zenklusen, D., Ferguson, A., Wei, K.E., El Hage, A., Tollervey, D., Chait, B.T., Singer, R.H., and Rout, M.P. (2009). Rrp17p is a eukaryotic exonuclease required for 5' end processing of Pre-60S ribosomal RNA. *Mol. Cell* 36, 768–781.
- Ofengand, J., and Bakin, A. (1997). Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaebacteria, mitochondria and chloroplasts. *J. Mol. Biol.* 266, 246–268.

- Palade, G.E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 59–68.
- Panse, V.G. (2011). Getting Ready to Translate: Cytoplasmic Maturation of Eukaryotic Ribosomes. *Chimia (Aarau)* 65, 765–769
- Panse, V.G., and Johnson, A.W. (2010). Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 260–266.
- Parker, M.D., Collins, J.C., Korona, B., Ghalei, H., and Karbstein, K. (2019). A kinase-dependent checkpoint prevents escape of immature ribosomes into the translating pool (*Molecular Biology*).
- Pelletier, J., Thomas, G., and Volarević, S. (2018). Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat. Rev. Cancer* 18, 51–63.
- Peña, C., Schütz, S., Fischer, U., Chang, Y., and Panse, V.G. (2016). Prefabrication of a ribosomal protein subcomplex essential for eukaryotic ribosome formation. *Elife* 5.
- Pérez-Fernández, J., Román, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X.R., and Dosil, M. (2007). The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5414–5429.
- Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., Schäfer, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J. Biol. Chem.* 284, 35079–35091.
- Phipps, K.R., Charette, J.M., and Baserga, S.J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 1–21.
- Piekna-Przybylska, D., Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2008). The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis. *Nucleic Acids Res.* 36, D178-183.
- Pillet, B., Mitterer, V., Kressler, D., and Pertschy, B. (2017). Hold on to your friends: Dedicated chaperones of ribosomal proteins: Dedicated chaperones mediate the safe transfer of ribosomal proteins to their site of pre-ribosome incorporation. *Bioessays* 39, 1–12.
- Polikanov, Y.S., Melnikov, S.V., Söll, D., and Steitz, T.A. (2015). Structural insights into the role of rRNA modifications in protein synthesis and ribosome assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 342–344.
- pre-ribosomal RNA and U3 snoRNA to initiate eukaryotic ribosome assembly. *Nat Commun* 7, 12090.
- Preti, M., O’Donohue, M.-F., Montel-Lehry, N., Bortolin-Cavaillé, M.-L., Choismel, V., and Gleizes, P.-E. (2013). Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic Acids Res* 41, 4709–4723.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* 331, 730–736.
- Raelijaona, F., Thore, S., and Fribourg, S. (2018). Domain definition and interaction mapping for the endonuclease complex hNob1/hPno1. *RNA Biol* 15, 1174–1180.
- Rodríguez-Galán, O., García-Gómez, J.J., and de la Cruz, J. (2013). Yeast and human RNA helicases involved in ribosome biogenesis: current status and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 775–790.
- Romier, C., Ben Jelloul, M., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P.H.N., 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 Cryst D* 62, 1232–1242.

Sá-Moura, B., Kornprobst, M., Kharde, S., Ahmed, Y.L., Stier, G., Kunze, R., Sinning, I., and Hurt, E. (2017). Mpp10 represents a platform for the interaction of multiple factors within the 90S pre-ribosome. *PLoS ONE* 12, e0183272.

Santama, N., Ogg, S.C., Malekkou, A., Zographos, S.E., Weis, K., and Lamond, A.I. (2005). Characterization of hCINAP, a novel coilin-interacting protein encoded by a transcript from the transcription factor TAFII32 locus. *J. Biol. Chem.* 280, 36429–36441.

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

Scaiola, A., Peña, C., Weisser, M., Böhringer, D., Leibundgut, M., Klingauf-Nerurkar, P., Gerhardy, S., Panse, V.G., and Ban, N. (2018). Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit. *The EMBO Journal* 37, e98499.

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

Scherrer, K., and Darnell, J.E. (1962). Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 7, 486–490.

Scherrer, K., Latham, H., and Darnell, J.E. (1963). Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells\*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 49, 240–248.

Schmitt, M.E., and Clayton, D.A. (1993). Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7935–7941.

Schulz, G.E. (1992). Induced-fit movements in adenylate kinases. *Faraday Discuss.* 93, 85–93.

Schütz, S., Fischer, U., Altvater, M., Nerurkar, P., Peña, C., Gerber, M., Chang, Y., Caesar, S., Schubert, O.T., Schlenstedt, G., et al. (2014). A RanGTP-independent mechanism allows ribosomal protein nuclear import for ribosome assembly. *ELife* 3, e03473.

Schütz, S., Fischer, U., Altvater, M., Nerurkar, P., Peña, C., Gerber, M., Chang, Y., Caesar, S., Schubert, O.T., Schlenstedt, G., et al. (2014). A RanGTP-independent mechanism allows ribosomal protein nuclear import for ribosome assembly. *ELife* 3, e03473.

Senapin, S., Desmond Clark-Walker, G., Jie Chen, X., Séraphin, B., and Daugeron, M.-C. (2003). RRP20, a component of the 90S preribosome, is required for pre-18S rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 31, 2524–2533.

Sengupta, J., Bussiere, C., Pallesen, J., West, M., Johnson, A.W., and Frank, J. (2010). Characterization of the nuclear export adaptor protein Nmd3 in association with the 60S ribosomal subunit. *J. Cell Biol.* 189, 1079–1086.

Senissar, M., Manav, M.C., and Brodersen, D.E. (2017). Structural conservation of the PIN domain active site across all domains of life. *Protein Sci.* 26, 1474–1492.

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.

- Sloan, K.E., Gleizes, P.-E., and Bohnsack, M.T. (2016). Nucleocytoplasmic Transport of RNAs and RNA–Protein Complexes. *Journal of Molecular Biology* 428, 2040–2059.
- Sloan, K.E., Knox, A.A., Wells, G.R., Schneider, C., and Watkins, N.J. (2019). Interactions and activities of factors involved in the late stages of human 18S rRNA maturation. *RNA Biology* 1–15.
- Sloan, K.E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Pruijn, G.J.M., and Watkins, N.J. (2013). Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J. Cell Biol.* 200, 577–588.
- Sloan, K.E., Warda, A.S., Sharma, S., Entian, K.-D., Lafontaine, D.L.J., and Bohnsack, M.T. (2016). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol* 14, 1138–1152.
- Sondalle, S.B., and Baserga, S.J. (2014). Human Diseases of the SSU Processome. *Biochim Biophys Acta* 1842, 758–764.
- Srivastava, P., Prajapati, V.K., Vanaerschot, M., Van der Auwera, G., Dujardin, J.C., and Sundar, S. (2010). Detection of *Leptomonas* sp. parasites in clinical isolates of Kala-azar patients from India. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 1145–1150.
- Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L., and Karbstein, K. (2012). A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* 150, 111–121.
- Sturm, M., Cheng, J., Baßler, J., Beckmann, R., and Hurt, E. (2017). Interdependent action of KH domain proteins Krr1 and Dim2 drive the 40S platform assembly. *Nature Communications* 8.
- Sun, Q., Zhu, X., Qi, J., An, W., Lan, P., Tan, D., Chen, R., Wang, B., Zheng, S., Zhang, C., et al. (2017) Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *ELife* 6.
- Tafforeau, L. (2015). [About the ribosomal biogenesis in human]. *Med Sci (Paris)* 31, 622–628.
- Tamaoki, T. (1966). The particulate fraction containing 45 s RNA in L cell nuclei. *J. Mol. Biol.* 15, 624–639.
- Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Sato, K., Ishikawa, H., Izumikawa, K., Yamauchi, Y., Hirota, K., Nakayama, H., Takahashi, N., et al. (2018). Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res.* 46, 9289–9298.
- Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Yamauchi, Y., Ishikawa, H., Takahashi, N., Nakayama, H., and Isobe, T. (2016). The complete chemical structure of *Saccharomyces cerevisiae* rRNA: partial pseudouridylation of U2345 in 25S rRNA by snoRNA snR9. *Nucleic Acids Res.* 44, 8951–8961.
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., and Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J. Cell. Sci.* 126, 4815–4821.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer* 6, 909–923.
- Tomecki, R., Labno, A., Drazkowska, K., Cysewski, D., and Dziembowski, A. (2015). hUTP24 is essential for processing of the human rRNA precursor at site A1, but not at site A0. *RNA Biol* 12, 1010–1029.
- Tomecki, R., Sikorski, P.J., and Zakrzewska-Placzek, M. (2017). Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells - focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases. *FEBS Lett.* 591, 1801–1850.

- Trapman, J., Retèl, J., and Planta, R.J. (1975). Ribosomal precursor particles from yeast. *Experimental Cell Research* 90, 95–104.
- Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13, 255–263.
- Turi, Z., Lacey, M., Mistrik, M., and Moudry, P. (2019). Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging. *Aging (Albany NY)* 11, 2512–2540.
- Turowski, T.W., Lebaron, S., Zhang, E., Peil, L., Dudnakova, T., Petfalski, E., Granneman, S., Rappsilber, J., and Tollervey, D. (2014). Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Res.* 42, 12189–12199.
- Tyc, K., and Steitz, J.A. (1992). A new interaction between the mouse 5' external transcribed spacer of pre-rRNA and U3 snRNA detected by psoralen crosslinking. *Nucleic Acids Res.* 20, 5375–5382.
- Udem, S.A., and Warner, J.R. (1972). Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* 65, 227–242.
- Udem, S.A., and Warner, J.R. (1973). The Cytoplasmic Maturation of a Ribosomal Precursor Ribonucleic Acid in Yeast. *J. Biol. Chem.* 248, 1412–1416.
- Ulbrich, C., Diepholz, M., Baßler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Böttcher, B., and Hurt, E. (2009). Mechanochemical Removal of Ribosome Biogenesis Factors from Nascent 60S Ribosomal Subunits. *Cell* 138, 911–922.
- Vanrobays, E., Gélugne, J.-P., Caizergues-Ferrer, M., and Lafontaine, D.L.J. (2004). Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis. *RNA* 10, 645–656.
- Vanrobays, E., Gélugne, J.-P., Gleizes, P.-E., and Caizergues-Ferrer, M. (2003). Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2083–2095.
- Vanrobays, E., Gleizes, P.E., Bousquet-Antonelli, C., Noaillac-Depeyre, J., Caizergues-Ferrer, M., and Gélugne, J.P. (2001). Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein. *EMBO J.* 20, 4204–4213.
- Vanrobays, E., Leplus, A., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., Wacheul, L., and Lafontaine, D.L.J. (2008). TOR regulates the subcellular distribution of DIM2, a KH domain protein required for cotranscriptional ribosome assembly and pre-40S ribosome export. *RNA* 14, 2061–2073.
- Vasiliev, V.D. (1974). Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data. *Acta Biol. Med. Ger.* 33, 779–793.
- Veith, T., Martin, R., Wurm, J.P., Weis, B.L., Duchardt-Ferner, E., Safferthal, C., Hennig, R., Mirus, O., Bohnsack, M.T., Wöhnert, J., et al. (2012). Structural and functional analysis of the archaeal endonuclease Nob1. *Nucleic Acids Res.* 40, 3259–3274.
- Vladimirov, S.N., Ivanov, A.V., Karpova, G.G., Musolyamov, A.K., Egorov, T.A., Thiede, B., Wittmann-Liebold, B., and Otto, A. (1996). Characterization of the human small-ribosomal-subunit proteins by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* 239, 144–149.
- Vourekas, A., Stamatopoulou, V., Toumpeki, C., Tsitlaidou, M., and Drainas, D. (2008). Insights into functional modulation of catalytic RNA activity. *IUBMB Life* 60, 669–683.

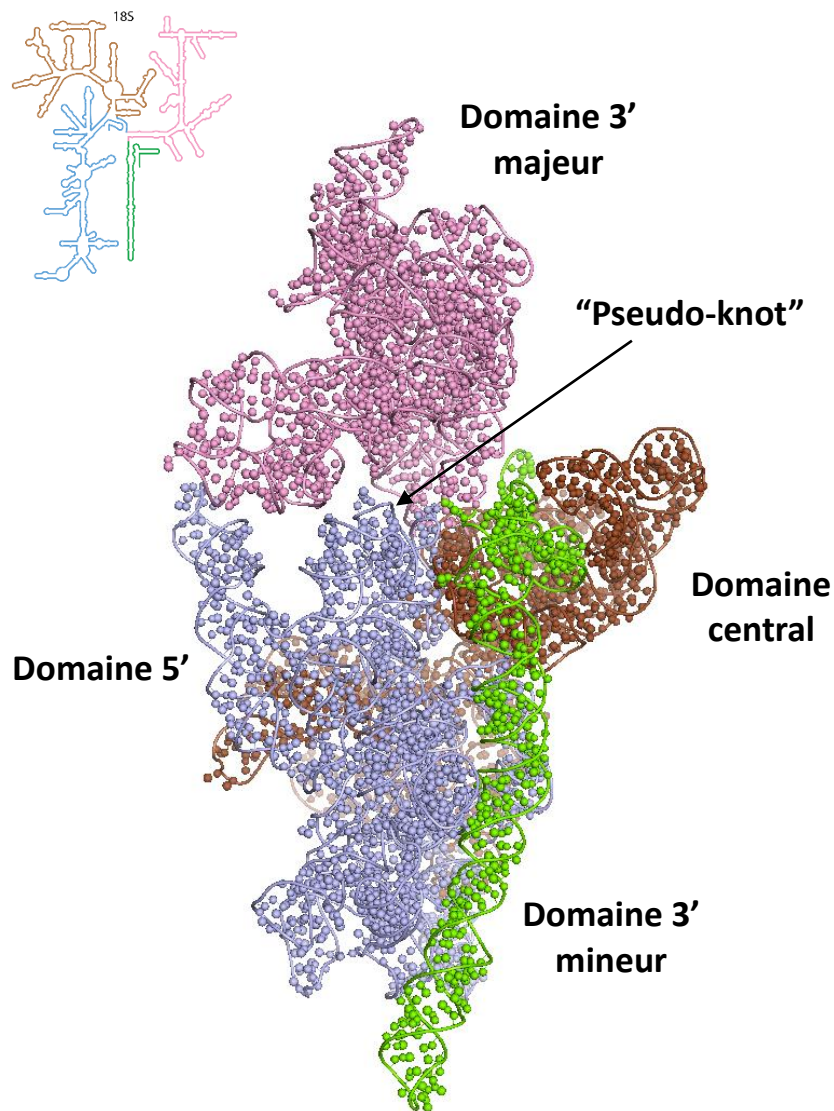
- Wang, B., Song, N., Tang, C., Ma, J., Wang, N., Sun, Y., and Kang, Z. (2019). PsRPs26, a 40S Ribosomal Protein Subunit, Regulates the Growth and Pathogenicity of *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*. *Front. Microbiol.* 10.
- Warner, J.R. (1977). In the absence of ribosomal RNA synthesis, the ribosomal proteins of HeLa Cells are synthesized normally and degraded rapidly. *Journal of Molecular Biology* 115, 315–333.
- Warner, J.R., and Soeiro, R. (1967). Nascent ribosomes from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58, 1984–1990.
- 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., Ségault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C., and Lührmann, R. (2000). A Common Core RNP Structure Shared between the Small Nucleolar Box C/D RNPs and the Spliceosomal U4 snRNP. *Cell* 103, 457–466.
- Wells, G.R., Weichmann, F., Colvin, D., Sloan, K.E., Kudla, G., Tollervey, D., Watkins, N.J., and Schneider, C. (2016). The PIN domain endonuclease Utp24 cleaves pre-ribosomal RNA at two coupled sites in yeast and humans. *Nucleic Acids Res.* 44, 5399–5409.
- Welting, T.J.M., van Venrooij, W.J., and Pruijn, G.J.M. (2004). Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.* 32, 2138–2146.
- Widmann, B., Wandrey, F., Badertscher, L., Wyler, E., Pfannstiel, J., Zemp, I., and Kutay, U. (2012). The kinase activity of human Rio1 is required for final steps of cytoplasmic maturation of 40S subunits. *Mol Biol Cell* 23, 22–35.
- Woolford, J.L., and Baserga, S.J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195, 643–681.
- Woolfs, H.A., Lamanna, A.C., and Karbstein, K. (2011). Roles of Dim2 in Ribosome Assembly. *J Biol Chem* 286, 2578–2586.
- Yokogawa, M., Tsushima, T., Noda, N.N., Kumeta, H., Enokizono, Y., Yamashita, K., Standley, D.M., Takeuchi, O., Akira, S., and Inagaki, F. (2016). Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase-1 by domain-domain interactions. *Sci Rep* 6.
- Yusupova, G., and Yusupov, M. (2017). Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372.
- Zhang, L., Wu, C., Cai, G., Chen, S., and Ye, K. (2016). Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast. *Genes Dev.* 30, 718–732.
- Zhang, Y., and Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 16, 369–377.
- Zhang, Y., Ni, J., Zhou, G., Yuan, J., Ren, W., Shan, Y., Tang, W., Yu, L., and Zhao, S. (2005). Cloning, Expression and Characterization of the Human NOB1 gene. *Mol Biol Rep* 32, 185–189.
- Zheng, S., Lan, P., Liu, X., and Ye, K. (2014). Interaction between ribosome assembly factors Krr1 and Faf1 is essential for formation of small ribosomal subunit in yeast. *J. Biol. Chem.* 289, 22692–22703.



# ANNEXES



## ANNEXE 1 : L'ARNr 18S



**Figure 48 :** Les différents sous-domaines de l'ARN 18S chez la levure (PDB ID 6FAI d'après Scaiola et al., 2018). (Bleu) le domaine 5', (Rose) le domaine 3' majeur, (Marron) le domaine central et (Vert) le domaine 3' mineur. Les bases sont représentées par des sphères et le squelette par un ruban.

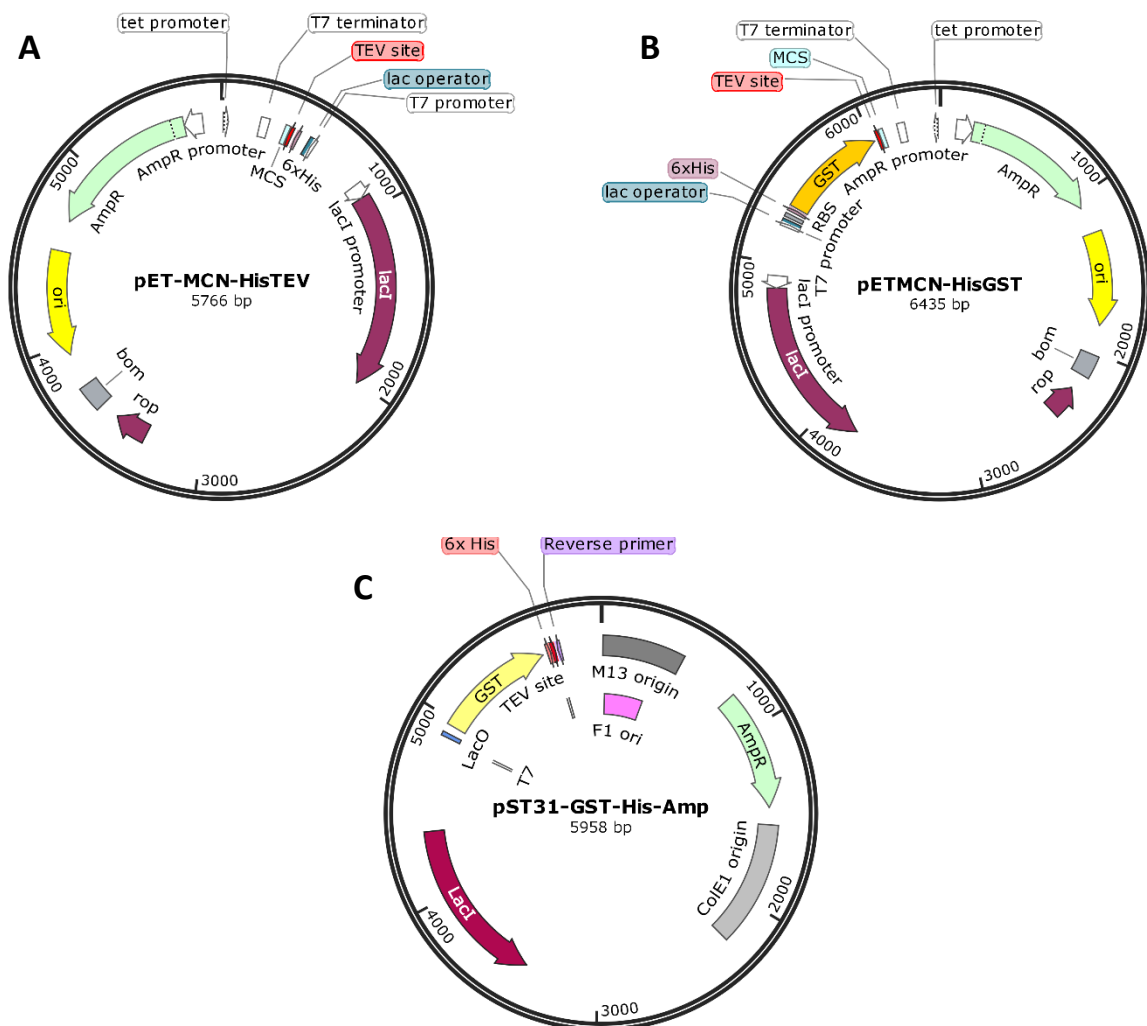
**ANNEXE 2 : Les oligonucléotides utilisés pour la génération des fragments protéiques utilisés pour les tests d'interaction et/ou pour des études structurales**

<i>NOMS</i>	<i>GENES</i>	<i>ORGANIS MES</i>	<i>SEQUENCES</i>
TEV_lic_hNob1 (1+)	Nob1	Human	ctttacttccaggccatATGGCTCCAGTGGAGCAC
Lic_hNob1 (1+)			ctttaagaaggagatatacatatgATGGCTCCAGTGGAGCAC
Lic_hNob1 (314-)			tctagactattagatccCTAGGGGTTGCGGGAGAA
TEV_lic_hNob1 (230+)			ctttacttccaggccatgCGGGTTGGCTGCCTGACC
Lic_hNob1 (230+)			ctttaagaaggagatatacatatgCGGGTTGGCTGCCTGACC
Lic_hNob1 (230-)			tctagactattagatccTCACACGTCTCGGGGACGTC
TEV_lic_hNob1 (104+)			ctttacttccaggccatgCAAGAACCACAGAAGGTT
Lic_hNob1 (104+)			ctttaagaaggagatatacatatgCAAGAACCACAGAAGGTT
Lic_hNob1 (104-)			tctagactattagatccTTATTTTAGGTGAGACACCCC
TEV_lic_hNob1 (249+)			ctttacttccaggccatgCTGCACGTGCTGGCGGTG
Lic_hNob1 (249+)			ctttaagaaggagatatacatatgCTGCACGTGCTGGCGGTG
TEV_lic_hNob1 (206+)			ctttacttccaggccatgGGCTGGATAACCCCCAGT
Lic_hNob1 (206+)			ctttaagaaggagatatacatatgGGCTGGATAACCCCCAGT
Pst31_hNob1 (104+)			tatttccaggctccatgCAAGAACCACAGAAGGTT
Pst31_hNob1 (180+)			tatttccaggctccatgGAGGACGTTCCAAGTGAG
Pst31_hNob1 (179-)			cctgtacagaattcgatTCAACCTCTGTCAATCAGCAG
Pst31_hNob1 (206+)			tatttccaggctccatgGGCTGGATAACCCCCAGT
Pst31_hNob1 (230-)			cctgtacagaattcgatTCACACGTCTCGGGGACGTC
Pst31_hNob1 (220-)			cctgtacagaattcgatTCACTCCTGCTGGATCTGCTT
Tev_lic_hNob1 (315+)			ctttacttccaggccatgAAGGTGCTGAACCCC
Lic_hNob1 (315+)			ctttaagaaggagatatacatatgAAGGTGCTGAACCCC
Lic_hNob1 (412-)			tctagactattagatccTCACCTTTTCTTCACAAA
Lic_hNob1 (134-)			tctagactattagatccCTAAGGCTTGTAGGGCAG
Lic_hNob1 (255-)			tctagactattagatccCTACACCGCCAGCACGTGCAG
Lic_fusion_hNob1 (115-)			accagaactgctgccCGATGAGCTCACCTT
Lic_fusion_hNob1 (202+)			ggcagcagttctgtGACGACGGGGGTGGC
Lic_hNob1_W208A_fw			GATGACGACGGGGGTGgcCGATAACCCCCAGTAA CATC
Lic_hNob1_W208A_rv			GATGTTACTGGGGGTTATcgcGCCACCCCCGTCGTC ATC
Lic_hNob1_W208D_fw			GATGACGACGGGGGTGGCgatATAACCCCCAGTAA CATC
Lic_hNob1_W208D_rv			GATGTTACTGGGGGTTATatcGCCACCCCCGTCGTC ATC
Lic_hNob1_E36Q_fw			ATCCGGGAGGTGGTCACTcagATTCCGGGACAAGGC CACA
Lic_hNob1_E36Q_rv			TGTGGCCTTGTCGCCAATctgAGTGACCACCTCCCG GAT
Lic_hNob1_D10N_fw			CACGTTGTGGCGaacGCTGGGGCTTTC
Lic_hNob1_D10N_rv	GAAAGCCCCAGCgttCGCCACAACGTG		
Lic_hNob1_D238N_fw	GTTGGCTGCCTGACCACAaacTTCGCCATGCAGAA TGTT		

Lic_hNob1_D238N_rv			AACATTCTGCATGGCGAAgttTGTGGTCAGGCAGCC AAC
Lic_hNob1_D83K_fw			AGCCTCTCTGCCACGaaaATCCAAGTGCTTGCA
Lic_hNob1_D83K_rv			TGCAAGCACTTGGATtttCGTGGCAGAGAGGCT
Lic_hNob1_L87S_fw			ATCCAAGTGagcGCACTCACA
Lic_hNob1_L87S_rv			TGTGAGTGCgctCACTTGGAT
Lic_hNob1_Y91A_fw			GTGCTTGCACTCACAgcgCAGTTGGAAGCAGAG
Lic_hNob1_Y91A_rv			CTCTGCTTCCAAGTgcgTGTGAGTGCAAGCAC
TEV_lic_hPno1 (1+)	Pno1	Human	ctttactccaggccatATGGAATCCGAAATGGAA
Lic_hPno1 (1+)			ctttaagaaggagatatacatATGGAATCCGAAATGGAA
TEV_lic_hPno1 (65+)			ctttactccaggccatagGGGCTCCTGAGTGGGAAA
Lic_hPno1 (65+)			ctttactccaggccatagGGGCTCCTGAGTGGGAAA
TEV_lic_hPno1 (73+)			ctttactccaggccatATGGAAGAAACAAGGAAAATT
Lic_hPno1 (73+)			ctttaagaaggagatatacatATGGAAGAAACAAGGAAAATT
Lic_hPno1 (252-)			tctagactattagatccTCAGAATCGATCTGCTGATCT
Lic_hPno1 (155-)			tctagactattagatccTCACAACCTGATGAGGGCAAG
TEV_lic_hPno1 (157+)			ctttactccaggccatATGGACCTCTTCCTAGAG
Lic_hPno1 (157+)			ctttaagaaggagatatacatATGGACCTCTTCCTAGAG
Lic_hPno1_W92A_fw			CCATTGAAAGAAAACgccATGAAGATATTTACT
Lic_hPno1_W92A_rv			AGTAAATATCTTCATggcGTTTTCTTTCAATGG
Lic_hPno1_R108A_fw			GAACATTTGGGACTTCAGATAgcCTTTAACTTGAA ATCAAGGAAT
Lic_hPno1_R108A_rv			ATTCCTTGATTTCAAGTTAAAGgcTATCTGAAGTC CCAAATGTTC
Lic_hPno1_Q105A_R108S_N109A_fw			GAACATTTGGGACTTgcGATAaGCTTTgcCTTGAAA TCAAGGAAT
Lic_hPno1_Q105A_R108S_N109A_rev	ATTCCTTGATTTCAAGgcAAAGCtATCgcAAGTCC CAAATGTTC		
TEV_lic_hCinap (1+)	Cinap	Human	ctttactccaggccatATGTTGCTTCCGAACATC
Lic_hCinap (1+)			ctttaagaaggagatatacatATGTTGCTTCCGAACATC
Lic_hCinap(172-)			tctagactattagatccTCAAGAGTTATGATCTTTGAT
Bi6_hCinap_fw (1+)			tgtcgacctgcagaagaggagaaattaaccATGTTGCTTCCGAAC
Bi6_hCinap_rv (172-)			ggtaatttctccttctgcaggtcgacaTCAAGAGTTATGATC
TEV_lic_hRPS14 (1+)	RPS14	Human	ctttactccaggccatATGGCACCTCGAAAGGGG
Lic_hRPS14 (1+)			ctttaagaaggagatatacatATGGCACCTCGAAAGGGG
Lic_hRPS14 (151-)			tctagactattagatccTCACAGACGGCGACCACG
Bi6_hRPS14_fw (1+)			tgtcgacctgcagaagaggagaaattaaccATGGCACCTCGAAAG
Bi6_hRPS14_rv (151-)			ggtaatttctccttctgcaggtcgacaTCACAGACGGCGACC
Tev_lic_hRPS26 (1+)	RPS26	Human	ctttactccaggccatATGACAAAGAAGAGAAGG
Lic_hRPS26 (1+)			ctttaagaaggagatatacatATGACAAAGAAGAGAAGG
Lic_hRPS26 (116-)			tctagactattagatccTTACATGGGCTTTGGTGG
Lic_hRPS26_(96-110)_rv			GGGACGTGGGGCAGCACCCGCAGGTCTAAATCGG GGTGGGGGTG
Lic_hRPS26_(96-108)_rv			tctagactattagatccTTACATGGGCTTTGGTGGGGGACG TGGGGC
TEV_lic_yNob1 (1+)	Nob1	Baker yeast	ctttactccaggccatATGACCGAAAACCAAACC
lic_yNob1 (1+)			ctttaagaaggagatatacatATGACCGAAAACCAAACC

<b>Lic_yNob1 (459-)</b>			tctagactattagatccCTAACTTCTCCTTTTGGGA
<b>Pst31_yNob1 (194+)</b>			tatttcagggctccatgTCCAAAGAGCAGATATGT
<b>Pst31_yNob1 (237-)</b>			ctgtacagaattcggatTCAACTATCCTTAATAATTGC
<b>Lic_yNob1_W223A_fw</b>			GCTGATGATGATGGTGATgcgATTACCCCCGAGAA CTTA
<b>Lic_yNob1_W223A_rv</b>			TAAGTTCTCGGGGGTAATcgcATCACCATCATCATC AGC
<b>Lic_yNob1_D271N_fw</b>			GCATTGGCGACTGGCaacTTTGCCGTCCAAAAT
<b>Lic_yNob1_D271N_rv</b>			ATTTTGGACGGCAAgttGCCAGTCGCCAATGC
<hr/>			
<b>TEV_lic_yRPS26 (1+)</b>	RPS26	Baker yeast	ctttactccagggccatATGCCAAAGAAGAGAGCT
<b>lic_yRPS26 (1+)</b>			ctttaagaaggagatatacatATGCCAAAGAAGAGAGCT
<b>lic_yRPS26 (119-)</b>			tctagactattagatccTTATAAAGCCTTCTTGGC
<hr/>			
<b>TEV_lic_ecNob1 (1+)</b>	Nob1	<i>E.cuniculi</i>	ctttactccagggccatATGATTGCAGTGATAGAC
<b>lic_ecNob1 (1+)</b>			ctttaagaaggagatatacatATGATTGCAGTGATAGAC
<b>lic_ecNob1 (125-)</b>			tctagactattagatccctaATACAAGTTGTAATG
<hr/>			
<b>TEV_lic_ecPno1 (1+)</b>	Pno1	<i>E.cuniculi</i>	ctttactccagggccatATGAGTGGGATCCAAACG
<b>Lic_ecPno1 (1+)</b>			ctttaagaaggagatatacatATGAGTGGGATCCAAACG
<b>Lic_ecPno1 (183-)</b>			tctagactattagatccCTAGTACTTCTCCTTAAGTCT

**ANNEXE 3 : Les vecteurs utilisés pour les expressions des fragments protéiques utilisé pour les tests d'interaction et/ou pour des études structurales**



**Figure 49 :** Carte des plasmides avec une étiquette d'affinité. Les vecteurs pET-MCN-His (A) et pET-MCN-His\_GST (B) porte une étiquette de purification en N-terminal et un site de clivage à la TEV. Les vecteurs portent une cassette de clonage MCS, la transcription est sous la dépendance de la polymérase T7. Ils ont également un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR), une séquence codante pour l'opéron lactose (lacI) et une origine de répliation (ori). Le vecteur pST31-GST\_His (C) porte également une étiquette d'affinité en N-terminal avec un site de clivage à la TEV, un gène de résistance à l'ampicilline, des origines de répliation M13, F1 et colE1. Le vecteur possède également un gène lacI.



**ANNEXE 4 : Les conditions commerciales utilisées pour les tests de  
cristallisation**

<b>SCREENS</b>	<b>COMPAGNY</b>
MCSG (1,2,3,4)	Anatrace
INDEX	Hampton research
Pro complex	Qiagen
SALT Rx	Hampton research
PEG Ion	Hampton research
PACT	Molecular dimension
Anion suites	Qiagen
Cation	Qiagen
CRYO I & II	Hampton research
Proplex I & II	Molecular dimension
MIDAS	Molecular dimension
CLASSICs	Qiagen
JCSG+	Molecular dimension
PEG suites	Qiagen
MORPHEUS	Molecular dimension
Crystal screen	Hampton research
WIZARD III/ Natrix	Molecular dimension/ Hampton research





## Résumé :

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques responsables de la traduction. Chez les eucaryotes, la biogénèse du ribosome est un processus complexe très régulé qui fait intervenir un nombre important de facteurs d'assemblage (~200). La construction d'un ribosome est initiée dans le nucléole puis continue dans le nucléoplasme et se termine dans le cytoplasme. La maturation cytoplasmique de la petite sous-unité ribosomale implique la dissociation séquentielle des facteurs d'assemblage tardifs et la maturation finale de l'ARNr 18S. Ce processus est catalysé par l'endonucléase Nob1 qui assure la coupure de l'extrémité 3' du précurseur de l'ARNr 18S (pré-18S) aboutissant à sa forme mature. Ce mécanisme est coordonné par la protéine Pno1 qui est le partenaire de Nob1. Des informations détaillées sur l'architecture des particules pré-ribosomiques nous ont permis de mieux comprendre les différents intermédiaires de la biogénèse. Cependant, certains aspects fonctionnels comme la conformation adoptée par Nob1 pour assurer la coupure du site D du pré-18S restaient encore flous. L'objectif de mon travail a été de mieux comprendre les aspects très tardifs de la maturation cytoplasmique du ribosome. Pour ce faire, nous avons redéfini l'organisation modulaire de l'endonucléase Nob1 chez les eucaryotes pour ensuite étudier son mode d'interaction avec son partenaire Pno1. Des tests fonctionnels *in vitro* ont été effectués pour étudier le rôle de Pno1 dans la régulation de la coupure par Nob1.

Nos résultats nous ont permis de montrer que le domaine catalytique de Nob1 adopte une conformation atypique. En effet le domaine PIN est composé de deux fragments (résidus 1-104 and 230-255) séparés par une boucle interne qui est importante pour la reconnaissance avec son partenaire Pno1. Nos études nous ont également montré que Pno1 inhibe l'activité de Nob1 en reconnaissant directement l'ARNr substrat, masquant ainsi le site de coupure de l'endonucléase. Ces résultats sont complémentaires et cohérents avec les données structurales de cryo-EM de la particule pré-40S humaine récemment publiées. En effet, Nob1 est dans une conformation incompatible avec la coupure du pré-ARNr puisque son domaine catalytique se retrouve à une distance d'environ 30Å de son ARN substrat. Ce phénomène implique donc des changements de conformations ou encore la nécessité de protéine accessoire pour déplacer certains facteurs. La protéine Cinap est impliquée dans la maturation de l'ARNr 18S. Nos études d'interaction avec les protéines localisées au niveau de la plateforme (à savoir RPS14, RPS26, le complexe Nob1/Pno1) ont permis de montrer que Cinap pouvait former un complexe tripartite avec l'endonucléase Nob1 et son partenaire Pno1. De plus, Cinap est capable de reconnaître RPS26 dans un complexe RPS14-dépendant. Il est important de noter que RPS26 est un composant de la petite sous-unité qui remplace Pno1 dans le ribosome mature. De ce fait le recrutement de RPS26 au sein du pré-ribosome nécessite la dissociation de Pno1 et cet échange serait assuré par Cinap. Sur la base des travaux effectués, nous pouvons proposer un modèle de maturation où la formation du complexe Cinap/Pno1 induirait un changement de conformation permettant à Nob1 de reconnaître son substrat et donc de catalyser la coupure du site D qui aboutit à la maturation de l'ARNr 18S et donc à la production de la sous-unité 40S mature.

**Mots clés :** Biogénèse du ribosome, maturation de l'ARNr 18S, complexe Nob1/Pno1, clivage de l'extrémité 3' du pré-18S, interaction protéique