N°d'ordre NNT : 2016LYSE1087

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégractive et Cellulaire

Spécialité de doctorat : **Biologie**

Soutenue publiquement le 01/07/2016, par :

Florian Laforêts

Etude de la régulation de l'activité de la fibrillarine : rôles des modifications post-traductionnelles

---

Devant le jury composé de :

Mr le Dr. Jérôme Cavaillé, DR CNRS – LBME	Rapporteur
Mr le Pr. Bruno Charpentier, PU – ImoPa, Université de Nancy	Rapporteur
Mme la Dr. Françoise Jamen, MCU - Université Paris-Sud 11	Examinatrice
Mr le Dr. Alexandre David, CR INSERM - IGF	Examinateur
Mr le Pr. Serge Lebecque, PUPH – UCBL1	Président
Mr le Dr. Jean-Jacques Diaz, DR INSERM - CRCL	Directeur de thèse
Mr le Dr. Frédéric Catez, CR CNRS - CRCL	Co-directeur de thèse

Á mon Papa et ma Maman

« The only sovereign you can allow to rule you is reason.
[…] Faith and feelings are the darkness to reason's light. »
Terry Goodkind

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé en français :

Le ribosome est responsable de la traduction des ARNm en protéines. Au sein du ribosome, les ARN ribosomiques (ARNr) jouent un rôle central dans la traduction, et leurs modifications post-transcriptionnelles moduleraient l'activité traductionnelle du ribosome, impactant ainsi sur l'expression génique.

Les ARNr humains contiennent 106 2'-O-méthylations, ajoutées par la fibrillarine (FBL). FBL fonctionne au sein d'un complexe snoRNP contenant les protéines Nop56, Nop58, 15.5kDa et un petit ARN nucléolaire (snoARN) à boîtes C/D. La régulation de l'activité de FBL et du complexe snoRNP à boîtes C/D ne sont pas connus. Ce travail a exploité des données structurales de FBL et du complexe de méthylation pour construire un modèle permettant d'explorer ses relations structure-fonction. L'impact de l'acétylation de FBL a également été exploré. Le 5-fluorouracile (5-FU) est un analogue de l'uracile, dont la cytotoxicité dépend de son altération du métabolisme des ARN. Le 5-FU inhibe la maturation des ARNr et altère la localisation de plusieurs facteurs nucléolaires, dont FBL. Ce travail montre que le 5-FU induit une nouvelle acétylation de FBL en position K292. De plus, le 5-FU réduit l'association de FBL avec les membres protéiques du complexe de méthylation, et induit une baisse globale de ses interactions. De plus, ce travail propose un rôle nouveau de la déacétylase SIRT7 et de l'acétyl-transférase CBP sur le complexe de méthylation. Ces enzymes semblent aussi participer aux dérégulations du complexe de méthylation induites par le 5-FU. L'ensemble de ces résultats supportent l'implication des modifications post-traductionnelles dans la régulation du complexe de méthylation des ARNr.

Mots clés : fibrillarine, 2'-O-méthylation, ARNr, modifications post-traductionnelles, 5-fluorouracile, complexe snoRNP, biogenèse des ribosomes.

Abstract in English :

The ribosome is responsible for the translation of mRNA into proteins. Within the ribosome, ribosomal RNAs (rRNAs) play a crucial role in translation, and their post-transcriptional modifications regulate the ribosome's translational activity and impact on gene expression.

The human ribosome contains 106 2'-O-methylations added by fibrillarin (FBL). FBL functions through a box C/D snoRNP complex consisting of Nop56, Nop58 and 15.5kDa along with a box C/D small nucleolar RNA (snoRNA). The regulation of FBL and the C/D box snoRNP complexe are unknown. This work exploited strtuctural data on FBL and the methylation complex in order to build a model allowing the extrapolation of structure-function relationships. The impact of FBL acetylation was also investigated. 5-fluorouracil (5-FU) is an uracile analog, and its cytotoxicity depends mostly on its alteration of RNA metabolism. As such, 5-FU inhibits rRNA maturation and alters the localization of nucleolar factors such as FBL. 5-FU induced a novel FBL acetylation at position K292, decreased FBL interaction with the methylation complex proteins, and induced a large scale inhibition of its interactions. This work discovered a new role of the deacetylase SIRT7 and the acétyl-transférase CBP on snoRNP integrity. Moreover, this study suggests that these enzymes participate in the 5-FU-induced alteration of snoRNP. This work supports the involvement of post-translational modifications in the regulation of the rRNA C/D box snoRNP 2'-O-methylation complex.

Key words: fibrillarin, 2'-O-méthylation, rRNA, post-translational modifications, 5-fluorouracile, snoRNP complex, ribosome biogenesis.

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Messieurs Jérôme Cavaillé et Bruno Charpentier d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Alexandre David et Françoise Jamen d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examinateurs. Je remercie aussi Mathieu Gabut qui, avec Alexandre David, a fait partie de mon comité de suivi de thèse. Vos commentaires contructifs ont contribué au bon déroulement de mon projet scientitique. Je veux aussi remercier Serge Lebecque, qui m'a suivi dès mon entrée dans le monde de la recherche, dont l'enthousiasme a su me motiver, et qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de soutenance de thèse.

Je veux aussi, bien sûr, remercier Jean-Jacques Diaz et Frédéric Catez qui m'ont encadré pendant ces cinq années. Vous m'avez procuré un environnement de travail idéal sur le plan pédagogique, mais aussi humain et scientifique.

Frédéric, merci pour la patience et la pédagogie dont tu as fait preuve à mon égard. Les conseils techniques et scientifiques que tu m'as transmis ont largement contribué à me faire murir. Tu as su trouver le juste milieu entre un encadrant professionnel, et un chef amical, et cela a été fondamental pour me mettre à l'aise tout au long de mon passage dans l'équipe. Ce fût un réel plaisir de travailler avec toi, et j'espère sincèrement que nous aurons de nouveau l'opportunité de collaborer. Maintenant je ne manquerai pas d'aborder un problème scientique par « Bon, c'est quoi ma question là ? ».

Jean-Jacques, merci pour ces longues discussions de science. Ces moments de reflexion m'ont vraiment aidé à me remettre en question et à reconsidérer mon/mes projets. Je pense que cela a aussi considérablement contribué à me faire murir sur le plan scientifique. Outre ces discussions, je te remercie de l'ambiance que tu insulfes à l'équipe. Cela nous place dans une atmosphère humaine, où bien que l'on cherche à faire du bon travail, bien que l'on fasse partie de l'élite en quelque sorte, on en reste pas moins humble, et on ne se prend pas trop au sérieux. Je pense que cela est une différence fondamentale par rapport à d'autres chefs d'équipe, et qu'il s'agit d'une réelle qualité humaine. Merci encore.

Je remercie aussi tous les autres membres de mon équipe :

Virginie, pour ta bonne humeur infaillible, tes nombreux conseils de biologie moléculaire (combien de fois as-tu interrompu ta musique pour me répondre ? ^^).

Jenny, pour tes conseils de biochimie et les tips en général sur la conduite d'une thèse et ce qui vient après.

Hichem, merci d'avoir tant contribué à la bonne humeur et l'esprit détendu qui règne dans notre chère équipe. Merci de m'avoir aidé sur les très nombreuses manipes xCELLigence que j'ai menées il y a quelques temps déjà, et merci pour ton aide dès que j'avais un doute sur mes cellules.

Merci à Elise, pour ton enthousiasme et ton dynamisme. Tu es un élément moteur de notre équipe, et j'ai pris grand plaisir à partager labo et soirée avec toi au cours de cette dernière année. Merci aussi pour la superbe réalisation du film de thèse. Tu gères !

Merci à Flora, notre quôta ! Vous faites la paire avec Virginie, et je ne dis pas ça parce que vous travaillez sur le cancer du sein… Ta bonne humeur constante fait de toi une collègue avec qui il est très agréable de travailler. En plus tu es notre founirsseur officiel de gouter et autres sucreries ! Merci de contribuer à notre lutte contre l'hypoglycémie, et merci d'être toi-même :)

Nathalie, merci pour nos inombrables discussions hors norme, à la limite du raisonnable ! Je me suis bien marré avec toi, durant toutes ces soirées avec les différentes générations d'étudiants qui ont fait un bout de chemin avec nous. Merci pour ta bonne humeur et tes compliments sur mes tenues vestimentaires (ça a bien flatté mon égo ^^), et à bientôt pour de nouvelles anecdoctes croustillantes !

Merci à tous les stagiaires, ceux de passage et moins de passage, vous êtes trop nombreux pour tous vous nommer, mais vous avez joué un rôle non négligeable dans l'agréable atmosphère de travail qui règne au 4e étage du Cheney A ! En particulier, je tiens à remercier Anaïs, Pierro et Anouk qui ont participé à ce travail de thèse et avec qui j'ai beaucoup apprécié de travailler.

Je remercie également tous les membres de mon équipe que je n'ai pas nommés. Vous aussi vous êtes nombreux ! Votre aide durant les répétitions, réunions d'équipe ont clairement aidé à faire avancer mon projet. Merci à tous.

J'adresse aussi un grand merci aux anciens membres : Gabriel, Zeina, Sabine et Marie-Alexandra. Vous avez aussi, à vos manières, contribué à ma formation, et ce fut un plaisir de travailler avec vous.

J'aimerais également remercier l'ensemble de l'équipe de Mathieu Gabut. Notre coloc au 4e étage du Cheney A procure un cadre de travail très agréable et propice à la collaboration. Que rêver de mieux ? Je remercie en particulier Anne-Cécile pour tes conseils et nos discussions dans le bureau, mais aussi Nabila, Fleur, et Marion. Merci pour l'entre-aide naturel et votre contribution au bon déroulement de notre quotidien !

J'ai aussi une pensée pour mes cousins, Laurent et Simon. Les deux semaines, une au cours de la rédaction de ma thèse, et une au cours de la préparation de ma soutance, passées chez Sim ont été plus que bénéfiques et m'ont permis de travailler dans un cadre reposant. De plus, les week-ends tous les trois avec Laurent correspondaient juste à ce dont j'avais besoin à ces moments là. Merci les mecs !

Je remercie du fond du cœur les personnes qui ont partagé ma vie durant ces 5 années. Il n'y a bien sûr pas eu que des bons moments, et le soutien que vous m'avez fourni m'a permi de tenir le coup dans les instants difficiles. Merci encore.

En particulier, je remercie Linda. Lin, tu n'as pas eu de chance puisque que tu m'as rencontré au début de ma dernière année de thèse. Tu as subit à mes côtés le stress des deadlines, la pression de la rédaction, et la tension de la préparation de la soutenance. Merci pour la patience et la tolérance dont tu as fait preuve à mon égard. Je suis content de t'avoir à mes côtés. Merci, tout simplement ;-)

Enfin, je tiens bien entendu à remercier ma famille et tous les proches qui m'ont soutenu pendant cette aventure. En particulier mes parents. Papa, Maman, vous m'avez donné les moyens d'arriver jusque là. Vous n'avez jamais cessé de m'encourager, me motiver, me recentrer, et occasionnellement lorsque cela était nécessaire, vous avez su me rassurer. Votre soutien inestimable m'a poussé jusqu'ici, et continuera encore. Vous êtes loin de la fibrillarine et des ribosomes, pourtant ces travaux n'auraient pas existé sans vous. Je n'ai pas les mots pour exprimer toute l'étendue de ma reconnaissance. Je peux juste dire que cette thèse, c'est à vous que je la dédie. Je vous dois tout. Merci.

Florian.

A Lyon le 04/07/2016

Table des matières

Remerciements 8

Table des matières 11

Liste des sigles et abréviations 14

Liste des tableaux et figures 17

I. Introduction 19

I.1. Avant-propos 20

I.2. La Biogenèse des ribosomes 22

I.2.1. Le nucléole : site de la biogenèse des ribosomes 24

I.2.2. La synthèse des ARNr 27

I.2.3. La maturation des ARN ribosomiques 32

I.2.4. Biogenèse des ribosomes et cancer 41

I.3. Machinerie snoRNP des modifications post-transcriptionnelles des ARNr 45

I.3.1. Stratégies d'expression et biogenèse des snoARN 46

I.3.2. La machinerie de Pseudouridylation 47

I.3.3. La machinerie de 2'-O-méthylation 50

I.3.4. snoRNP et pathologies 67

I.4. Fibrillarine 73

I.4.1. Evolution et conservation de la fibrillarine 73

I.4.2. Le gène *fbl* 76

I.4.3. Structure de FBL 79

I.4.4. Modifications post-traductionnelles de FBL 83

I.4.5. Les différentes fonctions de la fibrillarine 86

I.4.6. Partenaires protéiques de la fibrillarine 89

I.4.7. Fibrillarine et Pathologies 95

I.5. Traduction et hétérogénéité des ribosomes 99

I.5.1. Structure des ribosomes et traduction 99

I.5.2. La régulation de la traduction 105

I.5.3. Régulation de l'initiation de la traduction 109

I.5.4. L'hétérogénéité des ribosomes 110

I.6. Les Cancers Colorectaux 119

I.6.1. Stades et classification 119
I.6.2. Génétique et développement du cancer colorectal 122
I.6.3. Thérapies des cancers colorectaux 128
I.6.4. Résistance aux thérapies 130
II. Résultats 134
II.1. Etude de la structure de la FBL humaine au sein du complexe snoRNP C/D 135
II.1.1. Conservation de la structure de FBL entre humain et archées 135
II.1.2. Etude du domaine catalytique 141
II.1.3. Etude du domaine de liaison à SAM 146
II.1.4. Etude du mutants Nop1.3 149
II.1.5. Quel est le rôle des modifications post-traductionnelles de la FBL dans le complexe de méthylation? 153
II.2. Validation d'un modèle expérimental pour l'étude de mutants ponctuels de FBL 157
II.3. Identification des modifications post-traductionnelles de la FBL humaine 161
II.3.1. Identification des MPT de FBL en 2D-western blot 161
II.3.2. Identification de MPT de FBL en spectrométrie de masse 168
II.3.3. Etude de la PARylation de la FBL 170
II.4. Impact du 5-fluorouracile sur l'acétylation de FBL 177
II.4.1. Caractérisation de la cytotoxicité du 5-FU sur les cellules HCT116 178
II.4.2. Le 5-FU altère la localisation de FBL dans le nucléole 180
II.4.3. Le 5-FU n'altère pas l'expression de FBL 185
II.4.4. Impact du 5-FU sur les modifications post-traductionnelles de FBL 185
II.4.5. Etude du rôle de la lysine K292 dans la régulation de FBL 189
II.4.6. Impact de l'induction de l'acétylation sur FBL 194
II.4.7. Impact de l'expression de FBL sur la cytotoxicité du 5-FU. 211
III. Discussion 217
III.1. Mise en place d'un modèle structural de la fibrillarine humaine 219
III.1.1. Conservation de la structure de FBL 219
III.1.2. Nouvelle carte linéaire de la structure de la FBL humaine 220
III.1.3. Proposition d'un mécanisme de transméthylation pour la FBL humaine 222
III.2. Régulation de la fibrillarine 224
III.2.1. Mise en place d'une modèle d'étude de FBL 224

III.2.2. Existence d'un rétrocontrôle négatif du niveau de fibrillarine cellulaire 225
III.2.3. Rôle de Nop56 dans la fonction de FBL..... 225
III.2.4. Les modifications post-traductionnelles de la fibrillarine..... 226
III.3. Impact de l'acétylation sur l'assemblage du complexe de méthylation. 229
III.3.1. Acétylation de FBL..... 229
III.3.2. Impact de SIRT7 et CBP sur l'assemblage du complexe de méthylation 230
III.4. Altération de la biogenèse des ribosomes et de la fonction de FBL par le 5-FU 232
III.4.1. Impact de FBL sur la cytotoxicité du 5-FU, et rôle dans l'altération de la maturation des ARNr 232
III.4.2. Impact du 5-FU sur l'acétylation et l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation..... 233
III.4.3. Causes et conséquence de la perte de l'assemblage de FBL sous 5-FU 234
III.5. Conclusion générale 236
IV. Matériel et Méthodes 238
V. Annexes..... 251
V.1. Mises au point et validations expérimentales..... 252
V.1.1. Validation de l'anticorps anti acK292-FBL..... 252
V.1.2. Mises au point de l'immunoprécipitation de FBL 254
Références Bibliographiques..... 259

Liste des sigles et abréviations

2’-O-me : 2’-O-méthylation

4E-BP : eIF4E-binding Protein

5-FU : 5-Fluorouracile

acK : acétyl-lysine

ADP : adenosine diphosphate

AF : Acide Folinique

AgNOR : Coloration a l’argent des NOR

Akt : protein kinase B

APC : Adenomatous Polyposis Coli

ARN BD : domaine de liaison à l’ARN

ARNm : ARN messager

ARN Pol : ARN polymérase

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

BOP1 : Block of Proliferation 1

BR : Biogenèse des Ribosomes

CBP : CREB-binding Protein

CDK : Cyclin-dependent Kinase

Cdc14B : Cell Division Control 14B

CHX : Cycloheximide

CIN : Chromosome Instability

CK2 : Casein Kinase 2

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CRC : Colorectal Cancer

CRCL : Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

CrPV : Cricket Paralysis Virus

Cryo-EM : Cryo-électromicroscopy

DC : Decoding Center

DKC : Dyskérine

DFC : Dense Fibrillar Component

DMSO : Diméthylulfoxyde

dox/doxy : Doxycycline

eIF : eukaryotic Initiation Factor

EGF : Epidermal Groth Factor

EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition

ETS : External Transcribed Spacer

FBL : Fibrillarine

FBLL1 : fibrillarin-like 1

FGF1/2 : Fibroblast Groth Factor 1/2

GAR : Glycine Arginine-rich (domain)

GC : Granular component

GTP : Glucose triphosphate

HAT : Histone acetyl-transferase

HDAC : Histone deacetylase

HDI : HDAC inhibitor

IF : Immunofluorescence

IGF1R : Inuline-like Growth Factor 1 Receptor

IHC : immunohistochimie

IP : immunoprécipitation

IPG : immobilized pH Gradient

IRES : Internal Ribosome Entry Site

INSERM : Institu National pour la Santé et la Recherche Médicale

ITAF : IRES *trans*-acting Factor

ITS : Internal Transcribed Spacer

hnRBP : Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins

k-turn : kink-turn

k-loop : kink-loop

LSU : Large sub-unit

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts

MMR : Mismatch Repair

MPT : Modification Post-traductionnelle

MSI : Microsatellite Instability

MTA : methythioadenosine

mTOR : mammalian Target Of Rapaycin

NaB : Sodium Butyrate

NAM : Nicotinamide

NHP2 : Non histone protein 2

NHP2L1 : Non histone protein 2-like 1

NOB1 : NIN1/RPN12 binding protein 1 homolog

NOR : Nucleolus Organizer Regions

NS5 : Non Structural Protein 5

ORF : Open Reading Frame

PABP : Poly-A Binding Protein

PAR : Poly(ADP-ribose)ylation

PARG : Poly(ADP-ribose) Gycohydrolase

PARP1 : Poly(ADP-ribose) Polymerase

PDB : Protein Data Bank

PES1 : Pescadillo ribosomal biogenesis factor 1

PI3K : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

pI : point isoélectrique

PIC : pre-initiation Complex

PIH1D1 : PIH1 Domain Containing 1

PIP_2 / PIP_3 : phosphatidyl-inositol-(3)4,5-phosphate

pRb : retinoblastoma protein

PTC : peptidyl-transferase center

PTRF : Polymerase I And Transcript Release Factor

PUA : pseudouridylase et archéosine transglycolase

PWS : Prader-Willi Syndrome

R+ : tampon de lyse Ripa +

R- : tampon de lyse Ripa -

RACK1 : Receptor for activated C kinase 1

RC : Tampon de lyse Ripa classique

RMSD : Root Mean Square Deviation

RPAP3 : NA polymerase II associated protein 3

RT-qPCR : Real-time quantitative Polymerase chain reaction

RuvBL : RuvB-like

SAH : S-adenosylhomocysteine

SAM : S-adenosyl-methionine

SAM BD : SAM binding domaine

SDS-PAGE : SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SF2A : Shigella flexneri 2a

SL1 : Selecivity Factor 1

SMN : Survival Motor Neurone

SN II : substitution nucléophile de type II

SSU : Small su-bunit

SU : sub-unit

SUMO : Small Ubiquitine-like MOdifier

sARN : small RNA

sRNP : small riboucleoproteic complex

snRNP : small nuclear ribonucleoproteic complex

snoARN : petit ARN nucléolaire

snoRNP : small nucleolar riboucleoproteic complex

TAF : TBP associated Factor

TBP : TATA-binding Protein

TFIII : Transcription Factor for polymérase III

TNM : Tumor Node Metastasis

TSA : Trichostatine A

TTF-I : Transcription Termination Factor

UBF : Upstream-binding Factor

UCE : Upstream Control Elements

UTR : untranslated region

VEGFA : Vascular Endothelial Growth Factor A

WB : Western Blot

WT : Wild-Type

ZNHIT3 : Zinc-finger HIT-type Containing 3

ψ : pseudouridylation

Liste des tableaux et figures

Figure 1 : Organisation des unités d'ADN ribosomiques et biogenèse des ribosomes - p 17

Figure 2 : Ultrastructure du nucléole d'une cellule HeLa - p19

Figure 3 : représentation schématique des voies de clivage des pré-ARN ribosomiques chez l'homme - p27

Figure 4 : Cartes 2D des modifications post-transcriptionnelles des ARNr humains – p31 et 32

Figure 5 : Les voies de signalisation dérégulées dans les cancers stimulent la synthèse des ARNr - p35

Figure 6 : Structure du snoARN et du snoRNP à boîtes H/ACA chez les eucaryotes - p41

Figure 7 : Organisation du snoARN et du snoRNP à boîtes C/D chez les eucaryotes et les archées - p43

Figure 8 : Structure des protéines du complexe snoRNP à boîtes C/D - p47

Figure 9 : Structure du complexe sRNP à boîtes C/D chez l'archae S. Solfataricus - p51

Figure 10 : Structure détaillée du complexe sRNP à boîtes C/D chez S. Solfataricus - p51

Figure 11 : Organisation du complexe sRNP à boîtes C/D archée selon Lapinaite et al. – p53

Figure 12 : Modifications post-traductionnelles et caractéristiques stucturales de la fibrillarine humaine - p67

Figure 13 : Structure et MPT de la fibillarine humaine - p71

Figure 14 : Structure du ribosome humain - p89

Figure 15 : Domaines du ribosome cléfs dans la traduction - p91

Figure 16 : Initiation Cap-dépendante de la traduction, chez les eucaryotes - p93

Figure 17 : Initiation IRES-dépendante de la traduction, avec des IRES cellulaires - p95

Figure 18 : Classification TNM des cancers colorectaux - p107

Figure 19 : L'expression de FBL est plus élevée dans des tumeurs du côlon que dans la muqueuse saine - p113

Figure 20 : La séquence de FBL est très conservée entre les archées et l'homme - p122

Figure 21 : Validation de l'outil d'alignement de PyMOL - p125

Figure 22 : Conservation de la structure tertiaire de FBL entre les archées et l'homme - p126

Figure 23 : Conservation de l'organisation du domaine catalytique de FBL entre les archées et l'homme - p128

Figure 24 : Modèle de réaction de transméthylation pour la FBL de S. Solfataricus - p130

Figure 25 : Conservation du domaine de liaison a SAM entre les archées et l'homme - p132

Figure 26 : Les résidus mutés dans le mutant Nop 1.3 sont localisés à l'interface avec Nop5 et proche de SAM - p135

Figure 27 : Positions des modifications post-traductionnelles de la FBL humaine au sein du complexe snoRNP à boîtes C/D - p138

Figure 28 : Validation du modèle cellulaire HCT116-flagsh-WT - p143

Figure 29 : L'identification du nombre d'isoformes de FBL en 2D-western blot est dépendante de la congélation de l'échantillon - p146

Figure 30 : Validation du signal FBL en 2D-western blot - p149

Figure 31 : La fibrillarine humaine porte plusieurs modifications post-traductionnelles conservées dans trois lignées cellulaires de cancers - p151

Figure 32 : Détection d'une phosphosérine en position 126 en spectrométrie de masse - p153
Figure 33 : Mise au point de l'induction de la PARylation par l'H2O2 - p155
Figure 34 : Identification d'une potentielle PARylation de FBL - p157
Figure 35 : Les mutants de PARylation s'assemblent au sein du complexe snoRNP C/D - p159
Figure 36 : Caractérisation de la réponse cellulaire de cellules HCT116 au 5-FU - p163
Figure 37 : Le 5-FU induit un changement de localisation nucléolaire de FBL - p165
Figure 38 : Le 5-FU induit un changement de localisation nucléolaire de la flag-FBL - p167
Figure 39 : Le 5-FU n'altère pas l'expression des membres du complexe snoRNP à boîtes C/D - p168
Figure 40 : Le 5-FU induit un changement de profil d'isoforme de FBL dans les cellules HeLa et MCF7 - p170
Figure 41 : Détection d'une nouvelle acétylation de lysine en position 292 induite par le 5-FU - p172
Figure 42 : Le résidu K292 n'est pas indispensable pour la stabilité et l'association de FBL dans le complexe de méthylation - p175
Figure 43 : Localisation des flag-FBL mutants - p177
Figure 44 : Induction de l'acétylation globale par des inhibiteurs de HDAC et impact sur l'expression et la localisation de FBL - p180
Figure 45 : impact des inhibiteurs de HDAC sur l'acétylation de FBL - p182
Figure 46 : impact des inhibiteurs de HDAC et du 5-FU sur l'acétylation de la flag-FBL et son assemblage dans le complexe snoRNP C/D - p184
Figure 47 : SIRT1 n'a pas d'effet détectable sur l'acétylation de la lysine 292 de FBL - p187
Figure 48 : impact des inhibiteurs de HDAC sur l'acétylation de la flag-FBL et son assemblage dans le complexe snoRNP C/D - p189
Figure 49 : impact des inhibiteurs de HDAC sur l'acétylation de la flag-FBL en immunoprécipitation - p191
Figure 50 : Mise au point de l'induction des shARN FBL à la doxycycline - p193
Figure 51 : Mesure de la prolifération cellulaire de HCT116-shFBL en temps réel en réponse au 5-FU - p195
Figure 52 : Domaines de la fibrillarine humaine et surfaces de contacts au sein du complexe snoRNP C/D -
Figure A1 : Validation de l'anticorps anti acétyl-K292-FBL – p231
Figure A2 : Mise au point de l'immunoprécipitation de FBL – p234
Tableau 1 : Les modifications post-transcriptionnelles des nucléotides des ARNr - p29
Tableau 2 : Partenaires protéiques de FBL chez la levure identifiés par Krogan et al. 2006 - p79
Tableau 3 : Partenaires protéiques de FBL chez la levure recensés la base de données BioGrid (www.thebiogrid.org) - p83
Tableau 4 : Classe de HDACs ciblées par les différents inhibiteurs de HDACs utilisés - p179

I.Introduction

I.1. Avant-propos

La traduction est une étape majeure de la régulation de l'expression des gènes, au cours de laquelle les ribosomes traduisent les ARN messagers (ARNm) en protéines. Cette étape de synthèse des protéines est régulée par des facteurs et des voies de signalisation, permettant à la cellule d'adapter sa production de protéines en fonction de son environnement. Ces dernières années, un nouveau concept émergent place le ribosome non plus comme un simple effecteur, mais comme un régulateur de la traduction, via une modulation de sa composition et de son activité intrinsèque. On ne considère ainsi plus le ribosome comme une entité de constitution unique, mais comme une population hétérogène qui peut être le support de fonctions spécialisées. Nous entrons sans aucun doute dans une nouvelle ère du ribosome où le challenge consiste à mieux comprendre le fonctionnement intime de cette machine moléculaire et comment le ribosome peut être le support de régulations du phénotype normal ou pathologique de la cellule. Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années aux changements de composition des ribosomes au cours de la tumorigenèse, et plus largement aux altérations de la biogenèse des ribosomes, qui mènent à la production de ribosomes différents dans les cellules cancéreuses.

Le ribosome est un ribozyme, c'est-à-dire que les principales activités telles que le décodage du code génétique et la synthèse de la liaison peptidique sont portées par les ARNr. De plus, un nombre grandissant d'études pointent vers un rôle crucial des modifications post-transcriptionnelles des ARN ribosomiques dans la modulation de l'activité de traduction des ribosomes. Néanmoins, aujourd'hui, le rôle de ces modifications et les mécanismes moléculaires qui les impliquent ne sont pas connus.

Parmi ces modifications, on retrouve des 2'-O-méthylations, des pseudouridylations, et des méthylations et acétylations de bases. La 2'-O-méthylation est la modification des ARNr les plus représentée et sont addition est catalysée par la seule méthyl-transférase des ARNr connue à ce jour : la fibrillarine (FBL). Des travaux récents de notre équipe suggèrent que FBL, via son activité méthyl-transférase des ARNr, est responsable d'une modulation de l'activité traductionnelle des ribosomes et d'une traduction sélective (Marcel et al. 2013 ; Erales et al.,

en préparation). En outre, nos travaux ainsi que les données de la littérature montrent que FBL est surexprimée dans les cancers et suggèrent que l'expression de FBL puisse être un nouveau marqueur pronostique de l'évolution de la pathologie. Finalement, plusieurs études rapportent que l'élévation d'expression de FBL s'accompagne d'une augmentation de la traduction de gènes impliqués dans la survie et le développement tumoral (Marcel et al. 2013; Koh et al. 2011; Choi et al. 2007; Su et al. 2013). L'activité biologique de FBL semble donc participer au contrôle du phénotype tumoral de la cellule.

Cependant, aujourd'hui les mécanismes qui régulent l'expression et l'activité de FBL ne sont pas connus. Dans notre équipe nous développons des approches pour étudier la régulation du gène *fbl* dans divers modèles tumoraux. Dans ce contexte, l'objectif premier de mon travail de thèse était d'étudier les mécanismes de régulation de l'activité de FBL, au niveau de la protéine, et en particulier d'explorer le rôle de ses modifications post-traductionnelles.

Des travaux récents de l'équipe portant sur des chimiothérapies utilisées dans le cancer du côlon (Thérizols et al., en préparation; Bash Imam et al., en révision) ont montré que le 5-fluorouracil (5-FU) induit une altération de la biogenèse des ribosomes, la production de ribosomes dont l'activité de traduction est modifiée et une modification de l'activité traductionnelle de la cellule. Ces travaux ont révélé une altération de FBL dans les cellules traitées au 5-FU. Ainsi, une partie de mon travail de thèse a consisté à étudier les modifications post-traductionnelles FBL dans les cellules traitées au 5-FU.

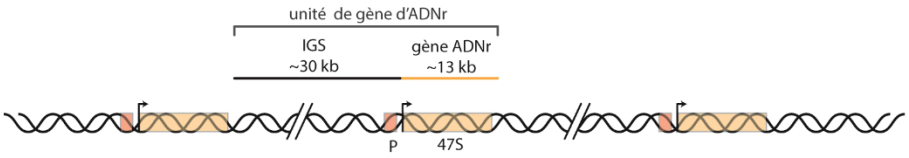
I.2. La Biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes est un processus complexe qui a lieu en grande partie dans le nucléole pour la cellule eucaryote. Elle donne lieu à la production des quatre ARN ribosomiques (ARNr) : 28S, 18S, 5.8S et 5S, assemblés à 80 protéines ribosomiques (PR), répartis en deux sous-unités (SU). Ce processus cellulaire implique l'activité des trois ARN polymérases, qui synthétisent les quatre ARNr, plus de 200 petits ARN nucléolaires (snoARN) (J. P. Bachellerie, Cavaillé, et Hüttenhofer 2002; Lestrade et Weber 2006a), ainsi que les ARNm codant pour les 80 protéines ribosomiques et plus de 300 facteurs protéiques (figure 1). Ces facteurs contribuent à la synthèse et à la maturation des ARNr, ainsi que leur assemblage progressif avec les protéines ribosomiques. Il s'agit donc d'un processus cellulaire majeur, qui consomme beaucoup d'énergie, et nécessite par conséquent d'être étroitement régulé.

Les ribosomes sont responsables de la traduction des ARNm en protéines. Cette synthèse protéique est cruciale pour la vie de la cellule et doit être adaptée au besoin de celle-ci. Pour cela la cellule doit adapter sa production de ribosomes. La biogenèse des ribosomes est ainsi régulée à plusieurs niveaux, notamment au niveau de la production et de la maturation des ARNr, et par de nombreuses voies de signalisation. De cette manière, des voies contrôlent la quantité des ribosomes produits en régulant la transcription par l'ARN Pol I, tandis que d'autres modulent la qualité de ces derniers notamment en altérant leur composition. Une telle altération survient notamment au niveau de changements de la composition en protéines ribosomique (paralogues ou différentes modifications post-traductionnelles), ainsi qu'au niveau des ARNr, via un changement du taux de modifications post-transcriptionnelles.

L'objectif de ce chapitre est de donner une vision globale de la biogenèse des ribosomes, en développant particulièrement la production d'ARNr matures ; et de mettre en évidences que la production de ces derniers est une étape clé dans la production d'une population de ribosomes hétérogène.

A



B

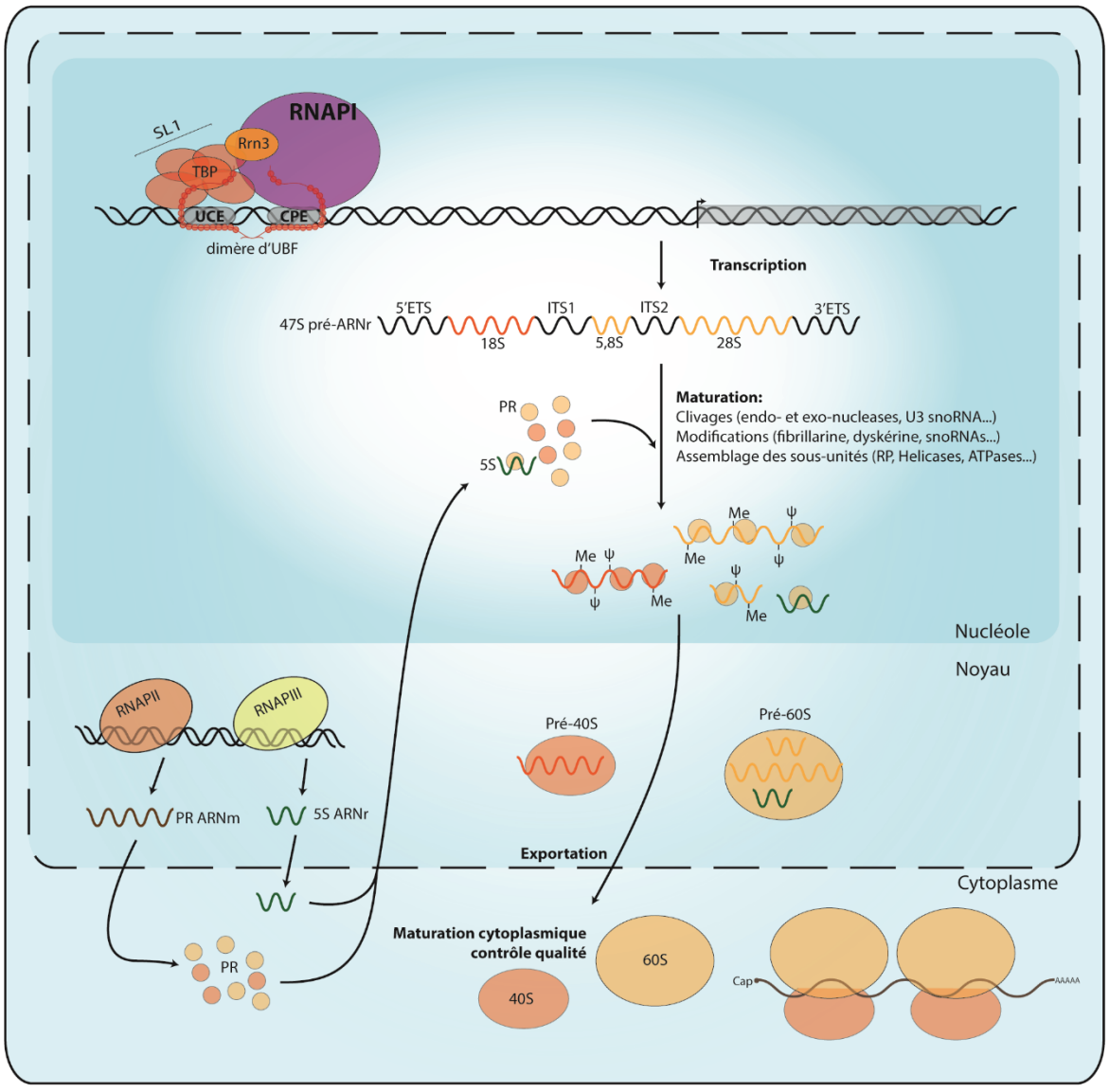


Figure 1 : Organisation des unités d'ADN ribosomiques et biogenèse des ribosomes

A, repésentation schématique de l'organisation des unités d'ADNr. Chaque unité contient la séquence du pré-ARNr 47S (47S), ainsi que le promoteur (P) en amont, et ces séquences sont séparées les unes des autres par une région intergénique (IGS) mesurant environ 30 kpb.

B, représentation schématique de la biognèse des ribosomes. Dans le nucléole, l'ADNr est transcrit par l'ARN Pol I et résulte en un pré-ARNr 47S. Celui-ci est ensuite clivé, résultant en les ARNr 28S, 18S et 5.8S, qui sont modifiés chimiquement et progressivement assemblés aux protéines ribosomiques. En parallèle, les ARN Pol III et II transcrivent respectivement l'ARN 5S et les ARNm codant pour les protéines ribosomiques . Une fois traduites les protéines ribosomiques sont importées dans le noyau et s'assemblent aux pré-ARNr. La finalisation de cet assemblage à lieu dans le cytoplasme résultant en les deux sous-unités matures du ribosome : la sous-unité 40S et la sous-unité 60S

Adapté de Thérizols G, Laforets F et al., 2015

I.2.1. Le nucléole : site de la biogenèse des ribosomes

Le nucléole est un domaine nucléaire visible en microscopie optique du fait de sa taille et de sa densité. Il se forme autour des 5 loci chromosomiques contenant les gènes d'ADNr, et appelés NORs (Nucleolus Organiser Regions) (Mosgoeller 2004). Ces gènes sont positionnés sur les chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21, et 22, et sont répétés en tandem avec environ 400 copies chez l'homme. L'assemblage des nucléoles a lieu autour de ces chromosomes. En particulier, l'assemblage commence dès la transcription des ADNr, et cause la rétention de facteurs nucléolaires par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine et ARN-protéine (Dundr et al. 2002; Phair et Misteli 2000; Shevtsov et Dundr 2011). Le regroupement de facteurs autour de la synthèse des ARNr et de leur maturation, donne lieu à un domaine nucléaire très dense. Le nucléole n'existe que tant que la synthèse des ARNr a lieu, et se désagrège lorsque celle-ci s'arrête. Il se désagrège notamment lors de la mitose, ou lors de l'inhibition spécifique de l'ARN Pol I par traitement, par exemple, à l'actinomycine D (Boisvert et al. 2007).

Le nucléole est composé de trois domaines distincts et observables en microscopie électronique: le composant granulaire (GC), le composant fibrillaire dense (DFC), et le centre fibrillaire (FC), détaillés dans la figure 2. Les principales étapes de la biogenèse des ribosomes ont été associées à ces trois régions du nucléole, grâce à diverses approches, dont la microscopie électronique, et grâce à la localisation de différents facteurs de la biogenèse des ribosomes (figure 2).

Bien qu'étant le lieu de la biogenèse des ribosomes, le nucléole a été associé à plusieurs fonctions. Ainsi, il est lié à plusieurs fonctions extra-ribosomiques, en particulier dans la régulation de la maturation et l'export d'ARNm et d'ARN de transfert (ARNt), ainsi que dans la réplication et la réparation de l'ADN (T. Pederson 1998; Thoru Pederson 2011). Cette plurifonctionnalité du nucléole est notamment soutenue par deux études de notre équipe décrivant le protéome du nucléole. Ces travaux soulignent la présence de protéines impliquées dans d'autres processus tel que le cycle cellulaire (Couté et al. 2006; Scherl et al. 2002). En outre, le nucléole est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose via la régulation de l'induction de p53 en cas de stress, permettant une réponse cellulaire appropriée (Boulon et al. 2010). Ces stress, appelés stress nucléolaires ou stress ribosomiques, permettent notamment de coordonner la production de ribosomes avec

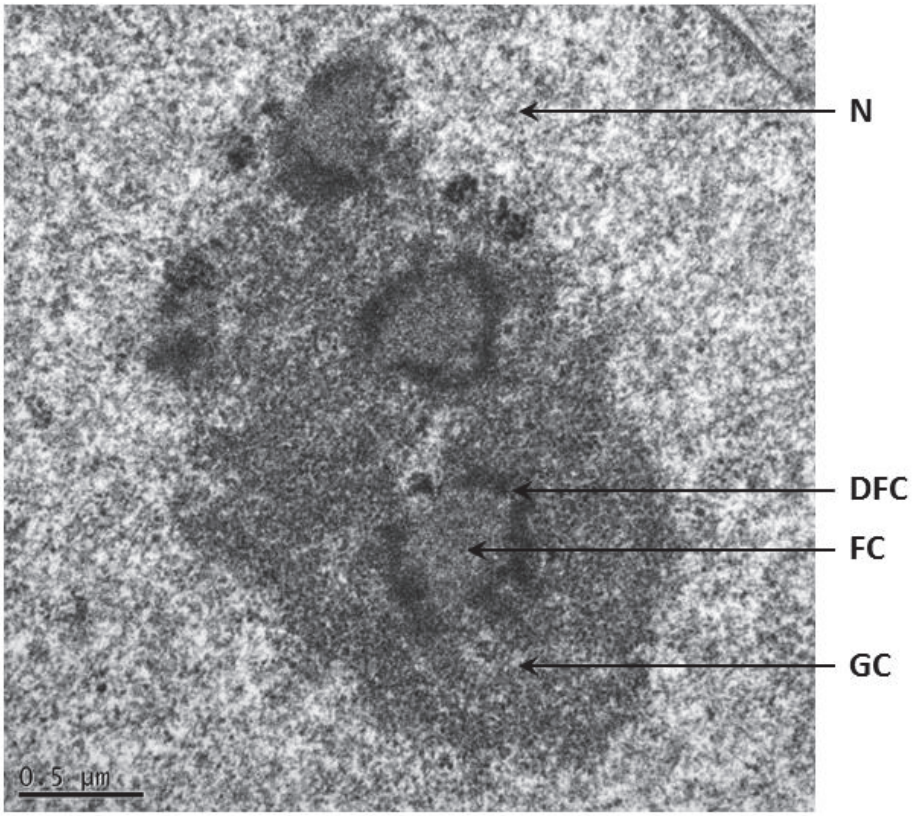


Figure 2 : Ultrastructure du nucléole d'une cellule HeLa

Le nucléole est composé de trois domaines ultra-structuraux distincts et observables en microscopie électronique: le composant granulaire (GC), le composant fibrillaire dense (DFC), et le centre fibrillaire (FC). Le FC forme une zone peu dense aux électrons, de forme globalement ronde, dans laquelle on retrouve les régions promotrices des gènes d'ADNr. Le DFC, entour le FC et présente une structure très dense aux électrons. Les grandes étapes de la biogenèse des ribosomes ont été associées aux trois régions du nucléole. l'ARN Pol I est localisée dans le FC, tandis que les protéines FBL et dyskérine, responsables des modifications post-transcriptionnelles des ARNr sont localisées dans le DFC. Ainsi, il est admis que la transcription des ADNr à lieu à l'interface du FC et du DFC, tandis que les premières étapes de la maturation des pré-ARNr se déroulent dans le DFC. Enfin, le GC généralement englobe les FC et DFC, et représente la majeure partie du nucléole. Dans le GC se déroulent les étapes d'assemblage des particules pré-ribosomiques qui sont responsables de l'aspect granulaire du GC. N, nucléoplasme.

d'autre processus, tels que le cycle cellulaire, l'apoptose ou la survie (Grummt 2013; James et al. 2014; R. Y. L. Tsai et Pederson 2014).

Dans les cellules tumorales, il a très tôt été observé que les nucléoles sont plus nombreux et présentent un volume plus important que dans les cellules saines (Pianese 1896). Depuis, la morphologie des nucléoles, mise en évidence par le marquage des nucléoles à l'argent (AgNOR), est utilisée par les anatomopathologistes pour évaluer l'agressivité de la tumeur au cours du diagnostic des patients atteints de cancer. En effet, dans les cancers, les altérations du nombre et de la taille des nucléoles sont associées aux tumeurs plus agressives et de moins bon pronostic (Derenzini, Montanaro, et Treré 2009).

I.2.2. La synthèse des ARNr

I.2.2.1. Mécanismes de la transcription des ADNr

Les ADNr sont organisés en séquences répétées, et comptent environ 400 copies chez l'homme. Chaque unité d'ADNr contient la séquence d'un ARNr précurseur 47S (pré-ARNr 47S), comprenant les régions correspondant aux ARNr 28S, 18S, et 5.8S, ainsi qu'une région intergénique (IGS). La région correspondant au précurseur 47S contient 14kb tandis que la région IGS mesure 30kb. La région génique est bordée par les séquences transcrites externes 5' et 3' (5'ETS et 3'ETS), et en son sein, chaque séquence d'ARNr est séparée par les séquences transcrites internes 1 et 2 (ITS1 et ITS2). En amont de la région transcrite, le promoteur de l'ADNr contient les éléments UCE (Upstream Control element) et CPE (Core Promoter Element) (Raška et al. 2004) (figure 1A).

L'ARN Polymérase I (ARN Pol I) est un complexe constitué de 14 sous-unités, dont la structure cristalline a été résolue chez la levure (Engel et al. 2013). L'initiation de la transcription par l'ARN Pol I commence par la fixation d'UBF (Upstream Binding Factor) et de SL1 (Selectivity Factor 1) sur le promoteur de l'ADNr (figure 1B). UBF forme un homodimère qui reconnait les éléments UCE et CPE formant ainsi une boucle à ADN (enhanceosome), et rapprochant ces deux composants du promoteur (Stefanovsky et al. 2001). SL1 est un complexe constitué de TBP (TATA binding protein) ainsi que cinq TAFs (TBP Associated Factors), qui interagit le promoteur, ainsi qu'avec le dimère d'UBF (Friedrich et al. 2005). Le complexe UBF/SL1 permet le recrutement de l'ARN Pol I au promoteur des ADNr. Cet

assemblage est permis par le facteur Rrn3 qui recrute la polymérase au niveau de SL1 (J. Russell et Zomerdijk 2005; Miller et al. 2001, 3) (figure 1B). Ce recrutement marque l'initiation de la transcription, et une fois effectué, la phase d'élongation s'effectue. Lors de l'élongation Rrn3 se dissocie du complexe ARN Pol I tandis qu'UBF et SL1 sont susceptibles de rester associés au promoteur, permettant ainsi le recrutement d'une autre ARN Pol I. Cette optimisation de la transcription donne lieu à une très grande densité de polymérases et donc d'ARNr en cours de synthèse sur chaque copie d'ADNr. Il résulte de cette densité des structures caractéristiques en forme de "sapin de Noël", visibles en microscopie électronique. Enfin, la terminaison de la transcription est marquée par le décrochage de l'ARN Pol I de l'ADN par les facteurs TTF-I (Transcription Terminaison Factor) et PTRF (Pol-I Transcript-Release Factor) au niveau d'un élément de séquence localisé en 3' de l'ADNr.

L'ARNr 5S n'est pas synthétisé dans le nucléole, mais dans un compartiment périnucléolaire par l'ARN Pol III (Information et al. 1995) (figure 1B). Les clusters de gènes ARNr 5S sont localisés principalement sur le chromosome 1 chez l'homme, avec 100 à 150 répétitions (Steffensen et al. 1975; Steffensen et al. 1977). D'autre copies du gène de l'ARNr 5S sont localisées dans un plus petit cluster contenant 5 à 10 copies, et autrement dispersées dans l'ensemble du génome (200 à 300 copies) (Sørensen et al. 1991; Sørensen et Frederiksen 1991). En bref, l'initiation de la transcription de l'ADNr 5S a lieu via le recrutement de l'ARN Pol III par TFIIIB (Transcription Factor for polymérase III B), et nécessite également l'assemblage des facteurs TFIIIA, TFIIIC2, et TFIIIC1 (Oettel et al. 1997).

I.2.2.2. Régulation de la transcription des ADNr

La régulation de la synthèse des ANRr est primordiale dans le contrôle de la production de ribosomes. La transcription des ADNr par l'ARN Pol I constitue donc une cible majeure des voies permettant la régulation quantitative de la biogenèse des ribosomes. Ces régulations permettent de coordonner la synthèse des ARNr en réponse à plusieurs voies de signalisation, régulant des processus cellulaires tels que la prolifération ou la disponibilité en nutriments. Ce contrôle s'effectue à la fois par une modulation du nombre de loci d'ADNr actifs (via des modifications épigénétiques), et par modulation de la quantité et des modifications post-

traductionnelles (MPT) des composants protéiques de la machinerie de transcription, en particulier UBF et SL1.

En effet, la diminution de l'expression d'UBF résulte en une baisse de la synthèse d'ARNr, tandis qu'une surexpression suffit à augmenter le recrutement de l'ARN Pol I sur les ADNr (R. Huang et al. 2002). De même, TBP, sous-unité de SL1, est surexprimée lorsque la voie des MAPK est induite, augmentant le recrutement de l'ARN Pol I (Zhong, Zhang, et Johnson 2004). Les quantités disponibles d'UBF et SL1 sont donc directement liées au taux de transcription par l'ARN Pol I. D'autre part, les modifications post-traductionnelles des composants de la machinerie de transcription constituent aussi une voie de régulation de la synthèse des ARNr. En particulier, la phosphorylation et l'acétylation d'UBF à plusieurs sites améliorent son interaction avec l'ARN Pol I et facilitent la synthèse des ARNr (Meraner et al. 2006). A l'inverse, la phosphorylation de SL1 inhibe son interaction avec UBF, empêchant le recrutement de l'ARN Pol I.

Par ailleurs, la transcription par l'ARN Pol I est contrôlée par l'accessibilité des loci d'ADNr. Cette accessibilité est modulée par des mécanismes épigénétiques, régulant la condensation de la chromatine aux loci d'intérêt. Ainsi, un locus d'ADNr actif est caractérisé par une chromatine ouverte, avec une faible densité en nucléosome, une hypométhylation de l'ADN, une acétylation de l'histone H4 en position K16, et une di-méthylation de l'histone H3 en position K4. A l'inverse, un locus inactif est caractérisé par une chromatine condensée, des nucléosomes espacés de manière régulière, une hyperméthylation de l'ADN, une faible acétylation de l'histone H4 et des tri-méthylations de lysines de l'histone H3 aux positions K9, K20 et K27. Ces modifications chimiques impliquent donc la participation d'ADN et d'histones méthyl-transférases ainsi que d'histones acétyl-transférases. Ces processus nécessitent aussi l'intervention d'autres facteurs tels que des hélicases et des facteurs du remodelage de la chromatine. Certains de ces facteurs ont une spécificité liée au promoteur de l'ADNr. C'est le cas de la nucléoline, qui permet le remodelage de la chromatine au niveau de ces loci, régulant l'accès de la machinerie de transcription. En particulier, la nucléoline est responsable de la décondensation de l'hétérochromatine en euchromatine, résultant en une accumulation d'ARN Pol I (Cong et al. 2012). La nucléoline possède une activité de remodelage de la chromatine (Angelov et al. 2006; Mongelard et Bouvet 2007) et facilite la transcription des ADNr (Durut et Sáez-Vásquez 2015). Ce rôle de la nucléoline est particulièrement intéressant

puisque cette protéine possède aussi un rôle dans la maturation des ARNr et leur assemblage aux protéines ribosomiques (Berger, Gaume, et Bouvet 2015; Hervé Ginisty, Amalric, et Bouvet 1998; H. Ginisty et al. 1999). Cela indique vraisemblablement une coordination entre synthèse et maturation des ARNr (Durut et Sáez-Vásquez 2015). Par ailleurs, Une étude récente montre une nouvelle modification de la chromatine : la méthylation de glutamine 104 de l'histone H2A. De façon inattendue, cette MPT est catalysée par la FBL. La méthylation de H2AQ104 est spécifique des loci d'ADNr, et inhibe l'association du complexe FACT avec la chromatine. L'activité de ce complexe dans le remodelage de la chromatine est bien connue, et par un mécanisme encore peu éclairci, la méthylation en H2AQ104 faciliterait le passage de l'ARN Pol I, régulant ainsi positivement la synthèse des ARNr (Tessarz et al. 2014). La participation de FBL et de la nucléoline à la fois à la régulation de la synthèse des ARNr et à leur maturation renforce le concept d'une coordination entre ces deux étapes de la biogenèse des ribosomes, et suggère que plusieurs facteurs multifonctionnels permettent cette co-régulation.

Puisque la biogenèse des ribosomes s'adapte en fonction de la demande en synthèse protéique de la cellule, différentes voies de signalisation sont activées selon les besoins en croissance, prolifération et en réponse aux conditions de stress. L'activation des voies par des signaux intra ou extracellulaires permet de réguler quantitativement la production d'ARNr et de ribosomes. Les voies mitogéniques contribuent en particulier à activer la machinerie de transcription de l'ARN Pol I (Drygin, Rice, et Grummt 2010). Les MPT de composants de la machinerie de transcription varient donc au cours du cycle cellulaire : par exemple, UBF est acétylé au cours de la phase S mais pas au cours de la phase G1, et cette acétylation a un impact positif sur son interaction avec l'ARN Pol I (Meraner et al. 2006). UBF est aussi phosphorylé à plusieurs sites par des kinases dépendantes de cyclines (CDK), notamment CDK2/Cycline A, au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire, durant lesquelles la synthèse d'ARNr est maximale. En revanche, dans des cellules quiescentes, UBF est hypophosphorylé (Voit et al. 1992; O'Mahony et al. 1992). Au cours de la mitose, SL1 est phosphorylé par CDK1/Cycline B, inhibant ainsi son interaction avec UBF et bloquant la transcription par l'ARN Pol I. Ce processus est inversé par la déphosphorylation de SL1 par Cdc14B à la fin de la mitose (Heix et al. 1998).

Par ailleurs, la transcription par l'ARN Pol I est activée par des facteurs de croissance, et réprimée lorsque la croissance est ralentie, lors de la privation de nutriments ou dans des conditions de stress oxydatif et d'inhibition de la synthèse protéique. La voie PI3K/Akt-mTOR, par exemple, s'active en réponse aux variations de la disponibilité des nutriments, et aux signaux mitogéniques : mTOR augmente la transcription par l'ARN Pol I en induisant l'activité de Rrn3 (par phosphorylation et déphosphorylation au site S44 et S199, respectivement) (Christine Mayer et al. 2004), et en phosphorylant UBF. Ces MPT facilitent l'assemblage de la machinerie de transcription et augmentent la transcription par l'ARN Pol I (Hannan et al. 2003). mTOR active aussi la transcription par les ARN pol II et III, induisant l'expression de gènes codant les protéines ribosomiques et l'ARNr 5S, respectivement (C. Mayer et Grummt 2006). D'autres part, la voie mitogénique Ras/Raf induit la phosphorylation d'UBF par ERK, facilitant leur interaction avec l'ADNr et induisant le recrutement de l'ARN Pol I (figure 5). La Caséine kinase 2 (CK2), active les voies Ras/Raf et PI3K/Akt-mTOR, et active en plus directement la biogenèse des ribosomes en régulant la localisation nucléolaire d'UBF, Rrn3 et SL1 par phosphorylation, facilitant leurs interactions au sein la machinerie de transcription ARN Pol I, et augmentant ainsi la synthèse des ARNr (Bierhoff et al. 2008; C.-Y. Lin et al. 2006; Louvet et al. 2006; Panova et al. 2006).

La croissance et la prolifération sont aussi contrôlées par c-Myc, qui active la biogenèse des ribosomes, essentiellement via son activité de régulation des ARN polymérases, stimulant la transcription de gènes codant des protéines promouvant le cycle cellulaire (Oskarsson et Trumpp 2005). Mais c-Myc a aussi une activité directement liée à la biogenèse des ribosomes : elle se lie aux ADNr via les éléments de séquence spécifiques des ADNr, interagit avec SL1 (figure 5), et induit l'acétylation d'histones aux locus d'ADNr, facilitant la transcription par l'ARN Pol I (Arabi et al. 2005; Dai et Lu 2008; Grandori et al. 2005). Par ailleurs, c-Myc régule la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines ribosomiques ou des facteurs de la biogenèse des ribosomes (Boon et al. 2001; Schlosser et al. 2003).

Ce lien entre les protéines contrôlant des processus majeurs comme la prolifération est renforcé par le rôle répresseur de p53 dans la biogenèse des ribosomes (Carson et Lois 1995; Sigal et Rotter 2000; « p53 Represses Ribosomal Gene Transcription » 1999). En effet, l'interaction directe de p53 avec TBP et le facteur TAF_I110 (sous-unité de SL1), inhibe la fixation de SL1 sur le promoteur de l'ADNr (figure 5). Par ailleurs, notre équipe a montré que

p53 est un répresseur transcriptionnel de *fbl*, responsable de la méthylation des ARNr et de l'histone H2A (Tessarz et al. 2014). Ainsi, p53, en contrôlant la transcription de *fbl,* peut aussi jouer un rôle régulateur à plusieurs niveaux de la biogenèse des ribosomes. D'autre part, pRb, impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, se fixe à UBF et est responsable de sa séparation de l'ADNr (figure 5), bloquant ainsi la transcription par l'ARN Pol I et la biogenèse des ribosomes. Un autre répresseur de la biogenèse des ribosomes, ARF, diminue la phosphorylation d'UBF, inhibant ainsi son interaction avec l'ADNr (Olivier Ayrault et al. 2004; O. Ayrault et al. 2006).

Enfin, B23, aussi appelé nucléophosmine, possède plusieurs activités, induisant la biogenèse des ribosomes à plusieurs niveaux. Cette protéine porte notamment une activité de chaperon d'histones : elle est associée à la chromatine au niveau des locus d'ADNr et facilite la transcription par l'ARN Pol I (Murano et al. 2008).

Cependant, prenant en compte que la cellule comprend environ 400 copies d'ADNr, nous ignorons toujours comment les loci actifs sont sélectionnés. Cette question est particulièrement importante, car des polymorphismes ou variations de séquences ont été observés dans les différentes séquences codantes et promotrices d'ADNr, et certains ADNr sont exprimés de manière tissu-spécifique (Caburet et al. 2005; L. H. Qu, Nicoloso, et Bachellerie 1991; Tseng et al. 2008). Une telle différence peut donner lieu à une population d'ARNr hétérogènes, et donc des ribosomes hétérogènes. Les conséquences d'une telle hétérogénéité sur l'activité traductionnelle des ribosomes et la synthèse protéique sont aujourd'hui peu connues, et sont discutées dans la partie « Hétérogénéité des Ribosomes et traduction ».

I.2.3. La maturation des ARN ribosomiques

La maturation des ARNr est initiée dès l'étape de synthèse du pré-ARNr 47S, via sa prise en charge par les facteurs de maturation. Il s'en suit une succession de coupures, repliements, modifications post-transcriptionnelles, et l'assemblage progressif avec les protéines ribosomiques (PR) (figure 1B). Tandis que le déroulement global de ce processus complexe est aujourd'hui bien connu, les mécanismes précis de maturation et leur coordination restent encore mal compris.

I.2.3.1. Les coupures des pré-ARNr

Le pré-ARNr 47S contient les séquences des ARNr 28S, 18S, et 5.8S. C'est donc à partir de ce précurseur, et via une succession de coupures endo- et exo-nucléasiques, que les ARNr sont produits (figure 3). Le pré-ARNr 47S humain comprend 12 sites de coupures recensés (Mullineux et Lafontaine 2012). Il est d'abord coupé aux extrémités, donnant ainsi le pré-ARNr 45S. Celui-ci peut alors suivre deux séquences de coupures différentes (voies 1 et 2), ne générant donc pas les mêmes intermédiaires de maturation, mais aboutissant aux mêmes ARNr matures (figure 3). L'orientation de la maturation des pré-ARNr via la voie 1 ou la voie 2 est différente d'une espèce à l'autre, d'un tissu à l'autre, entre différents types cellulaires, au cours du développement ou dans certaines pathologies (Belin et al. 2009). Ce niveau de variation indique que la biogenèse des ribosomes peut être modulée ou altérée au cours de la maturation des ARNr. Les conséquences de tels changements sur la fonction des ribosomes ne sont pas encore connues.

Au cours de la maturation selon la voie 1, le pré-ARNr 45S subit d'abord une coupure au site A0 dans la région 5'ETS, puis au site 1 ; tandis qu'au cours de la voie 2 : la première coupure du pré-ARNr 45S a lieu au site 2 dans la région ITS1 (figure 3). Cette coupure est importante car elle permet la séparation de la particule pré-ribosomique 90S en pré-60S et pré-40S, une étape clé de la biogenèse des ribosomes. Les deux pré-sous-unités suivent ensuite des voies de maturations distinctes (figure 3).

Plusieurs endo- et exonucléases sont impliquées dans la maturation des ARNr, agissant en coopération d'autres facteurs, dont des hélicases (Henras et al. 2008; Mullineux et Lafontaine 2012). De même, plusieurs snoARN (petits ARN nucléolaires) sont impliqués dans la maturation des ARNr en guidant le clivage aux sites appropriés (Enright et al. 1996; Michot et al. 1999; B. Peculis 1997; B. A. Peculis et Steitz 1993; K. T. Tycowski, Shu, et Steitz 1994). Parmi les snoARN impliqués dans le clivage, U3 est l'un des plus étudiés et des plus abondants. U3 est un snoARN à boîtes C/D, qui n'est pas nécessaire à la méthylation des ARNr mais qui est requis pour le clivage à plusieurs sites (Borovjagin et Gerbi 1999; Kass et al. 1990; Savino et Gerbi 1990). Il a été rapporté que chez l'homme, U3 interagit avec le pré-ARNr au niveau de la région 5'ETS, en aval du site 1 (Maser et Calvet 1989). U3 est un snoARN C/D atypique

possédant deux domaines fonctionnels (I et II), et chaque domaine serait spécifiquement impliqué dans un ou deux clivage(s). En effet, la délétion du domaine I

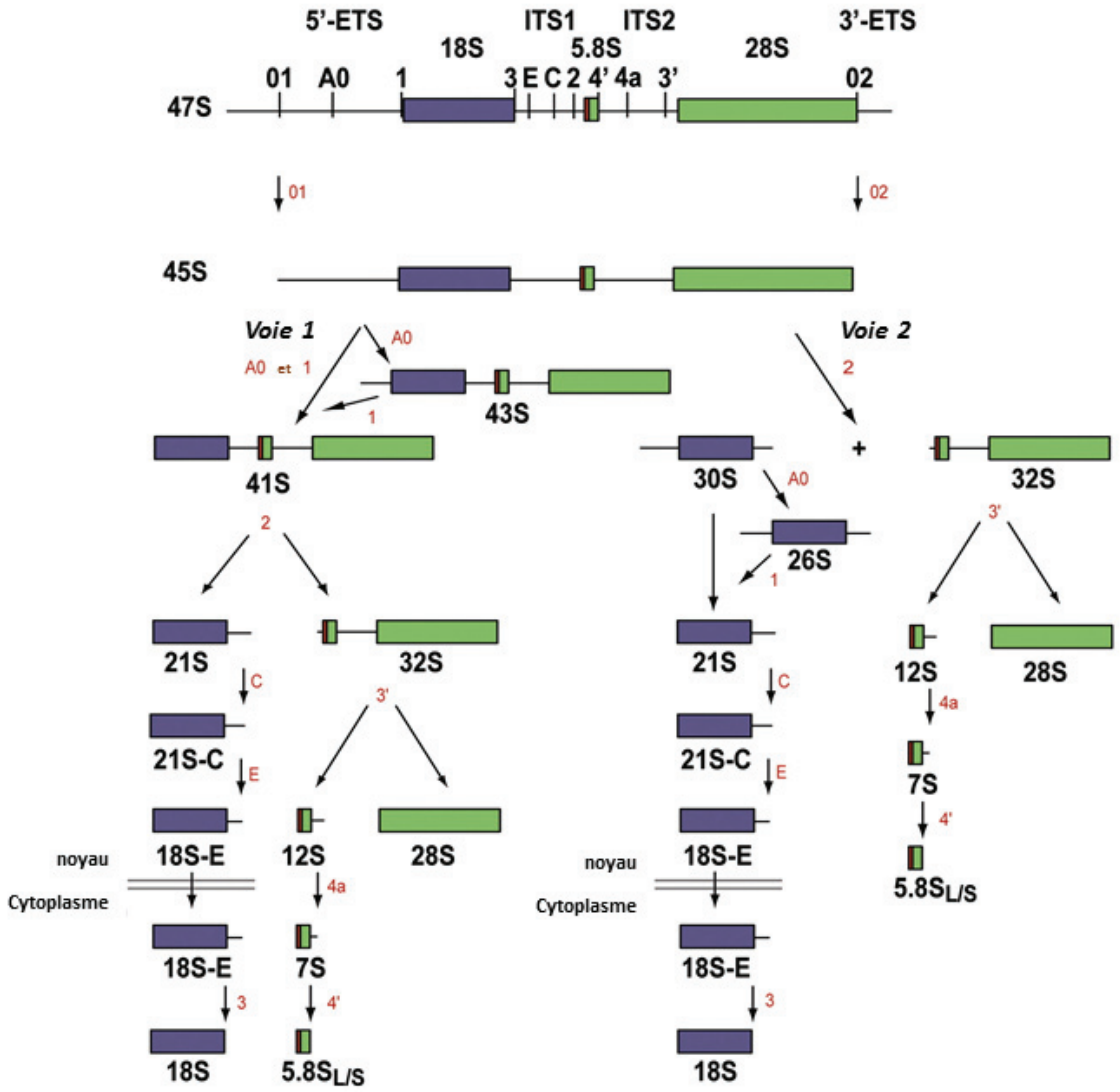


Figure 3 : représentation schématique des voies de clivage des pré-ARN ribosomiques chez l'homme
Le pré-ARN 47S synthétisé par l'ARN Pol I est rapidement clivé aux sites 01 et 02, résultant en un pré-ARNr 45S. Selon la voie 1 le 45S est d'abord coupé au site 1, puis au site 2, tandis que selon la voie 2, il est d'abord coupé au site 2. Plusieurs coupures endo et exonudéasiques permettent de produire les séquences finales des ARNr 28S, 18S et 5,8S .
Adapté de Mullineux et Lafontaine, 2012

conduit à une baisse des clivages aux sites 1 et 2, tandis que la délétion du domaine II conduit à une diminution de la coupure au site 3. Il a été suggéré qu'U3 participerait à l'orientation de la maturation des pré-ARNr vers les voie 1 ou 2 en se positionnant de manière différentielle sur le pré-ARNr 45S, interagissant soit via son domaine I soit via son domaine II (Borovjagin et Gerbi 1999). Par ailleurs, il a récemment été montré que le complexe snoRNP U3 est régulé par l'acétylation d'un de ses composants, U3-55k, et qu'une telle acétylation inhibe le clivage des ARNr, réduisant la production de 18S et de 28S. Cette acétylation est hydrolysée par SIRT7, une déacétylase de la famille des sitruin, dont l'activité sur la biogenèse de ribosome est bien documentée (W. Kim et Kim 2013). Les auteurs montrent que SIRT7 est requise pour la maturation des ARNr, via son activité régulation du complexe U3 (S. Chen et al. 2016). A ce stade, il est intéressant de noter, qu'U3 forme un complexe ribonucléoprotéique incluant la FBL, qui participe ainsi à la coupure des pré-ARNr (voir également le chapitre « Fibrillarine »).

I.2.3.2. Modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Au cours de leur maturation, et simultanément aux étapes de clivage et de leur assemblage avec les protéines ribosomiques, les pré-ARNr (excepté le 5S) subissent plusieurs types de modifications post-transcriptionnelles (figures 4A et 4B). Chez l'homme on compte à ce jour 10 méthylations de bases, 5 localisées sur la grande sous-unité (LSU) et 5 sur la petite sous-unité (SSU), dont 7 sont conservées chez la levure, et 2 acétylations également conservées chez la levure (Piekna-Przybylska, Decatur, et Fournier 2008; S. Sharma et Lafontaine 2015), localisées sur la SSU. Plus précisément, les méthylations de bases sont effectuées aux positions 1, 3 ou 5 sur les cycles pyrimidines, et aux positions 1, 6 ou 7 sur les cycles purines. Le cycle pyrimidine peut aussi être amino-carboxypropylé en position 3 et acétylé en position 4. On retrouve ainsi dans la SSU une uridine portant trois modifications ($m^1acp^3\ \psi$), une N^7-méthyl-guanosine (m^7G), une N^6-méthyl-adénosine (m^6A), deux cytosines acétylées (ac^4C), et deux N^6,N^6-diméthyl-adenosines ($m_2{}^6A$) ; et dans la grande sous-unité, une N^1-méthyl-adénosine (m^1A), une N^6-méthyl-adénosine (m^6A), deux C^5-méthyl-cytosines (m^5C), et une N^3-méthyl-uridine (m^3U) (tableau 1). Ces modifications de bases sont cependant les moins représentées des modifications post-transcriptionnelles des ARNr. En effet, les modifications des ARNr les plus représentées sont la pseudouridylation (ψ) et la 2'-

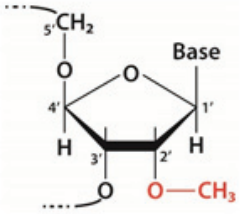
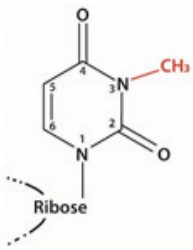
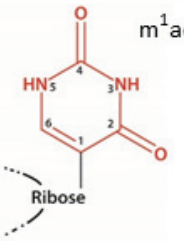
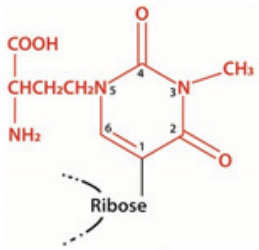
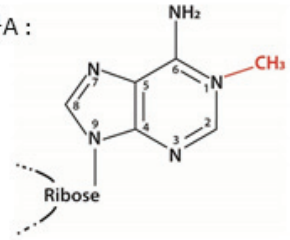
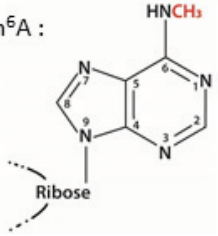
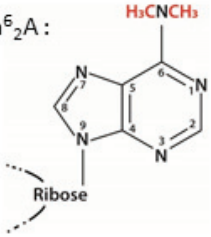
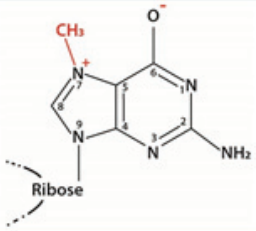
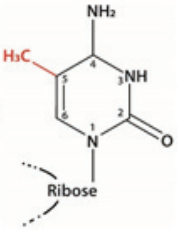
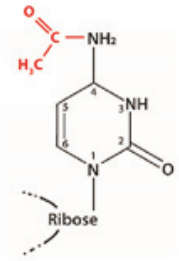
Nom	Résidu modifié
ribose	Am ; Gm ; Um ; Cm: 
uridine	m^3U:  ψ:  $m^1acp^3ψ$: 
adenosine	m^1A :  m^6A :  $m^6{}_2A$: 
guanosine	m^7G: 
cytidine	m^5C:  ac^4C 

Table 1 : Les modifications post-transcriptionnelles des nucléotides des ARNr

O-méthylation (2'-O-me). La pseudouridylation consiste en l'isomérisation d'un résidu uridine en pseudouridine via une rotation de 180° du cycle pyrimidine selon l'axe N_3-C_6 (table 1) (Ge et Yu 2013). On estime à ce jour que chez l'homme, 98 uridines portent cette modification dans les ARNr. Ce compte comprend les modifications dont la présence a été montrée ainsi que celle qui sont inférées sur la base de l'existence de snoARN H/ACA dont la séquence guide permet de cibler un nucléotide particulier des ARNr. D'autre part, La 2'-O-méthylation est le transfert d'un groupement méthyle du S-adénosyl-méthionine vers l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle en position 2' du ribose du résidu ciblé. Les 4 nucléotides de l'ARNr peuvent porter des 2'-O-méthylations. On compte aujourd'hui 106 sites de 2'-O-méthylations identifiés dans la littérature et par des données non publiées de notre équipe, dont 105 sont confirmés par nos données expérimentales (collaboration I. Motorin, Univ. Nancy) (Lestrade et Weber 2006a; Piekna-Przybylska, Decatur, et Fournier 2008).

Les modifications de bases sont catalysées par des méthyl-transférases qui reconnaissent directement l'ARNr substrat, et une acétyl-transférase qui peut nécessiter l'association avec U13, aujourd'hui bien caractérisées (X. Liang, Liu, et Fournier 2009; S. Sharma et Lafontaine 2015; Wurm et al. 2010). Cependant, la grande majorité des modifications transcriptionnelles des ARNr, les ψ ainsi que les 2'-O-me, sont catalysées par des complexes ribonucléoprotéiques formés autour de snoARN à boîtes H/ACA et à boîtes C/D, respectivement. L'enzyme responsable de la ψ est la dyskérine, tandis que l'enzyme responsable de la 2'-O-me est FBL. La description de la structure de ces complexes est discutée dans le chapitre « machinerie des modifications post-traductionnelles des ARNr ».

La conservation des modifications de bases chez la levure, et leur emplacement dans le ribosome suggèrent leur implication dans le contact entre les deux sous-unités, soit au cours de l'assemblage, soit lors de la traduction (S. Sharma et Lafontaine 2015). L'importance fonctionnelle des modifications de base dans la fonction des ribosomes est encore aujourd'hui inconnue. De plus, la position des ψ et des 2'-O-me sur les cartes représentant la structure 2D des ARNr révèlent des clusters de modifications dans des régions correspondant aux domaines fonctionnels du ribosome (figures 4A et 4B), ayant notamment des activités cruciales pour la traduction : le centre de transfert de la liaison peptidique et le centre de décodage. Des données indiquent que ces modifications sont

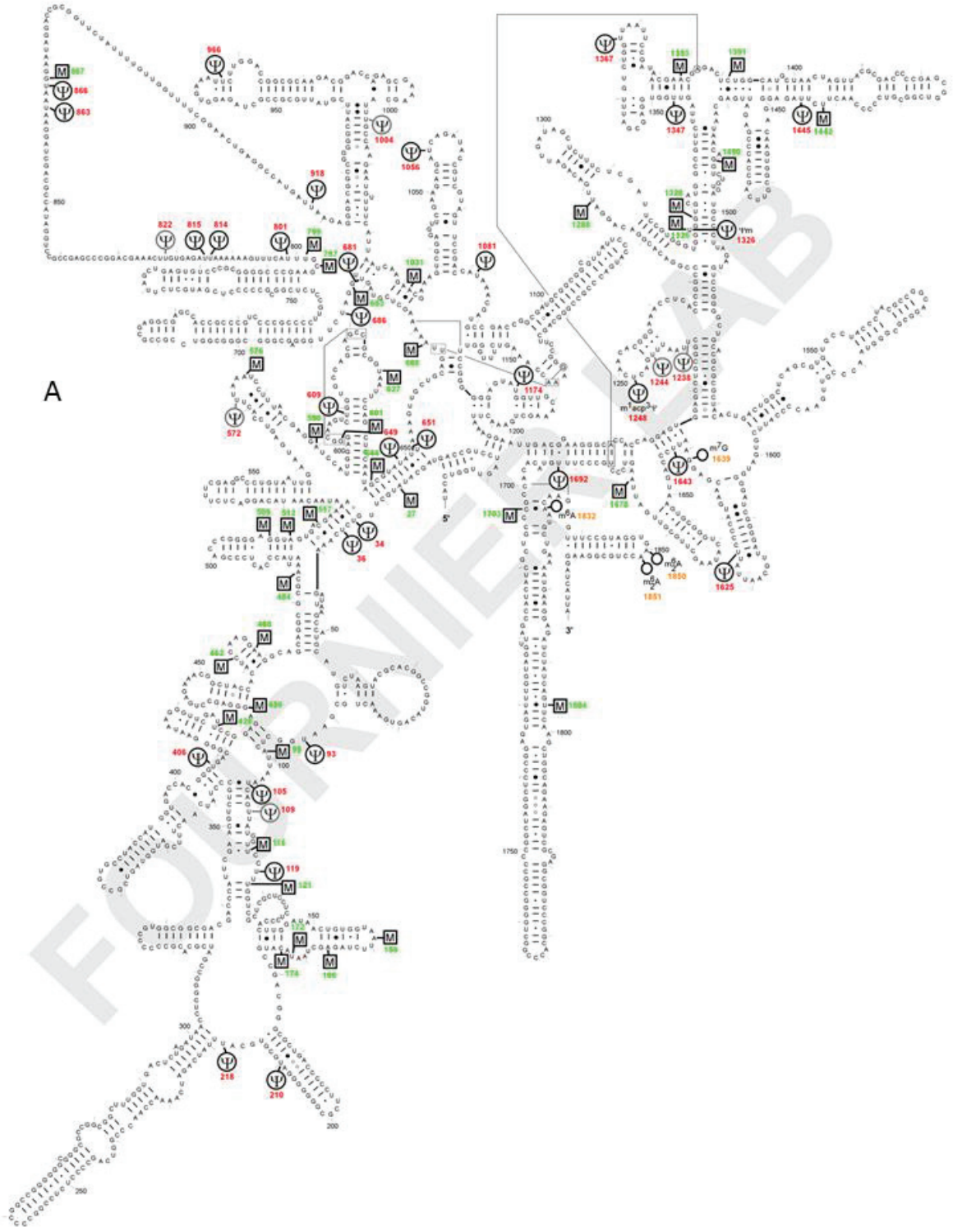


Figure 4. Carte 2D des modifications post-transcriptionnelles des ARNr humains
Représentation 2D des ARNr 18S (A), 28S et 2,8S (B) humains, montrant la position des 2'-O-méthylations (M), les pseudouridylations (ψ), et les méthylations de bases (**O**).
Adapté de Piekna-Przybylska, Decatur et Fournier MJ, 2008.

B

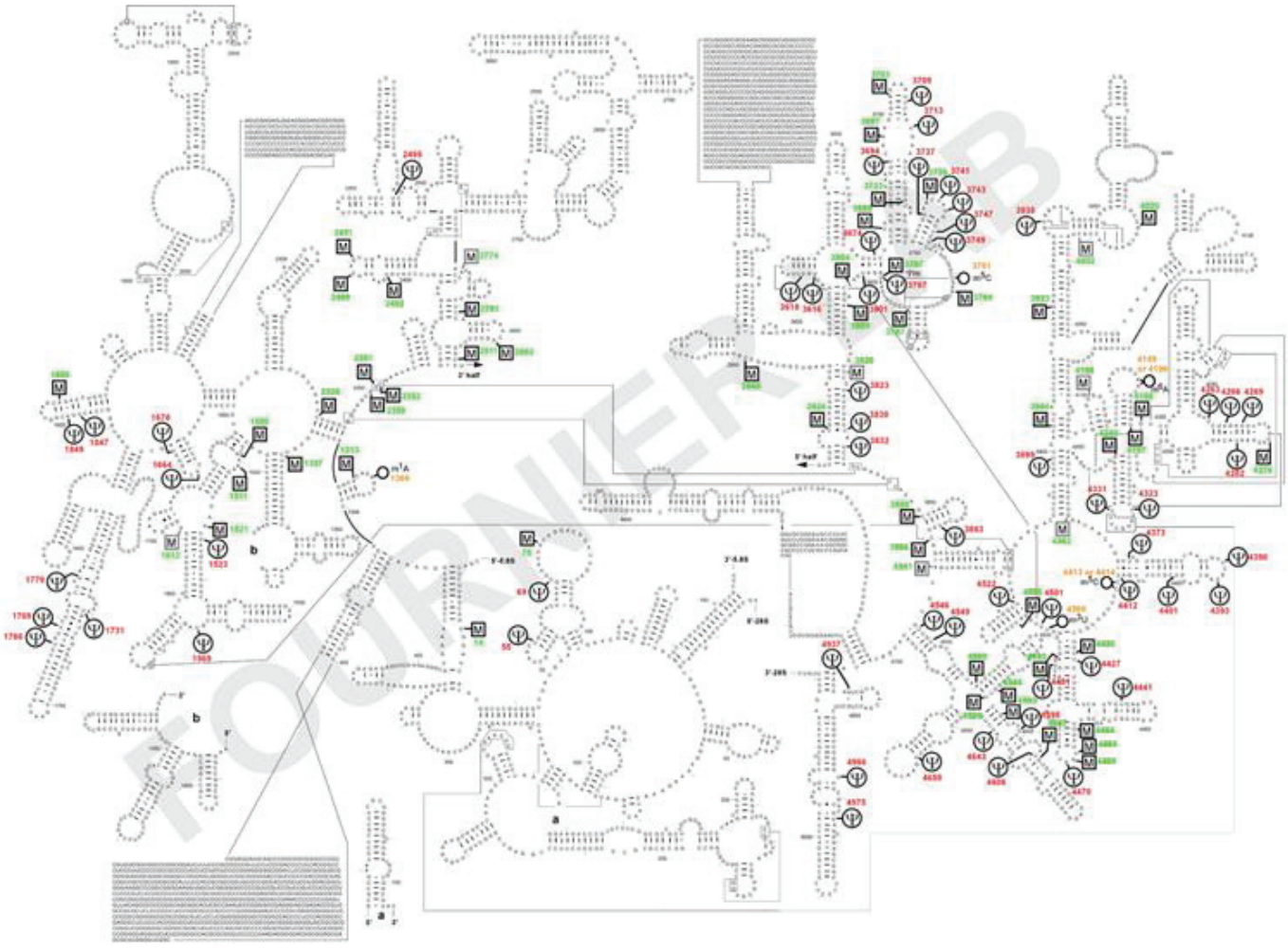


Figure 4. Carte 2D des modifications post-transcriptionnelles des ARNr 28S et 5,8S humains
Cf. légende figure 4A

importantes pour l'activité traductionnelle du ribosome, mais leur rôle précis est encore mal connu (voir chapitre « hétérogénéité des ribosomes et traduction »).

I.2.3.3. L'assemblage des ribosomes

L'assemblage commence de manière co-transcriptionnelle : le pré-ARNr en cours de traduction est pris en charge par les facteurs responsables de son association avec les protéines ribosomiques. Ce processus est très complexe, et son élucidation suscite un grand intérêt. Les études conduites notamment chez la levure et l'homme permettent aujourd'hui de dresser un schéma général de l'assemblage des ribosomes, bien décrit par Thompson et al. (Thomson, Ferreira-Cerca, et Hurt 2013). Les premières étapes d'assemblage ont lieu avant les premières coupures des ARNr et la particule pré-ribosomique formée est appelée pré-90S. La coupure au site 2 conduit à la séparation des pré-ARNr des futures petite et grande sous-unités, la pré-40S et la pré-60S, respectivement (figure 3). La maturation et l'assemblage de ces deux particules se poursuivent dans le noyau, et sont suivis de leur export dans le cytoplasme. L'export des particules pré-ribosomiques est également très complexe et est aujourd'hui en cours d'élucidation. L'assemblage et la maturation s'achèvent dans le cytoplasme.

I.2.4. Biogenèse des ribosomes et cancer

Le statut hyperprolifératif des cellules cancéreuses nécessite une forte activité de synthèse protéique. Pour cette raison la cellule cancéreuse doit produire une grande quantité de ribosomes. La hausse de la prolifération et de la croissance est liée à une sur-activation des voies mitogéniques et de pro-croissance dans les cancers, notamment via l'altération de l'expression et/ou de l'activité d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur (figure 5). Cette altération conduit à une augmentation de la production de ribosomes (Ruggero et Pandolfi 2003). En particulier, plusieurs composants de la voie PI3K-Akt-mTOR sont dérégulés dans les cancers, ce qui induit une sur-activation de mTOR (Pópulo, Lopes, et Soares 2012). Par exemple, les mutations ou délétions récurrentes du gène suppresseur de tumeur PTEN dans les cancers, lèvent l'inhibition de mTOR induite par ce dernier et contribuent à induire

fortement l'activité de mTOR dans les cellules tumorales. Par ailleurs, les protéines des familles Ras et Raf sont des oncogènes reconnus et sont fréquemment mutées dans les cancers (Garnett et Marais 2004; McCubrey et al. 2007; Zebisch et Troppmair 2006), induisant la signalisation de ERK et sur-activant la transcription par l'ARN Pol I (figure 5). Cette voie est également activée par les récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor, de la famille des récepteurs kinases de tyrosines) qui peuvent être mutés dans les cancers (figure 5). A ces données s'ajoute la surexpression de CK2 observée dans plusieurs cancers (Ruzzene et al. 2010) qui induit directement et indirectement la biogenèse des ribosomes.

Le proto-oncogène c-Myc est très fréquemment surexprimé ou sur-activé dans les cancers, et induit par conséquent une augmentation de la biogenèse des ribosomes (Oskarsson et Trumpp 2005) (figure 5). La régulation positive de l'expression de *fbl* par c-Myc (Koh et al. 2011) suggère que cette augmentation est accompagnée d'une altération de la maturation des ARNr. Ainsi, la sur-expression et la sur-activation de c-Myc observées dans les cancers sont responsables d'une augmentation de la production de ribosomes et probablement d'une altération de leur composition, suggérant que son effet transformant requiert la biogenèse de ribosomes (Barna et al. 2008).

B23 est aussi surexprimée dans les cancers, suggérant qu'elle induit une sur-activation de la biogenèse des ribosomes dans les cancers. Cependant, on retrouve aussi des mutations ou des délétions de B23 dans certaines tumeurs (Grisendi et al. 2006; Lim et Wang 2006). Pour ces raisons, bien que le rôle important de B23 dans la biogenèse des ribosomes et le phénotype cancéreux soit admis, sa nature pro ou anti-tumoral reste controversée.

La protéine Netrine-1 est un ligand de récepteurs à dépendance, secrété en conditions normales, qui promeut la survie cellulaire. Nétrine-1 est fréquemment surexprimée dans les cancers (Delcros et Mehlen 2013). Dans une étude conduite en collaboration avec notre équipe, il a été montré qu'une isoforme tronquée ΔN-Nétrine-1, exprimée par certaines cellules cancéreuses, est localisée dans les nucléoles. Cette isoforme a pour conséquence le recrutement du complexe d'initiation de la transcription des ADNr et une augmentation de la prolifération cellulaire (Delloye-Bourgeois et al. 2012). Ces résultats suggèrent que le mécanisme de la prolifération induite par Netrine1 dans les cellules cancéreuses dépend au moins en partie d'une augmentation de la synthèse des ARNr.

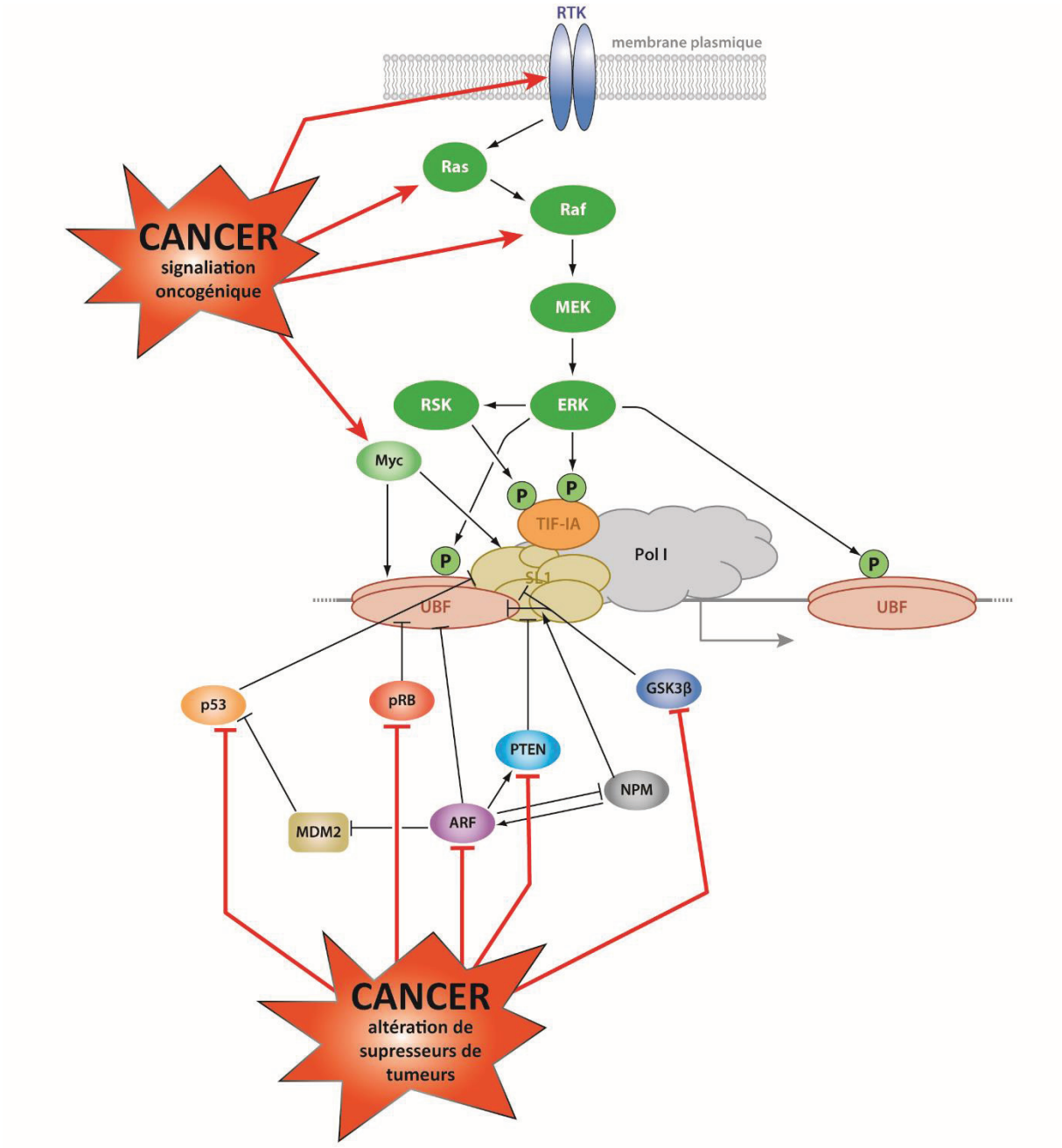


Figure 5 : Les voies de signalisation dérégulées dans les cancers stimulent la synthèse des ARNr
Les voies de signalisation contrôlées par des oncogènes sont suractivées dans le cancer (partie haute du schéma), tandis que les voies contrôlées par des gènes supresseurs de tumeur sont inhibées (partie basse du schéma). Ces altérations résultent en une suractivation de l'initiation de la transcription des ADNr par l'ARN Pol I. p53 inhibe l'interaction entre UBF et SL1 ; pRb remplace UBF sur l'ADNr ; PTEN inhibe la formation du complexe SL1 et stabilise ARF ; ARF cause l'hypo-phosphorylation de UBF conduisant à sa dégradation, inhibe l'activité de MDM2, et induit le transport et la dégradation de la nucléophosmine (NPM, B23) ; NPM induit l'expression de TAF_I48 (sous-unité de SL1) ; MDM2 induit la dégradation de p53 ; GSK3β se lie à TAF_I110 (sous-unité de SL1) et induit la dégradation de UBF ; Myc enrichit la présence de SL1 sur le promoteur des ADNr, et augmente l'expression de UBF ; l'induction de la voie Ras/Raf/ERK par les recepteur à kinase de tyrosine (RTK) conduit à la phosphorylation de UBF TIF-IA et leur activation. l'influence de la voie PI3K/Akt-mTOR n'est pas représentée. Les flèches rouges indiquent les dérégulations identifiées dans divers cancers.
Adapté de Drygin D et al., 2010

D'autre part, les mutations ou pertes d'hétérozigocité de gènes suppresseurs de tumeur sont aussi responsables de la sur-activation de la biogenèse des ribosomes dans les cancers. En effet, les mutations ou pertes d'hétérozigocité du gène suppresseur de tumeur p53 aboutissant à la perte de l'activité de ce dernier dans les cancers sont bien connues. Ainsi, les cellules tumorales ayant perdu l'activité de p53 perdent également la répression de la synthèse des ARNr, aboutissant à une sur-production de ribosomes (figure 5). De plus, notre équipe a montré que la levée de la répression de *fbl* par p53 induit une régulation traductionnelle différentielle de gènes clés dans la survie et le développement tumoral. Ces travaux démontrent pour la première fois qu'un changement de modifications post-transcriptionnelles des ARNr, altère qualitativement la traduction, et promeut le développement tumoral (Marcel et al. 2013). pRb est un autre gène suppresseur de tumeur muté dans de nombreux cancers (Di Fiore et al. 2013; Goodrich 2006). Ces mutations empêchent l'inhibition d'UBF et sont responsables d'une élévation de la biogenèse de ribosomes dans les cellules tumorales. Un autre gène suppresseur de tumeur, ARF, est fréquemment retrouvé muté ou délété dans les cancers (figure 5). Ainsi, ARF n'exerce pas son activité de répression de la biogenèse des ribosomes, résultant en une augmentation de celle-ci (Maggi Jr. et al. 2014).

L'ensemble de ces données montrent que la biogenèse des ribosomes est augmentée dans les cancers, et que cette altération a lieu à plusieurs niveaux. On constate que l'augmentation de la production de ribosomes dans les cancers n'est pas seulement causée par l'induction de la transcription par l'ARN Pol I. En effet, plusieurs facteurs dérégulés interviennent dans la maturation des ARNr. Cette dérégulation en particulier est aujourd'hui mal caractérisée. Il est par conséquent crucial de bien la décrire, car elle peut être source de d'altération non seulement de la quantité de ribosomes produits, mais également de leur composition.

I.3. Machinerie snoRNP des modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Au cours de leur maturation les ARNr sont pris en charge par de nombreux facteurs permettant leur repliement, clivages et modifications post-transcriptionnelles. On retrouve chez l'homme 12 modifications de bases, 98 ψ, et 106 2'-O-me.

Les modifications de bases sont ajoutées par des enzymes autonomes interagissant directement avec leur substrat, dont la spécificité de site ne requiert pas forcément l'hybridation site-spécifique de petits ARN (Mullineux et Lafontaine 2012). Ce mode de fonctionnement ressemble à celui employé par les enzymes responsables de la 2'-O-me chez les bactéries et dans les mitochondries (Motorin et Helm 2011; Rorbach et Minczuk 2012) et se distingue du mécanisme employé pour les 2'-O-me et ψ des ARNr (non mitochondriaux) chez l'homme. En effet, les 2'-O-me et ψ requièrent des complexes ribonucléoprotéiques associés à des petits ARN nucléolaires (snoRNP, snoARN respectivement). Ces derniers guident de manière site-spécifique la modification, de manière précise sur le nucléotide cible, par hybridation du snoARN avec l'ARNr substrat (Jérôme Cavaillé, Nicoloso, et Bachellerie 1996; Ganot, Bortolin, et Kiss 1997; Kiss-László et al. 1996). Cette différence fondamentale entre les 12 modifications de bases et les 204 2'-O-me et ψ indique que ces deux groupes de modifications ont évolué avec des mécanismes différents. En particulier, les 2'-O-me et ψ sont des modifications très différentes. Malgré cette différence, 2'-O-me et ψ conservent un mode de catalyse semblable. Cela adresse la question d'une fonction particulière de ce mécanisme, qui n'est pas appliqué aux modifications de bases, et qui témoigne d'une origine commune et d'une forte pression de sélection, spécifique à la 2'-O-me et la ψ (Lafontaine et Tollervey 1998).

La pseudouridylation est catalysée par la dyskérine, au sein du complexe snoRNP H/ACA, tandis que la 2'-O-méthylation, est catalysée par FBL au sein du complexe snoRNP C/D. Les snoARN ainsi que les snoRNP sont conservés entre les archées et le eucaryotes (Bratkovič et Rogelj 2011; Gaspin et al. 2000; Omer et al. 2000). Il existe notamment de nombreuses similitudes entre la biogenèse des ribosomes eucaryote et archée, et celle-ci est ainsi considérée comme un modèle d'étude intéressant, transposable à la biogenèse des ribosomes eucaryote. En particulier, les mécanismes de pseudouridylation et 2'-O-méthylation sont

similaires. Les travaux réalisés chez les archées sont nettement plus avancés que ceux effectués chez les eucaryotes ou l'homme en ce qui concerne la compréhension des relations entre la structure et la fonction de complexes snoRNP. Pour cette raison il est essentiel de bien étudier les données disponibles chez les archées et de les extrapoler chez l'homme.

I.3.1. Stratégies d'expression et biogenèse des snoARN

Les snoARN sont synthétisés selon plusieurs stratégies d'expression qui varient d'une espèce à l'autre (Dieci, Preti, et Montanini 2009). Chez les vertébrés (plus de 90% chez l'homme (Dieci, Preti, et Montanini 2009)), et rarement chez la levure ou les plantes, les snoARN sont contenus dans les introns de gènes transcrits par l'ARN Pol II, et sont ensuite excisés des pré-ARNm par la machinerie d'épissage. Il est intéressant de noter que la plupart de ces ARNm codent pour des protéines ribosomiques ou des facteurs de la biogenèse des ribosomes (Bratkovič et Rogelj 2011; Filipowicz et Pogacić 2002; D Tollervey et Kiss 1997), suggérant une co-régulation de l'expression des snoARN guides de la méthylation avec le reste de la biogenèse. Il a aussi été rapporté que certains snoARN sont transcrits et excisés à partir d'introns de gènes ne codant pas pour des protéines (Bratkovič et Rogelj 2011; Filipowicz et Pogacić 2002; D Tollervey et Kiss 1997). Quelques snoARN chez les vertébrés, ainsi que la plupart chez la levure sont exprimés à partir de leur propre promoteur par l'ARN Pol II le plus souvent, et dans de rares cas par l'ARN Pol III (Bratkovič et Rogelj 2011; D Tollervey et Kiss 1997; Filipowicz et Pogacić 2002). Très fréquemment chez les plantes, mais aussi retrouvé chez la levure et les trypanosomes, les snoARN sont issus d'un transcrit polycistronique contenant plusieurs snoARN différents (Bratkovič et Rogelj 2011; Filipowicz et Pogacić 2002; D Tollervey et Kiss 1997). Selon cette stratégie d'expression, les snoARN sont ensuite excisés via une machinerie indépendante de l'épissage, mais qui implique une activité enzymatique similaire à l'ARNase III, et des étapes de digestions exonucléolytiques, pour enlever les séquences superflues (Bratkovič et Rogelj 2011; Filipowicz et Pogacić 2002; D Tollervey et Kiss 1997).

Dans le cas d'une expression intronique, les snoARN sont issus d'introns excisés et débranchés, qui sont ensuite digérés par des exonucléases, enlevant ainsi les nucléotides en

excès (K T Tycowski et Steitz 2001). Un 2e type de maturation des snoARN, moins fréquent, consiste en l'excision directe du snoARN par des endonucléases, suivie de la génération d'extrémités matures par des exonucléases, indépendamment de l'épissage (Filipowicz et Pogacić 2002; K T Tycowski et Steitz 2001; Hirose, Shu, et Steitz 2003). Dans les cas de snoARN issus de gènes mono et polycistroniques, la maturation consiste aussi au clivage direct depuis les transcrits par des endonucléases, suivie de digestions exonucléolytiques (K T Tycowski et Steitz 2001).

Après excision et digestion exonucléolytique, la maturation des snoARN se poursuit dans le nucléoplasme et les corps de Cajal tel qu'il a été montré chez les plantes (Filipowicz et Pogacić 2002). Chez les vertébrés, plusieurs snoARN à boîtes C/D sont tri-méthylés au niveau de la guanosine à l'extrémité 5' lorsqu'il transitent par les corps de Cajal (Speckmann, Terns, et Terns 2000; Verheggen 2002; Maxwell et Fournier 1995; Mouaikel et al. 2002). La stabilité des snoARN dépend beaucoup de leur assemblage dans les complexes snoRNP, puisque l'association aux protéines de ces complexes protège les extrémités des snoARN et empêche leur dégradation (Hirose, Shu, et Steitz 2003; Morlando et al. 2004; Ballarino et al. 2005; Darzacq et al. 2006; P. K. Yang et al. 2005; Watkins et al. 2004). Ils sont ensuite transportés vers le composé fibrillaire dense des nucléoles pour jouer leur rôle dans la maturation des pré-ARNr (Lechertier et al. 2009).

Ce mode de synthèse et de biogenèse commun aux snoARN à boîtes C/D et H/ACA, renforce d'avantage l'hypothèse d'une origine commune à ces deux systèmes de modifications post-transcriptionnelles des ARNr.

I.3.2. La machinerie de Pseudouridylation

I.3.2.1. Les snoARN à boîtes H/ACA

Le composant ARN du complexe snoRNP H/ACA est le snoARN à boîtes H/ACA. Chez les eucaryotes, les snoARN à boîtes H/ACA contiennent en moyenne 133 nucléotides (Lestrade et Weber 2006b), et une structure secondaire commune à tous les snoARN H/ACA détaillée dans la figure 6.

I.3.2.2. Le complexe snoRNP H/ACA

Les snoARN à boîtes H/ACA s'assemblent avec quatre protéines : Gar1, Nhp2, Nop10 et dyskérine (DKC), chez l'homme (Kiss, Fayet-Lebaron, et Jády 2010) (figure 6). Chez la levure, les homologues de ces protéines sont toutes des protéines essentielles à la vie cellulaire, à l'exception de Gar1, qui est tout de même requise pour la fonction du complexe snoRNP H/ACA. L'ensemble de ces protéines sont aussi requises pour la maturation des ARNr (Bousquet-Antonelli et al. 1997; Girard et al. 1992). Des études génétiques et basées sur des mutants ponctuels de Cbf5p, l'homologue de la dyskérine chez la levure, ont montré que Cbf5p est l'enzyme responsable de l'isomérisation d'uridine en pseudouridine (Lafontaine et al. 1998; Zebarjadian et al. 1999).

La dyskérine humaine (aussi appelée Nap57) contient 514 acides aminés, et possède plusieurs domaines fonctionnels, dont un domaine riche en glycine et arginine en N-terminal, un domaine catalytique central, ainsi qu'un domaine de liaison aux ARN, et un domaine pseudouridylase et archéosine transglycolase (PUA) (L. Li et Ye 2006; S. Li et al. 2011; Manival et al. 2006). La structure des homologues de la dyskérine chez les archées et la levure montre une forte conservation de la structure tertiaire entre archées et eucaryotes, notamment au niveau du domaine PUA. Une partie du domaine N-terminal forme, avec le domaine PUA, un domaine distinct du domaine catalytique. La dyskérine a par ailleurs une autre fonction, distincte de son activité de pseudouridylation, puisqu'elle fait partie du complexe télomérase, impliqué dans le maintien de l'intégrité des télomères.

Nop10 est une petite protéine (64 résidus chez l'homme), qui stabilise le domaine catalytique de la dyskérine et permet le recrutement de NHP2 (L. Li et Ye 2006; Manival et al. 2006; Rashid et al. 2006) (figure 4). GAR1 se lie également au domaine catalytique de la dyskérine, mais de manière indépendante de NHP2 et Nop10 (figure 6). GAR1 interagit avec le site catalytique de la dyskérine et est nécessaire au renouvellement du substrat du complexe de pseudouridylation (S. Li et al. 2011; C. Wang et Meier 2004). Les structures cristallines du snoRNP H/ACA chez la levure et de son homologue chez les archées ont été résolues (Duan et al. 2009; Hamma et al. 2005; S. Li et al. 2011; B. Liang et al. 2007; B. Liang et al. 2009; Manival et al. 2006; Rashid et al. 2006) et, bien que la structure de l'homologue chez l'homme n'ait pas encore été décrite, il est possible d'extrapoler des informations structurales concernant le complexe humain (Y.-T. Yu et Meier 2014) (figure 6).

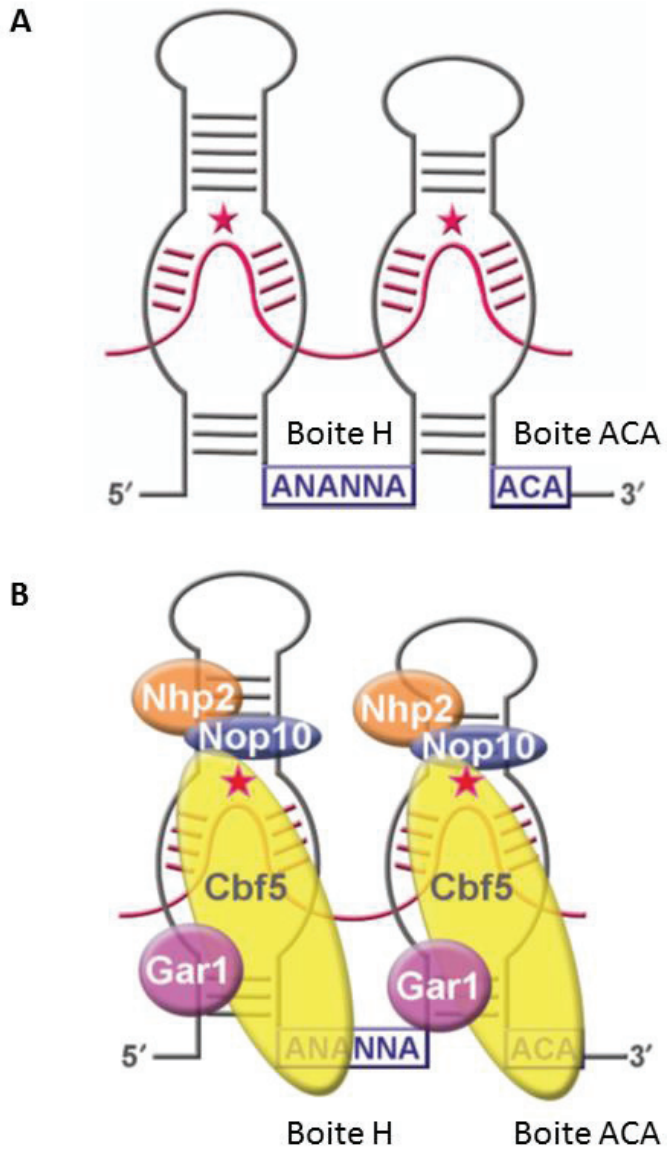


Figure 6 : Structure du snoARN et du snoRNP à boite H/ACA chez les eucaryotes

A, représentation schématique de la structure du snoARN à boite H/ACA. Il présente deux structures tige-boucles liées par une région charnière consistant en la boite H, dont la séquence consensus est ANANNA, où N peut être n'importe quel nucléotide. La boite ACA consiste en la séquence ACA, et est localisée à trois nucléotides de l'extrémité 3' du snoARN à boite H/ACA (Bortolin et al., 1999; Reichow et al., 2007; Watkins and Bohnsack, 2012). Les structures tige-boucles (l'une ou les deux) contiennent des séquences complémentaires des pré-ARNr et en s'appariant avec ces derniers, permettent de guider de manière site-spécifique la pseudouridylation sur le nucléotide cible (Ganot et al., 1997).

B, Représentation schématique du complexe snoRNP H/ACA. Deux copies de Gar1, Nop10 et Cbf5 (dyskérine) sont recrutées sur le snoANR H/ACA. Nop10 interagit avec Cbf5 et stabilise son domaine catalytique, et permet le recrutement de NHP2. GAR1 interagit avec le site catalytique de Cbf5.

L'étoile symbolise le site de pseudouridylation.

Adapté de Reichow et al., 2007

Peu d'études ont exploré la régulation du complexe snoRNP H/ACA. Comme mentionné ci-dessus, en plus de son activité de pseudouridylase la dyskérine est impliquée dans le maintien des télomères. Une étude récente rapporte que les mutations ponctuelles de la dyskérine retrouvées dans le syndrome de la dyskératose congénitale sont responsables d'un défaut d'activité de la dyskérine. Le maintien des télomères n'est plus assuré, causant ainsi un vieillissement prématuré des patients. Plus précisément, ces mutations ponctuelles sont localisées dans des sites consensus de SUMOylation de la dyskérine. Ces résultats suggèrent que l'activité de la dyskérine puisse requérir ou être régulée par cette modification post-traductionnelle. En plus de la SUMOylation, il a été rapporté que la dyskérine porte de nombreuses autres MPT (Mertins et al. 2013; K. Sharma et al. 2014; Zhou et al. 2013). A l'heure actuelle le rôle de ces modifications dans la régulation de l'activité de la dyskérine et du complexe snoRNP H/ACA n'a pas été étudié.

I.3.3. La machinerie de 2'-O-méthylation

I.3.3.1. Les snoARN à boîtes C/D

Le complexe responsable de la 2'-O-méthylation des ARNr s'assemble autour des snoARN à boîtes C/D. Ces snoARN sont conservés entre les archées (sARN C/D) et les eucaryotes, et présentent des caractéristiques structurales conservées entre les deux domaines (figure 7A). Tous les snoARN C/D contiennent les séquences consensus C (RUGAUGA où R est une purine) et D (CUGA), respectivement localisées proches des extrémités 5' et 3'. Ces extrémités sont rapprochées et s'apparient généralement sur une courte séquence (Maxwell et Fournier 1995; Tyc et Steitz 1989; K. T. Tycowski, Shu, et Steitz 1993; K. T. Tycowski, Shu, et Steitz 1996). La partie interne des snoARN C/D, globalement moins structurée (Balakin et al. 1994), contient aussi fréquemment des copies imparfaites des boîtes C et D, nommées C' et D', respectivement (Kiss-László, Henry, et Kiss 1998). Les boites C' et D' sont bien conservées chez les sARN C/D archées tandis que les snoARN C/D eucaryotes présentent moins souvent ce motif (Reichow et al. 2007). La région séparant les boites C' et D' peut former une petite structure tige-boucle (figure 7A). Le repliement des boites C et D forment les structures caractéristiques « stem-bulge-stem » appelée « kink-turn » (k-turn)

(figure 7A et 10E). Les boites C'/D' des snoARN C/D eucaryotes contiennent rarement ce motif, tandis que chez les archées les boites C'/D' forment une variante du k-

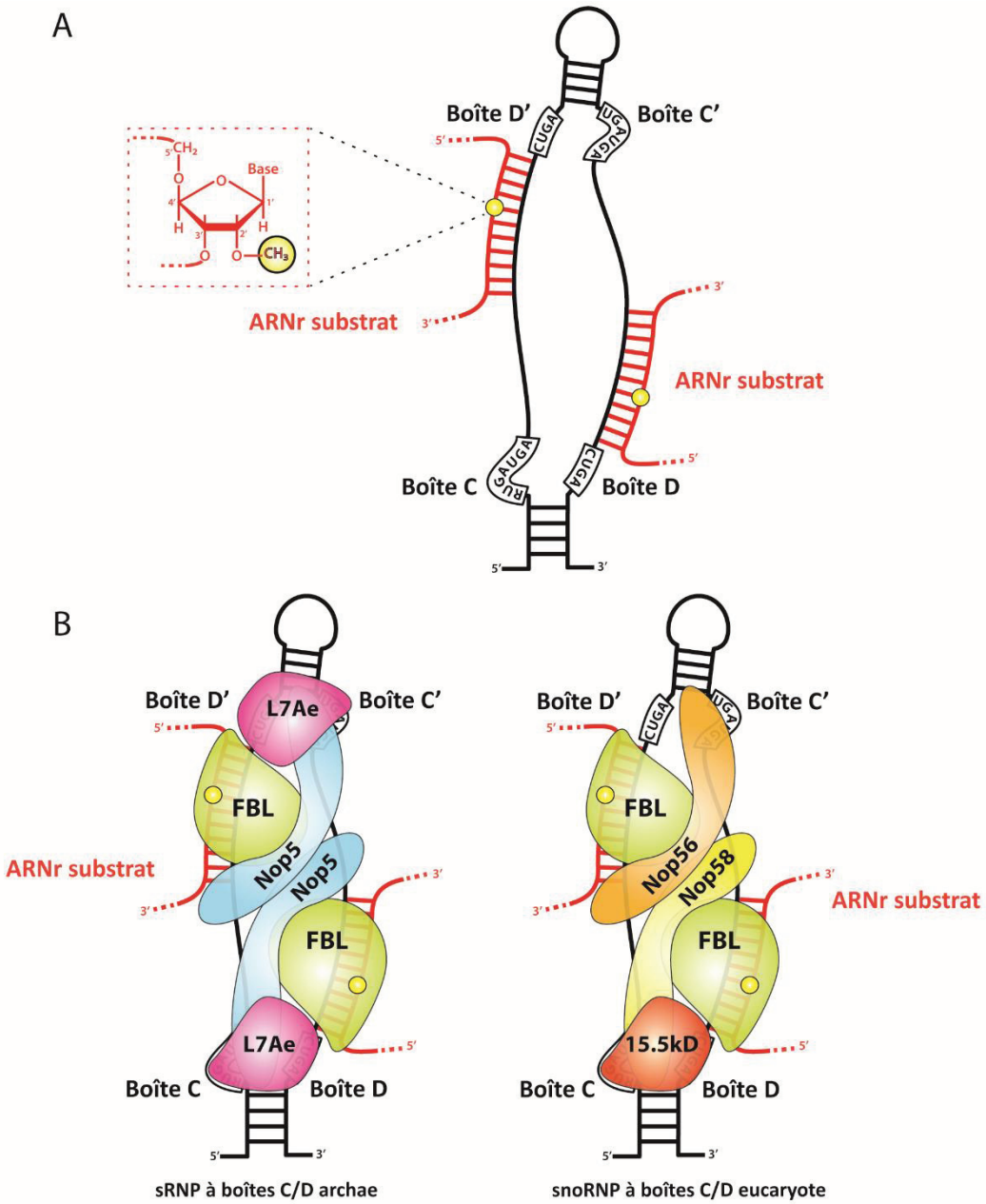


Figure 7 : Organisation du snoARN et du snoRNP à boîtes C/D chez les eucaryotes et les archées

A, repésentation schématique du snoARN à boîtes C/D. Les boîtes C et D sont des séquences consensus placées respectivement près des extrémité 5' et 3'. Ces extrémités s'assemblent en une courte double hélice. La partie interne du snoARN C/D peut contenir une structure tige-boucle, avec des copies imparfaites des boîtes C et D, respectivement C'et D', et contient systématiquement une partie moins structurée consistant en deux séquences complémentaires des ARNr. Ces séquences permettent de cibler la 2'-O-méthylation de manière site-spécifique sur le nucléotide de l'ARNr complémentaire au 5e nucléotide en amont de la boîte D (ou D') sur le snoARN C/D. Les boîtes C/D forment une structure caractéristique appelée k-turn. Chez les archées, les boîtes C'/D' forment une variante du k-turn appelée k-loop.
B, représentation schématique des complexes sRNP et snoRNP à boite C/D chez les archées (panneau de gauche) et les eucaryotes (panneau de droite). Chez les archées, L7Ae reconnaît les structures k-turn et k-loop. Deux copies de Nop5 homodimérisées intéragissent chacune avec les boîtes C/D et C'/D' et lient chacune une copie de fibrillarine (FBL). FBL est ainsi placée face au nucléotide cible sur l'ARNr substrat. Chez les eucaryotes le complexe a une organisation similaire, avec cependant une seule copie de 15.5kDa (homologue de L7Ae), positionnée sur le k-turn. Nop56 et Nop58, homologues de Nop5 seraient hétérodimérisées et lient chacune une copie de FBL.
Adapté de Thérizols G, Laforets F et al., 2015

turn distincte, appelée « k-loop » (Nolivos, Carpousis, et Clouet-d'Orval 2005). Les snoARN à boîtes C/D contiennent également des séquences (10 à 20 nucléotides) 100 % complémentaires avec une région des pré-ARNr, localisée en amont des boites D et D' (J.-P. Bachellerie et Cavaillé 1997; J.-P. Bachellerie et al. 1995; D Tollervey et Kiss 1997). Cette complémentarité de séquence permet au snoARN de guider de manière site-spécifique le complexe de méthylation sur le nucléotide cible de la transméthylation (figure 7A). Le site de méthylation est toujours le 5e nucléotide apparié du pré-ARNr en amont de la boîte D ou D' (C.-L. Chen et al. 2007; Kiss-László et al. 1996; Kiss-László, Henry, et Kiss 1998). Plusieurs snoARN à boîtes C/D ont été identifiés avec deux séquences guides, ciblant ainsi la méthylation sur deux sites différents. Cependant, la plupart n'ont qu'un seul site de 2'-O-méthylation identifié (Lestrade et Weber 2006b).

I.3.3.2. Les protéines du complexe snoRNP C/D

Autour du snoARN à boîtes C/D s'assemblent les membres protéiques du complexe de méthylation : fibrillarine, Nop56, Nop58 et 15.5kDa (figure 7B). L'objectif de cette partie est de décrire séparément ces différentes protéines, en rassemblant ce qui est connu sur leur structure, leurs interactions et leurs MPT, ainsi que les relations entre leur structure et leurs fonctions.

I.3.3.2.1. Fibrillarine (FBL)

FBL est la méthyl-transférase du complexe de méthylation. Cette activité est, entre autres, supportée par l'analyse de la structure tertiaire de FBL, qui porte un domaine méthyl-transférase caractéristique, ainsi que par la présence d'un domaine de liaison aux ARN, et le fait que FBL peut lier SAM, le donneur de méthyle (figure 8A et 13B). FBL possède également un domaine riche en glycines et arginines (GAR), dont la fonction n'est pas connue, mais qui serait impliqué dans la localisation nucléolaire de FBL (Levitskiĭ et al. 2004; Pih et al. 2000; Snaar et al. 2000). FBL possède également d'autres fonctions dans la biogenèse des ribosomes, en prenant part au clivage des ARNr, à la régulation de la transcription par l'ARN Pol I et à l'assemblage des ribosomes (Beltrame et Tollervey 1995; Koh et al. 2011; Tessarz et al. 2014; David Tollervey et al. 1993). La structure et la régulation de FBL sont discutées plus en détails dans le chapitre « Fibrillarine ».

I.3.3.2.2. Nop56 et Nop58

Nop56 (aussi appelée Nol5A) et Nop58 (aussi appelé Nop5) sont deux protéines nucléolaires, et sont paralogues. Chez l'homme, les deux protéines partagent 45% d'identité de séquence. Chez les archées on ne retrouve qu'un seul homologue pour Nop56 et Nop58 : Nop5. Il est donc probable qu'après divergence avec les archées, une duplication du gène ait eu lieu, résultant ainsi en deux protéines distinctes. Nop56 et Nop58 sont codées par les gènes *nop56* et *nop58* localisés respectivement aux loci 20p13 et 2q33.1 chez l'homme.

Chez l'homme, *nop56* donne lieu à plusieurs transcrits codant pour différentes isoformes. La plus étudiée code pour une protéine de 594 acides aminés. La structure tertiaire de Nop56 chez l'homme n'a pas encore été résolue. Nop56 comprend cependant un domaine Nop (Gautier et al. 1997; B. Liang et al. 2007; « NOP5, N-terminal (IPR012974) < InterPro < EMBL-EBI » 2016; Wu et al. 1998). Ce domaine est retrouvé dans les protéines impliquées dans la maturation des ARN et dans l'association avec des particules ribonucléoprotéiques. Les domaines Nop ont des propriétés de liaison aux ARN et aux protéines. Ils sont constitués d'hélices alpha et présentent une forme ovale (Aittaleb et al. 2003; S. Liu et al. 2007; « NOP5, N-terminal (IPR012974) < InterPro < EMBL-EBI » 2016, 58). Cependant, ces domaines restent assez peu décrits. Nop56 possède aussi un domaine N-terminal caractéristique des protéines de la famille Nop5 (Staub et al. 2004; « NOP5, N-terminal (IPR012974) < InterPro < EMBL-EBI » 2016, 5). La présence du domaine Nop est une confirmation de l'activité de Nop56 liée aux snoRNP puisqu'il est caractéristique des protéines liées aux protéines et ARN. Ce type de domaines pourrait être un moyen efficace de reconnaissance protéine-protéine et ARN-protéine permettant la formation de particule snoRNP ou snRNP.

La base de données PhosphoSitePlus (www.phosphositeplus.org) recense plusieurs dizaines de modifications post-traductionnelles de Nop56, chez l'homme. On compte ainsi 35 phosphorylations sur des sérines, thréonines et tyrosines, 9 ubiquitinylations de lysines, 1 acétylation de lysine, ainsi que 3 mono-méthylation de lysine et arginines (« NOL5A (human) » 2016). De plus, la base de données BioGRID (http://thebiogrid.org/) rapporte que Nop56 peut-être neddylée (J. Jones et al. 2008) et SUMOylée (Wen et al. 2014; Tatham et al. 2011; Bonacci et al. 2014), bien que la SUMOylation n'ait pas été détectée dans des cellules HeLa (Westman et al. 2010). Peu d'informations fonctionnelles ont été tirées de ces données. Cependant, plusieurs phosphorylations de Nop56 ont été détectées lors de l'étude du phosphoprotéome

mitotique, suggérant une régulation post-traductionnelle dépendante du cycle cellulaire (Santamaria et al. 2011; Nousiainen et al. 2006). Une autre étude conduite sur la différenciation de cellules souches embryonnaires, montre que Nop56 est phosphorylée, suggérant son implication dans la différenciation (Rigbolt et al. 2011). Cependant, la plupart de ces études sont basées sur des analyses protéomiques à large échelle, et aucun de ces travaux n'étudie spécifiquement le rôle de ces MPT dans la régulation de Nop56, que ce soit en termes de localisation ou d'assemblage dans le complexe snoRNP à boîtes C/D.

Par ailleurs, BioGRID rapporte 263 interactions pour Nop56, chez l'homme. Parmi toutes les protéines interagissant, on retrouve essentiellement des protéines ribosomiques ou de la biogenèse des ribosomes On retrouve également des hélicases et des protéines des voies de MAPK, telle que K-RAS. Aujourd'hui le lien fonctionnel avec ces interactions n'a pas été décrit, et il serait donc intéressant de tirer profit de ces données afin de mieux comprendre Nop56 et les mécanismes qui régissent sa fonction.

Chez l'homme, *nop58* donne lieu à plusieurs transcrits codant pour différentes isoformes protéiques. La plus étudiée d'entre elles est une protéine de 529 acides aminés. Comme Nop56, Nop58 possède un domaine Nop (Aittaleb et al. 2003; « Nop domain (IPR002687) < InterPro < EMBL-EBI » 2016), suggérant là aussi un rôle dans l'assemblage de la particule snoRNP, et un domaine N-terminal caractéristique des protéines de la famille Nop5 (Staub et al. 2004; « NOP5, N-terminal (IPR012974) < InterPro < EMBL-EBI » 2016).

D'après PhosphoSitePlus, chez l'homme, Nop58 porte 24 phosphorylations sur des sérines, thréonines et tyrosines, 2 SUMOylations aux positions K467 et K497, 4 acétylations de lysines, et 14 ubiquitinylations de lysines. De plus, BioGRID rapporte la neddylation de Nop58 (J. Jones et al. 2008). Peu de données sont disponibles sur les relations entre ces MPT et la fonction de Nop58. Cependant, on sait que la SUMOylation n'est pas requise pour la localisation de Nop58 dans le nucléole ou les corps de Cajal, mais est nécessaire pour son interaction avec les snoARN à boîtes C/D et leur localisation dans le nucléole (Westman et al. 2010). De la même manière que Nop56, les études décrivant les MTP de Nop58 suggèrent que certains sites de phosphorylation sont liés au cycle cellulaire (Stuart et al. 2015;

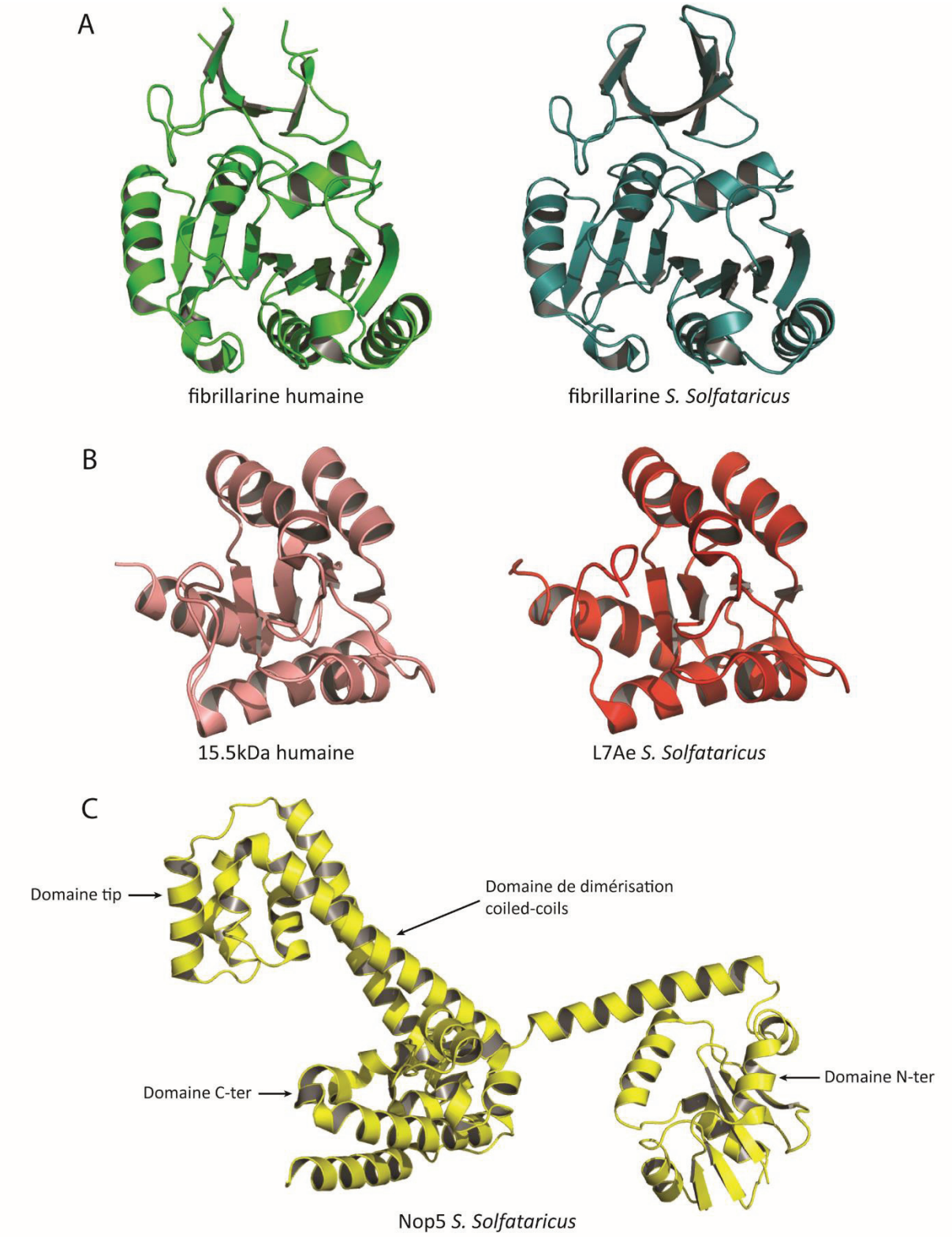


Figure 8 : Structure des protéines du complexe snoRNP à boite C/D

A, Structures tertiaires des FBL humaine (panneau de droite) et de l'archée *S. Solfataricus* (panneau de gauche). Accès PDB respectifs :2IPX et 3PLA.

B, Structures tertiaires des protéines 15.5kDa humaine (panneau de droite) et de l'archée *S. Solfataricus* (panneau de gauche). Accès PDB respectifs :2JNB et 3PLA.

C, Structure tertiaire de Nop5 (homologue de Nop56/Nop58) chez l'archée *S. Solfataricus.* Accès PDB 3PLA.

Kettenbach et al. 2011; Hegemann et al. 2011; Dephoure et al. 2008; Santamaria et al. 2011; Franchin et al. 2015), mais le rôle exacte de ces modifications post-traductionnelles dans la fonction de Nop58 reste inconnu.

BioGRID rapporte 111 interactions pour Nop58 chez l'homme. La plupart des protéines interagissant avec Nop58 sont des protéines ribosomiques, ou des facteurs de la biogenèse des ribosomes. On retrouve notamment la déacétylase SIRT7, dont l'activité de régulation de la biogenèse des ribosomes est déjà montrée à plusieurs niveaux (S. Chen et al. 2016; Kiran et al. 2015, 7; W. Kim et Kim 2013, 7). Nous ignorons cependant si Nop58 est déacétylée par SIRT7, et le rôle de cette interaction reste inconnu. D'une manière générale, le rôle des interactions décrites pour Nop58 n'a pas été étudié. Il sera donc important d'exploiter ces données d'interactions afin de caractériser au mieux la fonction de Nop58 et sa régulation.

La structure de Nop5, l'homologue de Nop56 et Nop58 chez les archées a été résolue dans plusieurs espèces d'archées. Entre différentes espèce d'archées, la conservation de la séquence primaire et de la structure tertiaire de Nop5 n'est pas très élevée (Cf. partie Résultats). Cependant toutes les structures de Nop5 présentent une topologie commune (figure 8C) : un domaine N-terminal et un domaine C-terminal constitué uniquement d'hélice α, reliés par un long domaine coiled coil, ainsi qu'un domaine « tip » (Oruganti et al. 2007; Aittaleb et al. 2003; J. Lin et al. 2011; Lapinaite et al. 2013; Ye et al. 2009).

I.3.3.2.3. 15.5kD

15.5kDa (également appelé NHP2L1, pour Non-Histone Protein-Like 1), est codé par le gène *nhp2l1*, localisé sur le chromosome 22 au locus 22q13. Ce gène code pour plusieurs transcrits alternatifs, dont les fonctions n'ont pas encore été étudiées. La principale isoforme de 15.5kDa est une protéine de 128 acides aminés chez l'homme. 15.5kDa est impliquée dans la régulation du spliceosome via son interaction avec U4 et la protéine au domaine Nop hPrp31. Plusieurs travaux ont permis de caractériser sa structure tertiaire (Vidovic et al. 2000; S. Liu et al. 2007). 15.5kDa présente une structure globale globulaire, avec un motif en sandwich α-β-α (figure 8B). 15.5kDa est de la famille de L7Ae (nom de son homologue chez les archées), qui est une protéine ribosomiques. Ce lien témoigne de l'implication de certaines PR dans la biogénèse des ribosomes. Les protéines de la famille L7Ae sont ont des propriétés

de liaison aux ARN. En effet, les homologues de 15.5kDa chez plusieurs eucaryotes, dont l'homme, possèdent une séquence conservée permettant de lier le k-turn des snoARN C/D (Biswas et al. 2011; Watkins et al. 2000) (figure 7B et 9A). Ce domaine de liaison au motif k-turn est conservé également chez l'homologue archée de 15.5kDa : L7Ae (Charron et al. 2004; Kuhn, Tran, et Maxwell 2002). L7Ae peut aussi se lier au motif k-loop formé par les boîtes C'/D' chez les archées (figure 7B). 15.5kDa ne peut cependant pas lier le k-loop (figure 7B) à cause d'une différence de séquence dans la boucle 9 avec L7Ae, bien que la conformation des résidus de cette région soit conservée entre les deux domaines phylogénétiques (Biswas et al. 2011; Charron et al. 2004). Ce domaine de liaison aux ARN est crucial car en se liant au k-turn des snoARN, 15.5kDa permet le recrutement des protéines du snoRNP C/D sur le snoARN.

Chez l'homme, 15.5kDa possède 12 MPT d'après PhosphoSitePlus. Parmi ces modifications, on retrouve 3 acétylations de lysines, 6 ubiquitinylations de lysines, et 3 phosphorylations de sérine et de tyrosine. Certaines de ces phosphorylations ont été révélées lors d'études conduites sur le phosphoprotéome mitotique ou au cours de la différenciation de cellules souches (Kettenbach et al. 2011; Rigbolt et al. 2011) suggérant, comme pour Nop56 que les MPT de 15.5kDa sont impliquées dans sa régulation au cours du cycle cellulaire et de la différenciation. Le rôle spécifique de ces MPT sur la fonction de 15.5kDa n'a cependant pas été étudié.

BioGRID rapporte 167 protéines interagissant avec 15.5kDa, chez l'homme. Comme pour les autres membres du complexe snoRNP, la plupart sont des protéines ribosomiques, des facteurs de la biogenèse des ribosomes ou des hélicases. On retrouve aussi des protéines impliquées dans l'épissage.

I.3.3.3. L'architecture du complexe snoRNP C/D

Le complexe snoRNP C/D est responsable de la 2'-O-méthylation site-spécifique des pré-ARN. Cette réaction de transméthylation requiert de positionner deux méthyl-transférases, fibrillarines, avec leur site catalytique faisant précisément face aux riboses cibles. Ainsi deux réactions de transméthylation peuvent avoir lieu pour chaque snoARN C/D : une ayant lieu 5 nucléotides en amont des boîtes D, et une 5 nucléotides en amont de la boîte D' (J. Lin et al. 2011; Kiss-László et al. 1996). La mise en œuvre de cette réaction est possible grâce

à l'implication des protéines du complexe de méthylation, Nop56, Nop58, 15.5kda et du snoARN à boîtes C/D.

I.3.3.3.1. L'assemblage du complexe snoRNP C/D chez les eucaryotes

In vitro, l'assemblage du complexe de méthylation s'initie avec le recrutement de 15.5kDa sur les boîtes C/D, puis la fixation d'un dimer FBL/Nop58, suivie de l'interaction avec un dimer FBL/NOP56 au niveau de la boîte C'/D', formant ainsi le complexe mature (Watkins, Dickmanns, et Lührmann 2002). Cependant la formation *in* vivo de cette particule ribonucléoprotéique est un processus plus complexe, faisant intervenir plusieurs facteurs et activités protéiques. Notamment l'assemblage requiert, le complexe chaperonne HSP90-R2TP (Boulon et al. 2008; Newman et al. 2000; R. Zhao et al. 2008). R2TP contient PIH1D1, RPAP3, et les ATPases AAA+ RuvBL1 et RuvBL2. L'assemblage nécessite également l'intervention des facteurs NUFIP et BCD1, et d'après une étude récente, ZNHIT3 (Rothé et al. 2014; Peng et al. 2003; Bizarro et al. 2014).

Les données d'assemblage *in vivo* les plus récentes (Bizarro et al. 2014) permettent de proposer un modèle d'assemblage du snoRNP C/D. D'après Bizarro et al., bien qu'il ait été montré que le complexe R2TP soit requis pour l'assemblage du snoRNP C/D, seules les ATPases du complexe R2TP sont présentes tout au long de l'assemblage, mais pas les deux autres membres du complexe (Bizarro et al. 2014). Puisque PIH1D1 interagit avec Nop58 et NUFIP, cette interaction permettrait de lier Nop58 et NUFIP avec le complexe R2TP, stimulant ainsi la délivrance dépendante d'ATP des ATPases RuvBL1 et 2 R2TP au profit du pré-complexe. NUFIP forme séparément un complexe avec 15.5kDa et ZNHIT3 (Bizarro et al. 2014; Boulon et al. 2008). De cette manière, l'interaction de PIH1D1 avec NUFIP et Nop58 permet la formation d'un pré-complexe contenant uniquement des protéines, résistant au traitement à la RNAse, et contenant les deux premiers membres du complexes snoRNP C/D : 15.5kDa et Nop58. Ce pré-complexe comprend également Bcd1, qui interagit avec RuvBL1 et 2 (Bizarro et al. 2014). Ce pré-complexe serait ensuite recruté sur le snoARN C/D via l'interaction de 15.5kDa avec le k-turn formé par les boîtes C/D (Watkins, Dickmanns, et Lührmann 2002), et ce recrutement libérerait ZNHIT3, qui n'est pas détecté dans le pré-complexe contenant le snoARN (Bizarro et al. 2014). Ce 2e intermédiaire contient donc le snoARN C/D, avec 15.5kDa lié au k-turn et interagissant avec Nop58, NUFIP et les ATPases

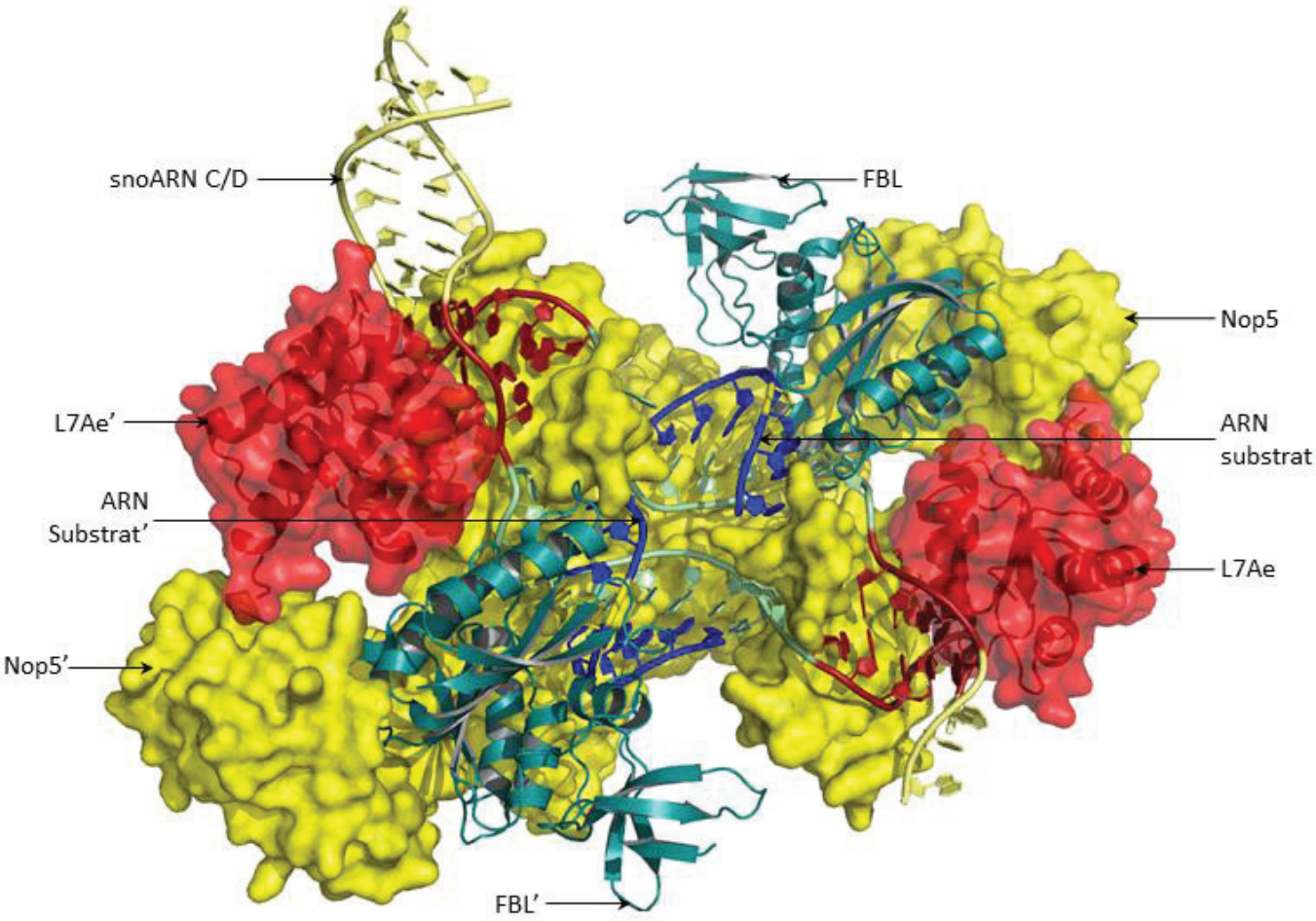


Figure 9. Structure du complexe sRNP à boite C/D chez l'archae *S. Solfataricus*
2 copies de L7Ae (L7Ae et L7Ae') sont positionnées respectivement sur les k-turn et k-loop des boites C/D et C'/D', du sARN à boite C/D. Deux copies de Nop5 (Nop5 et Nop5') homodimérisées via leur domaines coiled-coils interagissent respectivement avec les boites C/D et C'/D'. Chaque copie de Nop5 lie une copie de FBL (FBL et FBL'), faisant face au duplex sARN C/D-ARN substrat. Les sites catalytiques de FBL et FBL' sont positionnés pour méthyler le nucléotide complémentaire du 5e nucléotide en amont des boites D et D', respectivement.
Accès PDB : 3PLA.

RuvBL1 et 2. FBL fait également partie du complexe, et est recrutée par Nop58 à cette étape (Bizarro et al. 2014). La présence de NUFIP interagissant avec 15.5kDa empêcherait la formation prématurée du complexe catalytique sous sa forme active. Bizarro et al, suggèrent que de cette manière NUFIP serait un des régulateurs de l'activité du complexe de 2'-O-méthylation.

Ainsi, la libération de ce facteur, permet de recruter le dimère Nop56-FBL (Bizarro et al. 2014) qui est formé en amont de son recrutement au sein du complexe pré-snoRNP (Lechertier et al. 2009). RuvBL1 et 2 toujours présentes à ce stade de l'assemblage sont libérées, permettant une rotation du complexe, le fixant ainsi dans sa conformation active (Bizarro et al. 2014).

I.3.3.3.2. L'architecture du complexe sRNP C/D chez les archées

La structure du complexe snoRNP chez les eucaryotes n'a encore pas été résolue. Cependant, plusieurs études décrivent le complexe homologue sRNP C/D chez les archées, qui est par conséquent le seul modèle structural disponible. En particulier, Lin et al. ont co-cristallisé le complexe sRNP chez l'archées *S. Solfataricus*, avec un snoARN C/D transcrit *in vitro*, ainsi qu'un fragment d'ARN substrat synthétique (J. Lin et al. 2011) (figure 9). Ce complexe comprend 2 copies de FBL chacune liée à une copie de Nop5. Les deux Nop5 sont hétérodimérisées via leur domaines coiled coil, et interagissent avec les k-turn et k-loop formés par les boîtes C/D et C'/D', respectivement (J. Lin et al. 2011; Ye et al. 2009) (figures 9, 10B, et 10D). Sur chacune de ces boîtes sont fixées deux copies de L7Ae (J. Lin et al. 2011; Lapinaite et al. 2013), homologues de 15.5kDa chez les archées (figures 9 et 10A). Nop5 et L7Ae bloquent FBL avec son domaine catalytique faisant face au duplexe snoARN/pré-ARNr (figure 9). FBL forme des interactions et se place au niveau du petit sillon de cette double hélice avec des interactions de type Watson et Crick, mais n'a pas de spécificité de site. Cependant, les positions de Nop5 dimérisées avec FBL, du domaine tip de Nop5', et de L7Ae de part et d'autre de FBL l'empêchent de glisser le long du duplex d'ARN et la maintiennent de manière à ce que le domaine de liaison à SAM, ainsi que les potentiels résidus catalytiques, soient proches du 5e nucléotide en amont des boites D ou D' (J. Lin et al. 2011) (figure 10C). L'interaction entre Nop5 et FBL a lieu aussi via le domaine N-terminal de Nop5, et une partie du domaine méthyl-transférase de FBL (figure 9 et 10C). Ce domaine de FBL

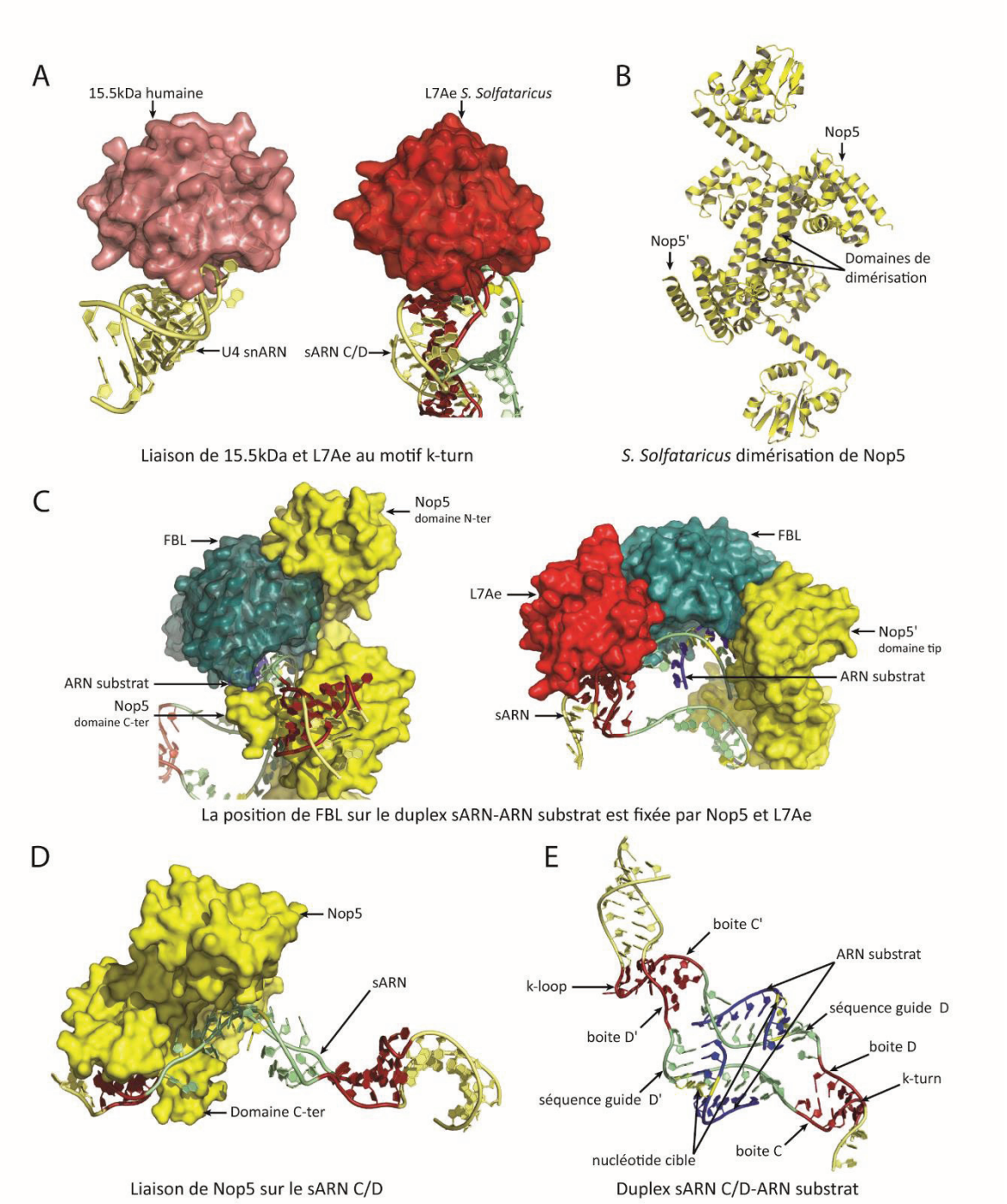


Figure 10 : Structure détaillée du complexe sRNP à boite C/D chez *S. Solfataricus*

A, 15.5kDa humaine (panneau de gauche) et son homologue archée L7Ae lient la structure k-turn. Sur le panneau de gauche 15.5kDa reconnait le k-turn au sein du complexe snARN U4, sur le panneau de droite L7Ae reconnait le k-turn formé par les boîtes C et D du sARN C/D. Accès PDB respectif : 2NJB et 3PLA.

B, Les deux copies de Nop5 s'homodimérisent par leur domaines coiled-coils respectifs (3PLA).

C, FBL est fixée sur le duplex sARN C/D-ARN substrat de manière à ce que son site catalytique fasse face au nucléotide cilbe. Cette position est forcée par les domaines C-terminal et N-terminal de Nop5 de part et d'autre de FBL (panneau de gauche), ainsi que par le domaine tip de Nop5' et L7Ae (3PLA).

D, Nop5 se fixe au sARN au niveau des boîtes C/D. Une partie de son domaine C-terminal force l'ouverture entre les deux séquences guides, causant le déapariement des premières bases de la séquence guide D, liberant l'accès pour l'ARN substrat.

E, le sARN à boîtes C/D en deux parties, du complexe sRNP présenté par Lin et al., contient les boîtes C, D, C' et D' (bordeau), formant les k-turn et k-loop, deux séquences guides en amont des boîtes D et D'. Ces séquences s'hybrident à l'ARN sustrat (bleu), et le nucleotide cible (jaune) est ainsi placé 5 nucléotides en amon des boîtes D ou D'.

interagit également avec L7Ae, qui interagit avec les domaines C- et N-terminal de Nop5 (J. Lin et al. 2011).

Cette étude met aussi en évidence l'impact de Nop5 sur la structure du snoARN : Nop5 forme des interactions avec le snoARN via son domaine coiled coil, et son domaine C-terminal interagit avec les boîtes C/D (l'autre copie, Nop5', interagit avec la boîte C'/D') (Ye et al. 2009; J. Lin et al. 2011). La liaison de Nop5 au snoARN C/D présente une caractéristique particulière : une protubérance du domaine C-terminal de Nop5 s'immisce entre les deux brins du snoARN, entre le k-turn et les séquences guides (Nop5' fait de même entre le k-loop des boites C'/D' et les séquences guides). Ces protubérances empêchent l'appariement des premières bases des séquences guides en amont des boites D et D' (J. Lin et al. 2011) (figure 10D). Cette intervention de Nop5 dans la structure du snoARN est probablement requise pour rendre les séquences guides disponibles pour l'appariement avec le pré-ARNr substrat (J. Lin et al. 2011).

La structure confirme également les précédentes observations concernant le domaine de liaison à SAM. Plusieurs résidus formant des interactions avec SAM sont identifiés et sont cohérents avec les résidus rapportés dans d'autres études structurales menées chez les archées (de Silva, Zhou, et Brown 2012; J. Lin et al. 2011).

Cette organisation monomérique de sARN C/D du complexe de méthylation est cependant discutée dans deux études, dont une plus récente, chez les archées *M. Jannaschii* et *P. Furiosus.* Ces travaux décrivent un complexe comprenant 2 sARN C/D, avec 4 copies de FBL, 4 copies de Nop5 et 4 copies de L7Ae (Bleichert et al. 2009; Lapinaite et al. 2013) (figure 11A). Les interactions protéine-protéine présentées dans cette structure sont essentiellement les mêmes que celle décrites par Lin et al. Cependant, le complexe sRNP C/D s'organiserait sur un dimer de sARN C/D. Selon la structure révélée par Lapinaite et al., les deux sARN C/D sont reliés par une homodimérisation de deux Nop5 par leur domaine N-terminal, liant chacun un sARN au niveau des boîtes C'/D'. Chacun de ces Nop5 est également homodimérisé avec un autre Nop5 via leur domaine coiled coil. Le tétramère de Nop5 forme ainsi une plateforme pour le reste du complexe de méthylation (Lapinaite et al. 2013) (figure 11A). La particularité de cette structure du complexe de méthylation en conformation active est que les 4 FBL liées par les 4 Nop5 ne sont pas toutes positionnées face au substrat en même temps. Seules deux FBL sont en conformation active à la fois,

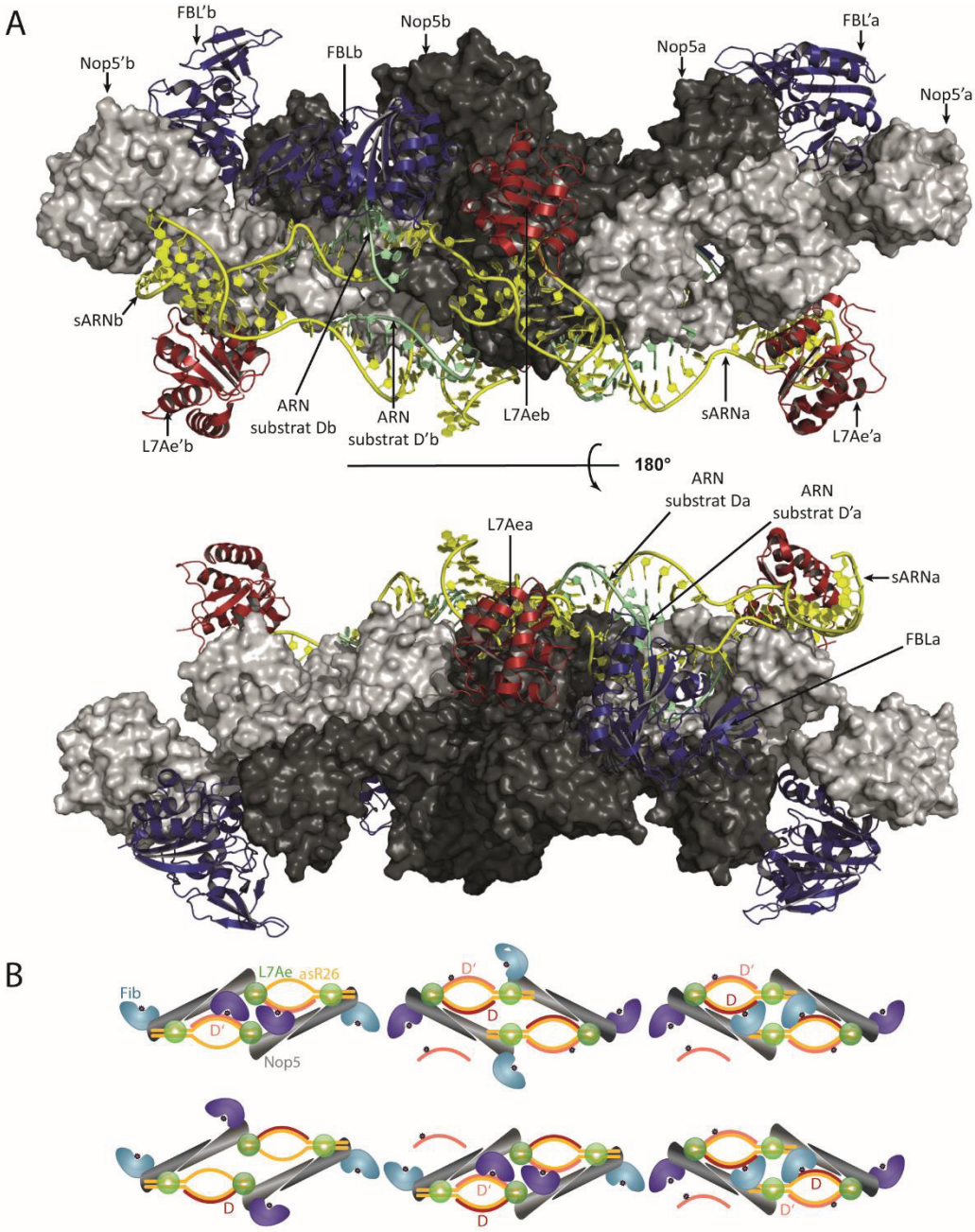


Figure 11 : organisation du complexe sRNP à boîtes C/D archée selon Lapinaite et al.

A, Structure du complexe sRNP à boîtes C/D chez l'archée *P. Furiosus,* en conformation active. Le complexe s'assemble autour d'un dimère de sARN C/D. Un tetramère de Nop5 forme une plateforme sur laquelle sont positionnées quatre copies de FBL, et 4 copies de L7Ae. Avec les deux sARN, quatre séquences guides permettent l'hybridation de quatre ARN substrats. Seules deux FBL sont positionnées au contact d'un ARN substrat, tandis que les deux autres sont situées à l'opposé des substrats, de l'autre côté de la plateforme formée par le tetramère de Nop5.

B, Modèle de méthylation séquentielle proposé par Lapinaite et al. En l'absence d'ARN substrat les FBL positionnées en amont des boîtes D' sur le même plan que le sARN. Modèle du haut, lorsque l'ARN substrat se fixe d'abord en amont des boîtes D', il est ainsi aussitôt méthylé. La subséquente fixation du substrat sur les séquences guides D cause un changement de conformation qui permet de placer les FBL fixées en amont des boîtes D sur le même plan que le substrat. Ce dernier est alors méthylé. Modèle du bas, lorsque le substrat se fixe d'abord à la séquence guide D, la méthylation n'a pas lieu, car les FBL correspondantes ne sont pas placées au contact du substrat. C'est la fixation du substrat sur la séquence guide D' qui cause un changement de conformation permettant d'abord la méthylation du substrat en D', puis de celui en D.

tandis que les autres sont sur un plan différent (de l'autre côté de la plateforme formée par le tétramère de Nop5), et éloignées du substrat (figure 11A et 11B). Ces travaux révèlent ainsi un mécanisme séquentiel de méthylation où en l'absence d'ARNr substrat, le complexe sRNP C/D présente les FBL liées au niveau des boîtes C'/D' sur le même plan que le snoARN, prête à catalyser la réaction de transméthylation. Lorsque le substrat pré-ARNr est recruté en amont de la boîte D', il est aussitôt méthylé. L'ajout suivant du substrat pré-ARNr en amont de la boîte D cause un changement de conformation du complexe qui présente alors les FBL liées au niveau des boîtes C/D sur le même plan que le substrat, permettant sa méthylation. Dans le cas où le substrat vient d'abord se fixer au niveau de la séquence guide en amont de la boîte D, la méthylation ne peut avoir lieu, les FBL correspondantes étant loin et sur un plan différent. C'est l'addition du substrat en amont de la boîte D' qui cause le changement de conformation, permettant la méthylation du substrat en D' puis en D (Lapinaite et al. 2013) (figure 11B). Ce modèle de méthylation séquentielle des pré-ARNr suggère qu'une régulation site-spécifique de la méthylation puisse avoir lieu de manière dépendante de la disponibilité de chaque site de méthylation dans le complexe sRNP C/D.

L'ensemble de cette étude, conduite sur le sARN C/D sR26 (Lapinaite et al. 2013) présente un avantage significatif par rapport aux travaux de Lin et al., dont la structure était basée sur un sARN synthétique et en deux partie (J. Lin et al. 2011). Cependant, il reste à confirmer si ce système de dimère de sARN est général à toutes les archées ou juste à certains sARN. Ce système pourrait aussi être simplement spécifique à certaines espèces d'archées.

I.3.3.3.3. Structure du complexe snoRNP eucaryote

L'ensemble des informations présentées dans le paragraphe précédent a permis de proposer un modèle du complexe snoRNP C/D mature chez les eucaryotes. Celui-ci contiendrait donc une copie de 15.5kDa liée au k-turn formé par la boîte C/D, interagissant avec Nop58 et Nop56 (Gonzales et al. 2005; G. Qu et al. 2011; Watkins et Bohnsack 2012). Nop58 forme un dimère avec FBL, et est positionnée pour la méthylation en amont de la boîte D. FBL interagit aussi avec 15.5kDa (Gonzales et al. 2005). Une seconde copie de FBL forme un dimère avec Nop56, lui-même dimérisé avec Nop58 via leur domaine coiled coil (Aittaleb et al. 2003; Lechertier et al. 2009; J. Lin et al. 2011). Cette copie de FBL serait positionnée pour méthyler l'ARNr en amont de la boîte D'. Nop56 et Nop58 interagissent respectivement avec

les boîtes C'/D' et C/D (Nues et al. 2011; Granneman et al. 2009; Cahill et al. 2002) (figure 7B). Enfin, bien que 15.5kDa ne peut lier le motif formé par les boîtes C'/D', il est probable qu'une copie de cette protéine soit recrutée au niveau des boîtes C'/D' par interaction avec Nop56 (Watkins et Bohnsack 2012; G. Qu et al. 2011).

Les différences entre les complexes archées et eucaryotes limitent cependant l'extrapolation d'informations structurales et fonctionnelles entre les deux modèles. En particulier, la duplication de Nop5 en deux paralogues Nop56 et Nop58 indique une différence fonctionnelle entre Nop5 et ces deux protéines qui n'a pour le moment pas été élucidée. Par ailleurs, la présence probable d'une seule copie de 15.5kDa dans le complexe snoRNP C/D eucaryote a probablement une conséquence sur son architecture et induit sûrement une variation avec le complexe archée.

Enfin, la régulation de l'activité du complexe snoRNP C/D n'a pas été étudiée. Une telle régulation pourrait intervenir à plusieurs niveaux, via chaque membre du complexe de méthylation en termes d'assemblage, localisation, ou modifications post-traductionnelles. Il est donc crucial de mieux comprendre les mécanismes responsables de la formation du complexe de méthylation, et ceux régissant son activité et la régulation de cette dernière.

I.3.4. snoRNP et pathologies

I.3.4.1. snoRNP H/ACA et pathologies

Des variations d'expression et d'activité des différents membres du complexe snoARN H/ACA dans les cancers ont été décrites, en particulier pour la dyskérine, et les snoARN à boîtes H/ACA (Ruggero et Pandolfi 2003; Whittaker, Martin, et Marais 2010).

La variation d'expression de snoARN H/ACA permet de discriminer plusieurs sous-types de myélomes multiples. Globalement, l'expression de plusieurs snoARN H/ACA est diminuée dans les myélomes multiples et les cellules plasmatiques secondaires de leucémie. Certains snoARN H/ACA sont cependant plus exprimés, mais cela reste un évènement assez rare (Ronchetti et al. 2012). Plusieurs autres snoARN H/ACA diminuent dans plusieurs cancers tels que les leucémies myéloïdes aigues, les cancers de la prostate, du poumon ou colorectaux (McMahon, Contreras, et Ruggero 2015).

Des mutations dans *DKC1*, codant pour la dyskérine, cause un défaut d'activité de cette dernière et sont associées au syndrome de dyskératose congénitale liée au chromosome X, dont l'un des symptômes est une augmentation de la susceptibilité au cancer (Heiss et al. 1998; Knight et al. 2001; Dokal 2000).

Les mutations de *DKC1*, ont largement été étudiées et il a été suggéré par plusieurs groupes qu'une telle altération de la fonction de la dyskérine induit une baisse de la pseudouridylation des ARNr et des changements de la traduction dépendante d'IRES. En effet, la traduction IRES-dépendante de gènes, dont p53, est diminuée lors d'une baisse transitoire de l'expression de la dyskérine par siARN, indépendamment de son rôle dans le maintien des télomères, dans des cellules de cancer du sein (Montanaro et al. 2010). De plus, une baisse de l'expression de la dyskérine conduit à une augmentation de la traduction dépendante d'IRES de VEGF. Par ailleurs, un modèle de souris portant des mutations de DKC1 réplique les symptôme de la dyskératose congénitale (sans avoir d'impact sur le maintien des télomères), dont la susceptibilité au cancer (Ruggero et al. 2003). Dans ce modèle, la pseudouridylation est diminuée et cela est accompagné d'une baisse de la traduction IRES-dépendant de plusieurs gènes, dont le gène suppresseur de tumeur et contrôleur du cycle cellulaire p27, dans l'hypophyse (Ruggero et al. 2003; Bellodi et al. 2010; Yoon et al. 2006). Ces résultats sont renforcés par la détection d'une mutation de DKC1 chez un patient atteint de cancer de l'hypophyse. L'adénocarcinome de ce patient présente une diminution de la pseudouridylation et une baisse de l'expression de p27 au niveau protéique (Bellodi et al. 2010).

Globalement, ces résultats montrent que la machinerie snoRNP de pseudouridylation des pré-ARNr diminue dans les cancers, suggérant que son activité joue en la défaveur de la progression tumorale.

I.3.4.2. snoRNP C/D et pathologies

Aujourd'hui, la variation de la 2'-O-méthylation des ARNr dans les pathologies, et en particulier dans les biopsies de patients atteints de cancer, n'est pas connue. Seules deux études publiées par notre équipe ont montré une variation de 2'-O-méthylation des ARNr dans des modèles cellulaires de cancers (Belin et al. 2009; Marcel et al. 2013). De plus, de nombreux

travaux rapportent une dérégulation des éléments du complexe de méthylation ou de facteurs de son assemblage dans des contextes pathologiques.

I.3.4.2.1. snoARN C/D et pathologies

Plusieurs snoARN à boîtes C/D sont surexprimés ou sous-exprimés dans différents cancers. Chez l'homme, la plupart des snoARN à boîtes C/D sont issus d'introns de gènes codant pour des protéines ribosomiques ou impliquées dans la biogenèse des ribosomes. Il a été décrit dans le chapitre précédant que la biogenèse des ribosomes est largement dérégulée dans les cancers, via l'altération de nombreuses voies de signalisation (Ruggero et Pandolfi 2003). Il est donc possible que ces altérations conduisent à la dérégulation de l'expression de snoARN dans les tumeurs. En effet, l'altération de l'expression de snoARN C/D dans les tumeurs de patients a déjà été rapportée, et pourrait représenter des marqueurs pronostiques potentiels dans certains cancers.

Par exemple, six snoARN à boîtes C/D sont surexprimés dans des tumeurs de cancer du poumon non à petites cellules (Liao et al. 2010) dont 3 sont aussi surexprimés dans le plasma des patients, facilitant la détection pour un éventuel diagnostic précoce (Liao et al. 2010). De plus, les snoARN C/D U32a, U33, U35a sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif, fréquent dans les cellules cancéreuses. En effet, l'absence de leur expression induit une résistance au stress oxydatif provoqué par le palmitate (Mannoor, Liao, et Jiang 2012; G. T. Williams et Farzaneh 2012). Cependant, cette résistance semble être indépendante de la 2'-O-méthylation de l'ARNr, puisque aucun changement de méthylation n'a été détecté aux sites correspondant à ces snoARN. De plus, ces derniers sont relocalisés dans le cytoplasme lors de l'induction du stress au palmitate, suggérant une fonction extranucléaire (Michel et al. 2011).

U50, est le snoARN à boîtes C/D dont l'implication dans la tumorigenèse est la plus étudiée. En effet, la perte par délétion ou la diminution d'expression de U50 ont été observées dans les cancers colorectaux, du sein et de la prostate (Dong et al. 2008; Dong et al. 2009; Mannoor, Liao, et Jiang 2012; Pacilli et al. 2013) et U50 est localisé au niveau de la translocation du locus chromosomique t(3 ;6)(q27 ;q15) dans les cellules de lymphomes. Par ailleurs, l'expression d'U50 a un effet négatif sur la prolifération cellulaire. En effet, sa réexpression dans des cellules de cancers du sein et de la prostate diminue la formation de

colonies (Dong et al. 2008; Dong et al. 2009). Le niveau d'U50 détecté dans les lymphocytes isolés de donneurs sains, et dont la prolifération est stimulée, est diminué en comparaison avec les lymphocytes non stimulés. De plus, la 2'-O-méthylation au site C2848, ciblée par U50, est aussi diminuée dans les lymphocytes stimulés, et sa sur- et sous-expression dans des cellules de cancer colorectal augmente et diminue la 2'-O-méthylation à ce site, respectivement. Cette variation est accompagnée d'une altération de la traduction IRES-dépendante (Pacilli et al. 2013). Ces résultats indiquent que l'altération de l'expression d'U50 dans les cancers joue un rôle sur la composition des ribosomes, et la régulation de la traduction. Enfin, le niveau d'expression d'U50 est associé au pronostic dans les cancers colorectaux, puisque plus son niveau d'expression est élevé, plus le stade d'avancement de la tumeur de la tumeur est faible. L'ensemble de ces données indiquent l'implication de la diminution ou de la suppression de l'expression de U50 dans la tumorigénèse, et pour cette raison il été suggéré que U50 est un gène suppresseur de tumeur (Mannoor, Liao, et Jiang 2012; G. T. Williams et Farzaneh 2012).

Ces données suggèrent que les changement d'expression des snoARN ne sont pas simplement une conséquence de l'élévation de la biogenèse des ribosomes, mais indiquent qu'ils favoriseraient le développement tumoral.

D'autre part, prêt de 120 snoARN C/D dont l'expression est soumise à l'empreinte parentale ont été identifiés (Girardot, Cavaillé, et Feil 2012; « snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box RNAs » 2012), et un grand nombre de ces snoARN jouent un rôle dans des pathologies comme le cancer ou le syndrome de Prader-Willi (PWS) (Anderlid et al. 2014; Q. Zhang et al. 2012; Y.-J. Zhang et al. 2014). En particulier, le gène *rian*, soumis à l'empreinte parentale, code pour au moins neuf snoARN C/D (J. Cavaillé et al. 2000; Jérôme Cavaillé et al. 2002) dont l'expression est augmentée d'un facteur allant de 9 à 539 dans différents cancers (Mannoor, Liao, et Jiang 2012). Par ailleurs, l'expression des snoARN C/D du locus 14q32.2, soumise à l'empreinte parentale maternelle (deux cluster de 9 et 31 snoARN), est très fortement augmentée chez les patients atteints de leucémie myéloïde aigue présentant la translocation réciproque du gène *PML* avec le gène *RARA*, par rapport aux patients sains ou ne présentant pas cette translocation. De plus, la surexpression du gène snoARN C/D 14q(II-1) conduit à une augmentation de la prolifération via une dérégulation du

cycle cellulaire, suggérant que l'augmentation d'expression des snoARN dans cette pathologie est impliquée dans le développement du cancer (Valleron et al. 2012).

Le PWS est caractérisé par des difficultés respiratoires, un appétit surdéveloppé et l'obésité. L'expression de gènes contenus dans le locus 15q11-q13, soumis à l'empreinte parentale, est altérée dans ce syndrome. En particulier, ce locus contient deux clusters de snoARN à boîtes C/D. La délétion du cluster HBII-85 sur le chromosome paternel reproduit la plupart des caractéristiques du PWS, suggérant que les symptômes causés par l'altération de l'empreinte parentale de ce locus dépend, au moins en partie, de la perte d'expression des snoARN C/D contenus dans le locus 15q11-13 (Duker et al. 2010; Sahoo et al. 2008; de Smith et al. 2009).

Ces snoARN n'ont pas été associés avec des sites des ARNr (Girardot, Cavaillé, et Feil 2012). Il a cependant été suggéré que certains sont impliqués dans l'épissage alternatif (Cassidy et al. 2012; Kishore et Stamm 2006). Par ailleurs, certains snoARN à boîtes C/D contenu dans ces clusters soumis à l'empreinte parentale (dans le locus 15q11-q13) sont transcrits sous la forme de longs ARN non codant avec un snoARN C/D positionné à chaque extrémité (Yin et al. 2012). Ces snoARN s'associent avec FBL et 15.5kDa. De plus, ces snoARN atypiques s'associent avec Fox2, un facteur d'épissage, régulent l'épissage, et ne sont pas localisés dans le nucléole ni les corps de Cajal (Yin et al. 2012) suggérant leur implication dans l'épissage et non dans la biogenèse des ribosomes. Par ailleurs, les snoARN C/D SNORD115 et SNORD116, impliqués dans le PWS (Bortolin-Cavaille et Cavaille 2012, 115), régulent l'expression de plus de 200 gènes (Falaleeva et al. 2015). Ces données indiquent que les complexes snoRNP peuvent jouer un rôle en dehors de la biogenèse des ribosomes. Ce rôle dans le PWS reste encore à être déterminé.

I.3.4.2.2. Protéine du complexe de méthylation et pathologies

Une autre altération de la machinerie de 2'-O-méthylation des pré-ARNr dans les cancers peut survenir via une perturbation de la régulation des gènes codant pour les membres protéiques du complexe snoRNP C/D. En particulier, l'expression de FBL est augmentée dans les cancers du sein, de la prostate, du col de l'utérus et nos résultats préliminaires indiquent que son expression est aussi augmentée dans les cancers colorectaux (Choi et al. 2007; Koh et al. 2011; Marcel et al. 2013; Su et al. 2013). Par ailleurs, l'expression

de Nop58 au niveau ARNm est plus élevée dans les lésions métastatiques que dans les lésions primaires chez des patients atteints de mélanome (Nakamoto et al. 2001). De plus, une augmentation de l'expression de *nop56* ainsi que d'autres gènes cibles de c-Myc est associée au lymphome de Burkitt, permettant le diagnostic de cette pathologie. En plus d'être associée à la translocation de *c-myc* dans ces lymphomes, l'augmentation de l'expression de Nop56 est aussi associée avec des mutants de c-Myc qui activent la transcription de *nop56* en induisant l'acétylation de H4 au niveau de son promoteur (Cowling, Turner, et Cole 2014). Bien que les mécanismes de ces altérations soient encore mal connus, il apparait très probable qu'elles sont causées par des gènes dont l'implication est bien connue dans le cancer, et dont l'expression et/ou l'activité a déjà été liée à la biogenèse des ribosomes et à l'expression de protéines du complexe de méthylation, tels que l'oncogène c-Myc ou le gène suppresseur de tumeur p53 (Boon et al. 2001; Cowling, Turner, et Cole 2014; Marcel et al. 2013; Schlosser et al. 2003).

Dans l'ensemble de ces résultats montrent que la machinerie snoRNP des modifications des pré-ARNr est altérée dans plusieurs pathologies, et en particulier dans les cancers, conduisant probablement à des changements de composition des ARN ribosomiques. En plus de la variation d'expression de snoARN et des membres protéiques des complexes snoRNP, la dérégulation de ces complexes pourrait avoir lieu directement au niveau des protéines qui le composent, en termes de stabilité, d'interactions et d'activité.

I.4. Fibrillarine

FBL est une des protéines les plus abondantes du nucléole, et possède plusieurs fonctions primordiales dans la biogenèse des ribosomes. Des homologues de FBL ont été caractérisées dans de nombreuses espèces, et initialement chez l'eucaryote *Physarum polycephalum* (Christensen et al. 1977). Grâce à des sérums auto-immuns issus de patients atteins de sclérodermie, FBL a ensuite été observée dans les composés fibrillaires denses de lignées cellulaires issues de plusieurs mammifères dont les cellules HeLa (Ochs et al. 1985; Lischwe et al. 1985), lui valant ainsi son nom. L'implication de FBL dans la maturation des ARNr a d'abord été suggérée par Kass et al. (Kass et al. 1990) grâce à des études conduites sur des lignées cellulaires de souris, puis confirmée et approfondie par plusieurs études conduites chez la levure, caractérisant ainsi son impact sur la méthylation des ARNr (David Tollervey et al. 1993), mais également sur d'autres étapes de la maturation des ARNr tel que leurs clivages ou leur assemblage aux protéines ribosomiques (D Tollervey et al. 1991; David Tollervey et al. 1993). Plus récemment, Tessarz et al. ont montré chez la levure et chez l'homme que FBL était également une histone-glutamine méthyl-transférase et que cette activité régule la transcription des ARNr par l'ARN polymérase I (Tessarz et al. 2014). Il existe donc plusieurs facettes à l'activité et probablement aux rôles biologiques de la FBL. Dans cette partie, nous verrons en détails les différentes fonctions et activités de FBL et nous mettrons en évidence les éléments manquants concernant la régulation de ces dernières.

I.4.1. Evolution et conservation de la fibrillarine

FBL est présente dans deux des trois règnes du vivant : les archées et les eucaryotes. Cette conservation entre deux domaines phylogénétiquement éloignés témoigne d'une origine ancestrale de FBL qui précède la séparation entre les archées et les eucaryotes. La présence de FBL dans de nombreuses espèces permet notamment d'analyser les relations entre les différents sous-groupes phylogénétiques en se basant sur les différences de séquences de FBL. Ainsi, les FBL archées sont clairement distinguées des FBL eucaryotes, et au sein des eucaryotes on constate que les FBL sont regroupées en sous-groupes en fonction de

leur appartenance aux fungis, plantes, invertébrés et vertébrés (Rodriguez-Corona et al. 2015). Malgré cette différence entre les groupes phylogénétiques, FBL présente une remarquable conservation de séquence, avec par exemple plus de 46% d'identité de séquence entre les FBL humaine et archées (Cf. partie Résultats).

Chez les eucaryotes, FBL a été observée et étudiée dans un grand nombre d'espèces. En particulier, Nop1, l'homologue de FBL chez la levure, a fait l'objet de nombreuses études génétiques aidant à caractériser ses fonctions (D Tollervey et al. 1991; David Tollervey et al. 1993). Chez la plante *arabidopsis thaliana*, deux homologues de FBL sont présentes : AtFib1 et AtFib2. Ces deux homologues partagent environ 69% d'identité de séquence avec la FBL humaine (Pih et al. 2000). Chez les archées, FBL a d'abord été observée par Amiri et al. (Amiri 1994), et bien que les archées n'aient pas de nucléole, ni composé fibrillaire dense, elle conserve son nom. Elle est cependant parfois nommée aFBL ou aFIB. Cette conservation de FBL chez les archées renforce l'hypothèse de son apparition ancestrale, suggérant que l'apparition de FBL et de sa (ses) fonction(s) est plus ancienne que l'apparition des premiers nucléoles. La FBL archée a beaucoup été utilisée pour des études nécessitant la purification d'une FBL recombinante, notamment grâce à un très bon rendement d'expression. Ainsi, nous disposons de beaucoup de données structurales sur les FBL archées issues de méthodes de diffraction, telle que la cristallographie aux rayons X, notamment parce qu'il est moins difficile de cristalliser les protéines archées (J. Lin et al. 2011; Lapinaite et al. 2013; de Silva, Zhou, et Brown 2012). De cette manière, malgré un manque de données structurales chez les eucaryotes, on sait aujourd'hui que les FBL des archées et eucaryotes présentent de forte homologie de structure. Cette conservation de structure est détaillée dans la section « Résultats ».

Le gène *fbl* est essentiel pour tous les organismes testés. De plus, une diminution de 90% du niveau de FBL par siARN chez la plante *n. benthamiana*, conduit à des plants de taille significativement réduite, et des lésions nécrotiques (S. H. Kim et al. 2007). Par ailleurs, le gène *fbl* est aussi essentiel chez la levure (D Tollervey et al. 1991; David Tollervey et al. 1993; Jansen et al. 1991), le protozoaire *tetrahymena termophila* (David et al. 1997), et la souris (Newton et al. 2003). En particulier, chez la souris, les embryons *FBL*$^{-/-}$ ne sont pas viables, se développant jusqu'au stade de morula mais ne formant pas de blastocystes, et les souris

hétérozygotes *FBL*$^{+/-}$ montrent une perte partielle des embryons (Newton et al. 2003). Le lien entre l'expression de FBL et le développement est retrouvé dans une étude montrant une augmentation de l'expression de FBL dans un sous-type de cellules neurales embryonnaires de la couche périphérique du mésencéphale du poisson zèbre, dont la prolifération est fortement activée (Recher et al. 2013). Par ailleurs, des manipulations non publiées de notre équipe sur des cellules humaines en culture montrent qu'une trop forte inhibition de l'expression de FBL par siARN conduit à la mort des cellules (Erales et al. en préparation). Ces données suggèrent un rôle biologique crucial de FBL et soulignent son importance dans la régulation de la prolifération au cours de l'embryogenèse.

Par ailleurs, plusieurs fonctions de FBL sont conservées entre les espèces eucaryotes. Chez la levure, Nop1 peut être remplacée par la FBL humaine, celle de *Xenopus Laevis* (Fatica et al. 2000; Cahill et al. 2002), ainsi que AtFib1 et AtFib2 de *arabidopsis thaliana* (Barneche, Steinmetz, et Echeverria 2000), montrant ainsi une complémentation fonctionnelle entre plusieurs organismes eucaryotes. Par ailleurs l'activité méthyl-transférase du complexe de méthylation dont fait partie la FBL a été rapportée dans plusieurs espèces d'archées et d'eucaryotes (Omer et al. 2002; Aittaleb et al. 2004; Tran, Zhang, et Maxwell 2003; David Tollervey et al. 1993). Le rôle de FBL dans la maturation des pré-ARNr est aussi conservé chez la levure et l'homme (Koh et al. 2011; Tafforeau et al. 2013; David Tollervey et al. 1993). L'étude de l'impact de FBL sur le développement chez la souris montre que les souris adultes FBL$^{+/-}$ ne présentent pas d'altération de la maturation des ARNr (Newton et al. 2003). Les étude des homologues de FBL ont aussi permis d'apporter des données sur leur structure (Rakitina et al. 2011) et leurs fonctions (Sáez-Vasquez et al. 2004; Barneche, Steinmetz, et Echeverria 2000). L'ensemble de ces données montre implication de FBL dans plusieurs processus cellulaires et physiologiques majeurs.

Cependant, les complémentations fonctionnelles de FBL ne sont pas toujours parfaites. La FBL de *tetrahymena termophila* ne peut remplacer Nop1 chez la levure (David et al. 1997) et la complémentation de Nop1 par les FBL humaine ou de *xenopus Laevis* induit des altérations de la morphologie du noyau et de la croissance de la levure. Aucune étude ne rapporte l'expression d'une FBL archée dans des cellules eucaryotes et réciproquement, la complémentation fonctionnelle de FBL de ces deux domaines n'a donc pas été étudiée. Malgré ces différences, la conservation de la FBL et de certaines de ses fonctions entre des espèces

phylogénétiquement éloignées permet d'exploiter les avantages inhérents à chaque modèle d'étude, et d'extrapoler des données sur les FBL d'une espèce à l'autre. Ces extrapolations sont cependant à prendre avec précaution, et il reste important de garder à l'esprit les différences existant entre les FBL de plusieurs espèces.

I.4.2. Le gène *fbl*

Les premières informations sur la séquence de *fbl* ont été obtenues en 1990 chez S. Cerevisiae (Henríquez, Blobel, et Aris 1990) et en 1991 chez l'homme (Aris et Blobel 1991). Aujourd'hui la base de données NCBI gene présente 1364 entrées de séquences de *fbl* de toutes espèces, avec des séquences annotées pour les modèles les plus courants, tels que *c. elegans*, *crosophila delanogaster*, *xenopus laevis*, *arabidopsis thaliana* et plusieurs espèces de rongeurs.

Chez l'homme, le gène *fbl* est localisé sur le chromosome 19 au locus 19q13. Deux pseudogènes sont référencés dans Genebank, un localisé sur le chromosome 4, qui ne contient pas d'ORF (Open Reading Frame) valide pour *fbl*, et un second (fibrillarin-like 1, FBLL1) sur le chromosome 5, qui contient une ORF, codant pour une protéine présentant 87% d'identité avec les 239 acides aminés du domaine C-terminal de FBL. Cependant, à ce jour, aucune étude ne rapporte l'expression de ce pseudogène.

En incluant le promoteur proximal, *fbl* se trouve dans une région mesurant au moins 12 kpb. *fbl* code pour un pré-ARNm de 11kb contenant 9 exons, et résultant en un ARNm mature de 1171 bases (figures 12A et 12B). Bien que des promoteurs et des sites de polyadénylations alternatifs soient mis en évidence par bio-informatique, seul un ARNm est clairement identifié dans les bases de données, et le gène *fbl* est prédit chez l'homme et la souris pour ne donner qu'un seul variant d'épissage alternatif (http://www.fast-db.com), suggérant que l'épissage alternatif n'est pas un évènement majeur de la régulation de *fbl*.

Le promoteur de FBL contient des éléments de réponses pour plusieurs facteurs de transcription. Environ 1500 bp amont du +1 de transcription, des E-box spécifiques de facteurs de l'EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) ont été détectées par analyse bio-informatique de cette région (Données non publiées). De même, l'analyse du promoteur indique que ce dernier contient deux éléments de réponse à p53 dans l'intron 1 (Marcel et al.

2013). Ces données ont été confirmée par test luciférase montrant l'induction ou la répression du promoteur de *fbl* par des facteurs de l'EMT, et la répression par p53 (Marcel et

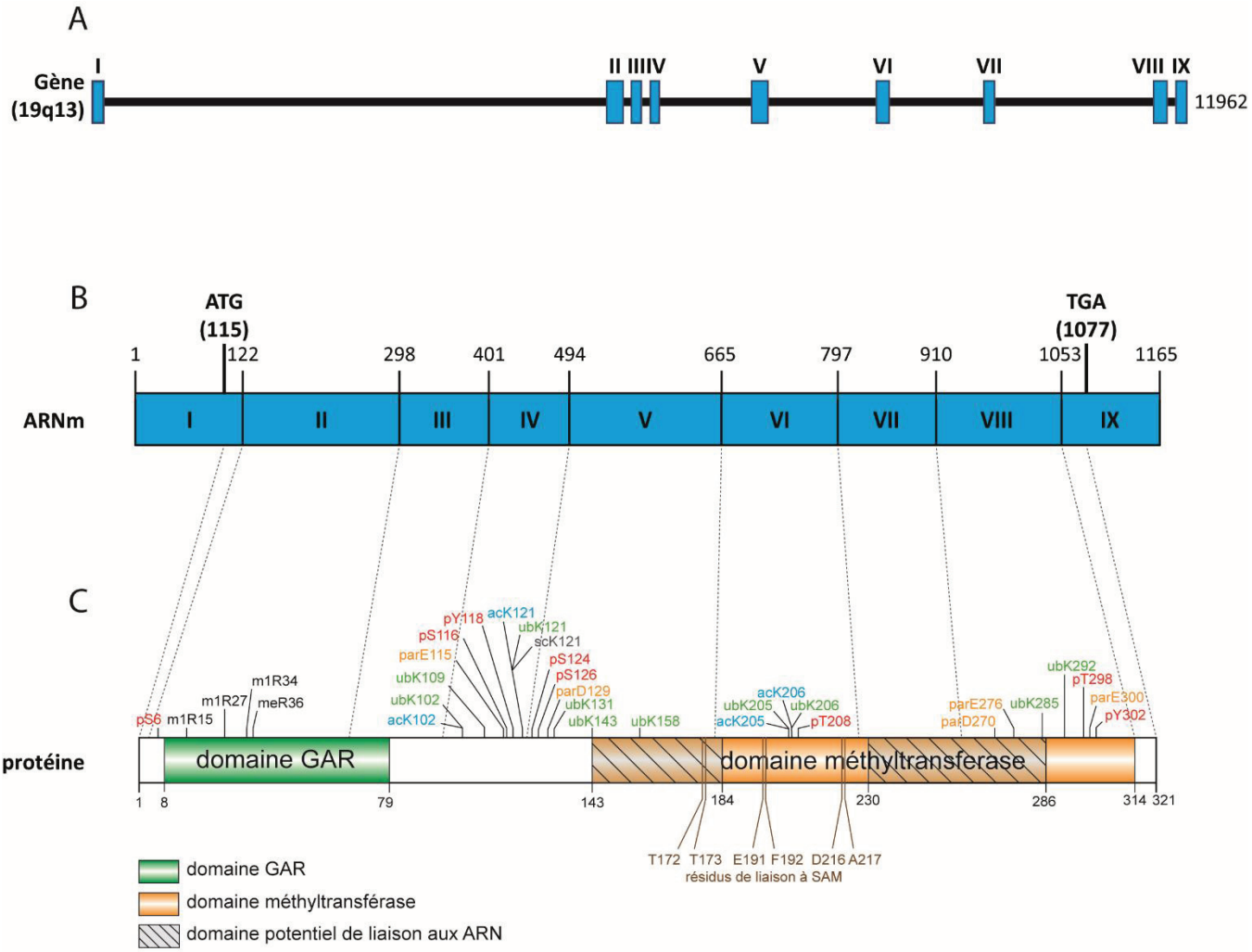


Figure 12 : Modifications post-traductionnelles et caractéristiques stucturales de la fibrillarine humaine
A, **B** Représentation linéaire du gène *fbl* (A) et de l'ARNm correspondant (B). Les exons sont indiqués sous forme de boites bleues, et numérotés avec les chiffres romains. La correspondance entre les exons et la structure linéaire de la protéine est indiquée par les lignes en pointillés.
C, Représentation linéaire de la structure de la fibrillarine humaine et de ses domaines structuraux. Au dessus de la structure sont indiquées les modifications post-traductionnelles de la FBL référencées à ce jour dans la littérature. En dessous sont indiqués les résidus ayant une potentielle implication dans la liaison au S-adénosyl-méthionine (SAM), d'après la littérature. la structure linéaire de la FBL humaine indique les différents domaines.
Phosphorylations (p, rouge), acétylations (ac, bleu claire), ubiquitinylations (ub, vert claire), poly(ARD-ribose)ylation (par, orange claire), succinylation (sc, gris).

al. 2013 ; donnée non publiée de notre équipe). Enfin, l'exon 1 de *fbl* contient un élément de réponse à c-Myc, et l'impact positif de ce dernier sur l'expression de FBL a également été montré (Koh et al. 2011).

L'impact de ces facteurs de transcription sur l'expression de FBL a été confirmé en corrélant leur expression et celle de FBL par RT-qPCR, dans des tumeurs du sein ou de la prostate (Koh et al. 2011; Marcel et al. 2013). L'ensemble de ces données suggèrent donc que l'expression de *fbl* est régulée par des gènes dont l'impact sur le cycle cellulaire, la croissance, la survie et l'apoptose sont cruciaux. Le fait que *fbl* soit régulée par p53 et c-Myc est cohérent, puisque ces gènes sont aussi connus pour leur régulation de la biogenèse des ribosomes (Cf. chapitre sur « Biogenèse des ribosomes »). Ces informations indiquent aussi que *fbl* est régulée au niveau transcriptionnel au cours de l'EMT. De plus, l'expression de FBL est associée au statut hyperprolifératif tissu-spécifique au cours de l'embryogenèse chez le poisson-zèbre (Recher et al. 2013), et permet le maintien du statut pluripotent de cellules embryonnaires chez la souris (Watanabe-Susaki et al. 2014). Il existe donc des mécanismes de contrôle de l'expression de *fbl*, dont l'impact sur le phénotype cellulaire est crucial. Ces mécanismes sont encore aujourd'hui peu connus.

I.4.3. Structure de FBL

La structure primaire de FBL présente un fort degré de conservation entre plusieurs espèces allant des archées aux mammifères. En effet, la FBL humaine partage plus de 45% d'identité avec les FBL des archées *A. pernix* et de *S. Solfataricus*. De plus, elle présente entre 67 et 70% d'identité avec la FBL de la levure (Jansen et al. 1991; Aris et Blobel 1991), et 81% avec *Xenopus Laevis* (Aris et Blobel 1991).

I.4.3.1. Domaine riche en glycines et arginines

La séquence primaire de FBL révèle en N-terminal un domaine riche en glycine et arginine (GAR) comprenant les 70-80 premiers résidus suivant les espèces (figure 12C), dont la structure cristalline n'a pas encore été résolue, probablement due à sa nature intrinsèquement désordonnée. Ce domaine n'est pas conservé chez toutes les espèces. En effet, le domaine GAR est absent chez les archées (Amiri 1994; H. Wang et al. 2000; J. Lin et

al. 2011; Lapinaite et al. 2013) ainsi que chez certains eucaryotes unicellulaires tels que *tetrahymena termophila* (David et al. 1997) et e*uglena gracilis* qui présente à la place un domaine riche en lysines et arginines (A. G. Russell et al. 2005). Le domaine reste autrement présent chez la plupart des eucaryotes (Lischwe et al. 1985; Jansen et al. 1991; Pih et al. 2000; Lapeyre et al. 1990).

Le domaine GAR contient un signal de rétention nucléolaire requis pour la localisation de FBL dans le nucléole des cellules HeLa (Levitskiĭ et al. 2004) et des protoplastes (Pih et al. 2000), mais pas pour localiser FBL dans les corps de Cajal (Snaar et al. 2000). La nécessité de ce signal pour la localisation nucléolaire de FBL est cependant discutée (Snaar et al. 2000; Pih et al. 2000) et l'implication du domaine le liaison à l'ARN (ARN BD) de FBL est également suggérée (Snaar et al. 2000). Le domaine GAR de FBL est responsable de l'interaction avec d'autres protéines, telle que la protéine survival motor neuron (SMN), protéine des corps de Cajal impliquée dans l'atrophie musculaire spinale (K. W. Jones et al. 2001). FBL s'accumule dans les corps de Cajal en l'absence d'interaction avec SMN (Pellizzoni et al. 2001; K. W. Jones et al. 2001). Ces données suggèrent que le domaine GAR de FBL est requis mais pas suffisant pour la bonne localisation fonctionnelle de FBL et suggère qu'il est requis pour des interactions protéine-protéine régulant la localisation de FBL dans les corps de Cajal ou a lieu la maturation des complexes snoRNP.

I.4.3.2. Domaine méthyl-transférase

Le domaine C-terminal de FBL (figures 12C et 13) présente une topologie caractéristique de toutes les méthyl-transférases dépendantes de SAM (Cheng et Roberts 2001) : un feuillet β constitué de 7 brins, entouré de 6 hélices α, 3 de chaque côté du feuillet β. Cette organisation est conservée entre les FBL archées et la FBL humaine, avec très peu de variations (Deng et al. 2004; de Silva, Zhou, et Brown 2012; Aittaleb et al. 2004; Lapinaite et al. 2013). Le domaine méthyl-transférase de FBL est le support de trois fonctions : la liaison au SAM, l'interaction avec l'ARN, et l'activité catalytique de transméthylation.

I.4.3.2.1. Le domaine de liaison au SAM

Le domaine de liaison au SAM (SAM BD) est principalement constitué des brins β1 à 3 (figures 13B et 13C), en accord avec les caractéristiques des méthyl-transférases dépendantes

de SAM connues, et comprend une dizaine de résidus formant des interactions polaires ou hydrophobes avec SAM. En particulier chez l'homme, trois couples de résidus sont prédits comme étant essentiels pour la liaison à SAM : les résidus 172-173, 191-192, et 216-217, par homologie avec d'autres méthyl-transférases (UniProtKB, www.uniprot.org). Ces résidus sont conservés entre les FBL archées et humaine, et leur rôle dans la liaison avec le ligand SAM est supporté par plusieurs études rapportant la structure cristalline de FBL archées (de Silva, Zhou, et Brown 2012; J. Lin et al. 2011).

I.4.3.2.2. Domaine catalytique

Le mécanisme précis de la réaction de transméthylation catalysée par FBL n'est pas caractérisé. Il est cependant fortement suggéré qu'il s'agit d'une substitution nucléophile de type II (Aittaleb et al. 2003). En effet, il existe plusieurs exemples décrivant l'action d'une O-méthyl-transférase, correspondant à ce mécanisme de réaction (Motorin et Helm 2011). Notamment, dans le cas de la catéchol-méthyl-transférase (Woodard et al. 1980), une base déprotone le groupement 2'-hydroxyle cible (nucléophile), qui attaque alors le carbone du groupement méthyle (électrophile) du SAM. Après un état de transition, le groupement méthyle perd sa liaison covalente avec le SAM au profit du groupement hydroxyle, qui perd son hydrogène. Le ribose cible est alors méthylé en 2'. Cette réaction met en évidence l'intervention essentielle d'une base tierce, qui déclenche la réaction de transméthylation en attirant l'atome hydrogène du groupement hydroxyle, permettant à ce dernier d'attaquer le carbone du groupement méthyl. D'après Cheng et al., le brin β4, du feuillet β caractéristique des méthyl-transférases dépendantes de SAM, contient les résidus catalytiques (Cheng et Roberts 2001) de ces enzymes. Il a notamment été suggéré par Aittaleb et al. (Aittaleb et al. 2003) que le résidu Asp 133 chez la FBL de *archeoglobus fulgidus* localisé au bout du brin β4 pourrait agir comme la base déclenchant la réaction de transfert du groupement méthyle, tandis que la lysine 182, localisée au bout du brin β5, a été suggérée comme stabilisant l'état de transition de cette réaction. Ces résidus sont conservés chez l'homme et la levure, ainsi que chez plusieurs espèces d'archées.

Plus récemment, le mécanisme de transméthylation par une ARN 2'-O-méthyl-transférase virale NS5 (non structural protein 5), du virus de la Dengue, a été étudié (Y. Zhao et al. 2015). Cette étude révèle la structure d'un domaine méthyl-transférase caractéristique

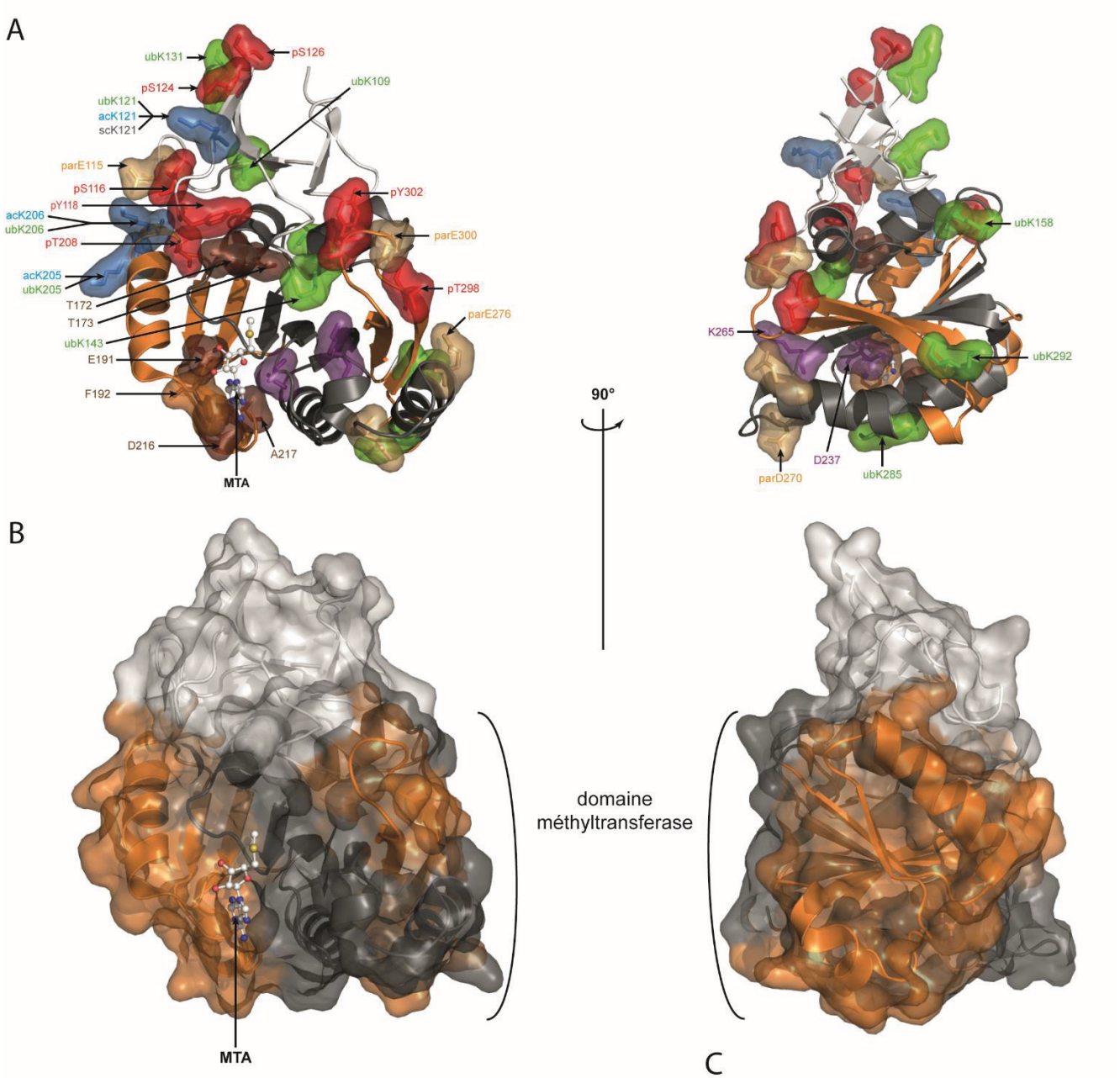


Figure 13 : Structure et MPT de la fibillarine humaine

A, **B**, Structure tertiaire de la FBL humaine (accès PDB 2IPX), indiquant la position des modifications post-traductionnelles (A), et la surface de ses domaines structuraux (B). Deux angles de vue sont représentés, celui de droite correspondant à une rotation de 90° dans un axe vertical à celui de gauche.

C, Domaine de liaison au SAM de la FBL humaine. La surface de ce domaine forme une poche permettant au MTA de se loger.

Phosphorylations (p, rouge), acétylations (ac, bleu claire), ubiquitinylations (ub, vert claire), poly(ARD-ribose)ylation (par, orange pâle), succinylation (sc, gris). MTA est un analogue du S-adénosyl-méthionine. Domaine méthyltransférase, orange ; régions du domaines méthyltransférase impliquées dans la liaison aux ARN, gris. accès PDB : 2IPX.

des méthyl-transférases connues, et met en évidence un résidu lysine localisé dans l'environnement catalytique, proche des groupements hydroxyle et méthyle substrats. Les auteurs montrent que cette lysine déclenche la réaction de transméthylation tandis qu'un résidu aspartate, également localisé proche des substrats, facilite la catalyse de cette réaction. Ces informations pourront être utilisées pour extrapoler des données fonctionnelles concernant la FBL humaine.

I.4.3.2.3. Le domaine de liaison aux ARN

La région centrale de FBL comprend le domaine de liaison à l'ARN (RBD) (figure 12C, 13A et 13B). Ce domaine contient la séquence GL/VVYAVEF, motif caractéristique des protéines qui lient l'ARN (Aris et Blobel 1991) conservé chez les FBL humaine, de *a. thaliana*, de levure et de X. Laevis. Chez la plante *a. thaliana*, FBL2 (l'une des deux FBL exprimées chez cette espèce) possède deux RBD, l'un localisé dans la région centrale de FBL2, et l'autre proche du domaine C-terminal (Rakitina et al. 2011). *In vitro*, ces domaines permettent l'interaction de FBL2 avec plusieurs espèces d'ARN, notamment ARNr, snoARN, snARN, siARN et des ARN viraux. De plus, ils montrent que ces deux RBD fonctionnent indépendamment, leur délétion n'abolissant pas l'interaction avec les différents ARN *in vitro*, mais leur présence simultanée dans la structure de FBL2 a un effet synergique vis-à-vis du potentiel d'interaction avec les ARN. Par ailleurs, les auteurs montrent que la séquence GL/VVYAVEF n'interagit pas directement avec l'ARN, mais serait impliquée dans le repliement du RBD de la région centrale. Tandis que les expériences *in vitro* montrent une activité de liaison aux ARN, les données de structure indiquent qu'il n'y a pas d'interaction directe. Cela suggère donc que FBL puisse interagir avec ses ARN substrats avant ou après la réaction de transméthylation, ou avec d'autres ARN. Notamment, il est probable que FBL interagisse avec des ARNm comme suggéré par D. Tollervey (Personnal communication, Tollervey, D., conférence EMBO, Août 2015).

L'ensemble de ces données sont essentiellement tirées d'études conduites chez les plantes, la levure, et les archées. Elles mettent en évidence le manque d'informations structurales et donc fonctionnelles concernant la FBL humaine.

I.4.4. Modifications post-traductionnelles de FBL

Grâce à des approches protéomiques, on sait aujourd'hui que la FBL humaine porte plusieurs modifications post-traductionnelles (figures 12C et 13A). La base de données PhosphoSitePlus (www.phosphositeplus.org) référence 21 résidus modifiés chez la FBL humaine. Des études de mutations du domaine GAR, de SILAC, et de spectrométrie de masse identifient quatre mono-méthylations d'arginine dans le domaine GAR (Guo et al. 2014; Ai et al. 1999). UniProtKB prédit en plus 6 di-méthylations d'arginines asymétriques dans ce domaine, par homologie avec le rat où ces MPT ont été décrites. D'autre part, quatre acétylations de lysines ont été décrites chez la FBL humaine, par SILAC et spectrométrie de masse, dans des échantillons enrichis en peptides acétylés avec des anticorps spécifiques de lysine acétylée (Choudhary et al. 2009; Mertins et al. 2013). PhosphoSitePlus référence également 8 phosphorylations (4 phosphosérines, 2 phosphothréonines, et 2 phosphotyrosines), décrites par spectrométrie de masse à partir de fractions enrichies en peptides phosphorylés via IMAC (Immobilised Metal Chromatography) (Grosstessner-Hain et al. 2011) ou dioxyde de titanium (Zhou et al. 2013). La FBL humaine pourrait aussi être sujette à 10 ubiquitinylations de lysines, dont 4 sur des lysines pouvant être potentiellement acétylées. L'enrichissement en peptide ubiquitinylés analysés par spectrométrie de masse a été effectuée par un anticorps spécifique du motif di-glycine-lysine, caractéristique des résidus ubiquitinylés après digestion trypsique (Wagner et al. 2011; Mertins et al. 2013; Woong Kim et al. 2011). Une étude spécifique à FBL rapporte que FBL peut être poly-ubiquitinylée, mais ne précise pas sur quel(s) site(s) (Min Chen et al. 2002).

De plus, d'autres travaux montrent que la FBL humaine porte également des poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation) (Y. Zhang et al. 2013; Jungmichel et al. 2013; Gagné et al. 2012). La PARylation est une MPT réversible qui consiste au transfert de monomères ADP-ribose d'un donneur (NAD^+) à un résidu aspartate, glutamate, lysine ou arginine. Cette MPT est catalysée par la famille des poly(ADP-ribose) polymérases (PARP), et hydrolysée par la PAR glycohydrolase (PARG). Impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, la PARylation est aussi associée au métabolisme des ARN, à la localisation sub-cellulaire spécifique de protéines, ou à l'assemblage de complexes protéiques (Y. Zhang et al. 2013; Jungmichel et al. 2013; Gagné et al. 2012). En particulier, PARP1 joue un rôle majeur dans la fonction et l'intégrité du nucléole. Chez la drosophile, la PARylation induite par PARP1 régule la maturation des ARNr et l'assemblage des ribosomes, probablement en régulant la localisation nucléolaire de

facteurs de la biogenèse des ribosomes (Boamah et al. 2012). Ces analyses ont été réalisées dans des fractions enrichies en peptides PARylés, via la suractivation de PARP et l'inhibition de PARG ou purification à l'aide de modules protéiques possédant une activité de liaison aux ADP-riboses, ou chromatographie d'affinité au boronate (Y. Zhang et al. 2013; Jungmichel et al. 2013; Gagné et al. 2012).

Une autre base de données, BioGRID, rapporte que la FBL humaine est également neddylée et FAT10-ylée (Chatr-aryamontri et al. 2013; Leng et al. 2014; J. Jones et al. 2008). Ces deux modifications post-traductionnelles sont une addition d'une molécule de Nedd8 ou de FAT10, des petites protéines similaires à l'ubiquitine. La neddylation est impliquée dans prolifération cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore le remodelage de la chromatine (J. Jones et al. 2008) ; tandis que la FAT10-ylation joue un rôle dans la traduction, la maturation des ARN, le repliement des protéines et l'assemblage de complexes macromoléculaires (Leng et al. 2014).

Il est intéressant de noter que deux phosphosérines pS6 et pS124 (la plus documentée, 28 études) ont été détectées lors d'étude du phosphoprotéome mitotique (Kettenbach et al. 2011; Dephoure et al. 2008; Malik et al. 2009; Olsen et al. 2010; Hegemann et al. 2011; Santamaria et al. 2011) suggérant que certaines MPT de la FBL humaine puissent avoir lieu en réponse à des signaux régulant la prolifération cellulaire, ou lors de l'arrêt de la biogenèse des ribosomes pendant la mitose.

A l'exception des méthylations d'arginines du domaine GAR, toutes ces MPT ont été détectées via des approches à large échelle, dans des conditions d'enrichissement parfois drastiques, voire sous des traitements chimiques qui ne sont pas forcément représentatifs d'un état cellulaire physiologique. De plus, une grande partie des résidus modifiés n'ont été identifiés que dans une ou deux études. Aucune de ces MPT n'a été l'objet d'études biochimiques dédiées, et bien que les rôles globaux de l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la PARylation soient très étudiés, nous ne disposons d'aucune information concernant leur rôle exact vis-à-vis de FBL et de son activité.

I.4.5. Les différentes fonctions de la fibrillarine

I.4.5.1. La 2'-O-méthylation des ARNr

FBL est aujourd'hui considérée comme la méthyl-transférase des ARNr. Ce rôle est supporté par de nombreuses études qui sont résumées ci-après. Le rôle de FBL dans la 2'-O-méthylation des ARNr est soutenu par ses caractéristiques structurales typiques des méthyl-transférases, décrites précédemment (H. Wang et al. 2000; Feder et al. 2003) et les données rapportant sa capacité à lier les ARN (Rakitina et al. 2011).

Cependant, peu d'études rapportent directement l'activité 2'O-méthyltranférase de FBL. Par un criblage de mutants ponctuels sensibles à la température chez la levure, Tollervey et al. ont identifié un mutant de Nop1 (FBL chez la levure) dont l'activité méthyl-transférase est déficiente, présentant une absence totale de méthylation des ARNr, mais qui maintient sa fonction dans la maturation et le clivage des ARNr, ainsi que dans l'assemblage des ribosomes (David Tollervey et al. 1993). Ce mutant (Nop1.3), porte deux mutations : A175V and P219S. La structure 3D de la FBL d'archées a par la suite permis de faire l'hypothèse que ces mutations influent probablement sur la capacité à Nop1.3 de lier le ligand SAM (H. Wang et al. 2000). Cette hypothèse est soutenue par une autre étude conduite chez la levure où les auteurs ont purifié le complexe C/D snoRNP par la technique TAP-Tag et testé son activité *in vitro*. Cette étude montre que le mutant Nop1.3 ne fixe pas le SAM et ne permet pas la 2'-O-méthylation (Galardi et al. 2002). Par ailleurs, des études similaires conduites chez les archées montrent que le sRNP contenant FBL, Nop5, et L7ae reconstitué *in vitro* permet la 2'-O-méthylation, tandis que le même complexe contenant une FBL mutée au niveau du domaine de liaison à SAM n'a pas d'activité méthyl-transférase (Omer et al. 2002).

L'ensemble de ces études montrent que FBL est la méthyl-transférase du complexe de méthylation. Cependant, les données ont été rapportées à partir d'études conduites principalement chez les archées et la levure et très peu d'informations sont disponibles sur l'activité méthyl-transférase de la FBL humaine.

Notre équipe a montré qu'une augmentation de l'expression de FBL dans des cellules épithéliales mammaires humaines, via l'inhibition de l'expression de p53, conduit à augmentation de la méthylation des ARNr à plusieurs sites. De plus, l'équipe rapporte que sous siARN FBL, les cellules HeLa présentent une baisse de la méthylation des ARNr observée par marquage [H^3]-méthylméthionine. (Erales et al. en préparation). Nous n'avons cependant

pas de donnée suite au KO FBL chez la souris, car ce KO n'est pas viable et des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) n'ont pas pu être dérivé (Newton et al. 2003).

I.4.5.2. La 2'-O-méthylation d'autres ARN

Des études conduites chez les eucaryotes et les archées ont identifié des cibles de la 2'-O-methylation dans d'autres espèces d'ARN. En particulier, chez les eucaryotes *C. Elegans*, *Xenopus* et chez la souris, deux petits ARN ont été identifiés permettant la 2'-O-méthylation site-spécifique du snARN U6 (spliceosome) (Kazimierz T Tycowski et al. 1998). Cette étude rapporte que ces ARN, contiennent des boîtes C, C', D et D', caractéristiques de snoARN C/D associés avec FBL et co-immunoprécipitent avec FBL suggérant une activité de méthylation des snARN. Par ailleurs, des petits ARN contenant à la fois les caractéristiques des snoARN C/D et ceux des snoARN H/ACA, et associés aux protéines correspondantes, sont capables de conduire la pseudouridylation et la 2'-O-méthylation de snARN. Ces ARN localisés dans les corps de Cajal, co-immunoprécipitent aussi avec FBL (Darzacq et al. 2002).

Chez les archées plusieurs sARN n'ont pas pu être associés à un site des ARNr. Des études ont donc été conduites sur d'autre ARN cibles pouvant correspondre à ces sARN. Ainsi, les séquences guides de certains sARN ont été associées avec des pré-ARNt (Dennis, Omer, et Lowe 2001). Plus précisément, la FBL d'archées ainsi que L7A, Nop5 et un sARN C/D (OE4630R-3'sRNA) forment un complexe contenant l'ARNt^{Trp}. Cependant, aucun ARNt n'a été suggéré comme cible chez les eucaryotes, laissant croire que la 2'-O-méthylation des ARNt est spécifique au règne des archées.

Enfin, la séquence guide du snoARN C/D HBII-52 chez l'homme, ne permet pas de cibler un site des ARNr, mais correspond plutôt à un site de l'ARNm du récepteur à la sérotonine 2C. Les auteurs de cette étude montrent également que l'homologue de HBII-52 chez la souris (MBII-52) co-immunoprécipite avec FBL (J. Cavaillé et al. 2000) suggérant que cette dernière participe à la méthylation d'ARNm (Personnal communication, Tollervey, D., conférence EMBO, Août 2015).

I.4.5.3. La méthylation de protéines

Plus récemment, le groupe de T. Kouzarides a montré qu'en plus d'être une ARN 2'-O-méthyl-transférase, la FBL humaine et son homologue Nop1 sont également des histone-méthyl-transférases. En effet, Nop1 méthyle la glutamine 105 de l'histone H2A chez la levure (Q104 chez l'homme) et le groupe montre que la FBL est l'enzyme responsable de cette méthylation chez l'homme (Tessarz et al. 2014). De plus, cette modification post-traductionnelle de l'histone H2A est particulièrement enrichie dans la chromatine des ADNr 35S. Cette modification est donc spécifique d'une région du génome transcrite par l'ARN polymérase I (ARN Pol I) et inhibe la fixation du complexe chaperon d'histone FACT (Facilitator of Chromatin Transcription) activant ainsi la transcription par l'ARN Pol I (Tessarz et al. 2014). Aujourd'hui, aucune étude ne décrit le mécanisme d'action de la FBL dans la méthylation d'H2A. Néanmoins, Nop1 purifiée est capable de méthyler directement l'histone H2A *in vitro*, sans autre co-facteur, suggérant que FBL puisse fonctionner dans un contexte moléculaire différent de celui de la méthylation des ARNr. Il a en été suggéré que FBL elle-même puisse être l'élément régulateur de cette modification post-traductionnelle, notamment via le grand nombre de modifications post-traductionnelles qu'elle porte, qui pourraient être la cible de voies de signalisation régulant la production de ribosomes (Tessarz et al. 2014). Ces données montrent que FBL régule à la fois la production de ribosomes en contrôlant la transcription par l'ARN Pol I et leur qualité via son activité 2'-O-méthyl-transférase des ARNr. De plus, elle indique que FBL n'est pas seulement une ARN méthyl-transférase, mais également une protéine méthyl-transférase. Il est donc possible que d'autres protéines soient substrats de FBL.

I.4.5.4. Le clivage des ARNr

FBL est également impliquée dans la maturation des ARNr, notamment leur clivage. En effet, le criblage de mutants effectué par Tollervey et al. a permis l'identification des mutants Nop1.2 et Nop1.5 dont les activités méthyl-transférases des ARNr sont maintenues, mais qui présentent un défaut de maturation des ARNr. En effet on constate par Northern Blot une accumulation de l'intermédiaire pré-ARNr 35S tandis que tous les autres pré-ARNr ainsi que les produits ARNr finaux 18S et 25S ne sont pas produits (David Tollervey et al. 1993). Certains snoARN à boîtes C/D ne sont pas impliqués dans la modification post-transcriptionnelle des ARNr, mais jouent tout de même un rôle dans leur maturation. C'est le cas notamment de U3,

dont l'importance précoce des pré-ARNr, dans plusieurs espèces eucaryotes bénéficie d'une littérature abondante (Maxwell et Fournier 1995; Venema et Tollervey 1999; Beltrame et Tollervey 1995; BOROVJAGIN et GERBI 2004). U3 est assemblé dans un complexe snoRNP contenant les membres connus du complexe de méthylation, dont FBL (Grandi et al. 2002; Dragon et al. 2002) appuyant d'avantage les arguments en faveur de son implication dans le clivage des ARNr. Par ailleurs, FBL est nécessaire à l'accumulation et la maturation d'ARNr dans des lignées cellulaires du cancer de la prostate, où le blocage du clivage, et donc de la production d'ARNr, est source de létalité (Koh et al. 2011). De plus, l'impact de la FBL sur le clivage des ARNr a été confirmé dans des cellules humaines avec la diminution de son expression par siARN qui conduit à une inhibition du clivage des ARNr (Tafforeau et al. 2013, Erales et al. En préparation).

I.4.6. Partenaires protéiques de la fibrillarine

FBL est associée à de nombreuses protéines et seulement un petit nombre de ces interactions sont requises pour ses fonctions connues. C'est notamment le cas de des interactions avec Nop56, Nop58 et 15.5kDa qui sont requises pour son activité méthyl-transférase des ARNr, au sein du complexe snoRNP à boîtes C/D. La FBL interagit aussi avec le facteur d'assemblage du complexe de méthylation Nufip dont le rôle serait de contrôler l'activation catalytique du complexe (Bizarro et al. 2014). Des interactions de FBL sont liées à l'implication de FBL dans l'infection par plusieurs virus (voir paragraphe suivant « FBL et Pathologies »). Certaines de ces interactions pointes vers un lien entre la fonction de FBL dans la biogenèse des ribosomes et son rôle dans l'infection virale, tandis que d'autres suggèrent des rôles indépendants de la biogenèse des ribosomes.

A ces données s'ajoutent plusieurs études protéomiques, qui caractérisent à large échelle les partenaires protéiques de FBL. Dans une étude à large échelle visant à décrire les complexes protéine-protéine se formant chez la levure, Krogan et al. ont identifié RPA49, sous-unité de l'ARN Pol I (homologue de PAF53, chez l'homme) comme partenaire interagissant avec Nop1 (Krogan et al. 2006). Cette interaction n'a pas encore été montrée

Partenaire protéiques de FBL chez la levure							
ABT1	DBP3	IMG2	NOB1	PRP4	RSC9	SSZ1	YIM1
ACF2	DBP4	IOC4	NOC2	PRP43	RTT101	STE11	YTM1
APL2	DBP6	KIF48	NOC3	PTI1	RTT103	STH1	
APL4	DBP7	KRI1	NOG2	PUF6	RVS167	STO1	
APM1	DIS3	LSG1	Nop13	QRT2	SBP1	SUA7	
ARD1	DOT1	LSM2	NOP58	RAD1	SCC4	TAF17	
ASC2	DST1	LSM4	Nop7	RAD4	SD2	TAF68	
ASK1	ECM16	LSM6	Nop8	RAD50	SEC28	TFA1	
BCK1	EFT2	LSM8	NTH1	RAD53	SEM1	TFC3	
BFR2	EGD1	LYS20	NUP133	RCL1	SET2	THO1	
BRE2	EGD2	MAK21	NUP145	RCO1	SFA1	TIF4631	
BRE5	EMP24	MCM16	NUP157	REB1	SGN1	TIF4632	
BUD21	ERB1	MDM20	ORC1	RPG1	SGV1	TIF5	
BUD22	FAP1	MMS22	ORC6	RPL12A	SIK1	TOP2	
CBF5	FRE3	MRP7	OSH2	RPL1A	SIN3	TRM3	
CBR1	GAL11	MRPS28	PAC10	RPL40A	SKI2	TRP5	
CDC24	GAR1	MSC7	PAT1	RPN3	SKI8	TSR1	
CDC33	GBP2	MSN2	PCL7	RPN6	SPC1	UBP10	
CDC73	GIN4	MTR4	PMR1	RPS26B	SPT20	UBP15	
CHD1	GIS2	NAB2	PMS1	RRP45	SPT4	UBP6	
CIC1	HCA4	NAP1	POL32	RRP5	SRP40	UGP1	
CRN1	HHF1	NAT1	POL5	RRP7	SRP68	ULP2	
CTK3	HTA2	NCL1	PPH21	RRP8	SSB2	UME6	
CTR9	HTB1	NHP2	PRE2	RRP9	SSF1	UTP6	
DBP	HTB2	NIP1	PRP11	RSA3	SSQ1	VIP1	

Tableau 2 : Partenaires protéiques de FBL chez la levure identifiés par Krogan et al. 2006

chez l'homme, mais montre qu'un homologue de FBL interagit directement avec la machinerie de transcription de l'ARN Pol I et pourrait expliquer le recrutement spécifique de FBL sur les loci transcrits par cette polymérase. Curieusement, Nop58 a également été identifiée comme partenaire interagissant avec RPA49, suggérant que des co-facteurs de l'ARN Pol I participent à la méthylation des histones, renforçant l'hypothèse d'une coordination entre la synthèse des ARNr et leur maturation.

La FBL interagit avec la protéine SF2A-p32, un facteur de régulation de l'épissage (Petersen-Mahrt et al. 1999; Yanagida et al. 2004). Cette interaction, montrée par co-immunoprécipitation de FBL est indépendante son association avec les pré-ARNr ou les snoARN. Nop52 interagit également avec p32, et cette interaction fait compétition à l'interaction entre p32 et FBL (Yoshikawa et al. 2011). Ces études montrent que p32 est requise pour la maturation des ARNr. De plus, récemment il a été montré que Nop52 est responsable du clivage au site 2 des pré-ARNr 47S/45S et 32S (Yoshikawa et al. 2015), suggérant que la compétition entre FBL et Nop52 pour l'interaction avec p32 est un évènement majeur de la biogenèse des ribosomes, puisque le clivage au site 2 est celui qui permet la séparation de la particule pré-ribosomique 90S en deux sous-unités.

Chez *A. Thaliana*, FBL2 fait partie du complexe Mediator. Mediator est un complexe multi-protéique permettant la régulation de la transcription par l'ARN Pol II (Bäckström et al. 2007). Cette interaction n'a pas été rapportée pour FBL1 suggérant que la duplication du gène *FBL* chez les plantes a donné lieu à des fonctions spécialisées des deux FBL. Par ailleurs, aucune association entre la FBL humaine et la transcription par l'ARN Pol II n'a été faite chez l'homme. Il est donc probable que l'association de FBL avec le complexe Mediator soit spécifique au règne des plantes.

D'autre part, près de 180 autres partenaires de Nop1, dont Nop58 ont été identifiés par analyse des complexes protéiques à large échelle chez la levure (tableau 2) (Krogan et al. 2006). Un grand nombre de protéines identifiées ne sont cependant pas impliquées de manière connue dans la biogenèse des ribosomes, suggérant l'implication de FBL dans d'autres processus cellulaires. Ces données sont renforcées par les travaux de Yanagida et al. qui détectent chez l'homme 170 protéines associées directement ou non à FBL (Yanagida et al. 2004). Parmi ces 170 protéines 73 sont des protéines ribosomiques. Dans les

97 autres protéines, seules 24 ont été associées à des facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes. Les 63 partenaires protéiques restantes portent diverses fonctions

Partenaires protéiques de FBL chez l'homme					
ABCE1	EIF2S2	LIN28B	PABPC4	RPL19	TAF9
AHDC1	EIF4A3	LRRC41	PAN2	RPL23	tat
ARFGEF1	EIF4G1	MAGOH	PASK	RPL5	TBC1D17
ARMCX3	EIF6	MCM5	PDCD11	RPL7	TBL3
ARRB2	ENO1	MCRS1	PES1	PRMT1	TERF2
BAK1	ERG	MEPCE	PHAX	PRMT6	TGS1
BANF1	EXOSC3	MGMT	PHF6	RBM19	TP53
BCORL1	EZH2	MOV10	PIN4	RPL4	TRO
BMI1	FN1	MPHOSPH10	PNO1	RPL6	TUBA3C
BOP1	FTSJ3	MRTO4	PIH1D1	RPL9	TUBB1
BRIX1	GEMIN2	MRTO4	PINX1	RPS11	TUBB8
BYSL	GEMIN4	MYC	PNO1	RPS13	U2AF1
C1QBP	GLYR1	NAA15	POP1	RPS14	UBC
CBX8	GNL3	NAF1	PRMT3	RPS15A	UTP15
CCDC8	GPATCH4	NAP1L2	PRMT5	RPS24	UTP18
CCDC86	GSG2	NAP1L3	PRPF3	RPS3	UTP3
CD40	GTF2B	NCL	PRPF31	RPS4X	VCAM1
CDC23	GTF3C1	NHP2	PRRC2C	RPS5	WDR36
CDK2	GTF3C2	NHP2L1	PUS7	RPS6	WDR36
CENPA	GTF3C3	NIFK	PWP1	RPS7	WDR43
CEP250	GTF3C5	NOC2L	PWP2	Rrbp1	WDR75
CHST8	GTPBP4	NOL11	PXK	RRP9	XPO1
CIRH1A	GXYLT2	KIAA0020	RANBP6	RRS1	Ybx1
COPRS	H3F3A	KPNA1	RBM23	RSL1D1	YY1AP1
COPS5	HNRNPR	MCM2	RECQL4	RSL24D1	ZFP91
CTCF	DKC1	NIFK	RIOK1	RSPRY1	ZMYM4
CUL3	EED	NOC3L	RIOK3	RTCA	ZNF281
CUL7	HDGF	NOL6	RNF19B	RUVBL1	ZNF316
DCAF13	HEMGN	NOL8	RNF2	RUVBL2	ZNF318
DDX18	HNRNPU	NOLC1	RPA1	SDAD1	ZNF324
DDX20	IPO5	NOM1	RPA2	SIRT7	ZNF430
DDX24	ITGA4	NOP2	RPA3	SMN1	ZNF496
DDX27	KLF6	NOP56	RPL10	SRFBP1	ZNF629
DDX5	KNOP1	NOP58	RPL11	SRRM2	ZNF644
DDX56	KPNA5	NPM1	RPL13A	TARDBP	ZNHIT3
DHX15	KPNA6	NSUN2	RPL15	RPS13	TCF3
EBNA1BP2	KRAS	NTRK1	RPL17	RPS2	TOP1
EEF1A1	LARP7	NXF1	RPL18	RPS8	UTP15
EGFR	LIN28A	OBSL1	RPL18A	SUZ12	ZNF93

Tableau 3 : Partenaires protéiques de FBL chez la levure recensés la base de données BioGrid (www.thebiogrid.org)

et activités. On retrouve notamment des facteurs de l'épissage renforçant l'hypothèse de la participation de FBL à ce processus. On retrouve également des facteurs de liaison à l'ARN et des kinases dépendantes de l'ADN. 44 de ces facteurs sont connus pour leur localisation nucléolaire (Yanagida et al. 2004).

De plus, 230 partenaires protéiques de la FBL humaine sont recensés sur la base de données BioGRID (tableau 3) (Chatr-aryamontri et al. 2013; « FBL Result Summary | BioGRID » 2016). Outre les autres membres du complexe snoRNP C/D, on retrouve beaucoup de protéines ribosomiques et des protéines jouant un rôle dans la biogenèse des ribosomes, ce qui est cohérent avec les deux études présentées ci-dessus. On retrouve également des hélicases de la famille de DDX. Il est intéressant de noter que la base de données rapporte aussi une interaction entre la FBL humaine et SIRT7, une déacétylase de la famille des sitruin, enrichie dans les nucléoles, et connue pour son rôle de régulation de la biogenèse des ribosomes (W. Kim et Kim 2013, 7).

Enfin, FBL interagit avec le phosphatidylinositol-4.5-bisphosphate (PIP2). Le niveau intracellulaire du PIP2 est contrôlé par PTEN qui est responsable de la déphosphorylation du PIP3 en PIP2. L'interaction du PIP2 avec FBL conduirait à un changement de conformation de FBL et un défaut de liaison de celle-ci au snARN U6, suggérant une altération de liaison aux ARN (Sobol et al. 2013; Yildirim et al. 2013).

La multitude d'interactions rapportées pour FBL dont on ne connait pas le rôle montre d'avantage l'étendue des fonctions possibles de FBL. Les protéines interagissant avec FBL peuvent en particulier être responsables de l'ajout ou l'hydrolyse de modifications post-traductionnelles, ou encore réguler directement la stabilité, la localisation, voir l'activité méthyl-transférase via des changements de conformation dépendants de ces interactions. Il est donc crucial d'éclaircir d'avantage les mécanismes qui permettent la régulation de l'activité de FBL. Par ailleurs, malgré les nombreuses fonctions et rôle biologiques aujourd'hui associés à FBL, plusieurs zones d'ombres persistent quant à la signification de ses interactions avec d'autres partenaires dont les rôles n'ont pas été assimilés aux fonctions connues de FBL.

I.4.7. Fibrillarine et Pathologies

Comme exposé dans les paragraphes précédents, plusieurs éléments indiquent que la FBL puisse jouer un rôle régulateur dans divers processus biologiques importants, tels que la traduction, la prolifération, le développement ou la pluripotence. En support de cette hypothèse, plusieurs observations indiquent qu'une dérégulation de FBL est associée à un phénotype pathologique.

I.4.7.1. Fibrillarine et cancer

L'implication de FBL dans le cancer est de plus en plus évidente. En effet, les études ayant mesuré l'expression de FBL dans les cancers montrent une surexpression par rapport au tissu sain. Les travaux de notre équipe ainsi que d'autres groupes montrent que le niveau d'expression de FBL en ARNm (études transcriptomiques et RT-qPCR) est significativement plus élevé dans les tumeurs du sein (Marcel et al. 2013; Su et al. 2013), du col de l'utérus (Choi et al. 2007) et de la prostate (Koh et al. 2011) en comparaison aux tissus sains. L'élévation de l'expression de FBL est confirmée au niveau protéique par western blot et immunohistochimie dans les cancers du sein (Su et al. 2013) et de la prostate (Koh et al. 2011; Su et al. 2013).

De plus, l'expression de FBL a été associée à l'expression d'oncogènes ou gènes suppresseur de tumeurs, connus pour leur implication dans le développement tumoral. En particulier, MYC régule la transcription de *fbl* (Schlosser et al. 2003; Coller et al. 2000) en se liant directement à son promoteur (Koh et al. 2011). Cette corrélation entre l'expression de *fbl* et de *c-myc* est validée dans des tumeurs du sein (Su et al. 2013), dans les cellules B humaines (Schlosser et al. 2003), ainsi que des fibroblastes primaires humains (Coller et al. 2000). Ces études démontrent clairement que *fbl* est une cible de c-MYC, dont l'impact sur le phénotype cancéreux et la biogenèse des ribosomes est aujourd'hui bien connu.

A ces études s'ajoutent des travaux de notre équipe qui démontrent que la transcription de *fbl* est réprimée par le gène suppresseur de tumeur p53, qui se lie directement au promoteur de *fbl*, au niveau de l'intron 1 (Marcel et al. 2013). L'équipe montre ainsi qu'en inactivant p53, l'expression de *fbl* est augmentée dans des lignées épithéliales mammaires immortalisées.

L'expression de FBL est également corrélée à des caractéristiques cellulaires associées aux cellules cancéreuses, notamment la prolifération. Par exemple, la diminution de l'expression de FBL par siARN a pour conséquence une baisse de la prolifération et de la clonogénicité de lignées cellulaires du cancer de la prostate et du sein, accompagnée d'une baisse du volume et du nombre de tumeurs formées par des cellules de cancer du sein injectées chez la souris (Koh et al. 2011; Su et al. 2013). De plus, notre équipe a montré qu'une surexpression de la FBL-GFP conduit à une augmentation de la prolifération et du nombre de colonies en agar mou (Marcel et al. 2013).

Enfin, l'augmentation de l'expression de FBL, induite par l'inhibition de p53, conduit à une augmentation du taux de méthylation de l'ARNr, associée une augmentation de la traduction de gènes clés dans la tumorigénèse, tels que *c-MYC*, *FGF1*, *FGF2*, *VEGFA*, et *IGF1R* (Marcel et al. 2013). Ces résultats sont soutenus par l'inhibition de l'expression de FBL par siARN dans les cellules HeLa, qui confirme l'impact de l'expression de FBL sur la traduction (Erales et al. en préparation).

Enfin, l'analyse de l'expression de FBL dans les tumeurs de cancer du sein révèle que cette dernière est corrélée avec la survie des patientes, faisant de FBL un marqueur potentiel indépendant de mauvais pronostic (Marcel et al. 2013 ; données non publiées).

L'ensemble de ces données présentent FBL comme une protéine clé dans le développement de plusieurs cancers, et suggèrent qu'elle puisse être impliquée dans la prolifération et le contrôle de la traduction des cellules cancéreuses.

I.4.7.2. Fibrillarine et infection virale

Le rôle de FBL au cours l'infection virale est soutenue par de nombreuses études. L'expression et/ou l'activité de FBL est requise pour l'infection par plusieurs virus. C'est en particulier le cas des virus hautement pathogéniques Hendra et Nipah (Deffrasnes et al. 2016), et du virus Groundnut Rosette, un virus de plante pour lequel FBL permet sa dissémination dans l'ensemble du phloème de la plante hôte (S. H. Kim et al. 2007; Zheng et al. 2014). De plus, FBL favorise la formation de particule virale, notamment, lors de l'infection par le virus Groundnut Rosette. En outre, lors de l'infection par les virus Hendra et Nipah, en absence de FBL, la synthèse d'ARN et protéines virales est sévèrement diminuée (Deffrasnes et al. 2016).

Par ailleurs, FBL interagit avec plusieurs protéines virales et colocalise avec ces dernières dans les nucléoles et/ou les corps de Cajal. La protéine ORF3 encodée par le virus Groundnut Rosette, interagit avec le domaine GAR de FBL lors de la phase nucléaire de l'infection et est transportée entre les corps de Cajal et le nucléole (S. H. Kim et al. 2007; Zheng et al. 2014). La protéine Tat du HIV, responsable d'une altération de la maturation des pré-ARNr et d'une baisse de la quantité de ribosomes produits, interagit avec FBL et le complexe snoRNP U3 lors de l'infection (Ponti et al. 2008), suggérant que le rôle de FBL dans l'infection virale est lié à sa fonction dans la biogenèse des ribosomes. FBL interagit aussi avec la protéine formant la nucléocapside du virus porcin artérivirus via son domaine GAR (Yoo et al. 2003) ainsi qu'avec la protéine NS1 dans les nucléoles des cellules infectées par le virus H3N2, responsable de la grippe (Melén et al. 2012).

Ces études suggèrent un rôle important de FBL dans l'infection par des virus ciblant des hôtes différents, que ce soit l'homme, d'autres animaux tel que le porc, ou des plantes. Cependant, bien qu'il ait été suggéré que l'impact de FBL lors de l'infection virale est lié à sa fonction dans la biogenèse des ribosomes, le rôle de ces interactions dans l'infection ou dans la réponse des cellules hôtes reste inconnu.

D'autre part, FBL peut aussi être délocalisée lors de l'infection virale. C'est notamment le cas lors de l'infection par le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1), au cours de laquelle une fraction de FBL est délocalisée dans les centromères (Morency et al. 2007), suggérant que FBL puisse être impliquée dans la réponse à certains stress génotoxiques. En outre, FBL est aussi délocalisée dans le cytoplasme au cours de l'infection par le virus Groundnut Rosette (S. H. Kim et al. 2007; Zheng et al. 2014). Cette délocalisation suggère un rôle potentiel de FBL dans d'autres fonctions cellulaires, indépendantes de la biogenèse des ribosomes, qui sont détournées par le virus.

I.4.7.3. Fibrillarine et sclérodermie systémique

FBL a également été identifiée par l'utilisation de sérum auto immuns de patients atteints de sclérodermie systémique (Lischwe et al. 1985; Ochs et al. 1985). Parmi les auto-anticorps générés par cette pathologie auto-immune, on retrouve des anticorps anti U3 RNP ciblant la fibrillarine. La présence de ces anticorps dans le sérum de patients constitue un biomarqueur spécifique la de sclérodermie systémique, bien que seulement 7% des patients

atteints de cette maladie ne soient séropositifs pour les anticorps anti U3 RNP (Kipnis, Craft, et Hardin 1990). Il a été rapporté que les sérums auto-immuns de patients mâles afro-américains atteints de cette pathologie sont particulièrement enrichis en auto-anticorps anti fibrillarine et cet enrichissement est corrélé avec une augmentation du risque d'hypertension artérielle pulmonaire (Sharif et al. 2011; Aggarwal et al. 2009). Curieusement, lors de traitements au mercure, la souris développe spécifiquement des autoanticorps ciblant le même épitope de FBL que les anticorps des patients atteints de sclérodermie systémique (Arnett et al. 1996). Par ailleurs, le traitement au mercure conduit à une inhibition de la transcription par l'ARN Pol I, la poly-ubiquitinylation de FBL et sa délocalisation dans le nucléoplasme, où elle colocalise avec le protéasome 20S (Min Chen et al. 2002; M. Chen et von Mikecz 2000). Plus de trente ans après la première identification de ces autoanticorps, les rôles des autoanticorps anti FBL et de la FBL dans la sclérodermie systémique ne sont pas connus.

I.5. Traduction et hétérogénéité des ribosomes

Après plusieurs étapes de maturation post-transcriptionnelles, les ARNm sont pris en charge par les ribosomes et sont traduits en protéines. Il existe plusieurs mécanismes de régulation de la traduction, faisant intervenir des éléments en *cis* présents sur l'ARNm et des facteurs protéiques et ARN agissant en *trans*, en lien avec diverses voies de signalisation cellulaire. Récemment, il a été proposé que le ribosome lui-même intervienne comme plateforme de régulation de la traduction. Cette nouvelle notion présente le ribosome non pas comme un complexe unique et invariable de la synthèse protéique, mais comme une population hétérogène, dont la composition et l'activité intrinsèque varient. Cette hétérogénéité intervient aux niveaux des PR et des ARNr. Ces concepts seront abordés dans ce chapitre, et constituent une hypothèse de travail pour notre équipe et mon travail de thèse.

I.5.1. Structure des ribosomes et traduction

Le rôle des ribosomes dans la traduction est clairement montré depuis les années 1950-1960 (McQuillen, Roberts, et Britten 1959; Kirsch, Siekevitz, et Palade 1960; Palade 1975). Cependant ce n'est que récemment que les techniques de biochimie et biophysique structurales, telles que la cristallographie aux rayons X et la cryo-électromicroscopie permettent l'étude de la structure tridimensionnelle du ribosome. La structure du ribosome bactérien a notamment donné lieu au prix Nobel de chimie pour V. Ramakrishnan, A. Steitz et A. Yonath en 2009 ; et la première structure du ribosome eucaryote a été publiée par le groupe de M. Yusupov en 2010 (Ben-Shem et al. 2010). Par la suite, le ribosome humain a été caractérisé par cryo-EM (Khatter et al. 2015; Anger et al. 2013), avec cependant des degrés différents de résolution. C'est pourquoi, on puise encore aujourd'hui beaucoup d'informations des ribosomes bactériens et de levure pour modéliser le ribosome humain et déchiffrer les principaux mécanismes de la synthèse protéique. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur le ribosome eucaryote.

Comme les ribosomes de toutes les espèces, le ribosome eucaryote présente une organisation asymétrique en deux sous-unités (SU), une grande et petite SU, nommées selon

leur coefficient de sédimentation : 60S et 40S, respectivement (figure 14A). L'assemblage des deux sous-unités forme le ribosome dont le coefficient de sédimentation est 80S, de masse moléculaire d'environ 4.3 MDa chez les mammifères. Chaque SU contient des ARNr en complexe avec des protéines ribosomiques (PR) : chez l'homme, la SU 40S comprend l'ARNr 18S ainsi que 33 PR, tandis que la SU 60S contient les ARNr 28S, 5,8S et 5S avec 47 protéines ribosomiques. Au sein du ribosome, il se forme donc un très grand nombre d'interactions protéine-protéine, ARNr-protéine, et ARNr-ARNr. Ces interactions sont bien sûr d'importance cruciale pour le mécanisme de traduction.

Le ribosome présente une forme globale avec des structures reconnaissables conservées dans le ribosome bactérien: La tête et le cou, l'épaule et le corps, ainsi qu'une plateforme et les pieds droit et gauche, formés par la SU 40S. La SU 60S forme aussi des structures caractéristiques : une protubérance centrale, ainsi que les tiges L1 et P (Wilson et Cate 2012; Anger et al. 2013) (figure 14B).

Le ribosome présente plusieurs sites fonctionnels. Notamment, lors de l'élongation, le polypeptide, protéine en devenir, forme une chaine qui sort petit à petit du ribosome. Cette chaine passe par un tunnel de sortie qui est formé par le ribosome entre le centre de transfert de la liaison peptidique (PTC) et la surface de la SU 60S. Ce tunnel joue un rôle dans le repliement de la protéine en cours de synthèse.

Le ribosome contient également trois sites A, P, et E dans lesquels l'ARNt est présent au cours de l'élongation. En particulier, au site A se fixe l'aminoacyl-ARNt intégré dans ce site par eEF1a et un GTP. Dans le site A, la position de l'ARNt est telle que la boucle de l'anticodon interagit directement avec le codon de l'ARNm permettant l'appariement entre les deux séquences. Les travaux conduits sur les ribosomes bactériens et de levure permettent de faire l'hypothèse que les interactions formées entre l'ARNr 18S et l'ARNt au site A ont pour fonction de vérifier le bon appariement codon-anticodon, et ainsi contrôlent le respect du code génétique (figure 15A). Ces interactions seraient formées par 3 nucléotides de l'ARNr 18S, conservés de manière universelle. Il est proposé que bien que ces interactions forcent l'appariement du codon et de l'anticodon, elles tolèrent le non-appariement de la 3e base du codon, induisant ainsi une potentielle dégénérescence du code génétique. L'absence d'appariement des deux autres bases cause cependant un défaut d'interaction entre l'ARNr 18S et l'ARNt au site A. Ainsi, les contraintes structurales

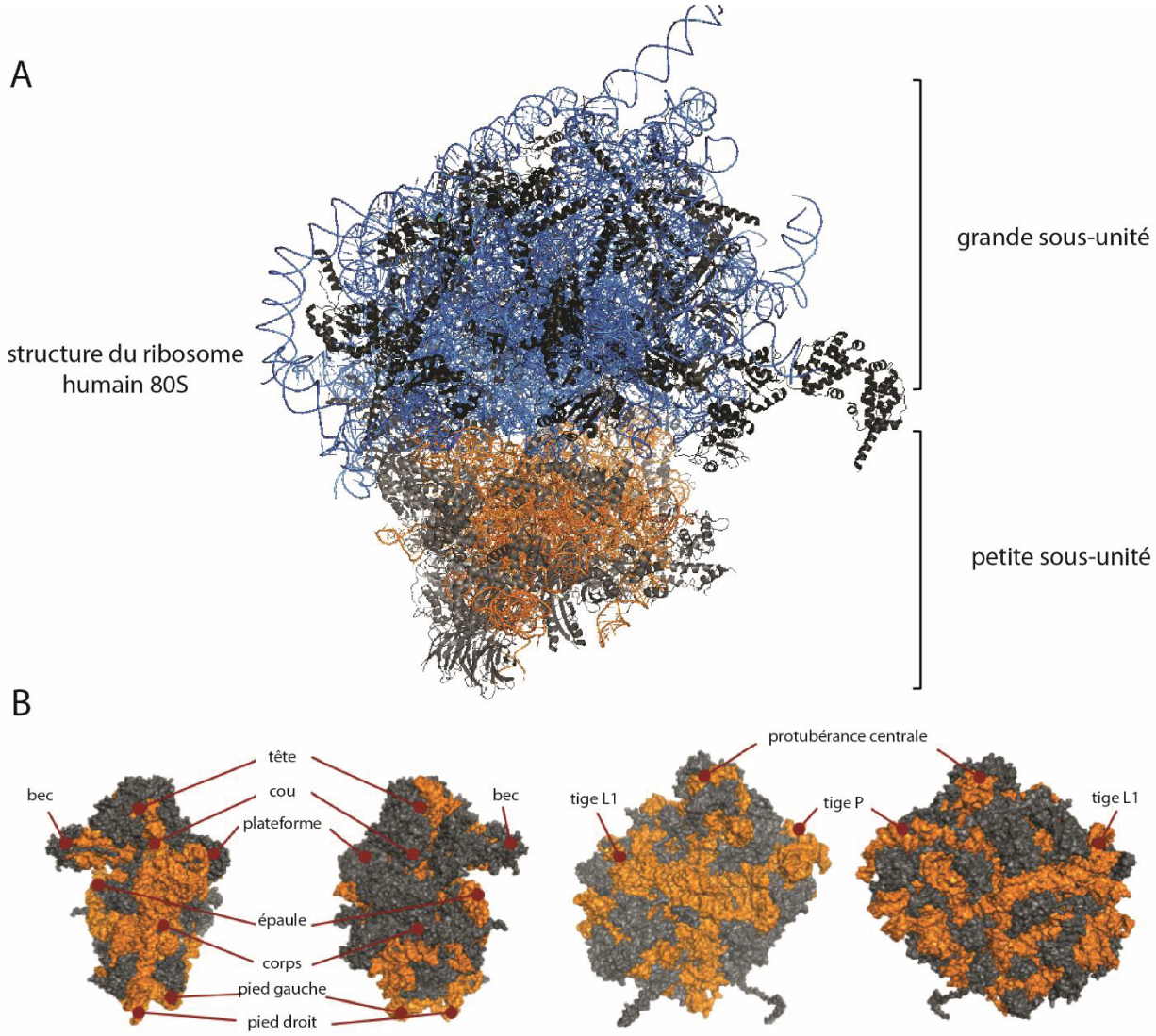


Figure 14 : Structure du ribosome humain

A, Structure globale du ribosome humain 80S. On distingue la grande et la petite sous-unité, qui s'assemble autour d'un espace de passage de l'ARNm. bleu, ARNr de la grande sous-unité, orange, ARNr de la petite sous-unité, noir, protéines ribosomiques

B, Structure de la sous unité 40S (gauche) : on distingue une mophologie particulière décrite par la tête, le cou, la plateforme, l'épaule, le corps, les pieds gauche et droit ainsi que le bec. A droite, la structure de la sous-unité 60S, présente aussi une morphologie particulière, avec notamment une protubérance centrale, la tige L1 et la tige P. Gris, protéines ribosomiques; orange, ARNr.

imposées par le ribosome auraient pour conséquence que l'ARNt serait expulsé du site A, hors du ribosome.

Au cours de l'élongation, le bon appariement entre le codon et l'anticodon permet l'hydrolyse du GTP, la libération d'eEF1a, et induit des changements structuraux dans le ribosome et l'ARNt. Ces changements de conformation joignent les extrémités CCA de l'aminoacyl-ARNt du site A et du peptidyl-ARNt positionné au site P, dans le PTC (figure 15B). Le PTC autour des extrémités des ARNt ne présente que des ARNr, les PR semblent trop éloignées pour participer directement à la réaction. Les ARNr au PTC forment des interactions avec les extrémités des ARNt positionnés aux sites A et P, et forment un environnement catalytique permettant le transfert de la liaison peptidique de l'ARNt au site P à celui au site A (Ramakrishnan 2002). Ces données structurales sont venues confirmer les données biochimiques qui proposaient qu'au sein du ribosome ce sont les ARNr qui sont porteurs de l'activité enzymatique, faisant du ribosome un ribozyme (B. Zhang et Cech 1997; Nissen et al. 2000), terme qualifiant les ARN possédant une activité enzymatique intrinsèque (Kruger et al. 1982).

Le site E (exit) est le site où l'ARNt est libéré du ribosome. Le transfert de la liaison peptidique de l'ARNt du site P à celui du site A déclenche un changement structural de l'ARNt du site P qui est déacétylé, et positionné de manière intermédiaire entre les sites P et E, tandis que l'aminoacyl-ARNt du site A est en position intermédiaire entre les sites A et P. Ce changement induit un mouvement de rotation de la SSU par rapport à la LSU. Ce mouvement déclenche la libération du site A qui peut ensuite être occupé par un nouvel aminoacyl-ARNt, le site P contient alors le nouveau peptidyl-ARNt. L'ARNt déacétylé venant de céder la liaison peptidique est alors positionné au site E (Exit). L'ARNt déacétylé présent au site E à l'étape précédente est expulsé du ribosome.

Ainsi, les données structurales issues de l'analyse de nombreux complexes de ribosomes ou de sous-unité associés aux différents facteurs de traduction, ont montré que le ribosome est une structure moléculaire dont le fonctionnement est intimement associé à sa structure. Toute variation de la composition chimique du ribosome est vraisemblablement donc de nature à modifier son fonctionnement au cours de la synthèse protéique.

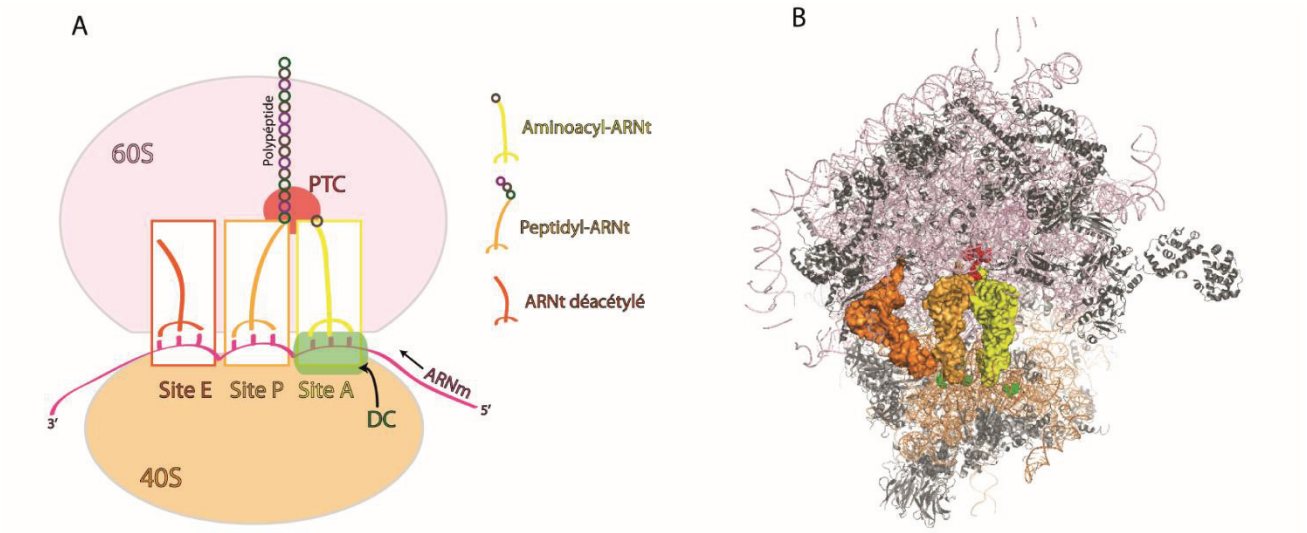


Figure 15 : Domaines du ribosome clés dans la traduction

A, Représentaion schématique de la postion des ARNt dans le ribosome. Au site A, le site d'entrée de l'ARNt, l'aminoacyl-ARNt présente la boucle anti-codon de manière à ce que cette dernière interagisse avec le codon de l'ARNm, dans le centre de décodage. L'extrémité de l'aminoacyl-ARNt portant l'acide aminé correspondant au codon est proche de celle du peptidyl-aminoacyl positionné au site P, et elles sont localisées dans le centre de transfert de la liaison peptidique. Le peptidyl-aminoacyl est lié au polypeptide en cours de formation. L'ARNt au site E est déacétylé et prêt à être expulsé du ribosome dès l'entrée d'un nouvel ARNt au site A.

B, Structure du ribosome 80S humain, avec la position prédite des ARNt. Jaune aminoacyl-ARNt au site A, vert peptidyl-ARNt au site P, orange, ARNt déacétylé au site E.

I.5.2. La régulation de la traduction

Le contrôle de la traduction intervient essentiellement au niveau de la régulation de son initiation. Le mécanisme majoritaire est l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe des ARNm, tandis qu'un second mécanisme, minoritaire, permet l'initiation de la traduction de manière indépendante de la coiffe. Cette modalité d'initiation est moins bien caractérisée que celle dépendante de la coiffe et concerne une plus petite population d'ARNm contenant des séquences IRES (Internal Ribosome Entry Site). Cependant, la population d'ARNm contenant des séquences IRES codant pour des protéines jouent un rôle majeur dans la régulation de nombreux processus, tels que la prolifération, l'apoptose ou encore la survie cellulaire.

I.5.2.1. L'initiation cap-dépendante de la traduction

La modalité d'initiation de la traduction la plus représentée est dépendante de la coiffe des ARNm. La coiffe est un nucléotide méthylé (m7GpppN) ajouté en 5' de l'ARNm par une liaison 5'-5' triphosphate. A l'extrémité 5' de l'ARNm, on retrouve aussi la méthylation des riboses des deux premiers nucléotides.

Le complexe de pré-initiation (PIC) 43S contenant la sous-unité (SU) 40S du ribosome ainsi que les facteurs de traduction eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 et le complexe ternaire eIF2/Méthionine-ARNt$_{initiateur}$/GTP, est recruté à l'extrémité 5' de l'ARNm, via le complexe eIF-4F fixé sur la coiffe. La coiffe est d'abord reconnue par eIF4E, qui recrute ensuite eIF4G, une protéine structurale, et l'hélicase eIF4A, formant ainsi le complexe eIF4F (figure 16). La PABP (Poly-A Binding Protein) se fixe sur la queue poly-A en 3' de l'ARNm, et forme une interaction avec eIF4G. De cette interaction résulte une structure circulaire de l'ARNm joignant les extrémités 5' et 3'. L'activité hélicase d'eIF4A déroule la région 5' de l'ARNm permettant ainsi le recrutement du PIC via eIF4G et eIF3 ou 5 (Hinnebusch et Lorsch 2012; Sonenberg et Hinnebusch 2009) (figure 16).

Une fois recruté le PIC scanne l'extrémité 5' de l'ARNm jusqu'à l'AUG qui définit le début de la séquence codante (Hinnebusch et Lorsch 2012; Sonenberg et Hinnebusch 2009). La sélection du site d'initiation peut-être influencée avec les nombreuses interactions qui ont lieu entre l'ARNm et la SU 40S lors de la recherche du codon initiateur. En particulier plusieurs hélices de l'ARNr 18S sont actrices de ces interactions (Pisarev et al., 2008). C'est le

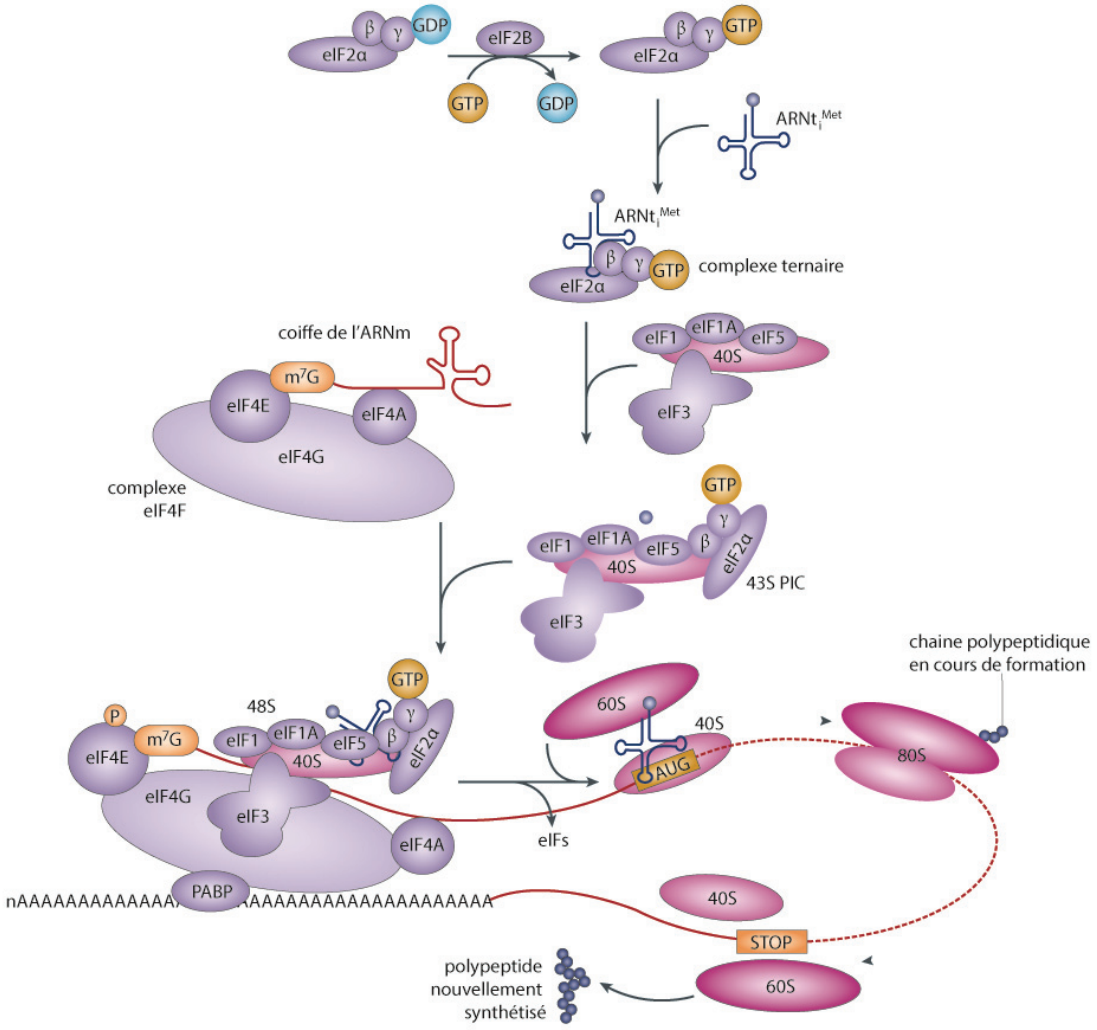


Figure 16 : Initiation Cap-dépendante de la traduction, chez les eucaryotes
Le complexe ternaire contitué de l'ARNt initiateur (ARNt$_i^{Met}$), eIF2 et d'un GTP est recruté avec le complexe de pré-initiation (PIC, contenant eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 avec la sous-unité 40S) sur la coiffe de l'ARNm. Ce recrutement a lieu via intéraction de eIF4E et eIF4A avec la coiffe et eIF4G (complexe eIF4F). La protéine de liaison à la queue poly A de l'ARNm (PABP) se fixe sur la queue poly A en 3' de l'ARNm, et interagit avec eIF4G, circularisant l'ARNm. le PIC scanne la région 5' de l'ARNm jusqu'au codon intiateur, généralement AUG. La reconnaissance de l'AUG déclenche l'hydrolyse du GTP lié à eIF2, et le relargage de eIF2, eIF3 et eIF5 et eIF2-GDP. Cela a pour conséquence de permettre le recrutement de la sous-unité 60S formant le ribosome 80S, marquant le début de l'élongation.
Adapté de Bhat et al., 2015.

complexe méthionine-ARNt$_{initiateur}$ dans le site P de la SU 40S qui reconnaît l'AUG, résultant en l'hydrolyse du GTP associé à eIF2. eIF1, eIF3, eIF5 ainsi que eIF2-GDP et un groupement phosphate sont relâchés, permettant ainsi de recruter de la SU 60S associée à eIF5BB sur l'ARNm et la SU 40S, formant le ribosome 80S (figure 16). L'ARNt positionné au site P, le ribosome 80S est prêt à commencer l'élongation de la traduction.

I.5.2.2. L'initiation IRES-dépendante de la traduction

La traduction peut également être initiée par des mécanismes alternatifs dits "indépendants de la coiffe", notamment lorsque l'initiation de la traduction dépendante de la CAP est inhibée. Cette stratégie a d'abord été découverte au cours de l'infection virale. Elle requiert des séquences formant des structures secondaires en amont du codon initiateur de la traduction, dans la région 5' non traduite, présentes dans certains ARNm, même en l'absence de la coiffe. Chez les virus les IRES sont classés en quatre groupes selon leurs structures secondaires et les facteurs canoniques d'initiation de la traduction nécessaires à l'initiation de la traduction avec ces IRES (Balvay et al. 2009)

Certains ARNm cellulaires possèdent aussi des IRES. En particulier, les IRES cellulaires connues à ce jour concernent des gènes d'importance cruciale pour la cellule. On retrouve des ARNm codant pour des protéines contrôlant l'apoptose, telle que Bcl-2, ou impliquée dans la prolifération, telle que FGF-1 et FGF2 ou encore l'angiogenèse avec VEGF. Certains de ces ARNm codent également des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs, qualifiés de « master gènes » comme p53 et c-Myc. Les IRES cellulaire présentent des structures très variables. Plus d'une centaine d'ARNm humains porteraient des séquences IRES (Weingarten-Gabbay et al. 2016). Cela reste cependant difficile à affirmer car les méthodes d'analyse de la traduction dépendante d'IRES sont controversées. Par exemple, lorsque les ARNm étudiés sont coiffés, les traductions CAP- et IRES-dépendantes peuvent avoir lieu en même temps (Thakor et Holcik 2012).

Le mécanisme d'initiation de la traduction IRES-dépendante est moins bien caractérisé. On sait cependant que cette modalité d'initiation de la traduction utilise des facteurs agissant en *trans* avec les IRES (ITAF) (figure 17). Les ITAF sont généralement des protéines interagissant avec l'ARNm, dont des hnRNP (heterogenous ribonucleoprotein). Aucun ITAF n'est requis pour l'initiation par l'ensemble des IRES, suggérant que chaque IRES

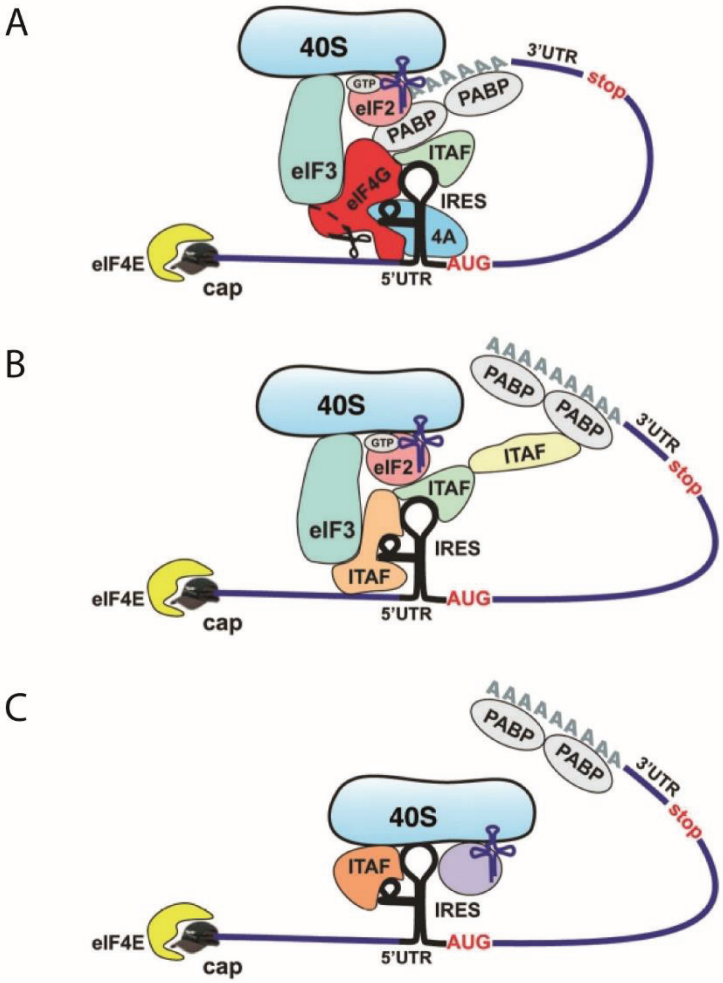


Figure 17 : Initiation IRES-dépendante de la traduction, avec des IRES cellulaires
L'initiation de la traduction IRES-dépendante ne requiert généralement pas la liaison de la coiffe par eIF4E et eIF4A. Plusieurs modes d'initiation sont possibles en fonction du nombre de facteurs canoniques de la traduction et d'ITAFs impliqués, et de la circularisation ou non de l'ARNm. A, initiation IRES-dépendante impliquant la circularisation de l'ARNm et la plupart de facteurs canoniques de l'initiation de la traduction. B, circularisation de l'ARNm et implication d'un nombre réduit de facteurs canoniques de l'initiation. C, seuls des ITAFs sont potentiellement requis, tandis que les facteurs canoniques d'initiation de la traduction ne sont pas indispensables.
Adapté de Komar et al., 2011.

requiert des ITAF spécifiques. Par exemple, pour l'ARNm de IGF1R, qui a été bien décrite, la traduction IRES-dépendante est induite par l'hnRNP C, et réprimée par HuR. Ces deux ITAF se fixent dans la région 5' non traduite de l'ARNm de IGF1R (Meng et al. 2005; Meng et al. 2008). A ces données s'ajoute le fait qu'une séquence de 9 nucléotides de l'IRES de l'ARNm de IGF1R est complémentaire d'une région de l'ARNr 18S, suggérant un mécanisme de recrutement spécifique dépendant d'interactions formées entre les ARNr et les séquences IRES (Meng et al. 2010).

Ces données mettent en évidence le manque de compréhension des mécanismes de l'initiation de la traduction IRES-dépendante. Il est donc important de continuer d'étudier cette modalité d'initiation de la traduction afin de mieux appréhender sa régulation.

I.5.3. Régulation de l'initiation de la traduction

La traduction est modulée via plusieurs voies de signalisation qui aboutissent majoritairement au contrôle des interactions entre les différents facteurs d'initiation. En particulier, les MPT de plusieurs de ces facteurs régulent l'initiation de la traduction. Par exemple, la phosphorylation de eIF2-α diminue l'initiation de la traduction (Sonenberg et Hinnebusch 2009). Le contrôle de l'initiation de la traduction CAP-dépendante peut avoir lieu en régulant la reconnaissance de la coiffe. Cette dernière peut être inhibée par un homologue de eIF4E (4E-HP). De plus, l'interaction de eIF4G avec eIF4E et eIF4F est inhibée par les protéines de la famille eIF4E-binding protein (4E-BPs) (Sonenberg et Hinnebusch 2009). La liaison de 4E-BP à eIF4E est contrôlée par la phosphorylation de 4E-BP qui inhibe cette interaction. En particulier, mTOR contrôle la traduction via son activité de kinase de 4E-BP. 4E-BP inhibe la traduction CAP-dépendante mais pas la traduction IRES-dépendante (Sonenberg et Hinnebusch 2009). Par ailleurs, mTOR phosphoryle aussi eIF4G, et les kinases de S6 (S6K) qui augmentent l'interaction de eIF4B avec eIF3 en le phosphorylant et facilite l'initiation (Holz et al. 2005). S6K phosphoryle aussi Pdcd4 induisant sa dégradation et empêchant ainsi son activité d'inhibition de la traduction par interaction avec eIF4A (Dorrello et al. 2006; H.-S. Yang et al. 2003). D'autre part, eIF4E et eIF4P sont phosphorylés en réponse à la stimulation de la voie Ras/RAF activant ainsi la traduction (Holz et al. 2005).

La traduction peut aussi est régulée par les micro ARN (miARN), qui l'inhibent au niveau de l'étape d'initiation, de manière dépendante de la CAP (Dalmay 2013). Les miARN agissent

de manière spécifique par hybridation avec les ARNm (Dalmay 2013). Cependant, l'effet des miARN sur la traduction n'affecterait pas l'initiation IRES-dépendante de la traduction (Dalmay 2013).

Enfin, la présence d'éléments *cis* dans les 5'UTR des ARNm interfère avec le complexe d'initiation eIF4F et la recherche du codon initiateur. Certaines protéines de liaison à l'ARN, reconnaissant soit directement l'ARNm via ses structures secondaires, soit la coiffe ou la queue poly-A (van Kouwenhove, Kedde, et Agami 2011), permettent de surmonter cette interférence et augmente la traduction, induisant la surexpression spécifique des certains ARNm (Ruggero 2013).

I.5.4. L'hétérogénéité des ribosomes

Le ribosome a longtemps été considéré comme un objet constant, dont la fonction est d'effectuer la synthèse protéique, et dont l'activité de traduction est régulée au niveau de l'initiation par l'intervention de facteurs agissant en *trans* et en *cis*. Cependant, un grand nombre d'études ces dernières décennies sont venues questionner cette vision du ribosome. Notamment, les variations de la composition des ribosomes entre différentes espèces suggèrent des variations fonctionnelles inter-espèces. Aujourd'hui, de nombreuses études rapportent que la composition des ribosomes peut varier en fonction du contexte physiologique pour une même espèce, étendant ainsi le questionnement des variations fonctionnelles du ribosome au sein d'un même organisme. Pour ces raisons, l'hétérogénéité des ribosomes fait de nos jours l'objet de beaucoup d'interrogations visant à déchiffrer la signification d'une telle variation de composition. Les résultats apportés jusqu'à aujourd'hui tendent à montrer que le ribosome, via une variation de sa composition et donc de son activité intrinsèque, est capable de réguler la traduction, impactant ainsi sur la vie de la cellule au même titre que d'autres grands mécanismes de régulation génique. C'est ainsi qu'ont émergés les concepts de code ribosomique et de ribosomes spécialisés (Dinman 2016; Gilbert 2011; Komili et al. 2007; Preiss 2016; Xue et Barna 2012).

I.5.4.1. Hétérogénéité des protéines ribosomiques et impact sur la traduction

La composition des ribosomes en protéines peut varier, et ne présente pas une stœchiométrie fixe (Slavov et al. 2015). Chez plusieurs espèces eucaryotes, telles que la levure ou les plantes, les PR sont codées par des gènes paralogues multiples. Par exemple, chez la levure : 59 des 79 PR sont codées par deux gènes paralogues (Kellis, Birren, et Lander 2004), et l'inhibition d'un paralogue de PR peut modifier la traduction d'un sous-groupe d'ARNm, montrant la fonction non redondante des différents paralogues (Komili et al. 2007; Xue et Barna 2012). Par ailleurs, chez la levure, le taux d'expression de 70 % des PR est différent de celui de leur paralogue, et le changement de ratio d'expression d'une PR par rapport à son paralogue affecte la fonction des ribosomes (Parenteau et al. 2011).

Chez les plantes, les PR peuvent être exprimées par des gènes multiples, avec notamment jusqu'à 7 copies d'une même PR rapportées chez *A. Thaliana*. Différents paralogues, en particulier pour les familles de protéines S5 et L10, peuvent être exprimés de manière différentielle au cours du développement. Cependant le mécanisme sous-jacent n'est pas connu et il pourrait s'agir d'une fonction extra-ribosomique des paralogues (Horiguchi et al. 2012).

Chez les mammifères, un très grand nombre de séquences codent pour des PR, bien que la plupart soient des pseudogènes qui ne sont pas exprimés. A la différence d'autres domaines du vivant, la majorité des PR des mammifères sont codées par une seule copie de gène (Balasubramanian et al. 2009). Ce n'est cependant pas le cas de la PR S4 qui est codée par trois gènes : *rps4x*, *rps4y1* et *rps4y2*, localisés respectivement sur les chromosomes X et Y. Chez l'homme, S4X et S4Y1 sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que l'expression de S4Y2 est restreinte à la prostate et aux testicules (Lopes et al. 2010), soulevant la question de la spécificité de fonction des ribosomes de prostate et de testicules contenant S4Y2. La possibilité que S4Y2 puisse avoir une fonction extra-ribosomique n'est pas écartée. De manière similaire, une étude protéomique menée chez la souris montre que les paralogues des PR L10 et L39, L10-like et L39-like, respectivement, sont exprimées uniquement dans les testicules (Sugihara et al. 2010). A ces donnée s'ajoutent d'autres analyses des PR, qui montrent l'expression préférentielle ou même spécifique de plusieurs PR dans des tissus humains (Bortoluzzi et al. 2001; Sahin et al. 2005). Notamment, chez l'homme, toujours en

termes d'expression spécifique aux organes sexuels, l'expression des PR S9, S10, S19, L14, et L38 n'est retrouvée que dans les ovaires. De plus, S13, S17, S23, S25, L37, L37a, L41, et L44 sont uniquement exprimées dans le muscle, et non dans le foie, le cerveau, ni la rétine (Bortoluzzi et al. 2001).

Par ailleurs, l'expression différentielle de certaines PR a également été observée lors du développement chez la souris, de manière tissu-spécifique (Kondrashov et al. 2011). Par exemple, la PR L38 est préférentiellement exprimée dans le composant mandibulaire du premier arc branchial, l'arche maxillaire, ainsi que dans la rétine neurale de l'œil et les somites précurseurs des vertèbres (Kondrashov et al. 2011). L38 est nécessaire à la formation du ribosome 80S pour un sous-groupe d'ARNm. En effet, la mutation ou l'inhibition de l'expression de L38 impacte spécifiquement des gènes de la famille *homeobox*, impliquée dans le développement chez les vertébrés, sans pour autant altérer la traduction dans son ensemble. Son enrichissement tissu-spécifique est corrélée avec l'expression de HAXA5, et l'expression de cette protéine est dépendante de L38, suggérant une activité de traduction tissu spécifique liée à L38 (Kondrashov et al. 2011).

D'autres exemples renforcent le lien entre l'expression de certaines PR et une traduction spécialisée. 8 PR sont essentielles à la réplication du virus de la stomatite vésiculaire. En particulier, la PR L40 (positionnée à la surface de la 60S) est requise pour l'initiation de la traduction CAP-dépendante d'ARNm viraux, mais ne l'est pas pour la traduction IRES-dépendante. En effet, en présence d'un siARN L40, le PIC se forme sur les ARNm viraux mais n'aboutit pas à la formation du ribosome 80S. L40 jouerait donc un rôle dans la traduction CAP-dépendante, et pourrait être impliquée dans la modulation spécifique de la traduction de certains ARNm en réponse à l'infection virale (Lee, Burdeinick-Kerr, et Whelan 2013).

De plus, les IRES viraux des ARNm de CrPV et HCV nécessitent la PR S25, positionnée au niveau de la tête de la SSU, pour la liaison avec le ribosome. Cette PR interagit de manière directe avec les séquences IRES, et sa délétion inhibe la fixation de la SU 40S sur l'IRES d'ARNm de CrPV. Cependant, cette inhibition n'empêche pas la traduction CAP-dépendante et n'affecte pas la fidélité de traduction (Muhs et al. 2011). Il apparait que S25 a le même impact dans des cellules HeLa (Landry, Hertz, et Thompson 2009).

D'autre part, chez la drosophile, la PR RACK1 est requise pour l'infection par plusieurs virus, ainsi que pour l'infection par le virus de l'hépatite C dans des cellules humaines. En particulier, chez la drosophile et dans des cellules hépatiques humaines, RACK1 est requise pour l'initiation IRES-dépendante de la traduction (Majzoub et al. 2014).

Enfin, la structure du ribosome mitochondrial révèle que le ribosome mitochondrial et hyperspécialisée pour la synthèse de protéines transmembranaires, appuyant d'avantage le lien entre l'hétérogénéité des ribosomes et la spécialisation de la traduction (Greber et al. 2014; Amunts et al. 2014).

Ces études montrent la présence conditionnelle de certaines protéines ribosomiques ou de leur paralogues dans les tissus, et mettent en évidence que cette variation peut induire ou inhiber la traduction de sous-groupes d'ARNm. Cette hétérogénéité de la composition des ribosomes en protéines ribosomiques est donc responsable d'une spécialisation de la traduction. Nous ignorons cependant comment une telle hétérogénéité est régulée.

L'hétérogénéité des PR est aussi marquée par leurs modifications post-traductionnelles. Chez l'homme 11 PR de la LSU et presque toutes les PR de la SSU portent de MPT (Odintsova et al. 2003; Y. Yu et al. 2005). La modification de PR la mieux caractérisée est la phosphorylation de S6 (Krieg, Hofsteenge, et Thomas 1988). La phosphorylation de S6 a été impliquée dans la régulation de la traduction d'ARNm présentant des polypyrimidine tracts (Malarkey, Coker, et Sturgill 1998). Cependant, cet impact est controversé puisqu'il a été rapporté qu'une S6 muté sur tous ses sites de phosphorylation n'altère pas la régulation de cette sous-population d'ARNm (Ruvinsky et al. 2005; Xue et Barna 2012). La variation des MPT des PR indique un autre niveau de l'hétérogénéité des ribosomes qui peut être modulée en réponse à des voies de signalisation dépendant de la disponibilité en nutriments ou des facteurs de croissance (Krieg, Hofsteenge, et Thomas 1988).

L'ensemble de ces données présentent de nombreux exemples de variations de PR. Cependant peu d'exemples montrent directement cette hétérogénéité au niveau des ribosomes et le lien avec la traduction reste à être fermement démontré.

I.5.4.2. Hétérogénéité des ARNr et impact sur la traduction

Comme mentionné précédemment, la structure tridimensionnelle du ribosome a révélé que les principales activités du ribosome, la vérification du bon décodage du code génétique et la synthèse de la liaison peptidique, font très largement intervenir les ARNr plutôt que les protéines. Ces domaines fonctionnels sont très bien conservés chez les eucaryotes, laissant croire à peu de place pour une variabilité intrinsèque en termes de structure dans le PTC et le DC. Néanmoins, les segments d'extensions des ARNr présents dans le ribosome humain et absents des ribosomes procaryotes et de levure témoignent d'une flexibilité de la structure des ARNr à ce niveau. En outre, l'hétérogénéité des ARNr peut survenir à deux niveaux : la variation de séquence des ADNr d'une copie à l'autre, et au niveau de leurs modifications post-transcriptionnelles.

I.5.4.2.1. Variation des séquences des ARN ribosomiques

On compte environ 400 copies des gènes d'ADNr chez l'homme (Gonzalez, Sylvester, et Schmickel 1988). Ces ADNr codant pour des transcrits dont les séquences varient sont effectivement exprimés (Kuo et al. 1996). Une telle variabilité pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'interaction des ARNr avec les multiples protéines de liaison à l'ARN avec lesquelles ils interagissent, mais aussi dans les interactions ARN-ARN formées par les ARNr. Cette variation de séquence est également susceptible de jouer un rôle dans l'initiation de la traduction. En effet, les régions 5' non traduites des ARNm de IGF1R et Gtx possèdent des séquences complémentaires de l'ARNr 18S, et ont ainsi un impact positif sur leur traduction (Meng et al. 2010; Dresios et al. 2006). Ces observations suggèrent qu'une variabilité de séquence des ARNr peut modifier leur accès aux ARNm et ainsi inhiber ce mécanisme qui facilite la traduction (Mauro et Edelman 2002; Mauro et Edelman 2007).

I.5.4.2.2. Hétérogénéité liée aux modifications post-transcriptionnelles des ARNr

On constate une augmentation du nombre de 2'-O-méthylations et de pseudouridylations des ARNr entre les eucaryotes et les autres domaines du vivant, ainsi qu'entre les vertébrés et d'autres eucaryotes. Cette augmentation suggère que la complexification des organismes au cours de l'évolution a été accompagnée d'une augmentation de ces modifications post-transcriptionnelles. Une telle complexification suggère un rôle fonctionnel, et plusieurs études de leur rôle dans la traduction appuient aujourd'hui cette hypothèse. Malgré les récentes avancées, la détection de modifications post-transcriptionnelles sur un site unique des ARNr pose un challenge technique (Motorin et al. 2007; C. Huang, Karijolich, et Yu 2016), et limite notre compréhension de leur rôle dans la régulation de la traduction. Cependant, des variations d'expression ou d'activité des composants des snoRNP suggèrent des variations des modifications post-transcriptionnelles des ARNr. Ces modifications sont en particulier localisées dans les domaines fonctionnels des ARNr tels que le PTC, le DC, ou à l'interface entre les deux SU (par exemple avec l'hélice 69) (Decatur et Fournier 2002), appuyant ainsi l'hypothèse que leur hétérogénéité puisse jouer une rôle dans l'hétérogénéité de la traduction.

I.5.4.2.2.1. Variations de la pseudouridylation des ARNr

Chez l'homme on compte aujourd'hui 98 pseudouridylations dont 38 % sont conservées chez la levure. La pseudouridylation est capable de former une liaison hydrogène supplémentaire par rapport aux uridines, donnant ainsi probablement plus de rigidité au zones modifiées de l'ARNr (Davis 1995; Charette et Gray 2000).

Les mutations ponctuelles dans le gène de la dyskérine, observées notamment chez les patients atteints de dyskératose congénitale, causent une baisse de 25 % du taux de pseudouridylation des ARNr (Ruggero et al. 2003). De plus, ces mutations altèrent l'expression des snoARN H/ACA de manière très hétérogène, et la pseudouridylation aux sites correspondant à ces snoARN H/ACA est également diminuée (Bellodi et al. 2013). Ces résultats montrent qu'en plus d'une baisse de son activité catalytique, les mutations de la dyskérine sont capables de causer une baisse d'expression des snoARN H/ACA.

Chez la souris, des mutations de la dyskérine causent une baisse de la pseudouridylation des ARNr, ainsi qu'une baisse de l'initiation de la traduction IRES-

dépendante. Ce changement traductionnel concerne en particulier des ARNm codant pour des gènes suppresseurs de tumeur tels que p27, ou encore des facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-xL ou XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) (Yoon et al. 2006). De plus, la baisse de l'initiation IRES-dépendante de la traduction de p27, due à la baisse d'activité de la dyskérine, favorise la tumorigénèse de l'hypophyse spontanée chez les souris DKC1 mutées (Bellodi et al. 2010). Les auteurs montrent un défaut de recrutement du PIC par les séquences IRES de p27 en présence de dyskérine mutée (Bellodi et al. 2010). Par ailleurs, une mutation de la dyskérine, identifiée dans la tumeur d'un patient atteint de cancer de l'hypophyse, cause une baisse d'activité de la dyskérine, et est corrélée avec une baisse du niveau d'expression protéique de p27 dans ces tumeurs (Bellodi et al. 2010).

De même, dans des cellules humaines, une baisse de l'expression de la dyskérine résulte en une baisse de la pseudouridylation des ARNr dans les ribosomes matures, mais la composition en protéines ribosomiques reste inchangée (Penzo et al. 2015). De plus, les ribosomes purifiés de ces cellules présentent respectivement une baisse et une augmentation de l'initiation IRES-dépendante de la traduction de p53 et de VEGF, dans un système de traduction *in vitro*. En revanche, l'initiation de la traduction CAP-dépendante de ces ARNm n'est pas modifiée. Ces résultats renforcent l'hypothèse que les ribosomes contribuent au phénotype associé aux mutations de la dyskérine. Par ailleurs, les ribosomes présentent une diminution de la fidélité de traduction dans les cellules sous siARN dyskérine (Montanaro 2010; Penzo et al. 2015). Ces résultats suggèrent que la dyskérine, via son activité de pseudouridylation des ARNr, est responsable d'une variation de l'activité des ribosomes, dont la conséquence est le contrôle traductionnel de gènes impliqués dans la tumorigénèse. Ainsi, la baisse d'expression ou d'activité de la dyskérine en modulant l'activité des ribosomes, pourrait résulter en une augmentation de l'agressivité tumorale.

I.5.4.2.2.2. Variation de la 2'-O-méthylation des ARNr

Chez l'homme, 106 2'-O-méthylations sont recensées à ce jour, dont 36 % sont conservées chez la levure. L'impact des 2'-O-méthylations n'est pas clairement caractérisé, néanmoins les données disponibles indiquent que les 2'-O-me augmentent l'hydrophobicité des nucléotides, stabilisent la structure tertiaire des régions d'ARNr modifiées, et altèrent les

interactions protéine-protéine et ARN-protéine (Blanchard et Puglisi 2001; Polikanov et al. 2015; D. J. Williams, Boots, et Hall 2001).

Chez la levure, une étude rapporte l'analyse du site A100 de méthylation de l'ARNr. Les auteurs montrent que seuls 68 % des ribosomes présentent une méthylation à ce site, et que les ribosomes méthylés ou non à ce site sont détectés dans les fractions polysomiques et monosomiques (Buchhaupt et al. 2014). Par ailleurs, l'analyse du profile globale des sites de 2'-O-méthylation par séquençage haut débit montre la modification partielle des ARNr de levure (Birkedal et al. 2015). Ces résultats démontrent l'existence d'une population de ribosomes hétérogènes variant au niveau de la méthylation d'un ou plusieurs sites, et prouvent que l'ensemble de cette population hétérogène peut être engagée dans la traduction d'ARNm. Ces résultats permettent aussi de montrer que la 2'-O-méthylation à tous les sites n'est pas essentielle à la fonction du ribosome de levure, suggérant plutôt une variation fonctionnelle (Birkedal et al. 2015; Buchhaupt et al. 2014).

Par ailleurs, dans des cellules humaines, la diminution de l'expression de la PR L13a cause une baisse de la 2'-O-méthylation globale et site spécifique du pré-ARNr 47S (Basu et al. 2011; Chaudhuri et al. 2007). De plus, notre groupe a démontré que la 2'-O-méthylation des ARNr varient dans des cellules de cancer du sein, augmentant avec l'expression de FBL, et l'agressivité tumorale (Belin et al. 2009; Marcel et al. 2013). Cette variation de 2'-O-méthylation est hétérogène : les sites de analysés révèlent une altération différentielle site-spécifique. On retrouve en particulier une forte augmentation de la 2'-O-méthylation des sites de l'ARNr 18S, en comparaison au 28S et au 5.8S. Ces résultats renforcent la notion que la composition des ribosomes peut varier en fonction du contexte physiologique, et démontrent pour la première fois que des modifications des ARNr varient en fonction du contexte tumoral. Enfin, une étude conduite chez le poisson-zèbre suggère que la 2-O-méthylation des ARNr peut avoir un impact direct sur le développement. En effet, les auteurs montrent que l'inhibition de l'expression d'un seul snoARN, et la subséquente diminution de la 2'-O-méthylation au site correspondant, résulte en un défaut de développement chez le poisson-zèbre et la mort des embryons. Malheureusement les auteurs n'ont pas communiqué de résultats concernant l'impact de l'inhibition de la 2'-O-méthylation sur la traduction dans cet organisme, et ainsi le mécanisme responsable pour de tels défauts de développement reste inconnu (Higa-Nakamine et al. 2012).

D'autre part, il apparait de plus en plus probable que ces modifications du taux de 2'-O-méthylation des ARNr ont un impact sur l'activité traductionnelle des ribosomes. Par exemple la baisse du taux de méthylation induite par l'inhibition de l'expression de L13a conduit à une baisse l'initiation IRES-dépendante de la traduction de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53 ou p27. La traduction IRES-dépendante de SNAT2 est également diminuée dans ces conditions (Chaudhuri et al. 2007). Cette baisse de la 2'-O-méthylation n'empêche pas de recruter le PIC sur l'IRES de SNAT2, mais inhiberait le recrutement de la SU 60S (Basu et al. 2011). De plus, notre groupe montre que les variations de 2'-O-méthylations induites par l'inhibition de p53 sont corrélées avec une altération de l'initiation IRES-dépendante de la traduction de gènes clés dans le cancer, tels que IGF1R, VEGFA, FGF1 et 2, et c-Myc (Marcel et al. 2013). Ces données de notre équipe démontrent non seulement que les modifications des ARNr sont hétérogènes en fonction des contextes physiologiques et pathologiques, mais suggèrent aussi que cette hétérogénéité est responsable d'une hétérogénéité de traduction, impactant ainsi directement sur l'expression de gènes clés dans le cancer et sur le phénotype cellulaire (Marcel et al. 2013).

L'ensemble de ces données montre l'existence d'une hétérogénéité des ribosomes. Ces variations peuvent avoir diverses conséquences sur le fonctionnement du ribosome, et mettent en évidence un manque de connaissance relatif à sa régulation. L'hétérogénéité des ribosomes intervient à plusieurs niveaux, notamment les protéines ribosomiques et des variations de modifications post-transcriptionnelles des ARNr. La variation de ces modifications être causée par la modulation de l'expression des snoARN, et peut provenir de la modulation de l'activité des machineries snoRNP pour lesquelles nous disposons aujourd'hui de très peu d'informations.

I.6. Les Cancers Colorectaux

Le cancer colorectal (CRC) est, d'après les statistiques de l'INCa, le 2e cancer le plus fréquent chez l'homme et chez la femme. Il est la 2e cause de mortalité par cancer chez l'homme et la 3e chez la femme, avec environ 43000 cas diagnostiqués et 17800 décès en 2015, en France. La survie moyenne à 5 ans des patients atteints de cancer colorectal est de 56 %, mais avec de grandes disparités en fonction du stade d'avancement de la tumeur au moment du diagnostic. En effet, lorsque les patients sont pris en charge à un stade précoce, la survie est de 77%, tandis que dans le cas d'un diagnostic tardif, la survie moyenne chute à 35 % (Gatta et al. 2000). Le cancer colorectal est donc un problème de santé publique majeur. En effet, même lors d'un diagnostic précoce la survie moyenne à 5 ans est de 77%. Lorsque le diagnostic est effectué à un stade tardif, les options thérapeutiques sont limitées et globalement leur efficacité est à améliorer. Il est donc crucial aujourd'hui, de mieux comprendre pourquoi les traitements aux chimiothérapies échouent, d'améliorer les thérapies existantes et d'identifier de nouvelles thérapies, afin d'améliorer la prise en charge des patients.

L'objectif de ce chapitre est de présenter une description des aspects moléculaires du CRC et des thérapies associées.

I.6.1. Stades et classification

Les cancers colorectaux sont classifiés en utilisant plusieurs critères histologiques. Cette classification dite TNM (Tumor Node Metastastasis) fait référence à trois indicateurs caractérisant l'avancement de la tumeur (Figure 18). Le premier est l'avancement de l'envahissement des différentes couches tissulaires de la paroi intestinale, la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse, et la séreuse. On distingue ainsi les stades d'envahissement Tis (présence d'un carcinome intra-épithélial ou laminaire, Tis pour carcinome *in situ*), T1 (invasion de la sous-muqueuse), T2 (Invasion de la musculeuse), T3 (invasion de la séreuse et des tissus péri-colorectaux) et T4 (invasion directe d'autres organes ou perforation du péritoine). Le second critère est l'invasion ou non des ganglions lymphatiques avec N0 et N1

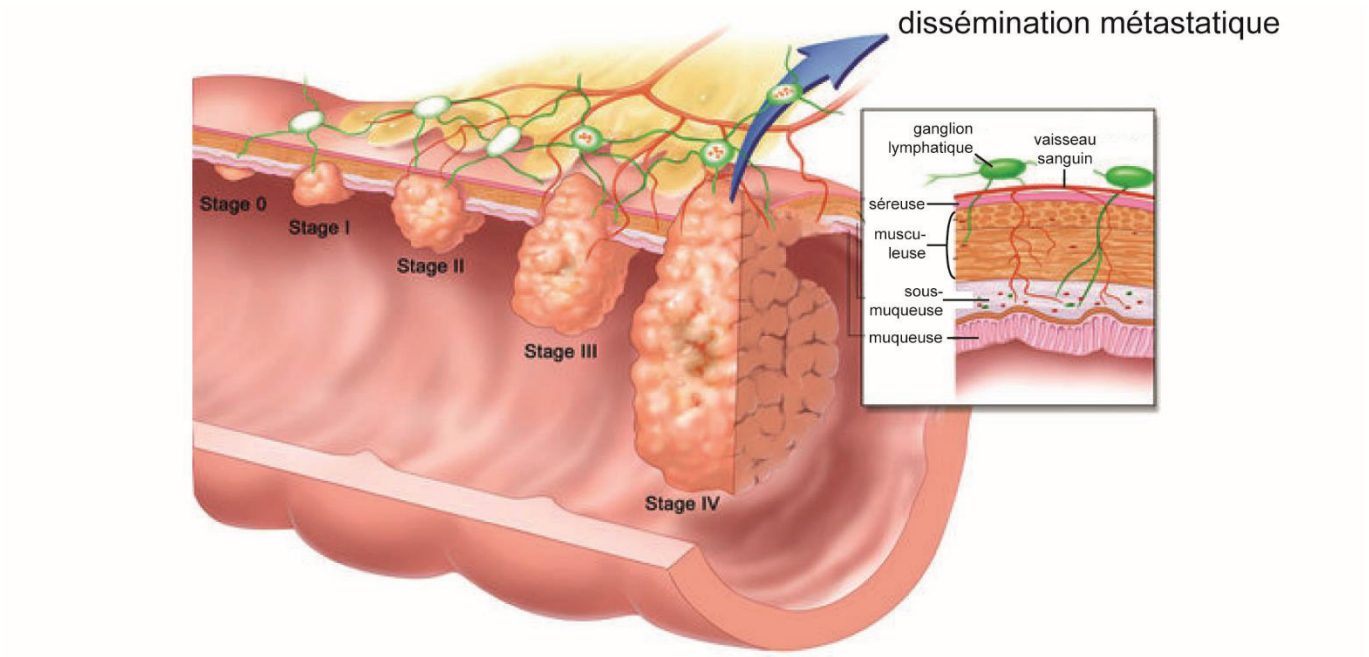


Figure 18 : Classification TNM des cancers colorectaux
La classification Tumor Node Metastasis est basée sur trois critères : l'invasion de la paroi intestinale, l'invasion de ganglions lymphatiques, et la présence de métastatses distantes, permettent de déterminer le stade d'avancement du cancer colorectal.
Stade I : Envahissement de la sousmuqueuse
Stade II : envahissement de toute la paroi intestinale
Stade III : Invasion des ganglions lymphatiques (indépendemment de l'invasion de la paroi intestinale)
Stade IV : présence de métastases distantes (indépendemment de l'invasion de la paroi intestinale et des ganglions).
Image adaptée de www.cancer.gov, site officiel du National Cancer Institute, NIH (USA).

présence ou absence d'invasion, respectivement. Enfin, la présence de métastases distantes, avec M0 et M1, absence et présence, respectivement (figure 18).

Les différents stades d'avancement des CRC sont donc définis avec ces trois critères. Le stade 0 correspond donc à une tumeur intra épithéliale, sans présence d'invasion du reste de la paroi intestinale, ni des ganglions lymphatique, ni de métastases distantes (Tis, N0, M0). Le stade I correspond à une tumeur ayant envahi la sous-muqueuse voir la musculeuse, sans présence d'invasion des ganglions lymphatique ni de métastases distantes (T1/T2, N0, M0). Le stade II correspond à l'envahissement de de l'intégralité de la paroi intestinale et peut même aller au-delà, mais ne présente pas d'envahissement des ganglions lymphatiques, ni de métastases distantes (T3/T4, N0, M0). Le stade III correspond aux cancers ayant envahi les ganglions lymphatiques, et concerne tout stade d'envahissement de la paroi intestinale, mais ne présentant pas de métastases distantes (N1, M0). Enfin, le stade IV correspond aux cancers présentant des métastases distantes, mais qui n'ont pas nécessairement envahi la paroi intestinale ou les ganglions lymphatiques (figure 18).

La compréhension de l'avancement histologique des cancers colorectaux est essentielle pour comprendre le lien entre les aspects moléculaires de ces cancers, et la prise en charge des patients ainsi que les aspects pronostiques. En effet, comme mentionné plus tôt, le pronostic de survie à 5 ans est différent en fonction du stade d'avancement du CRC (Gatta et al. 2000). De plus, la prise en charge thérapeutique est très différente d'un stade à l'autre. Pour les stades I, II, et III, le patient subit une résection chirurgicale de la tumeur suivie d'une chimiothérapie adjuvante, tandis qu'au stade IV la résection chirurgicale des métastases détectées n'est pas forcément pratiquée et seule une chimiothérapie palliative est appliquée. Enfin, certains marqueurs moléculaires correspondent à un stade particulier du CRC et sont corrélés avec un pronostic défini, souvent de manière cohérente avec celui associé à ce stade.

I.6.2. Génétique et développement du cancer colorectal

Les cancers colorectaux peuvent se développer selon deux voies majeures : l'instabilité chromosomique, ou l'instabilité en microsatellite. Chacune de ces voies présente des caractéristiques différentes, non seulement au niveau génétique mais également en termes de phénotype et de réponse aux chimiothérapies.

I.6.2.1. Voie de l'instabilité chromosomique

Le développement du cancer colorectal par l'instabilité chromosomique (CIN) est la plus commune des voies, et concerne 65 -70 % des CRC. Cette voie est la conséquence d'une défaillance de la ségrégation des chromosomes, et implique par conséquent la délétion ou l'amplification de régions chromosomiques portant des gènes clés dans la carcinogénèse colorectale.

En particulier, la perte de la région 5q dans 20-50% des CRC conduit à la perte d'expression d'*APC* (Fearon et Vogelstein 1990). De plus, des mutations somatiques d'*APC* sont observées dans 60-80% des CRC. Ces mutations sont aussi retrouvées dans des adénomes et des lésions néoplasiques précoces suggérant que la perte d'expression ou d'activité d'APC est un évènement précoce de la tumorigénèse colorectale (Powell et al. 1992). Les mutations rapportées dans le gène *APC* favorisent la tumorigénèse, probablement par l'intermédiaire de plusieurs voies de signalisation contrôlant entre autres la prolifération, l'apoptose, l'adhésion, la migration (Caldwell et Kaplan 2009; Behrens 2005; Mathers et al. 2003).

Un autre évènement génétique fréquent dans les cancers colorectaux est la mutation de K-ras, observée dans environ 40% des CRC (Andreyev et al. 1998; Hardingham et al. 1998; Forrester et al. 1987; Hayakumo et al. 1991). Ces mutations, interviennent principalement au niveau des codons 12 (le plus fréquemment) et 13 et rendent K-ras constitutivement actif ce qui a pour conséquence d'induire une forte prolifération en activant notamment des cibles en aval telles que Bcl-2 ou H2AFZ (J.-Y. Wang et al. 2006). Les mutations de K-ras ne sont pas nécessairement associées à une tumeur agressive. En effet, la mutation de K-Ras seule dans des cellules colorectales saines ne suffit pas à induire la transformation. K-ras contribue cependant au développement tumoral en association avec d'autres altérations génétiques (Hsieh et al. 2005; Jen et al. 1994).

La perte d'hétérozigocie de la région 18q, contenant Smad2, Smad4, et DCC (Deleted in Colorectal Cancer) dans 50-70 % des cancers constitue une autre altération génétique majeure des CRC et représente un facteur de mauvais pronostique (Lanza et al. 1998; Ogunbiyi et al. 1998). Smad2 et 4 sont impliquées dans la signalisation du TGF-β, et contrôlent la transcription de gènes tel que *c-myc* (McDermott, Longley, et Johnston 2002). *DCC* code pour un récepteur à dépendance, qui induit l'apoptose en l'absence de son ligand, la nérine-1 qui est aussi connu pour réguler l'adhésion et la migration cellulaire (Mehlen et al. 1998; Martín et al. 2006). La perte d'expression de Smad4 est un marqueur de mauvais pronostic et d'un stade avancé de la tumorigénèse colorectale (Worthley et al. 2007).

Enfin, la perte du locus 17p est responsable de la perte d'hétérozigocie de p53 dans 75 % des CRC. Associé à cela, p53 est muté dans le second allèle dans plus de 50% des CRC. La perte d'activité ou d'expression de p53 est retrouvée uniquement dans les CRC, non dans les adénomes colorectaux et est donc probablement un évènement tardif de la tumorigénèse colorectale (B. Vogelstein et al. 1988). L'importance de p53 dans le contrôle des processus cellulaires majeurs tels que le cycle cellulaire ou l'apoptose est aujourd'hui bien montré (Bert Vogelstein, Lane, et Levine 2000). Ainsi, la perte de p53 contribue fortement à l'agressivité des tumeurs colorectales. p53 est aussi un répresseur transcriptionnel de FBL, suggérant l'altération de l'expression de cette dernière dans les CRC.

L'ensemble de ces altérations génétiques et leurs études au cours de divers stades d'avancement des adénomes et carcinomes colorectaux ont permis de dresser un modèle séquentiel des évènements génétiques qui induisent la tumorigénèse colorectale. Les travaux du groupe de Vogelstein, ont en particulier mis en lumière ces évènements et permettent de proposer un modèle de tumorigénèse. Le début du développement de l'adénome aurait lieu à partir de l'épithélium et serait conduit à la formation de foyers de cryptes aberrantes par la perte d'APC. Ensuite, ces excroissances peuvent donner lieu à un adénome via la mutation de K- ras qui induit une forte augmentation de la prolifération. La perte du locus 18q et donc de Smad2, Smad4 et DCC qui suit conduirait à un adénome plus agressif, tandis que la perte de p53 achèverait la transformation de l'adénome en carcinome (Stryker, Carney, et Dozois 1987; Fearon et Vogelstein 1990; B. Vogelstein et al. 1988).

I.6.2.2. La voie de l'instabilité en microsatellites

Le développement du CRC via l'instabilité en microsatellites (MSI) représente environ 20% des CRC (Worthley et al. 2007). Les microsatellites sont de courtes séquences répétées réparties dans tout le génome et sont sensibles aux mutations telles que les délétions ou insertions induites par des erreurs de réplications. Ces mutations, responsables de l'instabilité des microsatellites surviennent à cause de défauts du système de réparation de mésappariement de bases de l'ADN (MMR pour Mismatch Repair) (Worthley et al. 2007; Al-Sohaily et al. 2012). La conséquence de cette défaillance est l'accumulation de mutations dans les gènes portant des microsatellites et peut aussi consister en un décalage du cadre de lecture qui provoque une production de protéines tronquées (Worthley et al. 2007; Al-Sohaily et al. 2012). Ces altérations génétiques sont fréquentes lors d'une défaillance du système MMR, et peuvent ainsi survenir dans des gènes codant pour des protéines régulant le cycle cellulaire, l'apoptose ou la survie, causant leur inactivation ou leur suractivation. Des changements d'expression ou d'activité de ces gènes clés dans la tumorigénèse peut promouvoir le développement de tumeurs (Worthley et al. 2007; Al-Sohaily et al. 2012). Le mécanisme exact de carcinogénèse colorectale via la voie MSI est encore mal caractérisé, bien que plusieurs études proposent l'implication de la mutation de B-Raf V600E (Soreide et al. 2006) et *TGFβIIR* (qui code pour un récepteur au TGFβ-II) (Parsons et al. 1995), promouvant la prolifération (Markowitz et al. 1995).

I.6.2.3. Méthylation épigénétiques de promoteurs

L'altération de l'activité de certains promoteurs par des modifications épigénétiques est aussi impliquée dans la tumorigénèse colorectale. La méthylation a lieu essentiellement sur les dinucléotides CpG et a pour conséquence l'inhibition du promoteur méthylé. De cette manière, plusieurs gènes clés dans le maintien du contrôle de la prolifération et d'autres caractéristiques cellulaires sont inhibés. Certains des gènes mentionnés précédemment peuvent aussi perdre leur expression via ce mécanisme, c'est le cas notamment d'APC, et de gènes impliqués dans le MMR.

I.6.2.4. Implication de la biogenèse des ribosomes dans les cancers colorectaux

La suractivation de la biogenèse de ribosome dans les cancers a été discutée dans la partie « biogenèse des ribosomes et cancer » et fait l'objet de nombreuses études (Ruggero et Pandolfi 2003). En particulier, plusieurs exemples permettent d'associer l'élévation de la biogenèse des ribosomes dans les cancers colorectaux. Plusieurs facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes sont notamment surexprimés, mutés, ou sous-exprimés dans ces cancers. C'est le cas de PES1 et BOP1 qui forment un complexe impliqué dans le clivage de la région ITS1, qui sont surexprimés dans les CRC (Killian et al. 2006; Lips et al. 2008; Xie et al. 2012). La surexpression de BOP1 conduit à une augmentation du nombre de fuseaux mitotiques, suggérant son rôle dans le développement tumoral via l'instabilité chromosomique. De plus, l'inhibition de l'expression de PES1 baisse la prolifération de cellules de CRC et diminue le développement de tumeur *in vivo* (Xie et al. 2012).

D'autre part, un variant allélique au niveau du locus du gène *rps21*, impliqué dans la stabilité de l'ARNr 18S chez la levure (Sato et al. 2003) est associé à une susceptibilité au CRC (Zeng et al. 2016). Des mutations dans *rps20* sont aussi impliquées dans la susceptibilité au CRC via la voie microsatellites sables (Goudarzi et Lindström 2016; Nieminen et al. 2014). Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de NOB1, impliquée dans la maturation cytoplasmique de la SU 40S (Zemp et al. 2009; Zemp et al. 2014) induit une baisse de la prolifération et un arrêt du cycle cellulaire dans des cellules de CRC (Y. Liu et al. 2014). Enfin, l'expression d'U50 est faible dans les CRC et sa sur- et sous-expression dans des cellules de cancer colorectal augmente et diminue la 2'-O-méthylation au site C2848, respectivement. Cette variation est accompagnée d'une altération de l'initiation traduction IRES-dépendante de la traduction (Pacilli et al. 2013).

Ces données de la littérature sont complétées par des données préliminaires acquises au début de mon projet de thèse. L'un des objectifs était d'analyser l'expression de FBL dans les CRC en immunohistochimie (IHC). Les données préliminaires ont été obtenues pour 6 tumeurs et il a été possible de comparer tumeur et muqueuse normale dans 4 de ces échantillons. Les marquages FBL montrent que celle-ci est exprimée à un niveau nettement

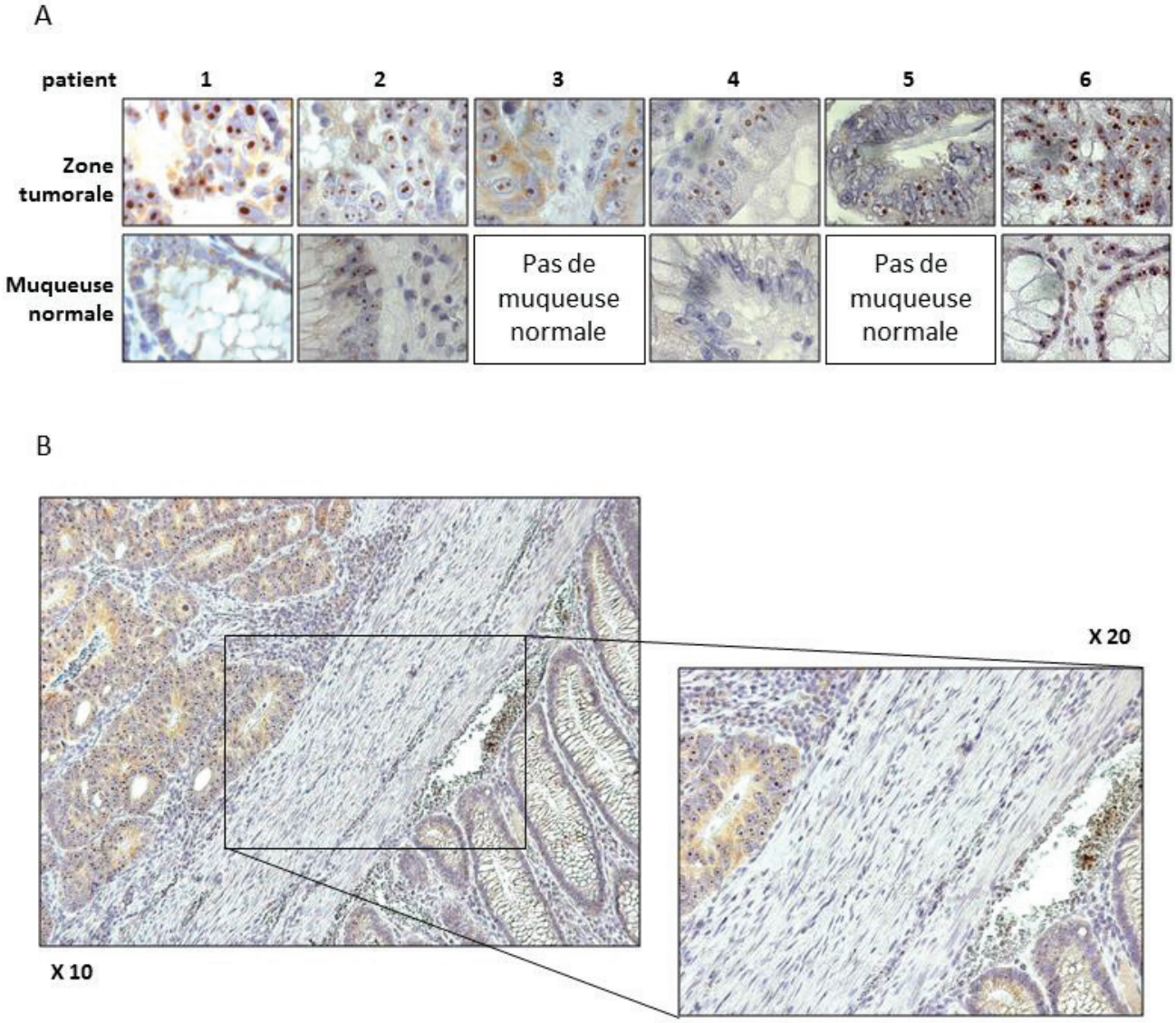


Figure 19. L'expression de FBL est plus élevée dans des tumeurs du côlon que dans la muqueuse saine
L'expression de FBL des tumeurs obtenues par résection chirurgicale, a été analysée par immunohistochimie. Le marquage marron correspond au signal FBL tandis que la coloration hématoxyline/éosine permet de visualiser les noyaux en bleu et le cytoplasme en rouge-orange.
A, Comparaison de l'expression de FBL dans les tumeurs et les tissus sain (muqueuse normale) adjacent (le cas échéant) pour chaque patient.
B, Agrandissement de l'image obtenue pour le patient 1 (objectif x10 image de gauche et x20 image de droite), où on peut aisément visualiser l'architecture désorganisée du tissus tumorale (parties gauches des deux images) et au contraire l'organisation des structures du tissus épithélial sain (parties droites des deux images).

plus élevé dans les tumeurs par rapport aux tissus sains adjacents, et suggèrent que FBL est surexprimée dans les tumeurs de cancers colorectaux (figure 19). Ces travaux sont aujourd'hui repris et approfondis avec pour but d'analyser non seulement l'expression de FBL dans les CRC mais aussi de déterminer d'éventuels liens entre cette expression et les types de tumeurs (stade, voie de développement, réponse aux traitements, rechute après prise en charge, survie des patients).

Ces résultats, ainsi que les données de la littérature mentionnées ci-dessus indiquent que l'altération de l'expression ou de l'activité de facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes sont associées au développement des cancers colorectaux. Cependant, certains de ces facteurs, comme Nob1, impliqué dans la biogenèse du protéasome 26S chez la levure (Tone et Toh-E 2002), sont impliqués dans d'autres fonctions cellulaires et l'impact de l'altération de leur expression n'est par conséquent pas nécessairement dépendant de la biogenèse des ribosomes.

I.6.3. Thérapies des cancers colorectaux

Le choix de la prise en charge du patient atteint d'un cancer colorectal dépend de plusieurs paramètres. Les cliniciens prennent ainsi en compte des critères histologiques et moléculaires. Lorsque le patient ne présente pas de métastases au moment de la résection chirurgicale de la tumeur, une chimiothérapie adjuvante peut être administrée. La chimiothérapie adjuvante a pour objectif d'éliminer les cellules tumorales ayant échappé à la chirurgie, permet d'augmenter le taux de survie et peut même aboutir à une guérison totale, c'est-à-dire sans rechute. La chimiothérapie adjuvante peut suivre plusieurs protocoles. Le protocole LV5FU2 consiste en l'administration de 5-fluorouracile (5-FU), un métabolite qui bloque la réplication de l'ADN en inhibant la thymidylate synthase et s'intègre à l'ADN et aux ARN. Le traitement au 5-FU est accompagné d'acide folinique (AF), qui potentialise l'effet du 5-FU. Un autre protocole, FOLFOX, consiste en plus en l'administration d'oxaliplatine. L'oxaliplatine est un composé dérivé du platine, qui induit des dommages à l'ADN, bloquant ainsi sa réplication. L'oxaliplatine forme en particulier des liaisons intra et inter brin, responsables de cassures de l'ADN. L'effet de l'oxaliplatine et très synergique avec le 5-FU et

la combinaison de ces deux molécules est donc un traitement de première ligne contre les CRC.

En amont de la chirurgie, la prise en charge des patients peut consister en une chimiothérapie néo-adjuvante, dont l'objectif est d'empêcher la diffusion métastatique en période préopératoire. Cette chimiothérapie n'est jamais effectuée seule et est donc toujours suivie de la résection chirurgicale de la tumeur qui reste le premier moyen de guérison en l'absence de métastases. La chimiothérapie néo-adjuvante est appliquée pour les patients porteurs de lésions métastatiques hépatiques ou pulmonaires, résécables ou non. Elle favorise la résection chirurgicale et permet de tester la chimiosensibilité des patients pour un traitement adjuvant.

Enfin, en présence de lésions métastatiques (souvent hépatiques, pulmonaires ou coliques) non résécables, le patient subit une chimiothérapie palliative. Cette chimiothérapie n'est malheureusement que rarement curative. Elle offre uniquement un prolongement de la survie du patient et constitue le seul recours thérapeutique actuel contre les métastases. La chimiothérapie palliative peut consister en un protocole FOLFOX ou un protocole FOLFIRI, qui consiste en l'administration de 5-FU, d'AF et d'Irinotécan (qui inhibe la topoisomérase I et ainsi bloque la réplication d'ADN). En complément, ces chimiothérapies peuvent être accompagnées de thérapies ciblées, notamment le Cetuximab ou le Bevacizumab lorsque K-ras est normal ou muté, respectivement. Cetuximab est un anticorps monoclonal qui cible le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Wong 2005; Tedesco, Lockhart, et Berlin 2004; Amador et Hidalgo 2004) souvent surexprimé dans les métastases de CRC ; sa surexpression est facteur de mauvais pronostique (Wei et al. 2011; Yarom et al. 2010). Le Cetuximab permet de contourner la résistance à l'irinotécan dans certains cas, mais est inefficace si K-ras est muté puisque la voie de signalisation en aval reste activée. Le Bevacizumab cible le VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Il inhibe donc l'angiogenèse, et permet de diminuer la croissance de la tumeur ainsi que la dissémination de métastases (Tol et Punt 2010; Keating 2014).

Dans ces différents protocoles thérapeutiques, le 5-FU est une molécule constamment présente. Le 5-FU est un métabolite analogue de l'uracile portant un atome de fluor en position C5. Il est utilisé en thérapies des cancers colorectaux depuis les années 50 (Heidelberger et al. 1957). Cependant, son effet cytotoxique est encore aujourd'hui mal

caractérisé. Le 5-FU est métabolisé en 5-fluorodéoxyuridine et bloque la réplication en inhibant la thymidylate synthase. Il s'intègre également dans l'ADN, induisant ainsi des dommages (Longley, Harkin, et Johnston 2003; Parker et Cheng 1990). Aujourd'hui, l'idée que l'action du 5-FU sur le métabolisme de l'ADN est responsable de sa cytotoxicité reste très ancrée. Cependant, il a également été montré que le 5-FU (métabolisé en 5-fluorouridine) s'intègre dans les ARN. Cette intégration est jusqu'à 15 000 fois supérieure à celle de l'intégration dans l'ADN (Kufe et Major 1981; Pettersen et al. 2011). Par ailleurs, la cytotoxicité du 5-FU peut être contrecarrée par l'ajout d'uridine qui restaure le métabolisme des ARN, tandis que l'ajout de thymidine, bien que permettant de restaurer l'activité de la thymidylate synthase et la réplication de l'ADN, n'empêche pas la cytotoxicité du 5-FU. Ces résultats indiquent que cette cytotoxicité est donc plutôt dépendante de l'action du 5-FU sur le métabolisme des ARN que de son action sur le métabolisme de l'ADN (Hoskins et Scott Butler 2007; Kufe et Major 1981; Pettersen et al. 2011; Pritchard et al. 1997; Ghoshal et Jacob 1997).

I.6.4. Résistance aux thérapies

Il existe deux types de résistance aux chimiothérapies. D'une part, la résistance primaire ou innée, qui est présentée par la tumeur avant même le traitement chimiothérapeutique, et qui se révèle dès les premiers traitements. D'autre part, la résistance secondaire ou acquise, qui se développe au cours des cycles de chimiothérapies répétés, et qui est caractérisée par une première phase de réponse au traitement qui semble fonctionner, puis finalement un échappement à ce dernier.

Plusieurs paramètres ont un effet sur la sensibilité de la tumeur. Notamment, l'hétérogénéité de celle-ci influe sur sa chimiosensibilité, et le temps de doublement des cellules tumorales est aussi à prendre en compte. Plus les cellules se divisent rapidement moins la tumeur sera sensible aux chimiothérapies. Par ailleurs, des paramètres de traitement comme la dose, la durée et le mode d'administration des molécules utilisées en chimiothérapie ont également un impact significatif sur l'efficacité du traitement.

La résistance aux chimiothérapies, bien qu'encore mal comprise, est aujourd'hui en partie expliquée par certains mécanismes cellulaires dérégulés. En particulier, l'adhésion cellulaire présente un rôle dans la sensibilité de la tumeur aux chimiothérapies. L'adhésion

cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire influe sur l'apoptose et la survie. La perte de ces contacts lors d'étapes précoces de la progression tumorale pourrait être responsable d'une baisse de la chimiosensibilité de la tumeur (Meredith, Fazeli, et Schwartz 1993; Fukai et al. 1998; Schwartz 2010) et les marqueurs moléculaire de cette défaillance pourraient être de bonnes cibles thérapeutiques (Schmidmaier et Baumann 2008).

Par ailleurs, plusieurs liens ont été établis entre la différenciation des cellules tumorales et leur résistance aux traitements. En particulier, la lignée de CRC LS174T, dont la différenciation a été induite par un traitement au butyrate de sodium, montre en culture des caractères de différenciation entérocytaires. Cette lignée présente une plus grande résistance au 5-FU ainsi qu'à d'autres agents chimiothérapeutiques, en comparaison à des lignées de CRC ne présentant pas ces caractères de différenciation (Ho et al. 1994). Ainsi, la différenciation cellulaire pourrait être responsable de la mise en place d'une résistance aux chimiothérapies. D'autre part, la lignée de CRC Caco-2 présente également des caractères entérocytaires. Cette lignée fait preuve d'une plus grande résistance à l'adriamycine (molécules utilisée en chimiothérapies contre plusieurs cancers) que d'autres lignées de CRC ne présentant pas les mêmes caractères de différenciation (Peters et Roelofs 1992). La lignée Caco-2 a été isolée chez un patient traité au 5-FU, la présence de caractères entérocytaires pourrait donc avoir été induite par ce traitement. Par ailleurs, des lignées cellulaires de CRC telle que HT29, sont capables de résister à divers stress métaboliques, induits, par exemple, par un manque d'apport en glucose ou par des traitements au 5-FU et à l'oxaliplatine (Lesuffleur et al. 1990; Lesuffleur et al. 1998). Ces données indiquent que l'hétérogénéité de la tumeur pourrait révéler, parmi les différentes populations de cellules présentes, des cellules ayant acquis ou ayant le potentiel d'acquérir une résistance aux chimiothérapies. De plus cette acquisition de résistance pourrait être due aux traitements eux-mêmes.

Enfin, la chimiosensibilité des tumeurs est dépendante de la capacité des cellules tumorales de déclencher l'apoptose. En effet, l'épithélium colorectal est un tissu dont l'une des particularités est le renouvellement très rapide (7 jours), et par conséquent est caractérisé par un fort taux de prolifération. Pour cette raison, l'équilibre entre la prolifération des cellules souches multipotentes, responsables du renouvellement de l'épithélium, et l'apoptose est très contrôlé. Cet équilibre permet de maintenir l'homéostasie cellulaire de l'épithélium. En particulier, lors de la réponse aux chimiothérapies, l'altération du processus apoptotique

diminue significativement l'efficacité du traitement, qui vise généralement précisément à induire la mort cellules par cette voie. Par conséquent, la chimiorésistance peut être induite par des protéines jouant un rôle majeur dans l'apoptose, comme Bax. La mutation (Ionov et al. 2000; Rampino et al. 1997) ou la sous-expression de cette protéine ont été rapportées dans les CRC et la faible expression est un facteur de mauvais pronostique de survie des patients (Sturm et al. 1999; Ogura et al. 1999). De plus, l'équilibre entre les protéines pro et anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-x_L est crucial pour la réponse de la tumeur à la chimiothérapie, particulièrement avec le 5-FU (Nita et al. 1998; Mirjolet et al. 2000) et permet de prédire la résistance (Scopa et al. 2001). Enfin, la perte de p53 dans une grande majorité des CRC (B. Vogelstein et al. 1988), dont l'implication dans l'apoptose est très bien montrée, empêche d'orienter la réponse des cellules tumorales vers l'apoptose en présence d'un stress génotoxique induit par des molécules comme le 5-FU ou l'oxaliplatine.

Un autre facteur de résistance d'importance pour le contexte de ce travail de thèse est l'impact de stress désactivateur de ribosome (RIS). Ce stress est induit par des xénobiotiques agissant sur l'ARNr 28S et désensibilise les cellules de CRC aux chimiothérapies. En particulier, ce stress réduit la mort des cellules tumorales induite par le 5-FU, dans la lignée HCT116 et *in vivo* (Oh et al. 2016). Ces informations sont intéressantes vis-à-vis de l'impact connu du 5-FU sur le métabolisme des ARN, en particulier des ARN impliqués dans la traduction : ARNr et ARNt. En effet, le 5-FU altère leur maturation et leur fonction, et inhibe la biogenèse des ribosomes (Burger et al. 2010; Kaiser, Jacobson, et Hedgcoth 1969; Mojardín et al. 2013; Ghoshal et Jacob 1997; Thérizols et al. en préparation). L'inhibition de la biogenèse des ribosomes par le 5-FU a lieu au niveau de la maturation des ARNr (Ghoshal et Jacob 1997). En effet, le 5-FU est responsable d'un blocage du clivage des ARNr, résultant en une accumulation de l'intermédiaire pré-ARNr 32S, sans altérer la synthèse du pré-ARNr 47S (Burger et al. 2010). Le 5-FU bloque aussi la pseudouridylation des ARNt et ARNm (L. Huang et al. 1998; X. Zhao et Yu 2007), il est donc possible que cet effet se produise sur les ARNr, ce qui serait aussi susceptible d'affecter leur maturation et la traduction. D'autre part, des travaux de notre équipe montrent l'intégration de 5-FU dans les ARNr des ribosomes cytoplasmiques en cours de traduction (Bash Imam et al. en révision ; Thérizols et al. en préparation). Ces ribosomes sont donc fonctionnels, mais leur activité de traduction est modifiée. Ils présentent notamment une altération de l'initiation IRES-dépendante de la traduction *in vitro* (Thérizols

et al. en préparation). Par ailleurs, le traitement au 5-FU induit une reprogrammation de la traduction, responsable d'une régulation traductionnelle différentielle d'un groupe d'environ 300 gènes (Bash Imam et al. en révision). Ces résultats montrent l'impact du 5-FU sur le ribosome et la traduction, et indiquent que le mécanisme d'action de cette chimiothérapie est encore mal connu.

Ces données ainsi que des travaux de notre équipe (Thérizols et al. en préparation ; Bash Imam et al. en révision) contribuent à interroger le rôle de la biogenèse des ribosomes et du ribosome lui-même dans la réponse aux chimiothérapies dans les cancers colorectaux.

II. Résultats

II.1. Etude de la structure de la FBL humaine au sein du complexe snoRNP C/D

Les données exposées en introduction montrent que les travaux étudiant l'activité de FBL sont très limités, et que les mécanismes responsables de la régulation de cette activité sont inconnus. Pour comprendre ou modéliser ces mécanismes, il est nécessaire de connaitre les relations entre la structure et la fonction de FBL, et les voies contrôlant sa régulation. Dans La première partie de mon travail de thèse, j'ai choisi d'exploiter les données structurales disponibles sur FBL, et de manière plus générale sur le complexe snoRNP C/D, afin de construire un modèle de travail pour l'exploration des relations structure-fonction de la FBL humaine.

II.1.1. Conservation de la structure de FBL entre humain et archées

Chez les eucaryotes, on dispose de très peu d'informations sur la structure de FBL et du complexe snoRNP, puisque seule une structure cristalline partielle de FBL humaine a été résolue. Cependant, de nombreuses études menées chez les Archées visent à explorer le mécanisme de 2'-O-méthylation des ARNr et le rôle des membres du complexe de méthylation : FBL, Nop5 (homologue de Nop56 et Nop58), et L7Ae (homologue de 15.5kDa), et le snoARN à boîtes C/D. Une étude récente de De Silva et al (De Silva, Zhou, et Brown 2012) décrivent la structure cristalline de la FBL de l'archée *aeropyrum pernix* liée au ligand donneur universel de méthyl : S-adenosyl-L-méthionine (SAM) à une résolution de 1.7 Å (accès PDB : 4DF3). Cette étude décrit précisément les résidus interagissant avec SAM. D'autre part, deux études décrivent l'organisation du complexe avec tous ses membres protéiques et le snoARN entier chez l'archée s*ulfolobus solfataricus* (J. Lin et al. 2011; Lapinaite et al. 2013). Ces travaux présentent non seulement le complexe dans son intégralité, mais également en configuration active, avec l'ARN substrat et le ligand SAH (SAM ayant transféré sont groupement méthyl). Les structures cristallines décrites (accès PDB : 3PLA et 4BY9, respectivement) sont donc des bases intéressantes pour étudier le rôle de chaque membre du complexe, et identifier les résidus importants pour l'activité méthyl-

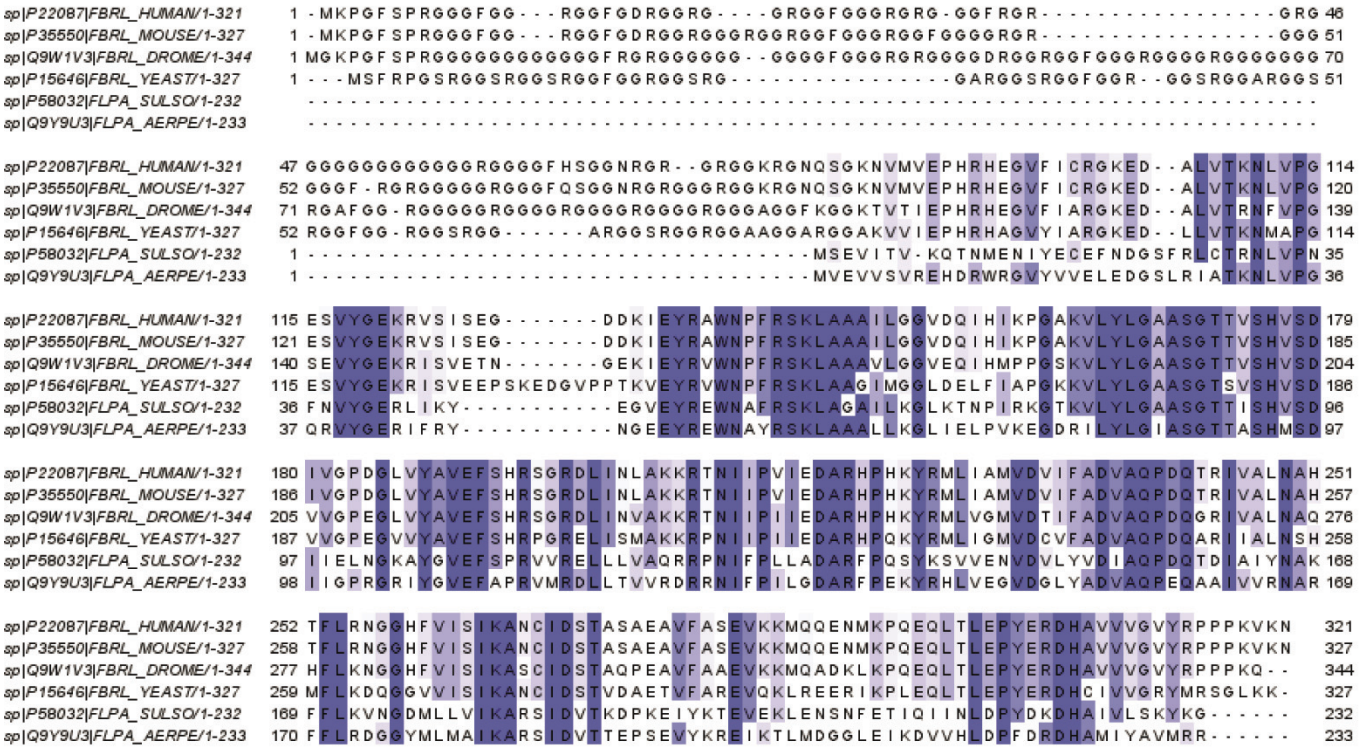


Figure 20 - La séquence de FBL est très conservée entre les archées et l'homme

Alignement des séquences primaires des FBL de plusieurs espèces. L'alignement montre une forte conservation des séquences primaires. La FBL humaine partage 95.4 % d'identité avec la FBL de souris, et 67.7 % avec Nop1 montrant un conservation haute dans le domaine des eucaryotes. Avec les archées, la FBL humaine partage respectivement 46.9% et 46.5% d'identité (FBL de *S. Solfataricus* et *A pernix*). On remarque que le domaine GAR en N-terminal est présent chez les eucaryotes mais pas chez les archées.

transférase. Cette partie de mon travail de thèse a consisté à rassembler ces données disponibles chez les archées, et à les extrapoler chez l'homme. Pour cela, j'ai principalement comparé la structure de la FBL humaine avec celles de s*ulfolobus solfataricus* issue de la structure présentée par Lin et al. (3PLA), co-cristallisée avec l'ensemble du complexe de méthylation, et d'aeropyrum pernix issue de la structure de De Silva et al. (4DF3), seules co-cristallisée avec SAM.

II.1.1.1. Conservation de la séquence

Une première étape a consisté en la mesure du pourcentage d'identité de séquence, avant de comparer la structure tertiaire des différentes FBL. L'alignement des séquences primaires montre une bonne conservation de FBL entre des archées, la levure et l'homme. La FBL humaine partage respectivement 46.5 % et 46.9 % d'identité avec les FBL d'*a. pernix* et de *s. solfataricus* (figure 20). En particulier, les sections de FBL les plus conservées correspondent au domaine méthyl-transférase, et notamment aux résidus de liaison à SAM (figure 20). Cette homologie de séquence met aussi en évidence la présence du domaine GAR chez les eucaryotes, et témoigne d'une modification importante de FBL au cours de l'évolution, et qui contraste avec la conservation des autres domaines. Cet alignement témoigne donc de la conservation de la séquence au niveau de domaines fonctionnels de FBL, entre les espèces éloignées du point de vue d'évolution.

II.1.1.2. Validation de l'alignement de structure

La forte homologie de séquence n'est cependant pas suffisante pour établir les acides aminés importants au sein de la structure. Afin de comparer ces structures et de prédire efficacement les acides aminés importants pour l'activité méthyl-transférase de la FBL humaine, j'ai utilisé l'outil de superposition de structure du logiciel PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC). Ce dernier repose sur l'alignement de séquences (type BLAST BLOSUM62) et l'association paire par paire des C_α des acides aminés. A l'issue de l'alignement, PyMOL donne un score correspondant à la moyenne

quadratique (RMSD – Root Mean Square Deviation) des distances entre les carbones qui est calculée de la manière suivante :

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^{N} d_i^2}$$

Où N est le nombre d'atomes appariés à l'issue de l'alignement, d_i est la distance entre l'atome *i* de la structure 1 et l'atome *i* de la structure 2 (*i* allant de 1 à N). La RMSD correspond donc à la distance moyenne entre les atomes (appariés) des deux structures superposées.

Afin de disposer d'une base de référence pour ces comparaisons de structure, cet outil a d'abord été utilisé pour superposer la structure de l'histone H4 connue pour être hautement conservée avec celle de ses orthologues chez plusieurs espèces d'archées et d'eucaryotes (Pereira et Reeve 1998). Les alignements des histone H4 de *p. horikoshii* et *m. janaschii* (archées) avec l'histone H4 humaine donnent respectivement les RMSD 2.818 Å et 1.671 Å. Lorsque l'on compare l'histone H4 humaine à ses homologues eucaryotes, on obtient des valeurs plus petites : respectivement 0.223 Å et 0.458 Å pour les alignements avec H4 de g*allus gallus* (poulet) et *x. laevis* (amphibien) (figure 21). Par ailleurs, on obtient 25.883 Å, 25.088 Å, et 11.923 Å lorsque l'on compare la protéine S4 humaine, faiblement conservée au cours de l'évolution, à ses homologue chez *haloarcula marismortui* (archée), *saccharomyces cerevisiae*, et *canis lupus familiaris* (chien), respectivement. Ces scores d'alignement forts (faible distance moyenne) pour des protéines dont la conservation est connue, et faibles (distance moyenne élevée) pour les protéines connues pour leur faible conservation au cours de l'évolution valident l'approche d'alignement de structure, et fournissent un référentiel de valeurs.

Les alignements de la FBL de *a. pernix* (4DF3) et de la FBL humaine (2IPX, H-FBL) avec la FBL de *s. solfataricus* (3PLA, sulfo-FBL) donnent respectivement les RMSD 0.756 Å et 0.684 Å. Ces valeurs sont bien inférieures à celles calculées pour l'alignement de l'histone H4 avec ses orthologues chez les archées. Cela indique que la structure tertiaire de FBL, en plus de sa structure primaire, est fortement conservée au cours de l'évolution. La superposition des trois FBL montre une grande conservation de la structure tridimensionnelle entre les différentes espèces (figure 22). En particulier au niveau du domaine C-terminal, qui présente une topologie caractéristique de toutes les méthyl-transférases dépendantes de SAM : un feuillet β constitué de 7 brins, entourés de 6 hélices α, 3 de chaque côté du feuillet β (Deng

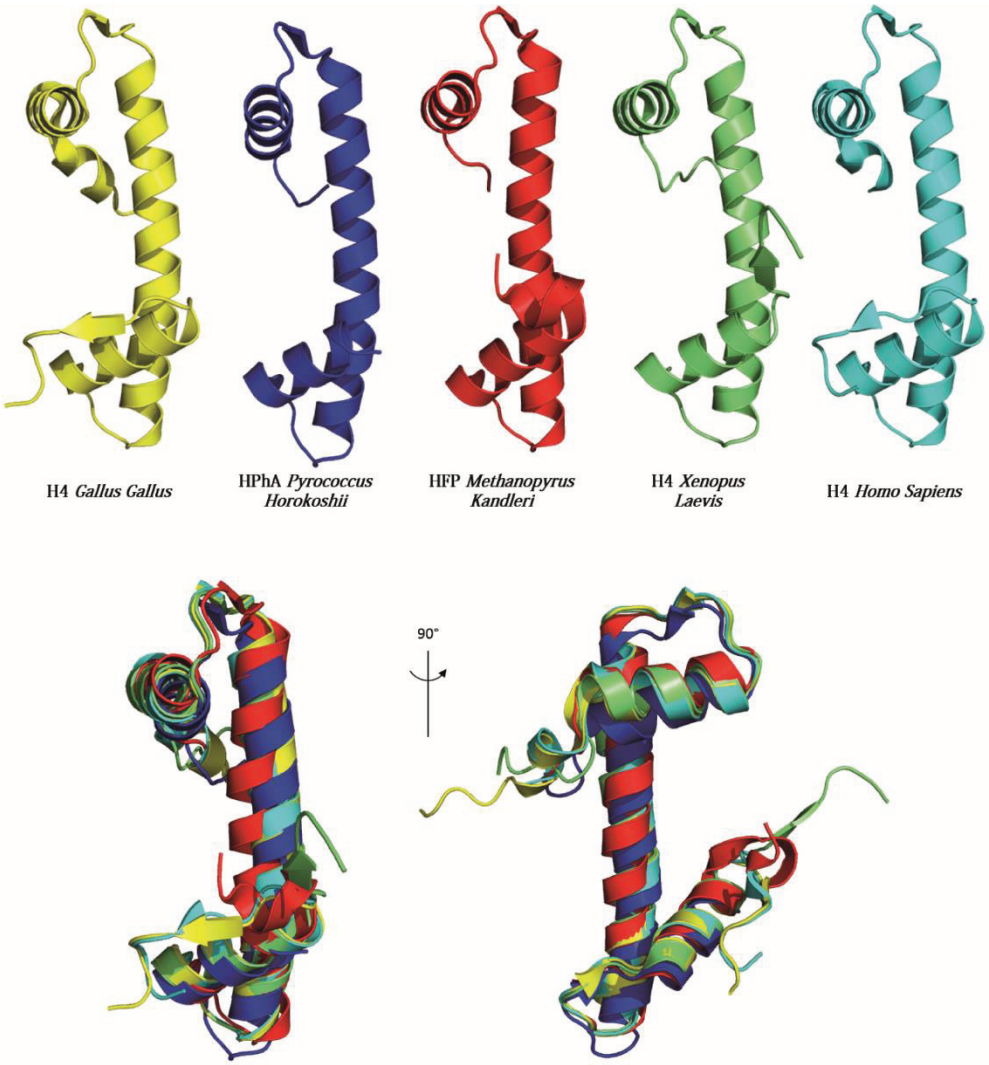


Figure 21 - Validation de l'outil d'alignement de PyMOL
Alignement des structures tertiaires d'histones de plusieurs espèces représentant les eucaryote et l'homme. Ces histones sont déjà connus pour leur forte conservation, et l'alignement obtenu avec PyMOL corrèle avec ces données, montrant une très forte conservation de structure même entre des espèces aussi phylogénétiquement éloignées que des archées et l'homme.

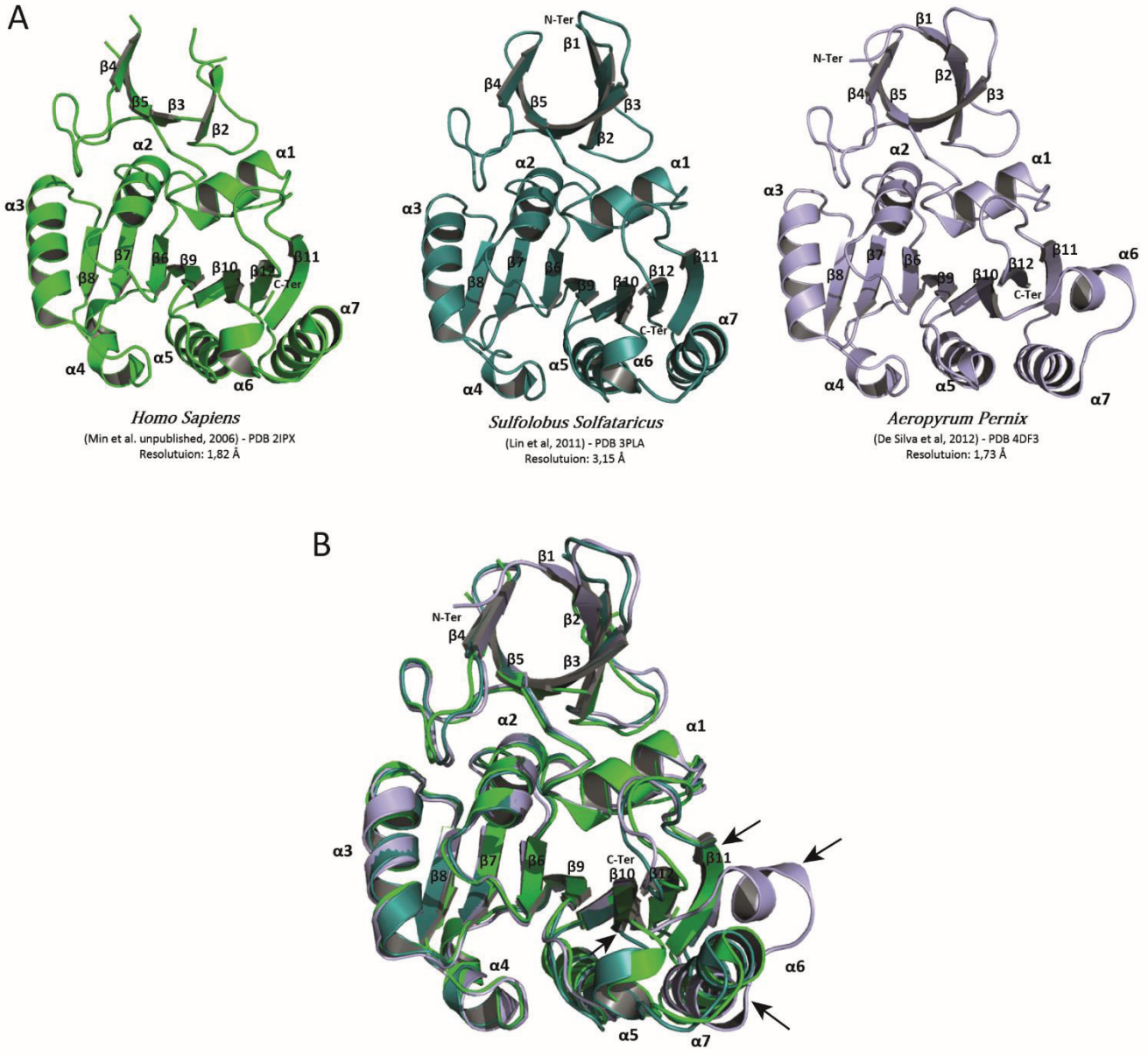


Figure 22 - Conservation de la structure tertiaire de FBL entre les archées et l'homme

A, Structures tertiaires de la FBL humaine (gauche), de la FBL de *s. solfataricus* (milieu) et de la FBL de *a. pernix* (droite). L'observation des ces trois structures révèle une apparente forte conservation de la structure globale.

B, Alignement des structures tertiaires des FBL humaine, de *s. solfataricus* et de *a. pernix*. L'alignement montre une très grande conservation des trois structures, même entre les FBL archées et humaine. Les principales différences structurales entre les différentes FBL sont indiquées par des flèches noires.

et al. 2004). On retrouve également des résidus conservés dans le domaine catalytique (Deng et al. 2004) de FBL dans les trois structures citées précédemment.

Cependant, quelques différences peuvent être observées : l'hélice α7 et les brins β10 et 11 présentent de légères variations d'orientation entre les 3 FBL testées, et l'hélice α6 chez la FBL de *a. pernix* est dans une orientation complètement différente de la position observée dans les deux autres espèces (figure 22). Ces variations d'orientation peuvent être dues au fait que la structure d'une protéine varie d'un cristal à l'autre. En revanche, les variations sont plus marquées avec la FBL d'*a. pernix*, seule co-cristallisée avec SAM (de Silva, Zhou, et Brown 2012), suggérant des changements de conformation inhérents à la fixation du substrat à son site de liaison.

La structure de la FBL est donc très conservée entre les archées et l'homme. Cela permet non seulement d'extrapoler des données structurales des FBL archées vers la FBL humaine, mais également d'aligner la FBL humaine aux deux FBL archées, et de déterminer la position de ses domaines et résidus vis-à-vis des membres ARN et protéiques du complexe de méthylation. Ces alignements ont donc permis de construire un modèle structural que je décris ci-après.

II.1.2. Etude du domaine catalytique

Dans un premier temps, l'étude structurale a été focalisée sur le site catalytique de FBL, localisé entre les brins β9 et β10, les hélices α1 et α6 ; et SAM (ou SAH, ou MTA, analogues de SAM). L'alignement de la FBL de *s. solfataricus* avec celle de *a. pernix*, co-cristallisée avec SAM, permet de positionner les résidus de la FBL à la fois vis-à-vis du groupement méthyl de SAM mais aussi vis-à-vis du groupement hydroxyle du ribose cible (figure 23A). On retrouve plusieurs résidus dans l'environnement catalytique chez *s. solfataricus*, en particulier K182, D153 et K60, localisés proches du groupement hydroxyle substrat et du groupement méthyl du SAM (figures 23A et 23B). Ces résidus forment des contacts avec le nucléotide cible ainsi qu'avec SAM. Chez l'homme, la configuration du domaine catalytique est similaire. L'alignement de la FBL humaine (H-FBL) avec celles de S. Solfataricus et A. pernix permet de positionner ses résidus vis-à-vis de SAM et du nucléotide cible. Ainsi on peut voir que la

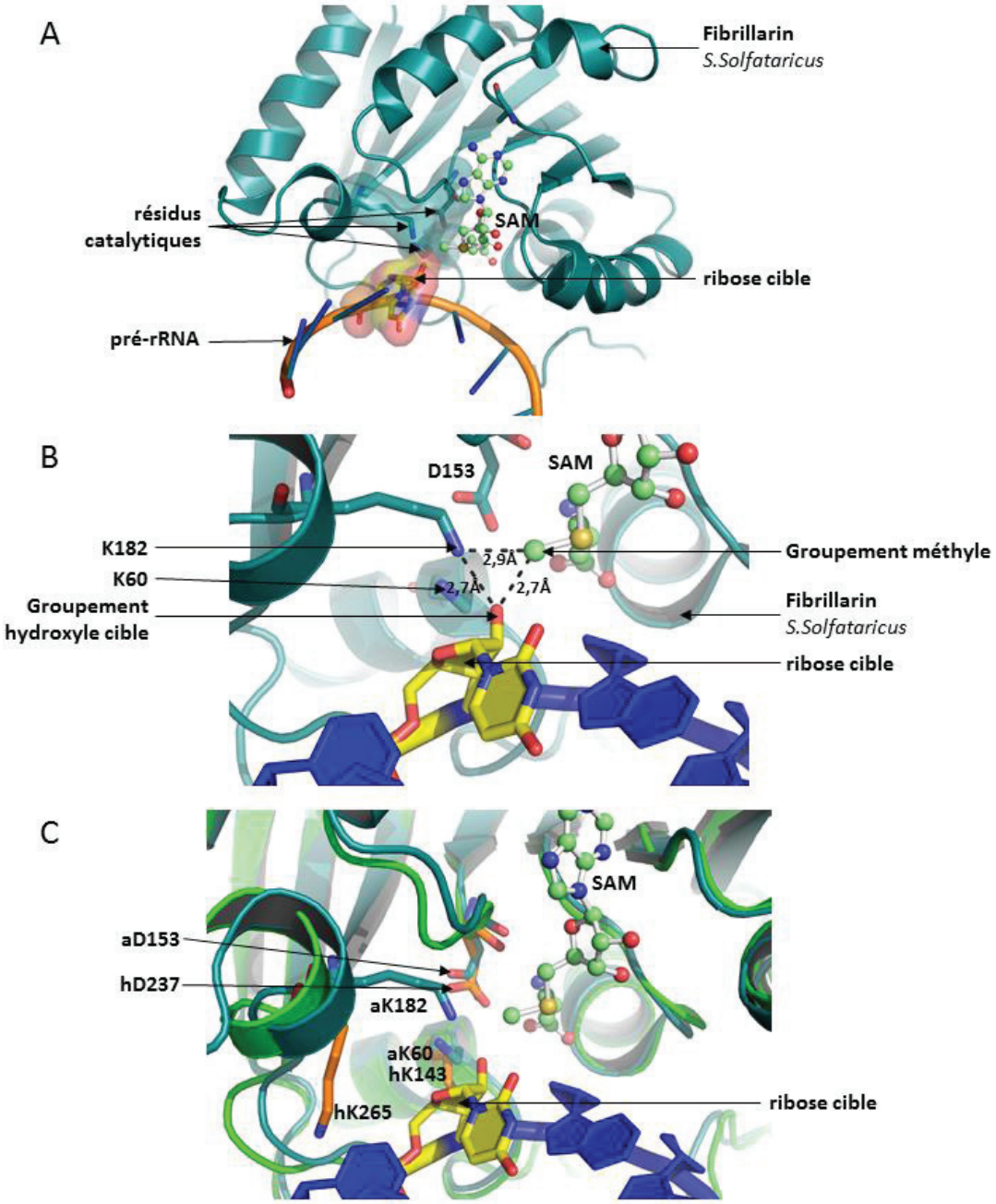


Figure 23 : Conservation de l'organisation du domaine catalytique de FBL entre les archées et l'homme
La superspoition des FBL humaine, de *S. Sol*fataricus, et de *A. Pernix* permet de positionner ces différentes FBL vis-à-vis de SAM et de l'ensemble du complexe de méthylation.
A, vue d'ensemble du domaine catalytique de FBL de *S. Solfataricus*. Les résidus de l'environnement catalytique forment des contacts avec le ribose cible de l'ARN substrat, et sont au contact de SAM également.
B, le groupement amine de la lysine 182 chez *S. Solfataricus* est situé à 2,7Å du groupement hydroxyle du nucléotide cible, et à 2,9Å du groupement méthyl de SAM, en position propice pour déclencher la réaction de transméthylation.
C, Superposition des domaines catalytiques de la FBL humaine (vert claire) et de *S. Solfataricus* (vert-bleu). On constate une conservation globale de l'organisation du site catalytique. La lysine 265 chez l'homme, homologue de la lysine 182 chez *S. Solfataricus* n'est pas positionnée dans la même orientation. Cette différence pourrait être du au fait que la FBL humaine ait été cristallisée seule et non en complexe.

conformation du site catalytique de la FBL humaine est très similaire à celle des FBL archées. On remarque cependant de légères variations d'orientations des résidus (figure 23C).

Le mécanisme exact de la réaction catalysée par la fibrillarine n'est pas connu, mais il existe plusieurs exemples décrivant l'action d'une O-méthyl-transférase. D'une manière générale, les réactions de transfert de groupement méthyle consistent en des substitutions nucléophiles de type 2 (SN2) (figure 24A). Notamment, dans le cas de la catéchol-O-méthyl-transférase, une base déprotone le groupement hydroxyle cible nucléophile (celui qui doit recevoir le groupement méthyle du SAM), qui attaque alors le carbone du groupement méthyle du SAM, électrophile. Après un état de transition, le groupement méthyle perd sa liaison covalente avec le SAM au profit du groupement hydroxyle cible (figure 24B).

Cette réaction met en évidence l'intervention d'une base, qui attire l'atome hydrogène du groupement hydroxyle, permettant à ce dernier d'attaquer le carbone nucléophile du groupement méthyl. Il a été suggéré par (Aittaleb et al. 2003) que le résidu Asp 133 chez la FBL de Archeoglobus Fulgidus (Asp 153 chez Sulfo-FBL et Asp 236 chez H-FBL) pourrait agir comme la base déclenchant la réaction de transfert du groupement méthyle, sous sa forme COO-. Ce résidu est conservé chez l'homme et la levure, ainsi que dans plusieurs espèces d'archées. Cependant, les atomes d'oxygène du groupement carboxylique de Asp 153 se trouve respectivement à 4.2 et 4.8 Å de l'hydrogène cible chez Sulfo-FBL, et à 4.1 et 3.9 Å chez l'homme (d'après la superposition de ces deux FBL). Ces distances sont probablement trop élevées pour permettre la déprotonation de l'hydroxyle cible. En revanche chez Sulfo-FBL deux résidus sont placés à des distances compatibles à la déprotonation de l'hydrogène ciblé : Lys 182 et Lys 60, dont les groupements amines (basiques) sont situés à 3.0 et 2.6 Å, respectivement. Par ailleurs, Lin et al. désignent 3 acides aminés comme étant « proches du centre de réaction » (J. Lin et al. 2011) : K60, K182 et D153 (chez Sulfo-FBL). Ces trois résidus sont conservés entre *A. pernix*, *S. Solfataricus*, et *Homo Sapiens*, mais également chez la levure et la souris, et sont donc potentiellement la base déprotonante.

Ainsi, dans la FBL humaine, K265, K143 et D236 sont les résidus probablement impliqués dans le transfert du groupement méthyl, et contiennent potentiellement la base qui, en attirant l'hydrogène du 2'OH du ribose cible, déclenche la substitution nucléophile de type II. Parmi ces résidus, la lysine 182 chez sulfo-FBL est localisée à la fois proche de l'atome

d’hydrogène du groupement hydroxyle du ribose cible, et de l’atome de carbone du SAM, tandis que K60 et D133 sont situés à plus de 3.5 Å du groupement méthyle. Le résidu K182,

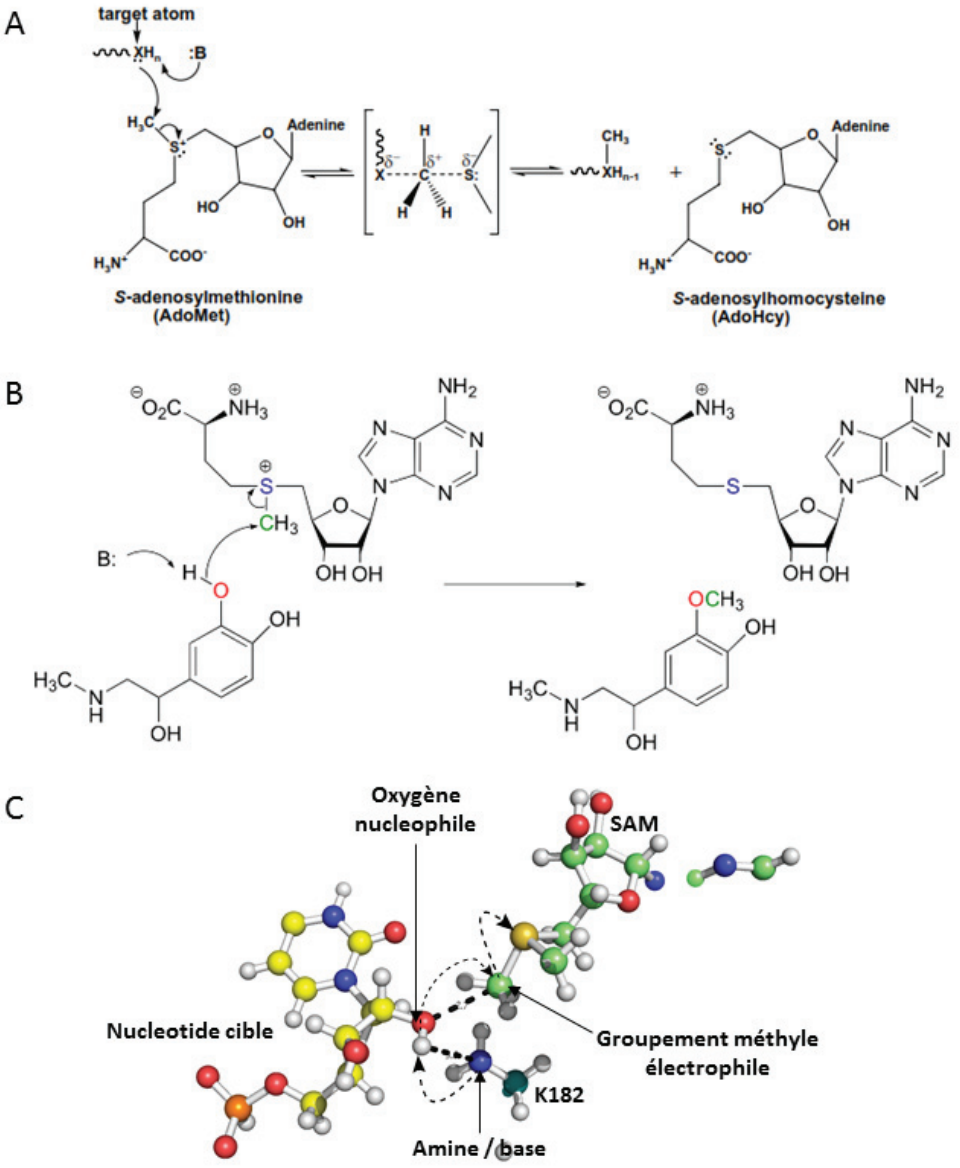


Figure 24 : Modèle de réaction de transméthylation pour la FBL de *S. Solfataricus*

A, Schéma mécanistique général de la réaction de transméthylation. Substitution nucléophile de type II (SNII) : un groupement basique (B:) déprotone un groupement nucléophile (XH_n), qui attaque le carbone électrophile d'un groupement méthyl (CH_3). Après une étape de transition, le groupement méthyle est transféré sur le groupement nucléophile.

B, Réaction de transméthylation connue pour la Cathécol-O-méthyltransférase. Ce mécanisme correspondant à une SNII indique que la réaction est dédenchée par une base (B:)localisée dans l'environnement catalytique qui déprotone le groupement hydroxyle cible (orange), qui à son tour attaque le carbone du groupement méthyle (vert) de SAM, permettant le transfert de ce dernier sur l'oxygène accepteur.

C, Modèle de transméthylation pour la FBL de *S. Solfataricus* proposé d'après les observations faites au cours de ce travail de thèse. Le mécanisme suit une réaction de type SNII. Le groupement amine de la lysine 182 (265chez l'homme) déprotone le groupement hydroxyle en 2' du ribose du nucléotide cible, qui à son tour attaque le carbone du groupement méthyl de SAM. Ce dernier est transféré sur l'atome d'oxygène en 2' du nucléotide cible.

K265 chez l'homme, parait donc être le meilleur candidat pour déclencher la réaction de transméthylation. L'alignement des FBL humaine et de sulfo-FBL montre que la K265 de la FBL humaine présente une orientation très différente de son homologue chez sulfo-FBL. Cette différence fait que le groupement amine de K265 chez l'homme se trouve trop loin du site catalytique pour être l'élément déclencheur de la réaction. Cette différence d'orientation peut être due au fait que la FBL humaine n'a pas été cristallisée en conformation active, avec ses partenaires (protéiques et snoARN) et son substrat. Par conséquent il se pourrait que le site catalytique change de conformation de manière dépendante de l'association de la FBL avec ses partenaires protéiques, le snoARN guide, et l'ARN substrat. La lysine 182 semble être le meilleur résidu (déclencheur de la réaction) candidat chez *s. solfataricus*, et malgré cette différence d'orientation, j'ai postulé que la lysine équivalente chez l'homme (265) est le meilleur candidat également, puisque la forte conservation de structure de FBL suggère que les mécanismes moléculaires impliqués dans son activité sont conservés au cours de l'évolution.

II.1.3. Etude du domaine de liaison à SAM

Dans une deuxième partie, la conservation des domaines de liaison à SAM a été étudiée, afin de déterminer les résidus essentiels à la fixation du ligand à FBL, et donc essentiels à sa fonction de méthylation.

La structure de la FBL humaine contient le ligand MTA, un analogue de SAM, qui correspond à sa partie S-Adénosine et ne porte pas le groupement méthyle. La superposition de la structure de la FBL de *a. pernix* cristallisée avec SAM (le groupement méthyle présent), avec celle de la FBL de *s. solfataricus* cristallisée en conformation active et en complexe avec son ARN substrat, et celle de la FBL humaine permet d'extrapoler la position de SAM au sein des différentes FBL. On constate que les substrats des complexes d'*a. pernix* (SAM), du complexe de *s. solfataricus* (SAH), analogue ayant perdu le groupement méthyle, produit de la transméthylation) et de la structure de FBL humaine (MTA), sont très bien superposés et que leur orientation varie très peu (non montré), permettant de conclure que l'extrapolation de la position de SAM par rapport aux résidus voisins dans les FBL alignées est pertinente.

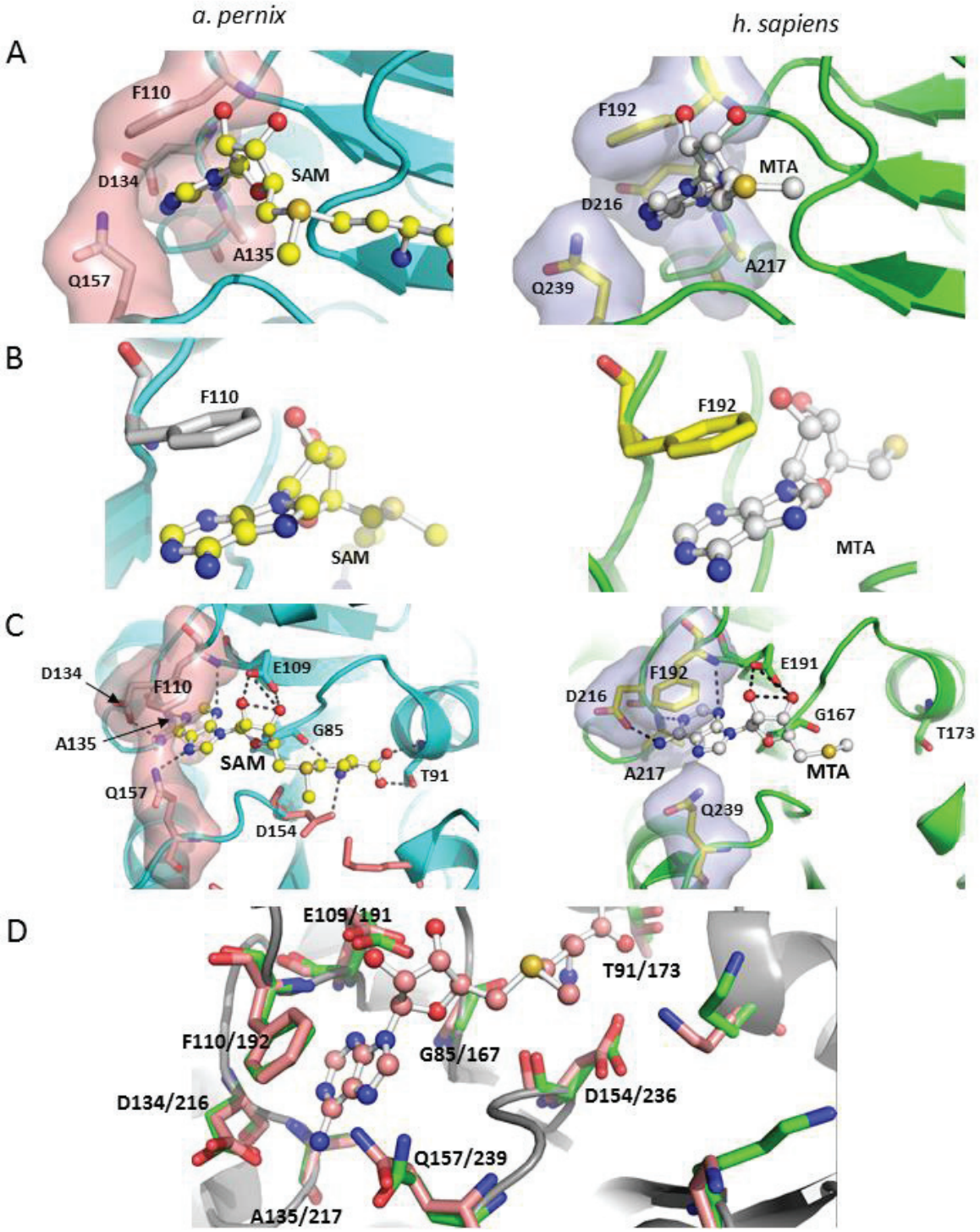


Figure 25 : Conservation du domaine de liaison a SAM entre les archées et l'homme

Comparaison des domaines de liaison à SAM des FBL humaine (vers claire, droite), et de *a. pernix* (bleu ciel, gauche).

A, comparaison des poches de liaison à SAM, qui interagissent en particulier avec la partie adénosine de SAM. La forme de cette poche chez l'homme et chez *a. pernix* est très conservée.

B, Chez l'homme et *a. pernix* une interaction de type π-π se forme entre les cycles adénosine de SAM d'une phénylalanine stabilisant le cycle adénosine de SAM.

C, Plusieurs résidus entourant SAM (ou MTA) forment des interactions électrostatiques avec ce dernier. Ces interactions sont conservées entre *a. pernix* et l'homme.

D, Superposition des domaines de liaison à SAM de la FBL humaine et de *a. pernix* . Cette image montre que même l'orientation des chaines latérales des acides aminés impliqués dans la liaison à SAM est similaire, indiquant que les mécanismes moléculaires impliqués dans la liaison de ce ligand sont conservés.

Da Silva et al. décrivent avec précision le domaine de liaison à SAM de la FBL d'a. pernix. Les résidus F110, D134, A135 et Q157, conservés chez l'homme (respectivement F192, D216, A217, et Q239) sont mentionnés comme étant clés pour l'interaction entre SAM et son domaine de liaison dans la FBL. Ces 4 résidus forment ensemble une poche, en forme de creux avec un angle droit, dans lequel vient se nicher le cycle adénosine de SAM, et forment des interactions électrostatiques avec ce dernier (figure 25A). L'arrangement de cette poche est conservé chez l'homme, de même que les interactions électrostatiques ; mise à part celle avec Q240 (Q157 chez *a. pernix*) (figure 25A). Par ailleurs, il se forme en plus une liaison de type π-π entre le cycle aromatique de F110 (chez *a. pernix*) et le cycle adénosine de SAM, grâce à la superposition en deux plans parallèles de ces deux cycles (figure 25B). Cette interaction joue un rôle essentiel dans la stabilisation de l'interaction entre SAM et FBL (de Silva, Zhou, et Brown 2012). De plus, un ensemble d'interactions hydrophobes se forment entre l'atome de carbone du cycle aromatique de F110 et ceux du cycle adénosine de SAM (données non montrées). Ces deux types d'interactions sont présents chez l'homme au niveau du résidu F192 (figure 25A pour les interactions électrostatiques), dont l'orientation du cycle aromatique par rapport au ligand varie très légèrement, et qui par conséquent perd 2 interactions hydrophobes avec le cycle adénosine (données non montrées). Néanmoins, on constate une remarquable conservation de structure de cette partie du domaine de liaison à SAM allant jusqu'aux interactions atome-atome.

En plus de la partie adénosine, les parties ribose et méthionine de SAM (de la partie CH2 jusqu'à l'extrémité COO-) forment également des interactions avec des résidus environnant, dont la majorité est conservée entre *a. pernix* et l'homme (figure 25C). En effet, 3 liaisons électrostatiques sont formées entre les groupements hydroxyle du ribose de SAM et le résidu E109 (E191 chez l'homme). Les résidus Y83, G85 et D154 (homologues humains : Y165, G167, D236) forment chacun une interaction électrostatique avec le groupement amine de la partie méthionine (figure 25C). De plus, l'extrémité de SAM forme deux interactions électrostatiques avec la Thr 91 (T173, chez l'homme), qui oriente SAM au sein de son domaine de liaison, contribuant ainsi au bon positionnement du groupement méthyle vis-à-vis de l'hydroxyle cible (figure 25C). Enfin, les parties ribose et méthionine de SAM forment des interactions hydrophobes avec les résidus les entourant. De cette manière, E109 (E191, chez l'homme) interagit avec le ribose de SAM, et A87 ainsi que T91 (A169 et T173, chez l'homme)

interagissent avec la partie méthionine (non montrées). On ne peut cependant pas observer ces interactions entre la FBL humaine et une quelconque partie méthionine du ligand MTA, puisque ce dernier ne la possède pas. En revanche, on peut extrapoler ces interactions électrostatiques grâce à la superposition de la FBL humaine et de la FBL de *a. pernix* (co-cristallisée avec SAM). Ce modèle structural (figure 25D) permet de prédire que les interactions entre la partie méthionine de SAM et les résidus environnant sont conservées chez l'homme. Cette conservation n'a cependant pas pu être vérifiée pour les interactions hydrophobes, puisque pour les mettre en évidence un autre programme que PyMOL a été utilisé, disponible sur la base de données PDB, et par conséquent il n'a pas été possible de procéder à la superposition.

L'alignement de la FBL humaine avec la FBL d'*a. pernix* confirme de manière très visuelle l'excellente conservation de structure entre les deux homologues. On constate, même pour les chaines latérales des résidus du domaine de liaison à SAM, très peu de variations d'orientation. La plupart des interactions entre FBL et SAM sont conservées à l'atome près, et témoignent donc de la conservation des mécanismes moléculaires impliqués dans la liaison de ce ligand.

II.1.4. Etude du mutants Nop1.3

Une étude publiée par David Tollervey en 1993 a permis de montrer plusieurs activités de la fibrillarine chez la levure: son rôle dans l'assemblage des ribosomes, la 2'-O-méthylation, et le clivage des ARNr (David Tollervey et al. 1993). L'aspect très intéressant de cette étude est lié à l'identification de plusieurs mutants présentant sélectivement des défauts dans chacune de ces activités. Ainsi, les auteurs montrent que le mutant Nop1.3 est défaillant pour la 2'-O-méthylation des ARNr, tandis que son activité de clivage de ces ARN et l'assemblage des ribosomes n'est pas affecté. Le mutant Nop1.3 présente quatre mutations ponctuelles. Deux de ces mutations ont été décrites comme n'ayant pas d'impact sur l'activité de FBL. En revanche, la présence des deux autres mutations, A175V et P219S, résulte un une perte d'activité méthyl-transférase de Nop1 (David Tollervey et al. 1993). Ces deux résidus sont conservés chez l'homme (A168 et P212, respectivement) et chez s*. solfataricus* (A85 et P129). La proline est aussi conservée chez *a. pernix*, contrairement l'alanine (respectivement P130 et

I86). La conservation entre les archées et eucaryotes suggèrent un rôle fonctionnel de ces deux résidus. En les replaçant dans le modèle

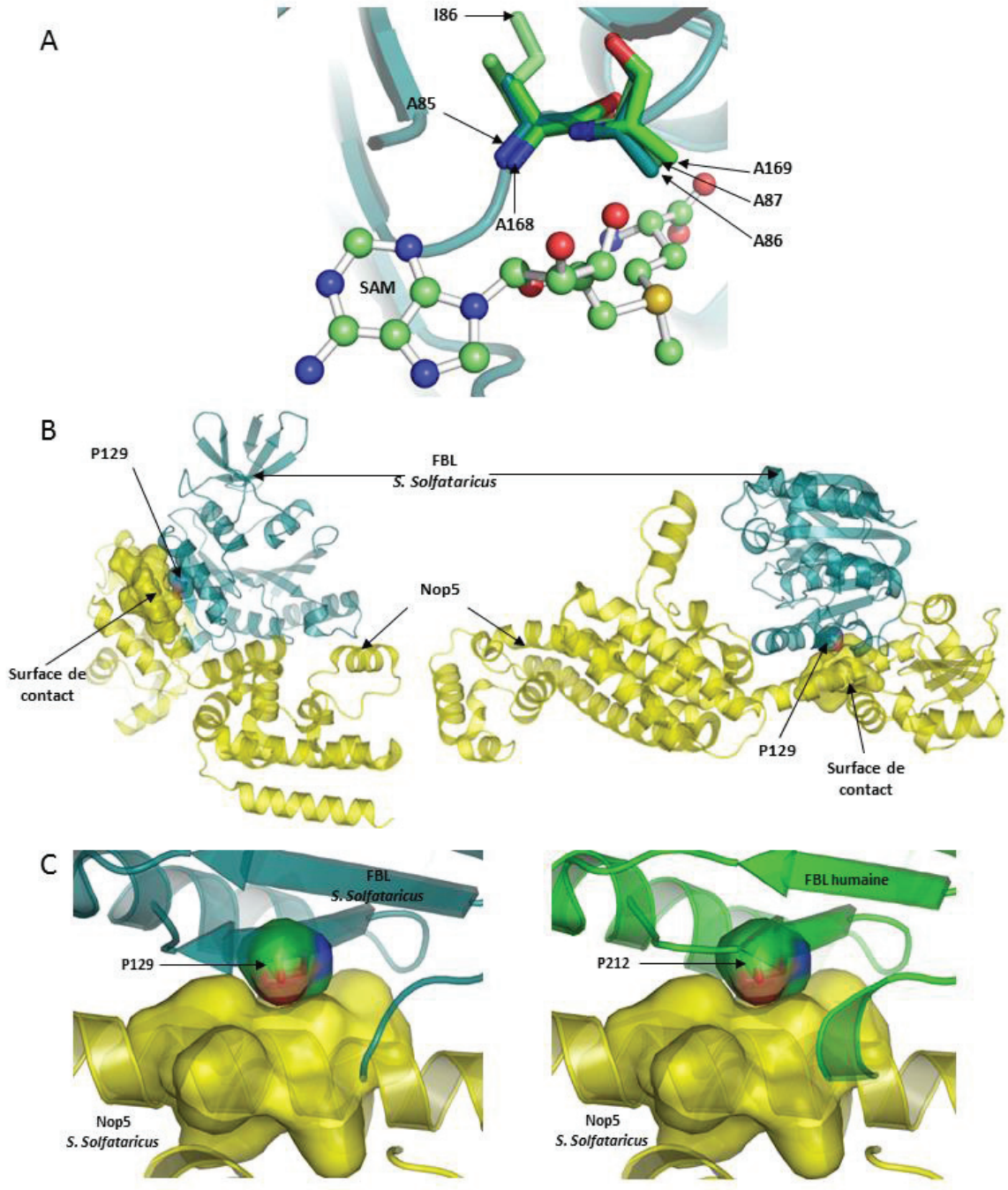


Figure 26 : Les résidus mutés dans le mutant Nop 1.3 sont localisés à l'interface avec Nop5 et proche de SAM

A, L'alanine mutée dans le mutant Nop1.3 est conservée chez *S. solfataricus* et chez l'homme. La position en 3D de ce résidu dans ces organismes est très similaire et se trouve adjacente à une alanine conservée formant une interaction hydrophobe avec SAM.

B, La proline mutée dans le mutant Nop1,3 est conservée dans toutes les FBL testées et d'après la structure du complex de méthylation et le modèle présenté dans ce travail de thèse se trouve à l'interface avec Nop5.

C, Cette proline (P129 chez *S. solfataricus* P212 chez l'homme) se loge dans une hélice du domaine N-terminal de Nop5 (panneau de gauche). La superposition de la FBL humaine à celle de *S. solfataricus* montre que cette position de la proline est hautement conservée chez l'homme.

d'alignement des trois FBL décrit précédemment, il est possible de proposer un rôle. L'alanine A168 chez l'homme se trouve adjacente à l'alanine 169 (évidemment…) qui forme une interaction hydrophobe avec le groupement méthionine de SAM (figure 26A). On peut donc faire l'hypothèse qu'une mutation de cette alanine perturbe l'orientation du résidu A169 et altère sont interaction avec SAM. Une telle altération pourrait modifier l'orientation de SAM au sein de son domaine de liaison et empêcher la réaction de transméthylation. Il a notamment été montré que le mutant Nop1.3 ne lie pas le SAM (Galardi et al. 2002), et il est prédit que ce défaut d'interaction est en partie responsable de la perte de l'activité méthyl-transférase (H. Wang et al. 2000).

La proline 129 chez sulfo-FBL se trouve à l'interface entre FBL et Nop5. Elle est positionnée sur un brin β faisant partie de la surface de FBL qui est liée par Nop5. Ainsi d'après le modèle d'alignement des FBL, le résidu P212 chez H-FBL serait localisé à l'interface entre Nop56/Nop58 et la FBL humaine. Chez sulfo-FBL, on remarque que ce résidu se loge à la surface d'une hélice α du domaine N-terminal de Nop5 interagissant avec FBL. La forme de la proline est d'ailleurs très complémentaire de la surface de contact de Nop5 avec FBL et pourrait jouer un rôle important dans cette interaction. Chez l'homme et *a. pernix*, l'orientation de la proline est également identique. Lorsqu'on aligne la FBL humaine avec sulfo-FBL on remarque que P212 présente la même complémentarité de forme avec Nop5 que le résidu homologue P129 (figure 26C), suggérant que dans le complexe humain, P212 participerait à l'interaction avec les partenaires Nop56 et/ou Nop58. Cette hypothèse est renforcée par d'autres structures rapportant l'interaction entre Nop5 et FBL chez les archées où ce même résidu proline est conservé et localisé à l'interface avec Nop5 (non montré). Notons que cette conservation de position est observée malgré la très faible conservation de Nop5, en termes de séquence primaire et de structure tertiaire. L'interaction entre FBL et Nop56 / Nop58 est cruciale pour l'activité méthyl-transférase du complexe puisque toutes les protéines de ce complexe sont requise pour effectuer la catalyse de la transméthylation. Il est donc probable que les éléments structuraux permettant ces interactions aient été d'avantage conservés. Pour cette raison, la mutation de P219 dans Nop1.3 pourrait être en partie responsable de la perte de 2'-O-méthylation des ARNr.

Les mutations pour les deux résidus présentent chacune un mécanisme d'inhibition potentiel de l'activité méthyl-transférase de FBL et du complexe snoRNP C/D. Il a notamment

été montré que le mutant Nop1.3 interagit bien avec Nop56p et Nop58p, chez la levure, indiquant que la mutation de la proline n'est pas suffisante pour perdre cette interaction (Galardi et al. 2002). Il est probable que bien que les protéines interagissent toujours, la nature de l'interaction soit altérée. Ainsi, chacune de ces mutations pourrait, seule, être responsable de la perte d'activité méthyl-transférase. Alternativement l'altération simultanée de FBL par ces deux mutations pourrait aussi être requise.

II.1.5. Quel est le rôle des modifications post-traductionnelles de la FBL dans le complexe de méthylation?

Outre les relations structure-fonction, intrinsèques à la structure même de FBL, le modèle d'alignement des FBL m'a aussi permis de prédire le rôle de certaines de ses modifications post-traductionnelles (MPT). Comme mentionné en introduction, la FBL humaine possède un grand nombre de MPT. On retrouve entre autres des acétylations et ubiquitinylations de lysines, des phosphorylations de sérines, thréonines et tyrosines, et des PARylations. Ces modifications ont pour la plupart été rapportées en précisant les résidus modifiés. J'ai ainsi pu les replacer sur la structure de la FBL humaine et, en alignant cette dernière aux FBL archées, prédire la position des MPT au sein du complexe de méthylation.

II.1.5.1. Ubiquitinylation à l'interface avec le substrat pourrait inhiber l'interaction de FBL avec ses partenaires

D'après la littérature, plusieurs lysines sont rapportées ubiquitinylées (Wagner et al. 2011; Mertins et al. 2013; Woong Kim et al. 2011). Ces études ne rapportent pas s'il s'agit de poly ou mono-ubiquitinylation. Le rôle de la plupart de ces MPT est difficile à prédire car elles sont souvent localisées dans des régions de la FBL humaine pour lesquelles le modèle ne prédit pas d'interaction particulières avec les partenaires ARN ou protéines du complexe. On peut cependant prédire que l'ubiquitinylation de la lysine 143 a un rôle dans l'interaction avec le pré-ARNr substrat. En effet, cette lysine est localisée très proche du site catalytique et au contact de l'ARN substrat. Plus précisément, elle forme des contacts polaires avec le ribose du nucléotide cible. Il est donc probable que l'encombrement stérique causé par l'ajout d'une

ubiquitine à ce site empêche l'interaction avec le pré-ARNr cible. De plus, cette lysine est localisée dans le centre de réaction de transméthylation. Elle est par conséquent

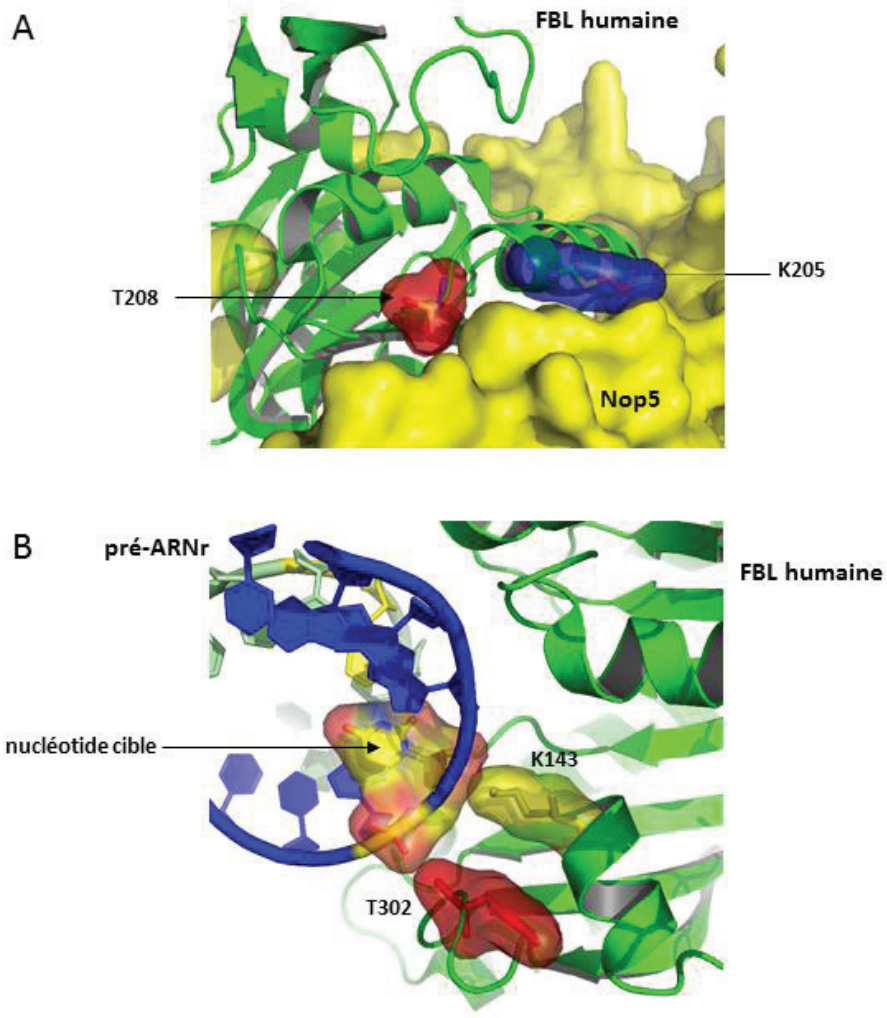


Figure 27 : Positions des modifications post-traductionnelles de la FBL humaine au sein du complexe snoRNP à boite C/D

La FBL humaine (vert claire 2IPX) a été superposée à la FBL de *S. Solfataricus* au sein du complexe de méthylation permettant de positionner ses modifications post-traductionnelles vis-à-vis des différents membres du complexe de méthylation.

A, Le modèle de superposition prédit que la thréonine 208 (rouge) et la lysine 205 (bleue), respectivement phosphorylée et acétylée, sont positionnées avec leur groupement modifiés à l'interface avec Nop56 / Nop58 (Nop5 sur la figure, jaune).

B, Le modèle prédit que la phospho-thréonine 302 (rouge) et la lysine ubiquitinylée 143 (jaune pâle) sont localisées au contact de l'ARN substrat (bleu) et en particulier très proches du nucléotide cible de la transméthylation (jaune).

susceptible de jouer un rôle dans cette réaction. L'ubiquitinylation à ce site pourrait ainsi constituer un mécanisme de régulation de l'activité de FBL. Par ailleurs, deux lysines ubiquitinylées sont localisées proches de Nop5. Dans le modèle d'alignement la lysine 205 est à l'interface avec le Nop5 dimérisé avec FBL, tandis que la lysine 206 est orientée dans une direction différente et pointe vers le domaine tip de la seconde copie de Nop5 (Nop5'). Cela suggère que la présence d'ubiquitine à ce site pourrait aussi réguler l'activité de FBL en contrôlant son interaction avec Nop56 et Nop58.

II.1.5.2. L'acétylation et la phosphorylation à l'interface avec Nop56 pourraient jouer un rôle dans l'interaction avec FBL

Ces deux mêmes lysines sont également acétylées, et leur position suggère que cette acétylation puisse aussi avoir un rôle dans la régulation de l'interaction avec Nop56 et Nop58. Nous ignorons cependant si l'acétylation peut avoir dans ce cas un impact positif ou négatif sur ces interactions. De plus, il est possible qu'un mécanisme impliquant à la fois ubiquitinylation et acétylation de ces lysines soit impliqué. D'autre acétylations ont été rapportées, notamment la lysine 122, qui d'après le modèle d'alignement n'est pas localisé près d'un partenaire protéique, ni dans les domaines catalytique et de liaison à SAM. Une autre lysine a été décrite (K102), mais la structure partielle de la FBL humaine ne comprend pas la région contenant ce résidu.

II.1.5.3. Position des résidus phosphorylés

Deux résidus phosphorylés se trouvent au niveau de surfaces d'interaction de la FBL humaine : T208 et T302. En effet, T208, localisée proche des lysines 205 et 206 est aussi localisée à l'interface avec Nop5 suggérant que la phosphorylation de ce résidu puisse jouer un rôle dans l'interaction entre FBL et Nop56 ou Nop58. T302, comme K143 est localisée à l'interface avec l'ARN substrat et proche du nucléotide cible. Cette position suggère aussi un rôle de régulation de la phosphorylation dans l'interaction de la FBL humaine avec le pré-ARNr substrat. Un autre résidu phosphorylé, Y118, est situé proche de deux résidus clés dans l'interaction avec SAM, en particulier le groupement hydroxyle de la chaine latérale de ce

résidu tyrosine. La phosphorylation de ce résidu pourrait avoir un impact sur la conformation du domaine de liaison à SAM et influer sur la capacité de la FBL humaine à lier SAM. Plusieurs autre résidus phosphorylés sont localisés dans une même région de FBL, entre les domaines méthyl-transférase et GAR, et ne semble pas, d'après ce modèle, être localisés près d'un partenaire protéique ou ARN.

II.1.5.4. Position des résidus PARylés

La localisation des résidus PARylés de la FBL dans des domaines de la FBL ne suggère pas leur implication dans les interactions avec les partenaires, ni dans l'interaction avec SAM ou dans la catalyse de la transméthylation. Seul l'aspartate 270, localisé proche de Nop5, pourrait jouer un rôle dans cette interaction. En particulier, ce résidu est proche de la partie du domaine C-ter de Nop5 qui interagit avec les boîtes C/D ou C'/D' du sARN C/D. Cette région de Nop5 est celle qui empêche l'appariement des premières bases de la séquence de complémentarité du sARN rendant cette séquence libre pour l'hybridation de l'ARN substrat. La PARylation est une modification arborescente de grande taille et pourrait jouer un rôle dans l'interaction de la FBL humaine avec Nop56 et Nop58, en favorisant leur recrutement (rôle de « scaffold ») ou au contraire en empêchant l'accès de ces protéines à FBL.

II.2. Validation d'un modèle expérimental pour l'étude de mutants ponctuels de FBL

La mutagenèse ponctuelle est une approche établie pour l'étude du rôle de modifications post-traductionnelle. Une grande partie de mon travail de thèse est ainsi basé sur l'analyse de la fonction de mutants ponctuels de la FBL humaine, dont le design a été effectué à partir du modèle structurale de la FBL humaine présenté ci-dessus. Plusieurs séries de mutations ciblant des sites modifiés ont été générées au cours de ce travail, ainsi que des mutations visant à inhiber l'activité méthyl-transférase ou l'interaction avec des partenaires et servant de contrôles.

A cette fin, j'ai choisi d'utiliser une version taguée de FBL, afin de pouvoir dissocier la FBL endogène de la FBL artificiellement exprimée, qu'elle soit sauvage ou mutée, dans des applications telles que l'immunofluorescence (IF) ou l'immunoprécipitation (IP). J'ai choisi d'utiliser le tag 3xflag (simplement appelé flag dans la suite du texte), notamment pour sa petite taille. Un tag de petite taille diminue la probabilité qu'il interfère avec l'assemblage de FBL en complexe. Par ailleurs, j'ai choisi d'attacher le flag en position N-terminale, car d'après l'étude du complexe de méthylation chez les archées, il s'agit de l'extrémité la plus extérieure au complexe. Un plasmide préalablement construit et mis au point dans le laboratoire a ainsi été employé, p3xflag-FBL-WT, permettant l'expression d'une flag-FBL sauvage. Les résultats préliminaires concernant la flag-FBL-WT indiquaient une localisation nucléolaire identique à la FBL endogène. Plusieurs tests ont été effectués pour évaluer la validité de cette construction, et sont exposés ci-après.

La transfection du plasmide mentionné ci-dessus a été testée dans les cellules HCT116, une lignée de cancer du côlon. Après transfection, on observe en immunofluorescence une forte surexpression de la flag-FBL (données non montrées). Une telle surexpression ne permet pas d'analyser efficacement la fonction biologique de FBL. Pour pallier à cette problématique, nous avons décidé d'établir un modèle de lignées cellulaires inductibles permettant un meilleur contrôle de la surexpression. Par ailleurs, dans l'objectif d'effectuer par la suite des tests fonctionnels de l'activité de FBL, la présence de la FBL endogène risque d'empêche d'évaluer correctement l'activité de la flag-FBL. Un vecteur lentiviral a donc été construit avec

pour objectif de 1) développer une lignée exprimant un le vecteur d'intérêt de manière stable, 2) exprimer de manière inductible la flag-FBL-WT ou mutée, et 3) co-exprimer un shARN ciblant la région 3'UTR de l'ARNm de FBL (shARN-1090) de manière à sélectivement inhiber l'expression de la FBL endogène. Une lignée cellulaire HCT116 shARN1090-flag-FBL-WT (flagsh-WT) a ainsi été développée, co-exprimant la flag-FBL-WT et le shARN-1090 ciblant la FBL endogène.

Dans un premier temps, les conditions optimales d'induction de l'expression de la flag-FBL dans cette lignée ont d'abord été déterminées. Les résultats présentés figure 28A montrent une expression de la flag-FBL dès 24h de traitement. Ce signal augmente après 48h et 72h de traitement. L'induction à la doxycycline pendant 72h a donc été sélectionnée pour la suite des manipulations avec cette lignée, car elle permet la meilleure induction de l'expression de la flag-FBL, sans induire de surexpression notable. La localisation de la flag-FBL, analysée par immunofluorescence, est très similaire à ce qui est observé pour les cellules non induites et ce que nous observons de manière générale dans les cellules HCT116. On retrouve ainsi la flag-FBL localisée sous forme de spots correspondant aux nucléoles (co-localisation avec la nucléoline), et aux corps de Cajal (co-localisation avec la coilline) (figure 28D et données non montrées).

Afin de disposer de tous les contrôles, des lignées inductibles exprimant uniquement la flag-FBL-WT (sans le sh1090) ont été construites. L'expression de la flag-FBL dans HCT116 (et également des HeLa développées en parallèle) a été testée en western blot après une cinétique de stimulation à la doxycycline. Les résultats présentés figure 28B montrent l'expression de la flag-FBL-WT dès 24h dans les cellules HCT116 flagsh-WT, avec une augmentation de cette expression à 48h puis à 72h. Il est intéressant de noter que dans ces cellules, l'expression de la flag-FBL est accompagnée d'une baisse de l'expression de la FBL endogène. Ceci suggère que le niveau total de FBL cellulaire est régulé. Cet effet est supporté par la baisse encore plus importante du niveau de FBL endogène dans les HeLa flag-FBL, une lignée dans laquelle le niveau de flag-FBL est plus important que dans les HCT116 (figure 28C).

Par ailleurs, afin de vérifier l'assemblage correct de FBL au sein du complexe de méthylation l'immunoprécipitation de la flag-FBL a été mise au point, avec pour objectif de co-immunoprécipiter les partenaires Nop56, Nop58 et 15.5kDa. 72h après induction de l'expression à la doxycycline, la flag-FBL des cellules HCT116 flagsh-WT a été

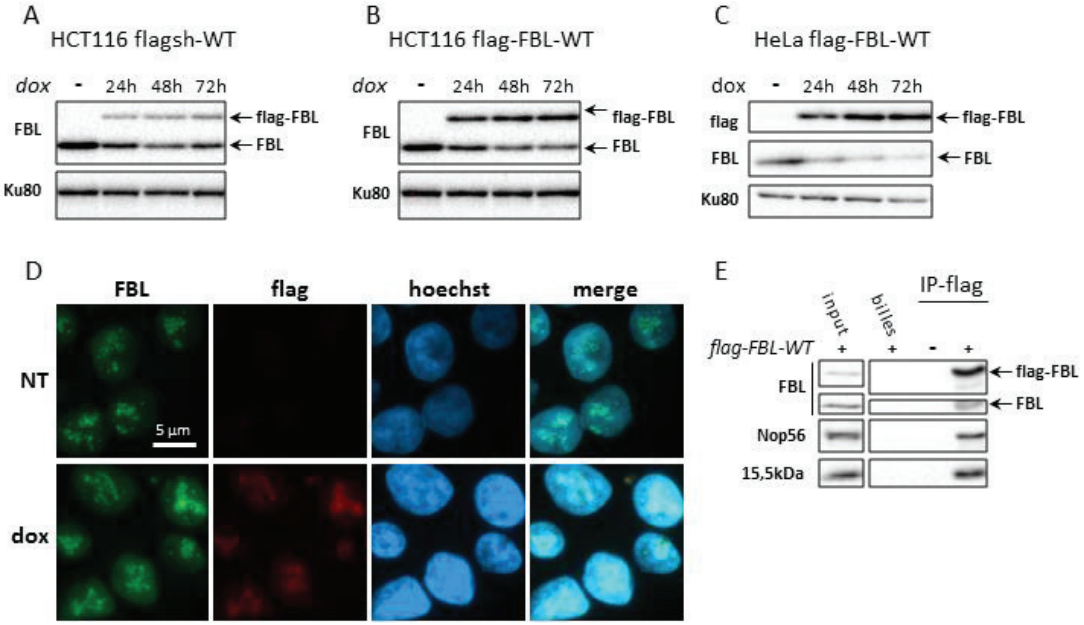


Figure 28 : Validation du modèle cellulaire HCT116-flagsh-WT

A, **B**, **C**, Western blot montrant le niveau d'expression de la flag-FBL et de la FBL endogène dans des cellules HCT116 sh1090-flag-FBL-WT (flagsh-WT) (**A**), flag-FBL-WT (**B**), ou HeLa flag-FBL (**C**), induites ou non à la doxycyline pendant 72h. L'expression de la flag-FBL est visible dès 24h et augmente avec le temps de traitement dans les lignées flag-FBL et flagsh. L'expression de la flag-FBL seule diminue l'expression de la FBL endogène. La lignée HCT116 flagsh exprime un taux modéré de flag-FBL et la FBL endogène est toujours présente.

D, Immunofluorescence montrant des cellules HCT116 flagsh traitées ou non à la doxycycline, pendant 72h. En vert, signal de l'anticorps anti-FBL ; en rouge, signal de l'anticorps anti-flag ; en bleu Hoechst marquant les noyaux. L'image la plus à droite correspond au merge des trois signaux. Dox, doxycycline ; NT, non traitées ; FBL, fibrillarine.

E, La flag-FBL a été immunoprécipitée depuis des cellules HCT116 flagsh-WT, induites ou non à la doxycycline, avec un anticorps anti-flag. Un mock (billes) a été réalisé avec du lysat de cellules induites (flag-FBL-WT) obtenu après incubation du lysat avec les billes, en absence d'anticorps. Une fraction totale (input) du lysat a également été déposée. Les échantillons ont ensuite été analysés par western blot avec pour la présence de FBL, et de Nop56, Nop58 et 15,5kDa.

immunoprécipitée avec un anticorps anti-flag. Les résultats présentés figure 28E montrent un bon signal flag-FBL. Une bande de faible intensité est observée systématiquement en dessous de la flag-FBL et au-dessus de la taille de la FBL endogène. L'origine de cette bande n'est pas connue, mais pourrait être un produit de dégradation de la flag-FBL. De façon intéressante, la FBL endogène est co-immunoprécipitée avec la flag-FBL-WT indiquant la formation de complexes contenant à la fois la Flag-FBL et FBL endogène, un phénomène déjà observé avec la GFP-FBL (figure A2A). Nop56 et de 15.5kDa sont co-précipitées par l'anti-flag, mais la présence de Nop58 en IP dans ces cellules n'a pas pu être validée, probablement à cause de l'efficacité limitée des anticorps anti Nop58 disponibles. Ces résultats montrent que les cellules HCT116 flagsh-WT sont un modèle cellulaire adapté à la co-IP des partenaires de la FBL dans le système d'expression inductible de la flag-FBL, et valide l'association de la flag-FBL-WT dans le complexe de méthylation.

L'ensemble de ces résultats montre que la lignée HCT116 flagsh-WT permet l'expression d'une FBL taguée avec une expression modérée, une localisation dans les nucléoles et les corps de Cajal conforme à la FBL endogène, et qui s'assemble dans le complexe snoRNP de méthylation des ARNr.

II.3. Identification des modifications post-traductionnelles de la FBL humaine

On dispose aujourd'hui de beaucoup de données de protéomique rapportant des MPT de la FBL humaine. Ces études sont basées sur des purifications de peptides modifiés parfois très poussées, qui ont beaucoup apporté dans l'identification des MPT, mais ne permettent pas d'évaluer la représentativité ni la pertinence des MPT identifiées. L'étude structurale de la FBL humaine, décrite en première partie des résultats de ces travaux de thèse, prédit un rôle fonctionnel pour certaines de ces modifications. L'objectif de cette partie de mon travail de thèse a été d'analyser ces MPT, et d'étudier leur rôle potentiel.

II.3.1. Identification des MPT de FBL en 2D-western blot

Afin de mieux connaitre la représentation des MPT de la FBL humaine et d'investiguer leur(s) rôle(s), cette dernière a été analysée en électrophorèse bidimensionnelle. Cette technique permet la séparation des protéines selon deux propriétés : leur point isoélectrique (pI) par isoélectrofocalisation sur un gel gradient de pH immobilisé (IPG), puis selon leur taille par SDS-PAGE. Cette double séparation permet de séparer d'éventuelles isoformes d'une même protéine, notamment des formes différemment modifiées de cette protéine. Dans le contexte de ces travaux l'électrophorèse bidimensionnelle a été mise au point afin de séparer efficacement les isoformes de FBL, puis un western blot avec un anticorps anti-FBL a été effectué (2D-western blot).

II.3.1.1. Impact de la congélation sur le nombre d'isoformes de FBL

Sous une forme non-modifiée, la FBL humaine a un pI prédit à 10,18. Des IPG permettant la séparation des protéines les plus basiques disponibles dans le commerce ont été utilisés, soit entre les pI 6 et 11. Les premiers essais ont été effectués sur des extraits totaux de cellules HCT116. Afin de vérifier la bonne séparation en deux dimensions des protéines, un gel a été coloré au bleu de Coomassie. Le gel coloré au bleu de Coomassie, présenté figure 29A, montre une bonne séparation des protéines entre les pI 6 et 9, avec des

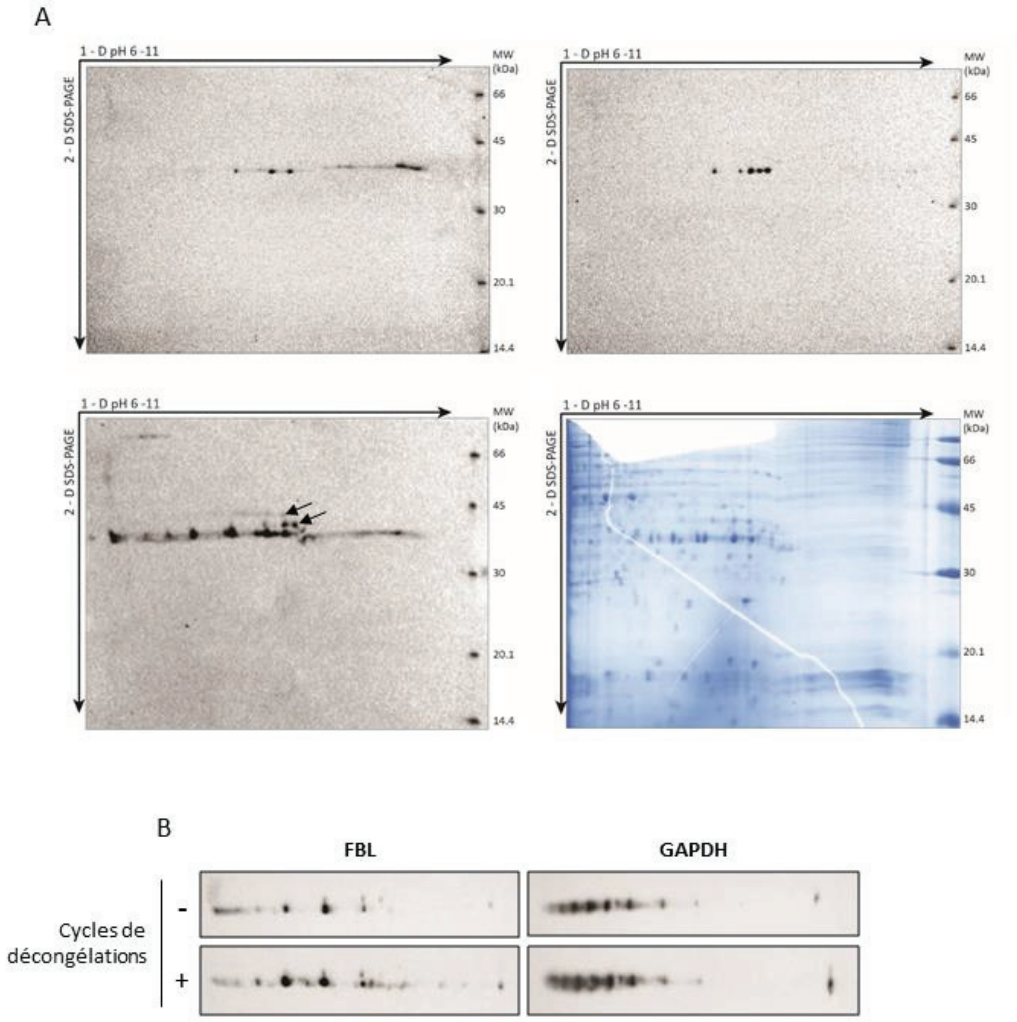


Figure 29 : L'identification du nombre d'isoformes de FBL en 2D-western blot est dépendante de la congélation de l'échantillon.

Des lysat totaux de cellules HCT116 ont été séparés en électrophorèse bidimensionnelle selon leur point isoélectriques par électrofocalisation entre les points isoélectriques (pI) 6 et 11, puis selon leur taille par SDS-PAGE.
A, Les gels ont soit été colorés au bleu de Coomassie, soit le profil d'isoforme de fibrillarine (FBL) a été analysé en western bot avec un anticorps anti-FBL. Image en haut à gauche, 1ère révélation. Image en haut à droite 2e expérience avec le même lysat. Image en bas à gauche, 3e expérience avec le même lysat. Image en bas à droite, coloration du gel au bleu de Coomassie après plus de 3 utilisations du même échantillon. Les flèches dans l'image en bas à gauche pointent les spots de masses moléculaires supérieures.
B, Des lysat totaux de cellules HCT116 ayant subit ou non des cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide. Le profil d'isoformes de fibrillarine (FBL) a ensuite été analysé avec un anticorps anti-FBL. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.

points distincts et d'intensités variables. Cependant entre les pI 9 et 11 on constate des trainées horizontales, montrant une isoélectrofocalisation peu efficace des protéines lors de la 1ere dimension dans cette gamme de pH. Ce défaut de focalisation provient probablement du fait que l'eau devient chargée aux pH élevés, et crée des courants d'électroendosmose.

Le premier 2D-western blot avec un anticorps anti-FBL (figure 29A) montre 2 spots assez intenses et un spot d'intensité moindre à un pI d'environ 8-8.5. On constate également un point de faible intensité. De plus, une trace est observée dans une gamme de pI plus basique et correspond probablement à un défaut de focalisation de FBL dans cette zone de l'IPG. Curieusement, le second essai avec le même extrait total, a donné un résultat similaire mais avec d'avantage de spots et sans la trace. Une 3e répétition avec toujours le même lysat montre cette fois un nombre de spots encore plus grand, ainsi qu'une trace dans une gamme de pI plus basique. Dans cette 3e expérience, on peut voir les spots qui correspondent à ceux observés dans les deux manipulations précédentes. Les autres points de signal qui apparaissent correspondent à des pI plus acides, entre 6 et 8. Les points nouvellement apparus dans ce 2D-western blot présentent des intensités différentes, indiquant que certaines formes modifiées de FBL sont plus représentées que d'autres. Ces trois manipulations apportent plusieurs informations. La première est que plusieurs formes de FBL présentant des pI différents sont présentes dans les cellules HCT116. Cela suggère des MPT diverses et combinées donnant lieu à une multiplication de pI des différentes FBL. Ces FBL modifiées possèdent de pI plus bas que le pI calculé pour la FBL non modifiée, et indiquent la perte de charges positives pouvant être due à la modification de lysine ou arginines (acétylation, ubiquitinylation), ou au gain de charge négatives, induit par la phosphorylation. De plus, la présence de spots correspondant à des masses moléculaires significativement supérieures (+2.3 kDa et + 4.7kDa) à ce qui est attendu pour FBL suggère aussi des MPT modifiant la taille de FBL. D'autre part, ces résultats montrent qu'à partir d'un même extrait cellulaire on peut obtenir différents signaux en 2D-western blot. Etant donné que la seule différence de manipulation a été la congélation/décongélation de l'échantillon j'ai fait l'hypothèse que ces cycles peuvent modifier la solubilité de FBL dans le tampon de lyse urée/thiourée et ainsi permettre à un plus grand nombre de FBL différemment modifiée d'être observées.

Afin de déterminer si les cycles de congélation/décongélation influent sur la solubilité de FBL dans le tampon de lyse urée/thiourée, les signaux obtenus à partir d'un même lysat de

cellules HCT116, traité ou non par de tels cycles, ont été comparés. Comme contrôle de charge, la GAPDH a été utilisée, dont le pI permet de la détecter dans la même gamme de pI que FBL. Les résultats présentés figure 29B montrent l'apparition d'un plus grand nombre de points après des cycles de congélation/décongélation, tandis que le signal GAPDH ne change pas de manière significative. Cela confirme l'impact de ces cycles sur la solubilité de FBL, et cette étape a donc été ajoutée au mode opératoire pour préparer les lysats lors des 2D-western blot suivants.

II.3.1.2. Validation du signal FBL par siARN FBL

Afin de confirmer que le signal observé correspond bien à FBL un 2D-western blot a ensuite été effectué, en comparant des cellules HeLa transfectées avec un siARN FBL à des cellules transfectées avec un siARN contrôle. L'efficacité du siARN a d'abord été validée en 1D-western blot comme le présente la figure 30A, puis la manipulation en électrophorèse bidimensionnelle a été effectuée. La GAPDH a de nouveau été utilisée comme contrôle de charge. On constate dans les cellules HeLa traitées avec le siARN FBL une baisse d'intensité ou même une disparition de tous les spots observés sous siARN contrôle (figure 30B). Un signal résiduel montre que l'expression de FBL n'est pas entièrement éteinte, ce qui est cohérent avec les résultats de 1D-western blot (figure 28A). On remarque qu'un des spots les plus intenses présente une plus faible diminution d'intensité, suggérant une stabilité plus grande de cette forme de FBL. Entre les deux conditions le signal de la GAPDH ne présente pas de différence d'intensité ou de motif. Ces résultats valident l'identité des spots observés comme étant des formes différentes de FBL.

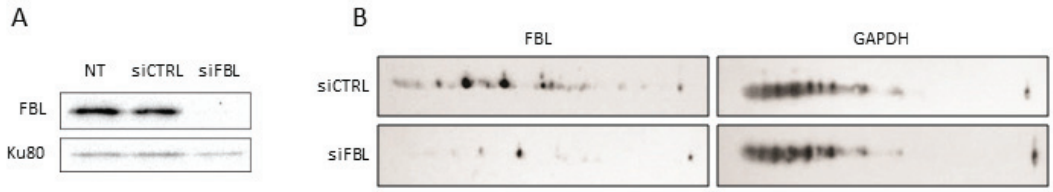


Figure 30 : Validation du signal FBL en 2D-western blot.
A, Western blot montrant l'efficacité de l'inhibition de l'expression de FBL par siARN dans des cellules HeLa transfectées ou non avec un mix de siARN FBL. Ku80 a été utilisé comme contrôle de charge.
B, Des lysats totaux de cellules HeLa traitées ou non avec un mix de siARN FBL ont été séparés en électrophorèse bidimensionnelle selon leur point isoélectrique (pI) par isoélectrofocalisation entre pI 6 et 11, puis selon leur taille par SDS-PAGE. Le profil d'isoformes de fibrillarine (FBL) a ensuite été analysé en 2D-western bot avec un anticorps anti-FBL. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.

II.3.1.3. Les modifications post-traductionnelles de FBL sont présentes dans trois lignées humaines de cancer.

Afin d'évaluer si le profil de FBL observé en 2D était spécifique aux HCT116 ou pouvait être généralisable à d'autres cellules, j'ai analysé la présence des MPT de FBL dans d'autres lignées : les cellules HeLa et une lignée de cancer du sein, MCF7. Les résultats (figure 31A) montrent une conservation des principales formes, celles dont l'intensité est la plus intense, dans les trois lignées. Cette conservation est encore plus flagrante entre les cellules HCT116 et HeLa où la plupart des formes sont observées dans les deux lignées. On retrouve, entre les HCT116 et les HeLa, les spots de masses moléculaires supérieures. Curieusement dans les deux lignées, ces spots apparaissent juste au-dessus d'autres spots observés à la taille attendue. Ces résultats indiquent que les modifications de FBL présentes dans les cellules HCT116, sont également retrouvées dans les cellules HeLa et partiellement dans les cellules MCF7.

La présence ou l'intensité de certains spots observés en 2D-western blot varie. Il n'est pour le moment pas possible de conclure sur les raisons de ces variations, mais il peut s'agir d'une variation de solubilité ou de stabilité des MPT. Cependant, malgré cette variabilité, certains motifs d'isoformes sont similaires entre les différentes expériences. Avec l'ensemble des résultats de 2D-western blot anti-FBL obtenus dans différentes lignées, j'ai dressé une carte du motif d'isoformes de FBL observables avec cette technique. Cette carte, présentée figure 31B, montre la fréquence de l'observation des différents spots ainsi que leur intensité/taille et leur position. En particulier, 4 spots de forte intensité sont retrouvés dans toutes les manipulations et dans toutes les lignées. D'autre spots d'intensité et fréquence plus faible sont retrouvés dans la majorité des 2D-western blot, mais absent dans certains. Enfin, certain spots n'apparaissent que rarement et sont généralement d'intensité faible, suggérant qu'ils sont peu représentés dans les cellules et par conséquent plus difficilement observables. Ces résultats montrent, en termes de quantité, qu'une majorité de FBL contenue dans les cellules testées porte des modifications post-traductionnelles, et indiquent que la FBL non modifiée serait peu représentée. De plus, ces résultats suggèrent que ce sont les formes modifiées de FBL les plus abondantes qui sont conservées dans les trois lignées testée, et qu'ensemble ces formes représentent une quantité majeure de FBL.

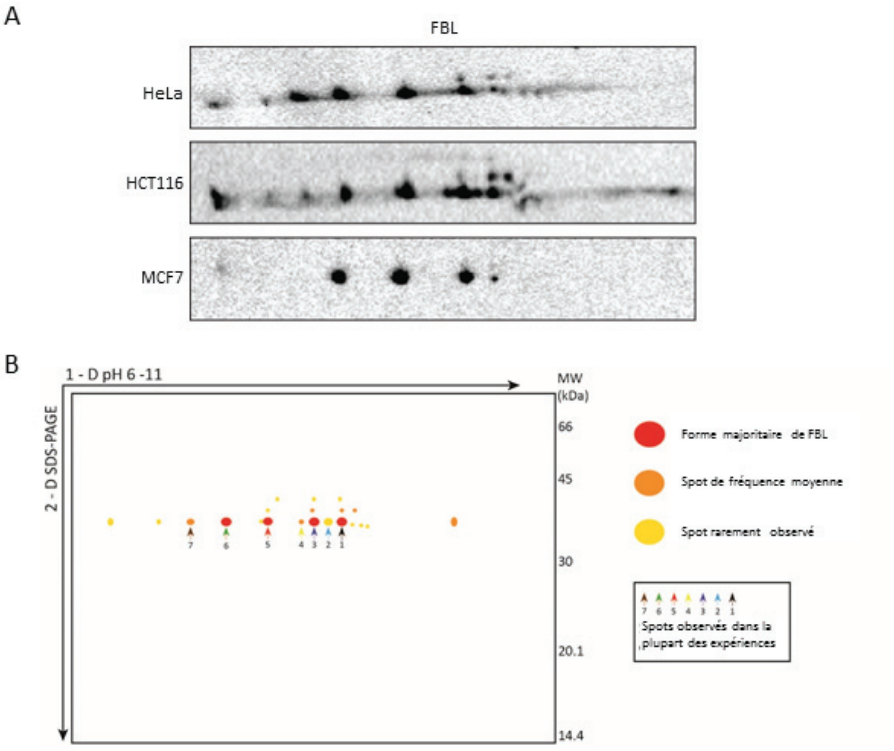


Figure 31 : La fibrillarine humaine porte plusieurs modifications post-traductionnelles conservées dans trois lignées cellulaires de cancers.

A, Comparaison des profiles d'isoforme de FBL en 2D-western blot. Les protéines des lysats issus de trois lignées cellulaires différentes, HCT116, HeLa et MCF7ont été séparées en électrophorèse bidimensionnelle selon leur point isoélectrique (pI) par isoélectrofocalisation entre pI 6 et 11, puis selon leur taille par SDS-PAGE. Le profil d'isoformes de fibrillarine (FBL) a ensuite été analysé en 2D-western bot avec un anticorps anti-FBL. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.

B, Schéma représentant les différents spots obtenus en 2D-western blot avec des anticorps anti-FBL. La taille des spots est représentative de leur taille dans les 2D-western blot et est généralement corrélée avec leur intensité. Les spots sont colorés en fonction de leur fréquence.

Les MPT de FBL sont donc une caractéristique importante de FBL, suggérant que la FBL fonctionnelle est modifiée.

II.3.2. Identification de MPT de FBL en spectrométrie de masse

Afin d'identifier plus précisément les MPT de FBL nous avons ensuite utilisé la spectrométrie de masse. La difficulté de cette technique réside dans le nécessité qu'un peptide soit suffisamment représenté pour être détecter. Afin d'augmenter la détection de FBL, des méthodes permettant d'enrichir en FBL, étaient requises. Pour cela, dans un premier temps, l'immunoprécipitation de la FBL endogène a été testée. Beaucoup d'efforts ont été investis dans la mise au point de cette IP, en testant plusieurs paramètres, dont les anticorps, les tampons ou encore les billes (Cf. annexe – mise au point de l'immunoprécipitation de FBL, figure A2). Suite à un faible rendement de l'IP de la FBL endogène, j'ai pris la décision d'utiliser plutôt un fractionnement cellulaire. Il est à noter que ce travail a été effectué avant l'obtention de la flag-FBL. Les nucléoles de cellules HCT116, ont donc été isolés, et les extraits protéiques issus des différentes fractions ont été séparés en SDS-PAGE et le gel a été coloré au bleu de Coomassie colloïdal (figure 32A). Les extraits protéiques des différentes fractions ont également été analysés en western blot anti-FBL, montrant un enrichissement d'un facteur 4 entre les fractions cytoplasmiques et nucléolaires (figure 32A). La bande correspondant à la taille de FBL a ensuite été découpée et analysée en spectrométrie de masse après digestion trypsique. La quantité de FBL détectée dans les différentes fractions et conditions, normalisée sur le spectre total montre un enrichissement de FBL d'environ un facteur 3 dans les fractions nucléaires par rapport aux fractions cytoplasmiques (données non montrées). L'analyse des bandes découpées après séparation en SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie colloïdal montre une faible couverture de séquence (figure 32B), avec seulement 7%, dans la fraction nucléolaire. Seule une MPT est détectée dans cette fraction, et consiste en la phosphorylation de la sérine 126. Cette MPT a déjà été décrite dans la littérature. Néanmoins, une nouvelle modification, une acétylation, a été détectée avec cette technique, et qui est décrite dans la partie « impact du 5-FU sur l'acétylation de FBL ».

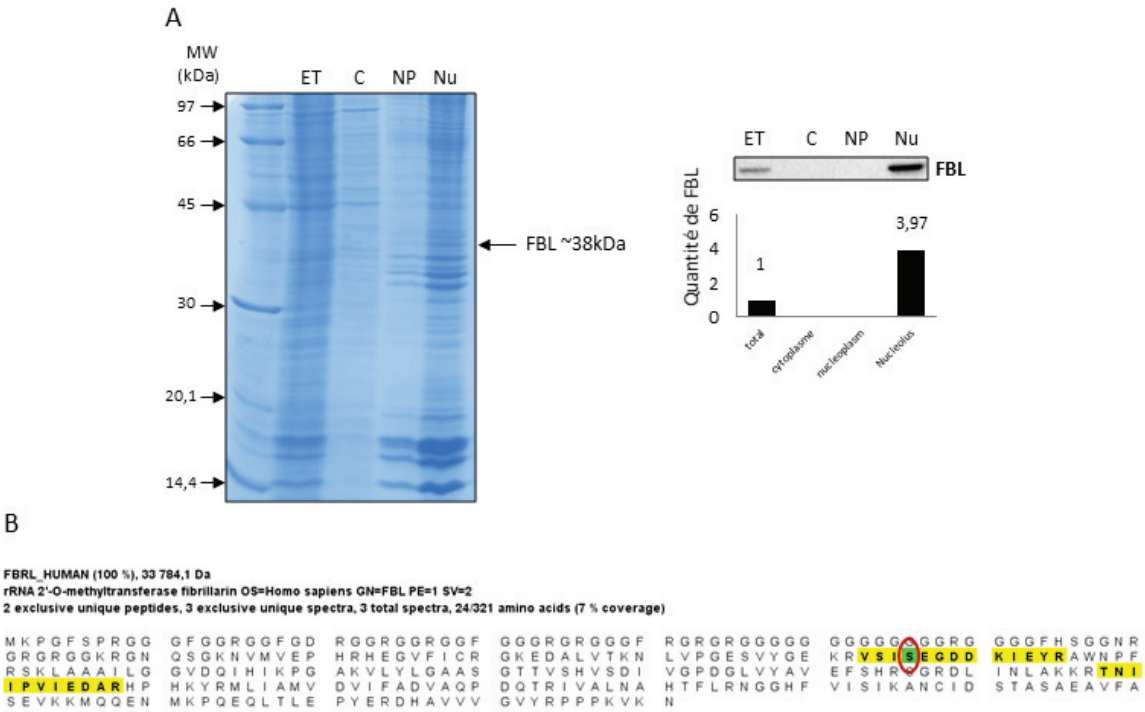


Figure 32 : Détection d'une phosphosérine en position 126 en spectrométrie de masse

A, Fractionnement cellulaire de cellules HCT116 analysé en SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie colloïdal (panneau de gauche). L'enrichissement en FBL dans le fraction nucléolaire a été contrôlé par western blot et la quantification est rapporté à la bande détectée dans les extrait totaux (panneau de droite).

B, La fraction nucléolaire des cellules montrée en B, a été analysé en spectrométrie de masse. La détection de la phosphorylation de la sérine 126 est illustrée. La partie jaune des séquence correspond à la partie détectée en spectrométrie de masse.

FBL, fibrillarine ; ET, extrait total, C, fraction cytoplasmique ; NP, fraction nucléoplasmique ; Nu, fraction nucléolaire. MW, marqueur de taille.

Compte tenu de l'abondance des formes modifiées de FBL observées en 2D-PAGE, cette analyse montre une difficulté de détection des MPT de FBL en spectrométrie de masse. La suite du projet a donc été conduite par une approche candidat.

II.3.3. Etude de la PARylation de la FBL

Les données de la littérature indiquent que FBL est PARylée, et suggère un rôle de de la PARylation dans sa fonction. Par ailleurs, l'activité de PARP1 est requise pour le maintien de l'intégrité du nucléole et pour la biogenèse des ribosomes chez la drosophile *in vivo* (Boamah et al. 2012; Kotova, Jarnik, et Tulin 2009), ainsi que pour la localisation de FBL dans les corps de Cajal (Kotova, Jarnik, et Tulin 2009; Abd Elmageed et al. 2012). Ces données particulièrement intéressantes nous ont conduits à étudier plus précisément la PARylation de FBL.

II.3.3.1. Mise au point de l'induction de la PARylation

La PARylation est une modification catalysée par PARP1 (PAR Polymerase), qui peut être hydrolysée par PARG (PAR Glycohydrolase). PARP1 est en particulier activée lors de dommages à l'ADN. Dans la littérature, les études de la PARylation utilisent donc des agents génotoxiques en combinaison avec un système réprimant l'expression de PARG, tel qu'un siARN ou des lignées exprimant un shARN PARG de manière stable (Gagné et al. 2012; Jungmichel et al. 2013; Y. Zhang et al. 2013). Dans notre étude nous avons utilisé le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est largement utilisé pour induire la PARylation. Nous avons travaillé en collaboration avec le Dr Janet Hall (CRCL), qui a mené plusieurs études sur les voies de PARylation.

Les conditions de traitement avec H_2O_2 ont été mises au point : plusieurs concentrations et temps de traitements ont été testés, en partant de données disponibles dans la littérature (Y. Zhang et al. 2013; Jungmichel et al. 2013). Afin de contrôler la quantité de protéine déposée nous utilisons habituellement la protéine Ku80. Cette protéine est

impliquée dans la réparation de l'ADN, et son activité et expression peuvent donc être modifiées par le traitement à l'H_2O_2. Par conséquent, la β-actine a aussi été utilisée comme

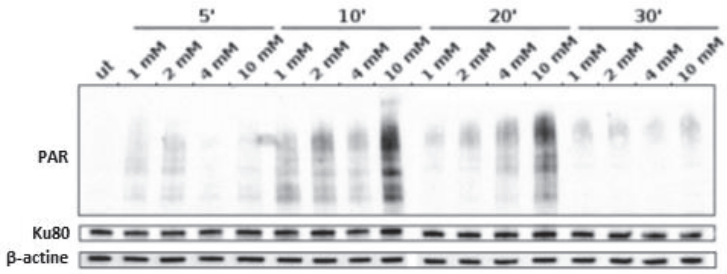


Figure 33 : Mise au point de l'induction de la PARylation par l'H_2O_2.
Western blot montrant le niveau de PARylation (anticorps anti-PAR) dans des cellules HeLa traitées ou non avec H_2O_2 pendant différents temps (5' = 5 minutes, etc), à différentes concentrations. Ku80 et β-actine ont été utilisés comme contrôles de charge. PAR, Poly(ADP-ribose) ; NT, non traitées.

contrôle de charge. Les résultats (figure 33) montrent que la quantité de ces deux protéines ne change pas avec les traitements à l'H_2O_2. Les résultats montrent une légère augmentation de la PARylation dès 5 min de traitement, avec la concentration minimale utilisée de 1 mM en H_2O_2. Cependant on n'observe pas d'effet dépendant de la dose sur la PARylation à 5 min et 30 min de traitement. Un tel effet n'est observé qu'à 10 et 20 min de traitement, avec notamment une plus forte augmentation de la PARylation après 10 min qu'après 20 min. Les résultats montrent qu'à ces temps, la concentration 10 mM en H_2O_2 offre la meilleure élévation de la PARylation (figure 33). Ainsi, le traitement pendant 10 min avec 10 mM d' H_2O_2 a été choisi pour induire la PARylation dans les manipulations suivantes.

II.3.3.2. Identification d'une forme de FBL PARylée

Nous avons ensuite analysé l'impact des conditions d'induction de PARylation sur FBL en western blot avec un anticorps anti-FBL. Les résultats (non montrés) n'indiquent pas de changement d'expression ou de taille de FBL. Cela suggère soit que la PARylation de FBL n'est pas induite dans ces conditions, soit que le niveau de FBL PARylée est trop faible pour permettre la détection d'une bande de taille supérieure à celle de la FBL non modifiée (34 kDa). Afin de pallier à ce problème, nous avons utilisé le plasmide p3xflag-FBL-WT, qui permet la surexpression de la flag-FBL-WT dans les cellules HeLa. L'objectif était de compenser la potentielle faible représentation de la FBL PARylée par cette surexpression de flag-FBL. Les résultats de western blot anti-FBL (figure 34A) montrent, comme attendu, la surexpression de la flag-FBL. Le niveau de PARylation augmente dans les cellules traitées à l'H_2O_2 (figure 34A). Curieusement, les cellules transfectées avec les p3xflag-FBL-WT présentent un niveau de PARylation plus élevé que les cellules non transfectées, sous H_2O_2, suggérant que la surexpression de la flag-FBL induit une élévation du niveau globale de PARylation cellulaire. Le western blot anti-FBL montre un haut niveau d'expression de flag-FBL en comparaison à la FBL endogène, et cette expression n'est pas altérée par le traitement à l'H_2O_2. Cependant, la surexposition de FBL permet de visualiser une bande à environ 90 kDa qui est légèrement visibles dans les cellules non traitées, mais qui apparait clairement dans les cellules traitées à l'H_2O_2. Ces résultats suggèrent que la-flag FBL subit une modification qui induit un changement de taille sous traitement à l'H_2O_2. Les autres

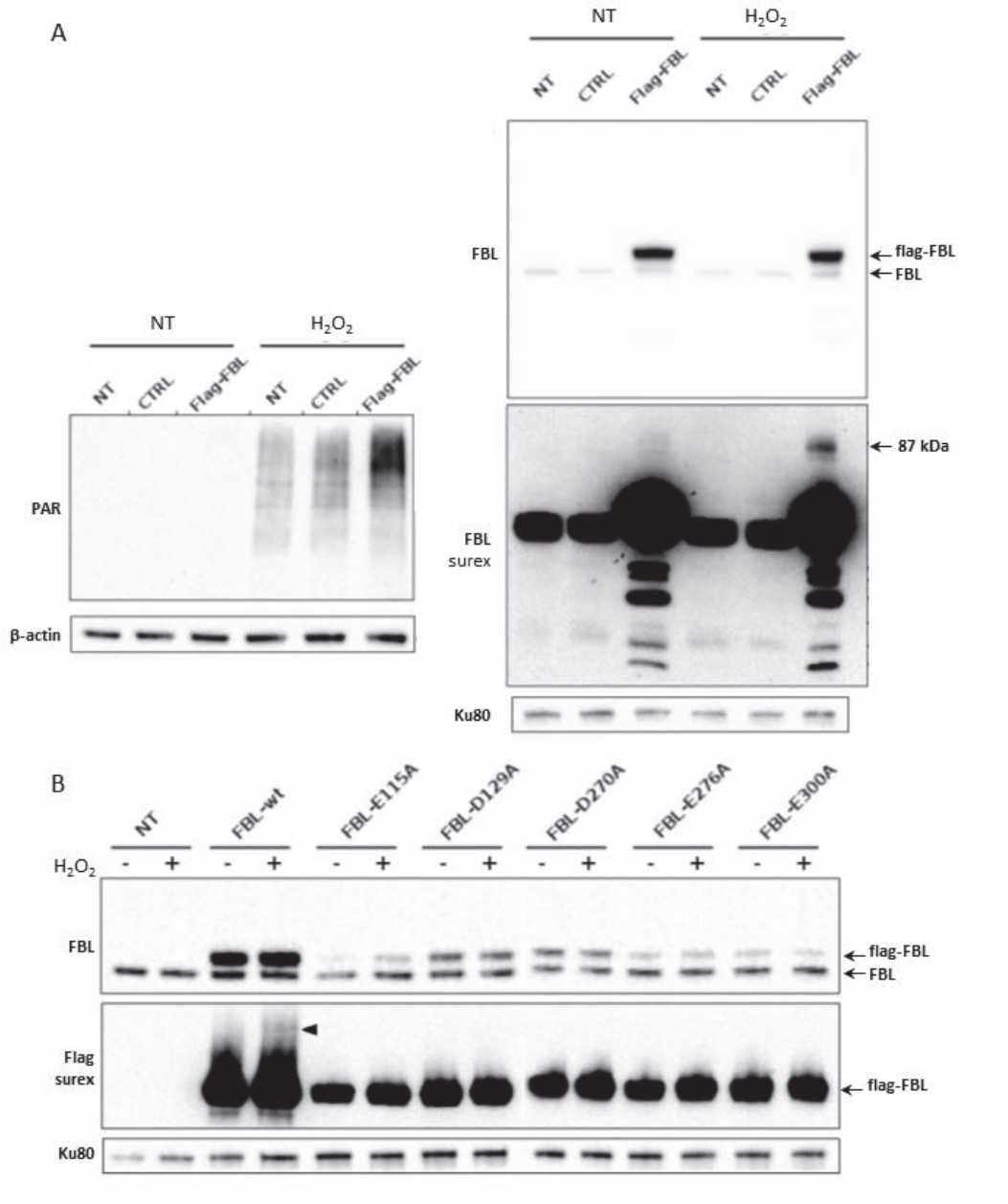


Figure 34 : Identification d'une potentielle PARylation de FBL.

A, Western blot montrant le niveau de PARylation (anticorps anti-PAR, panneau de gauche) et le niveau de flag-FBL (panneaux de droite) dans des cellules HeLa traitées ou non avec H_2O_2, transfectées ou non avec le plasmides p3xflag-FBL-WT. Ku80 et β-actine ont été utilisés comme contrôles de charge. CTRL, indique un contrôle dans lequel seul le réactif de transfection (pas d'ADN) a été déposé sur les cellules.

B, Western blot montrant le niveau de flag-FBL dans des cellules HeLa traitées ou non avec H_2O_2, transfectées ou non avec les plasmides p3xflag-FBL-WT ou mutants des résidus connus pour être PARylés. Ku80 a été utilisée comme contrôle de charge. PAR, Poly(ADP-ribose) ; NT, non traitées / non transfectées ; siCTRL, siARN contrôle ; surex, surexposition.

bandes observées après surexposition, de tailles inférieures à la FBL endogène, correspondent probablement à des produits de dégradation de la flag-FBL.

Afin d'approfondir ce résultats l'expérience a été répétée en utilisant, en parallèle, des flag-FBL mutées sur des résidus rapportés PARylés dans la littérature. Les traitements à l'H_2O_2 des cellules transfectées avec ces mutants ne montrent pas de variation des différentes flag-FBL mutée (figure 34B). On remarque que l'expression de ces mutants est cependant plus faible que celle de la flag-FBL-WT. La surexposition après révélation avec un anticorps anti-flag révèle de nouveau, pour la flag-FBL-WT, une bande de taille supérieure à la flag-FBL qui pourrait correspondre à la FBL PARylée. On n'observe cependant pas de bande similaire pour les mutants. Cette absence de bande peut être due soit à une absence de modification de la FB mutée, soit au fait que les flag-FBL mutées sont moins fortement exprimées que la flag-FBL-WT. Ces résultats renforcent l'hypothèse que FBL est PARylée.

II.3.3.1. Rôle de la PARylation dans l'assemblage de FBL au sein complexe de snoRNP C/D

Les mutants de PARylation ont ensuite été utilisés pour déterminer le rôle de cette modification post-traductionnelle sur FBL. L'ajout de polymère d'ADP-ribose est susceptible d'influencer les interactions protéine-protéine de FBL. En effet, l'encombrement stérique généré par la PARylation peut empêcher des interactions, ou au contraire servir de plateforme de recrutement et faciliter l'interaction avec des partenaires protéiques. Pour cette raison, la capacité de mutants ponctuels de résidus PARylés de FBL à s'assembler dans le complexe de méthylation a été testée en immunoprécipitation. Les résultats montrent, en input, que l'expression de certains de ces mutants, en particulier E115A, D129A et E300A, est plus faible que celle de la FBL endogène (input figure 35), et tous les mutants s'expriment à un niveau plus faible que la flag-FBL-WT. Il est possible la transfection soit à l'origine de ces différences ou que la stabilité de ces mutants soit différente. Pour tous les mutants, l'introduction de mutations ponctuelles au niveau des résidus PARylés de FBL n'induit pas la perte d'interaction avec 15.5kDa et Nop56 (figure 35), suggérant leur bon assemblage dans le complexe de méthylation. Cette immunoprécipitation a été effectuée dans des cellules non traitées.

L'impact de l'induction de la PARylation par H_2O_2 sur l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation n'a pas encore été étudié.

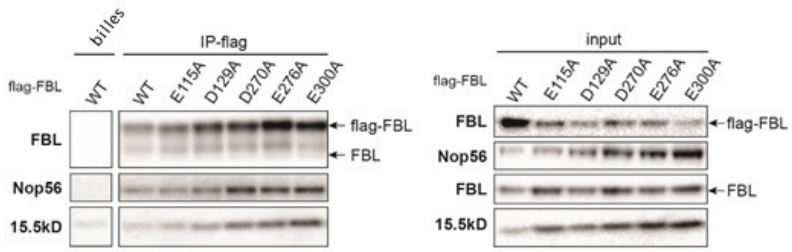


Figure 35 : Les mutants de PARylation s'assemblent au sein du complexe snoRNP C/D
La flag-FBL a été immunoprécipitée avec un anticorps anti-flag à partir des lysats de cellules HCT116 transfectées ou non avec les plasmides p3xflag-FBL-WT ou exprimant les mutant ponctuels de résidus PARylés de FBL. Un mock (billes) a été réalisé avec du lysat de cellules transfectées (p3xflag-FBL-WT) incubé avec les billes en absence d'anticorps. Une fraction totale (input) du lysat a également été déposée. Les échantillons ont ensuite été analysés par western blot avec pour la présence de FBL, et de Nop56, Nop58 et 15,5kDa.

L'ensemble de ces données suggèrent que les traitements au peroxyde d'hydrogène induisent la PARylation de FBL. Les mutants ponctuels des résidus rapportés PARylés dans la littérature sont capables de s'assembler dans le complexe de méthylation. La caractérisation de ces MPT devra être poursuivie en analysant l'impact de ces mutants sur la localisation de FBL, et l'impact de l'induction de PARP1 sur cette localisation et l'assemblage de FBL en complexe.

II.4. Impact du 5-fluorouracile sur l'acétylation de FBL

L'équipe explore la contribution de l'altération de la biogenèse des ribosomes au cours de la tumorigenèse dans trois principaux modèles de cancer, dont le cancer du côlon. Une série d'expériences pilotes avait été effectuées dans l'équipe afin d'explorer la relation entre les chimiothérapies utilisées dans le traitement des cancers colorectaux et la biogenèse des ribosomes. Le 5-FU s'est avéré un traitement particulièrement intéressant à explorer, notamment du fait qu'il soit un analogue de base s'intégrant dans les ARN dont les ARNr. Il est donc possible que le 5-FU altère les voies de modifications des ARNr. Dans ce contexte, une altération de la localisation intra-nucléolaire de la FBL a été observée et a été le point de départ du travail présenté dans ce chapitre.

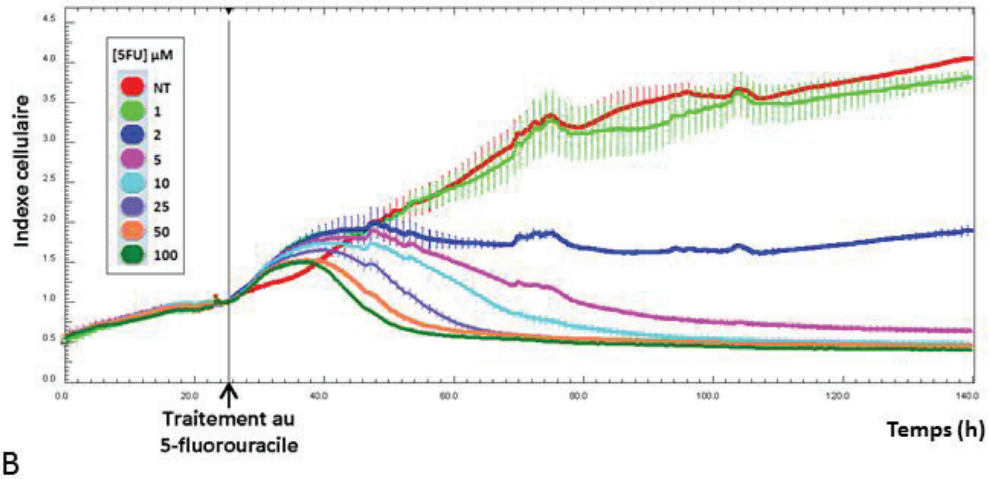
La littérature ainsi que des travaux en cours de publication de notre équipe montrent que le 5-FU affecte l'appareil traductionnel à plusieurs niveau : il bloque la biogenèse des ribosomes au niveau du clivage des pré-ARNr (Burger et al. 2010, Thérizols et al. en préparation), altère l'activité de traduction des ribosomes (Thérizols et al. en préparation) et induit un changement de la synthèse protéique à large échelle (Bash Imam et al. en révision). Nous ignorons cependant le rôle du 5-FU sur une des enzymes clés de la maturation des ARNr : FBL. Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'altération de la biogenèse des ribosomes par le 5-FU une partie de mon travail de thèse a été consacrée à étudier l'impact de cette chimiothérapie sur FBL.

II.4.1. Caractérisation de la cytotoxicité du 5-FU sur les cellules HCT116

Etudier l'impact d'une chimiothérapie couramment utilisée en traitement des cancers colorectaux sur la FBL dans une lignée de cancer colorectal requiert dans un premier de bien connaître sa cytotoxicité et son impact au niveau cellulaire. Afin de déterminer la cytotoxicité du 5-FU sur le HCT116, plusieurs méthodes sont utilisées au sein de notre équipe, dont des tests de viabilité cellulaire reposant sur l'activité métabolique des cellules, tel que le MTT. En plus de ces approches, nous développons notamment des outils dits "temps réel" que sont la technologie xCELLigence (Roche Applied Science®), et la vidéo-microscopie en "time lapse". L'xCELLigence est un système de culture qui mesure l'impédance électrique, c'est à dire la résistance au passage d'un courant électrique, générée par l'accrochage des cellules à des électrodes tapissant le fond des puits. Plus le nombre de contacts formés par les cellules adhérant aux électrodes est grand, plus l'impédance électrique est grande. Cela permet de mesurer la prolifération et des changements de morphologie cellulaire. Les résultats se traduisent sous forme d'un index cellulaire représentant la quantité de cellules dans les puits et les éventuels changements de morphologie.

La prolifération des cellules HCT116 a été suivie lors de traitements par des concentrations croissantes de 5-FU. Les résultats montrés figure 36A, présentent en ordonnée un index cellulaire calculé à partir du signal d'impédance. La variation de cet index au cours du temps témoigne de la prolifération ou de la mort des cellules. Dans le cas des cellules témoins non-traitées, les résultats indiquent une augmentation continuelle du nombre de cellules avec infléchissement des courbes en fin d'expérience, traduisant une prolifération constante des cellules puis un ralentissement, qui peut être dû à l'approche de la confluence ou à l'épuisement du milieu. La prolifération des cellules HCT116 témoigne d'un effet dépendant de la dose de 5-FU, avec une diminution du signal d'impédance en fonction de la concentration (figure 36A). Le graphique montre une brusque élévation du signal au cours des 10h suivant le traitement que nous avons identifié par vidéo-microscopie (données non montrées) comme étant une réponse au stress qui se manifeste par une forte activité cellulaire avec déplacements accélérés et mitoses avortées. Nous avons sélectionné les conditions induisant une mortalité partielle de la population, où une partie des cellules échappent au traitement. Ceci mime ce qu'il se passe chez les patients. Nous avons ainsi

A



B

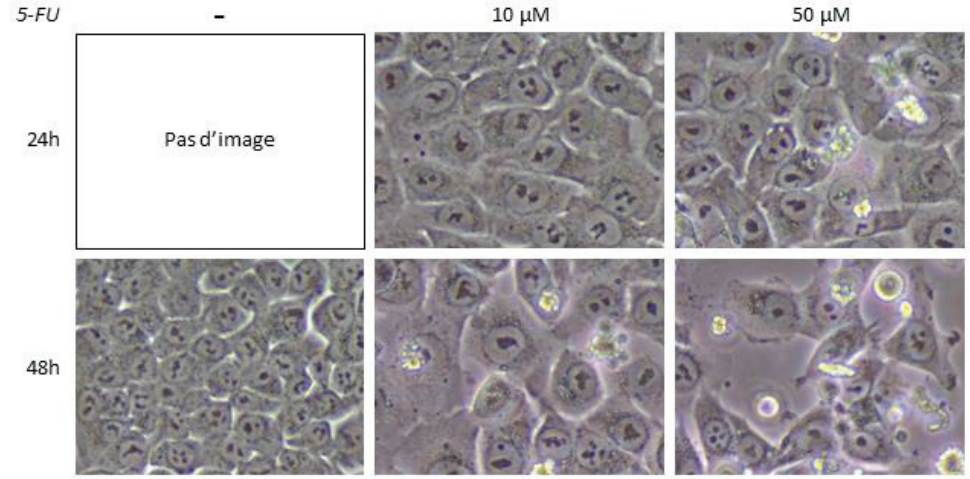


Figure 36 : Caractérisation de la réponse cellulaire de cellules HCT116 au 5-FU.
A, Des cellules HCT116 ont été traitées 24h après ensemencement avec 1, 2, 5, 10, 25, 50 ou 100µM de 5-FU, et leur prolifération a été mesurée pendant 6 jours. Les effets du 5-FU sur la prolifération des cellules HCT116 indiquent que l'action de la drogue dépend de la concentration et du temps. Le contrôle négatif à été effectué avec des cellules non traitées. Pour chacune des conditions la manipulation a été effectuée en double, les résultats montrés correspondent à la moyenne et à l'écart-type sur ces duplicats.
B, Observation en microscopie optique en contraste de phase de cellules HCT116, traitée ou non au 5-FUà 10 µM ou 50 µM pendant 24h ou 48h.

sélectionné les concentrations 10µM et 50µM. Le temps de traitement sélectionné est de 24h, qui est une phase où les cellules répondent au traitement mais ne sont pas encore en apoptose. Nous avons également choisi pour certaines manipulation d'étudier la réponse après 48h de traitement, et/ou avec 50 µM afin d'étudier la réponse cellulaire des conditions plus cytotoxiques.

Pour préciser l'impact du 5-FU sur la morphologie des cellules HCT116, des observations ont été faites en contraste de phase après traitements au 5-FU à 10 µM ou 50 µM pendant 24h ou 48h (figure 36B). Dans toutes les conditions de traitement au 5-FU on observe que la taille des cellules est augmentée (elles sont plus étalées), et que les nucléoles apparaissent plus gros et plus ronds que dans les cellules non traitées. Ce changement d'aspect des nucléoles est en particulier plus important dans les cellules traitées à 48h et/ou avec 50 µM de 5-FU. On observe, en accord avec l'étude de la prolifération en temps réel, une baisse du nombre de cellules vivante dépendante du temps et de la concentration de 5-FU. Ces changements phénotypiques sont très reproductibles est permettent de s'assurer de l'efficacité du traitement au 5-FU au moment de la récolte des cellules.

II.4.2. Le 5-FU altère la localisation de FBL dans le nucléole

Afin de vérifier si les altérations de localisation de FBL décrites dans la littérature sont reproduite dans notre modèle, nous avons analysé la localisation de FBL sous traitement au 5-FU dans la lignée HCT116 (Burger et al. 2010). Les résultats présentés figure 37A montrent la localisation de FBL ainsi qu'un marqueur nucléolaire, la nucléoline (NCL). Les traitements affectent la taille des noyaux qui sont en moyenne plus grands après traitement au 5-FU. Les nucléoles après traitement sont aussi affectés, ils sont d'aspect plus arrondis, plus gros et moins nombreux par cellule. Le traitement au 5-FU pendant 24h à 10 µM induit un changement de profil de FBL. En effet, FBL reste localisée dans les corps de Cajal, et reste nucléolaire, mais au lieu d'être répartie en spots dense et hétérogènes, sa localisation dans le nucléole est plus diffuse et homogène. Pour déterminer si le changement de localisation de FBL était lié à une réorganisation du nucléole, une analyse en microscopie électronique a été effectuée. Le DFC, dans lequel est normalement localisée FBL disparait dans les cellules traitées au 5-FU, et l'aspect granulaire du GC est atténué, apparaissant plus foncé en

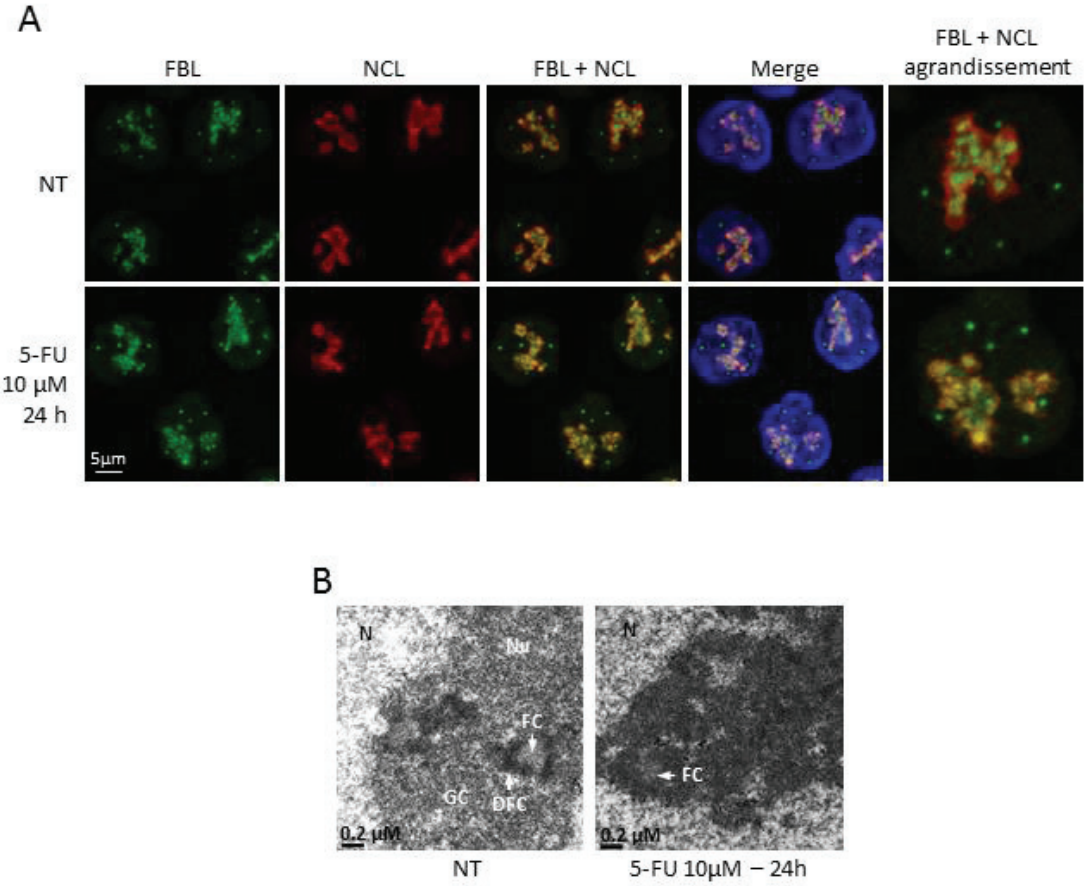


Figure 37 : le 5-FU induit un changement de localisation nucléolaire de FBL

A, Immunofluorescence montrant des cellules HCT116 traitées ou non au 5-FU pendant 24h à 10 µM. En vert, signal de l'anticorps anti-fibrillarine (FBL) ; en rouge, signal de l'anticorps anti-nucléoline (NCL); en bleu Hoechst marquant les noyaux. NT, non traitées ; 5-FU, 5-fluorouracile.

B, Nucléoles de cellules HCT116 traitées ou non au 5-FU à 10µM pendant 24h observés en microscopie électronique. N, nucléoplasme ; Nu, nucléole ; FC, centre fibrillaire ; DFC, centre fibrillaire dense ; GC, composant granulaire.

Adapté de Thérizols et al. En préparation

microscopie électronique. Cela suggère que les éléments du DFC et du GC sont "mélangés" et indique que la biogenèse des ribosomes est perturbée (figure 37B). Ces résultats, ainsi que l'apparente homogénéisation de la localisation nucléolaire de FBL suggère que celle-ci est délocalisée dans un domaine de type composé granulaire après traitement au 5-FU. En revanche, la localisation de NCL n'est pas modifiée par le traitement, suggérant que celui-ci ne touche pas l'ensemble des protéines nucléolaires, et que l'effet de délocalisation observée est spécifique à certaines protéines.

Afin de déterminer si la forme taguée de FBL se comporte de façon similaire à la FBL endogène, l'expérience a été effectuée dans les cellules HCT116 flagsh induites à la doxycycline. Les résultats présentés figure 38 montrent dans les cellules non induites et non traitées une localisation attendue de FBL, hétérogène dans les nucléoles et localisée également dans les corps de Cajal. Le traitement des cellules non induites avec 10 µM de 5-FU pendant 24h induit comme attendu une relocalisation plus homogène et diffuse de FBL dans les nucléoles. FBL est toujours présente dans les corps de Cajal. On constate que les nucléoles sont plus arrondis et plus gros dans des cellules traitées. Ce changement de morphologie est accompagné d'une augmentation de la taille des noyaux. Le traitement à 50 µM résulte en des changements similaires à ceux observés à 10 µM, mais accentués : les nucléoles sont d'avantage arrondis, et encore moins nombreux. De plus, la localisation de FBL est plus homogène qu'à 10 µM.

Dans les cellules induites à la doxycycline et non traitée au 5-FU, la localisation de la flag-FBL est similaire à celle observée pour la FBL endogène dans les cellules induites (figure 38). Les traitements à 10 et 50 µM montrent les mêmes altérations de la localisation de la flag-FBL sous 5-FU que celles observées pour la FBL endogène. On retrouve aussi une accentuation de ces altérations entre les traitements à 10 µM et 50 µM. Ces résultats confirment que le 5-FU induit un changement de localisation nucléolaire de FBL, et que cette altération touche aussi la flag-FBL dans la lignée HCT116 flagsh.

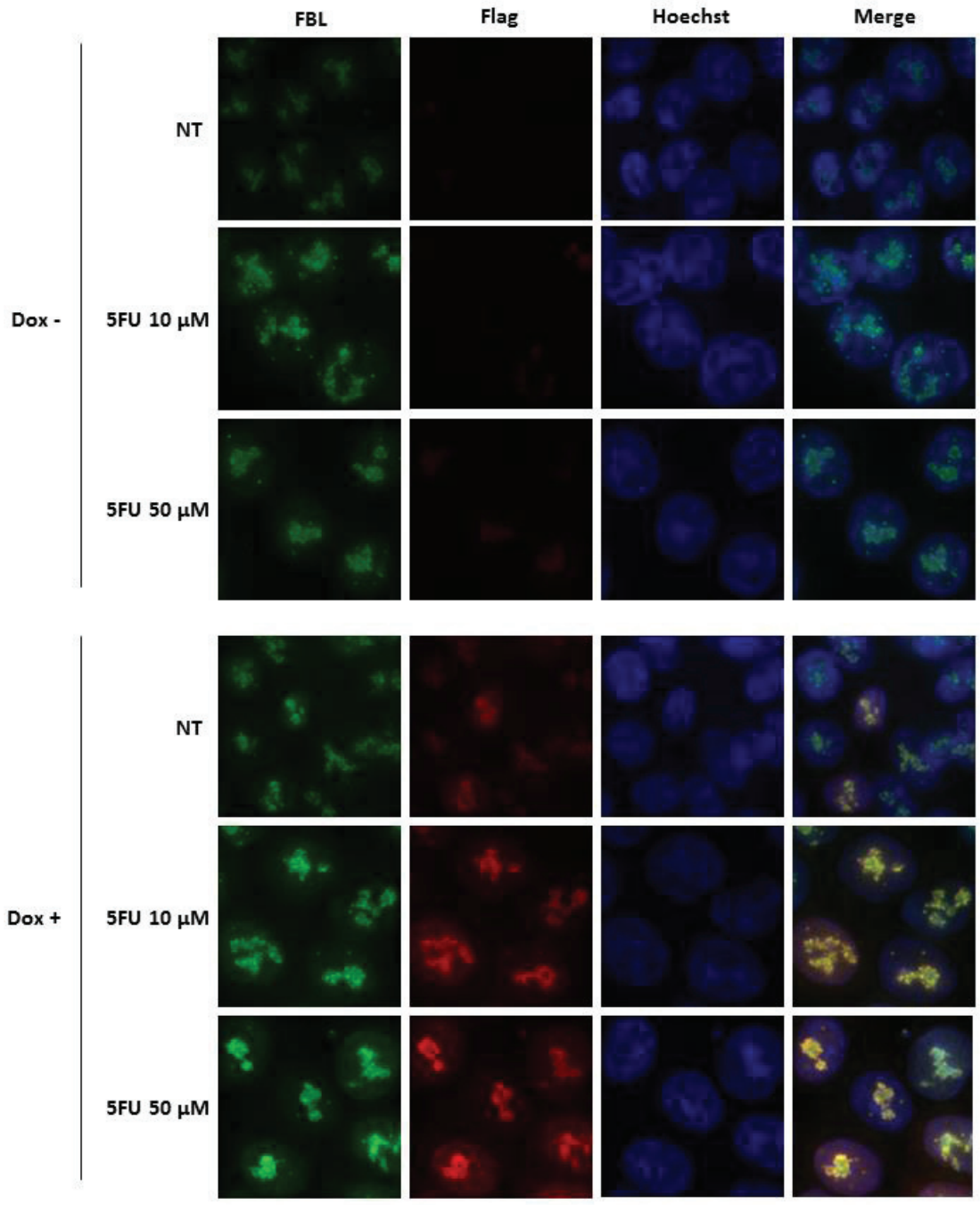


Figure 38 : le 5-FU induit un changement de localisation nucléolaire de la flag-FBL
Immunofluorescence montrant des cellules HCT116 flagsh induites ou non à la doxycycline, pendant 72h et/ou traitées ou non au 5-FU à 10 µM ou 50 µM pendant 24h. En vert, signal de l'anticorps anti-FBL ; en rouge, signal de l'anticorps anti-flag ; en bleu Hoechst marquant les noyaux. Dox, doxycycline ; NT, non traitées ; FBL, fibrillarine.

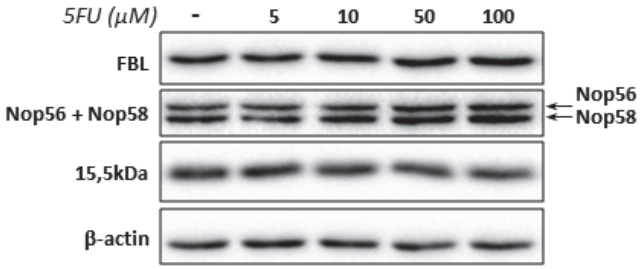


Figure 39 : Le 5-FU n'altère pas l'expression des membres du complexe snoRNP à boite C/D.
Western blot montrant le niveau d'expression de FBL et des autres membres du complexe de méthylation (Nop56, Nop58, 15,5kDa) dans des cellules HCT116 traitées avec des concentrations croissantes de 5-FU. La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge

II.4.3. Le 5-FU n'altère pas l'expression de FBL

Afin de déterminer si l'altération de la localisation de FBL est accompagnée d'une variation d'expression, des cellules HCT116 ont été traitées avec dans concentrations croissantes de 5-FU et l'expression de FBL a été analysée en western blot. Les résultats présentés figure 39 montrent que le niveau protéique de FBL ne varie pas sous traitement au 5-FU, même sous des doses hautement cytotoxiques telle que 50 et 100 µM pendant 24h. On constate que l'expression des partenaires protéiques de FBL au sein du complexe de méthylation, Nop56, Nop58, et 15.5kDa n'est pas altérée par le traitement au 5-FU non plus.

II.4.4. Impact du 5-FU sur les modifications post-traductionnelles de FBL

L'absence, de changement d'expression de FBL et le fait que cette dernière soit délocalisée sous traitement au 5-FU m'ont conduit à faire l'hypothèse que le 5-FU peut avoir un impact sur les modifications post-traductionnelles de FBL. Afin de tester cette hypothèse, j'ai utilisé le système de 2D-western blot décrit précédemment, dans le but de déterminer l'impact du 5-FU sur le profil de MPT de FBL. Des problèmes ont été cependant rencontrés en 2D-western blot avec la lignée HCT116 au cours de ces manipulations et l'impact du 5-FU sur le profil de MPT dans cette lignée n'a pu être déterminé. En revanche, cette expérience a été effectuée avec succès avec les cellules HeLa et la lignée de cancer du sein MCF7. Dans un premier temps, l'impact du 5-FU sur le niveau protéique de FBL dans ces lignées a été vérifié en 1D-western blot. Les résultats présentés figure 40A montrent que sous traitement, l'expression de FBL varie peu dans les cellules HeLa. Cependant, on observe une baisse du niveau de FBL dans les MCF7 sous 5-FU, contrairement à ce qui a été observé pour les cellules HCT116. Ce comportement différent n'a pas été d'avantage étudié, mais suggère que le 5-FU induit une baisse de l'expression de FBL dans les cellules MCF7 par une voie qui n'est pas activée dans les cellules HCT116.

L'analyse du profil de MPT des cellules HeLa et MCF7 sous 5FU est présentée figure 40B. Dans les cellules HeLa le profil et l'intensité des spots de la GAPDH sont similaires, montrant que cette dernière n'est pas altérée par le traitement au 5-FU. En revanche, Le profil de la FBL change. En effet, le spot le plus à gauche et le plus intense dans les cellules non traitées

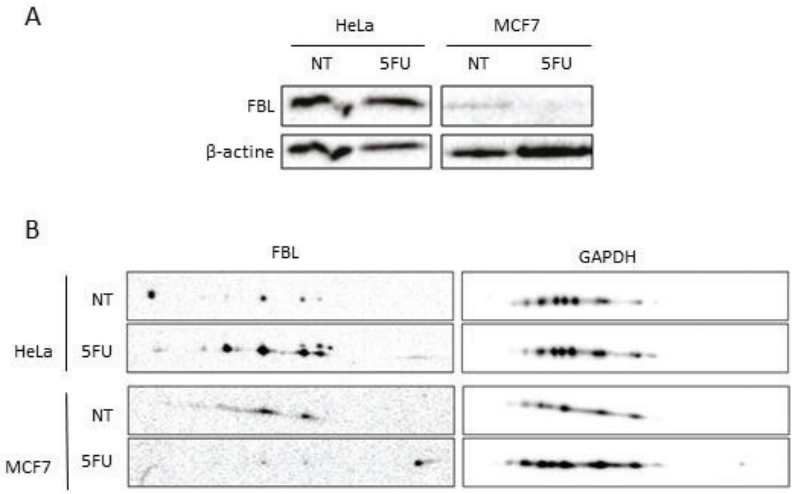


Figure 40 : Le 5-FU induit un changement de profil d'isoforme de FBL dans les cellules HeLa et MCF7
A, Western blot montrant le niveau d'expression de FBL dans des cellules HeLa et MCF7 traitées ou non au 5-FU pendant 24h à 10 µM. La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge
B, Des lysat totaux de cellules HeLa et MCF7 traitées ou non au 5-FU pendant 24h à 10 µM ont été séparés en électrophorèse bidimensionnelle selon leur point isoélectriques par électrofocalisation entre les points isoélectriques (pI) 6 et 11, puis selon leur par SDS-PAGE. Le profil d'isoforme de fibrillarine (FBL) a été analysé en western bot avec un anticorps anti-FBL. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.
NT, non traitée, 5-FU, 5-fluorouracile.

diminue fortement, et la majorité des autres spots augmentent en intensité. On constate en plus l'apparition de nouveaux spots d'intensités faibles, suggérant une modification des MPT de FBL par le 5-FU.

Afin de préciser les changements de MPT de FBL observés en 2D-western blot, nous avons eu recours à la spectrométrie de masse. Les noyaux de cellules HCT116 ont été fractionnés, et les lysats totaux ou nucléaires ont été séparés en SDS-PAGE. La bande à la taille attendue pour FBL a été découpée et analysée en spectrométrie de masse. La figure 41A présente la couverture de la séquence de FBL dans les fractions nucléaire, qui s'élève à 48% dans les cellules traitées au 5-FU. Le domaine GAR n'est pas couvert, ce qui était attendu, puisque la forte fréquence en arginine de ce domaine génère des peptides trop petits pour être identifiés avec fiabilité. Aucune MPT n'a été détectée dans les fractions cytoplasmiques, ni dans les fractions nucléaires issues de cellules non traitées. Seules la fraction nucléaire des cellules traitées au 5-FU présent une MPT détectée. En effet, une nouvelle acétylation a été détectée sur la lysine 292. Cette MPT a précédemment été décrite chez la souris (Weinert et al. 2013), mais n'a pas encore été décrite chez l'homme. Ces résultats suggèrent que le 5-FU induit l'acétylation de FBL à la position 292.

Afin de confirmer l'induction de l'acétylation de FBL à cette position par le 5-FU, et permettre son étude, un anticorps spécifique de la FBL acétylée en position 292 a été produit (la mise au point et la vérification de la spécificité de cet anticorps sont détaillées en annexe « validation de l'anticorps anti acK292-FBL », figure A1). Pour confirmer l'augmentation de l'acétylation de FBL sous 5-FU, cet anticorps anti acK292-FBL a été utilisé, sur la flag-FBL immunoprécipitée. Les résultats présentés figure 41B montrent que pour des quantités égales de flag-FBL, la quantité de flag-FBL acétylée en K292 est plus grande sous 5-FU que dans les cellules HCT116 non traitées, transfectées avec le plasmide p3xflag-FBL. Ces résultats confirment que le 5-FU induit l'acétylation de FBL sur la lysine 292.

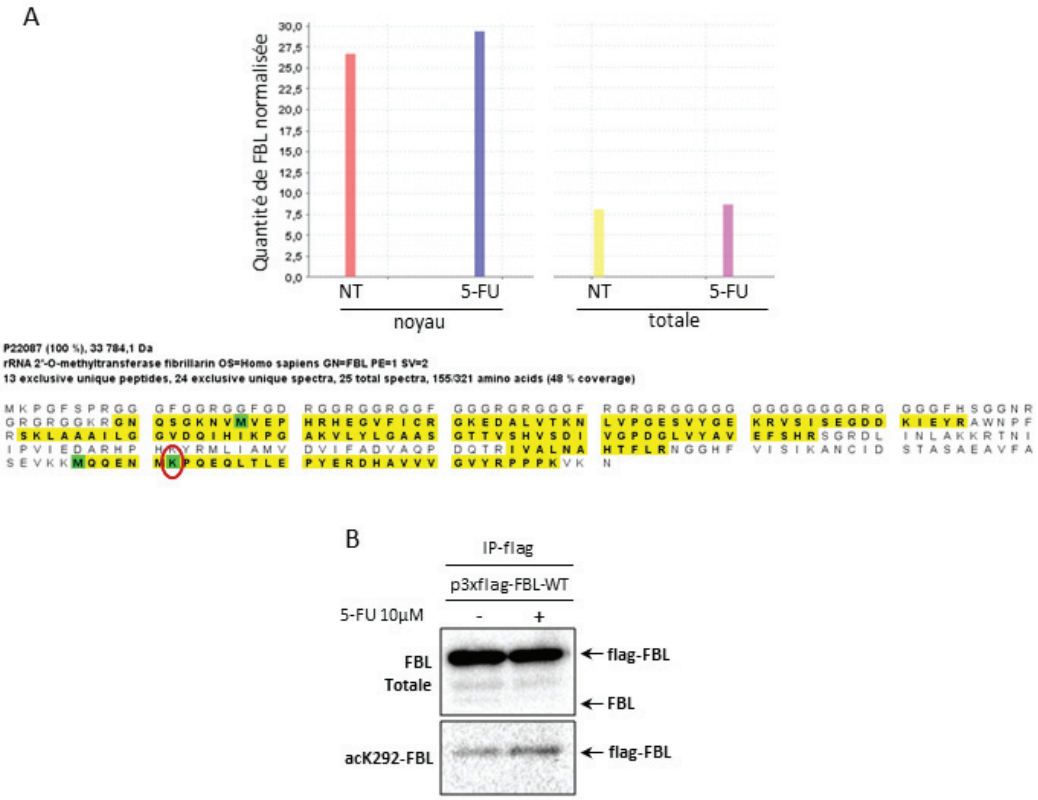


Figure 41 : Détection d'une nouvelle acétylation de lysine en position 292 induite par le 5-FU

A, Des extraits totaux ou nucléaires de cellules HCT116 traitées ou non au 5-FU ont été séparés en SDS-PAGE et la bande correspondant à la taille attendue pour FBL a été découpée et analysée en spectrométrie de masse. L'histogramme montre la quantité de FBL détectée dans chaque fraction normalisée sur le spectre total. La séquence illustre la détection d'une acétylation de la lysine 291 dans la fraction nucléaire, sous 5-FU.

B, La flag-FBL a été immunoprécipitée à partir de lysats de cellules HCT116 transfectées ou non avec le plasmide p3xflag-FBL-WT pendant 24h et traitées ou non au 5-FU à 10µM pendant 24h. Les produits d'IP ont été déposés deux fois de manière à analyser le niveau de FBL acétylée en K292 et le niveau de FBL totale en western blot.

FBL, fibrillarine ; 5-FU, 5-fluorouracile ; NT, non traitée ; La partie jaune de la séquence correspond à la partie détectée en spectrométrie de masse.

II.4.5. Etude du rôle de la lysine K292 dans la régulation de FBL

Afin d'étudier le rôle de l'acétylation de la lysine 292, une mutation ponctuelle a été introduite dans la flag-FBL à cette position de manière à obtenir une flag-FBL-K292A, qui ne peut être acétylée. Pour déterminer l'impact de ce résidu sur la fonction de FBL, la capacité du mutant flag-FBL-292A à s'assembler dans le complexe de méthylation ainsi que sa localisation nucléolaire ont été comparées à celles de la Flag-FBL-WT, dont la localisation et l'assemblage dans le complexe de méthylation ont déjà été vérifiées (figure 26). De plus, afin de comparer ce mutant à une flag-FBL dont la fonction est altérée, deux autres mutants ont été inclus dans ces manipulations : le mutant flag-FBL-P212A, dont l'interaction avec Nop56 et Nop58 est prédite altérée par le modèle structural présenté en partie 1 de ces résultats ; et le mutant flag-FBL-K265A, dont l'activité de catalyse de la transméthylation est altérée, d'après le modèle. Ces mutants permettent d'une part d'avoir un contrôle négatif de la fonction de FBL, et d'autre part, l'analyse de l'altération de leur fonction permet de tirer des informations nouvelles sur les relations structure-fonction de la FBL humaine. 3 lignées HCT116 flagsh supplémentaires ont ainsi été développées, exprimant respectivement les mutants flag-FBL-P212A, flag-FBL-K265A, et flag-FBL-K292A.

Afin de valider l'expression des mutants ponctuels de FBL dans les lignées HCT116 flagsh, l'expression de ces mutants a été vérifiée en western blot (figure 42A). Les résultats montrent que les mutants flag-FBL-K265A et K292A s'expriment à un niveau semblable à celui de la flag-FBL-WT, tandis que le mutant flag-FBL-P212A est nettement moins exprimé que la flag-FBL-WT. Bien que son expression ne soit pas évidente dans la figure 42A, elle a été confirmée dans d'autres séries d'expériences (voir les figures 42B et 42C) ainsi que dans le modèle HeLa (données non-montrées). Ces résultats suggèrent que l'introduction d'une mutation au résidu P212 de FBL diminue sa stabilité.

II.4.5.1. Rôle de la lysine K292 dans la localisation de FBL

Afin de déterminer si la lysine 292 de FBL joue un rôle dans sa localisation, la localisation de la flag-FBL-K292A a été comparée à celle de la flag-FBL-WT, ainsi qu'aux autres mutants ponctuels de FBL. Comme décrit précédemment, les HCT116 flagsh-WT présentent la flag-FBL localisée de manière très similaire à la FBL endogène (figure 43).

Le mutant P212A s'exprime très faiblement. Le peu de signal qui est obtenu colocalise en partie avec le signal FBL uniquement dans les cellules exprimant le plus de flag-FBL, et est réparti de manière similaire à la flag-FBL-WT dans les nucléoles et les corps de Cajal. Cependant, dans la majorité des cellules, le signal flag-FBL-P212A présente plutôt un signal nucléaire diffus, indiquant que cette mutation ne permet plus à FBL de se localiser dans les nucléoles et les corps de Cajal. Les cellules HCT116 flagsh-K292A présentent un signal FBL dans les nucléoles similaire à celui observé pour la flag-FBL-WT, et on retrouve la FBL localisée dans les corps de Cajal. Enfin, le mutant K265A présente un signal FBL plus fort sous doxycycline, un signal légèrement nucléoplasmique mais principalement nucléolaire (figure 43). Le signal flag présente des caractéristiques similaires et montre une flag-FBL-K265A localisée dans les nucléoles et les corps de Cajal de manière semblable à la flag-FBL-WT. Ces résultats montrent que les mutations ponctuelles K292A et K265A introduites dans FBL n'affectent pas de façon majeure la localisation de la protéine, suggérant que l'acétylation en position K292 ne joue pas un rôle dans la localisation de FBL. En revanche, la mutation P212A affecte la localisation de FBL, qui n'est plus entièrement localisée dans les nucléoles et le corps de Cajal, suggérant un rôle crucial du domaine de FBL contenant ce résidu dans la régulation de sa localisation.

II.4.5.2. Impact de la lysine K292 dans l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation

Dans un second temps, afin de déterminer si l'acétylation du résidu K292 joue un rôle dans l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation, l'IP des flag-FBL mutées ou sauvage a été réalisée dans les lignées HCT116 flagsh (figure 42B). On retrouve dans les extraits totaux ce qui a été observé précédemment : une faible expression de la flag-FBL-P212A et une expression des flag-FBL-K265A et K292A similaire à celle de la flag-FBL-WT. De plus, l'expression de Nop56 et 15.5kDa n'est pas modifiée entre les quatre lignées, indiquant que l'expression des mutants de FBL n'affecte pas de façon majeure l'expression de ses partenaires. En IP avec l'anti-flag, on observe des quantités de flag-FBL immunoprécipitée équivalente entre les trois mutants et la flag-FBL WT, malgré les différences d'expression observées dans les extraits totaux. Cela suggère que l'IP est suffisamment efficace pour

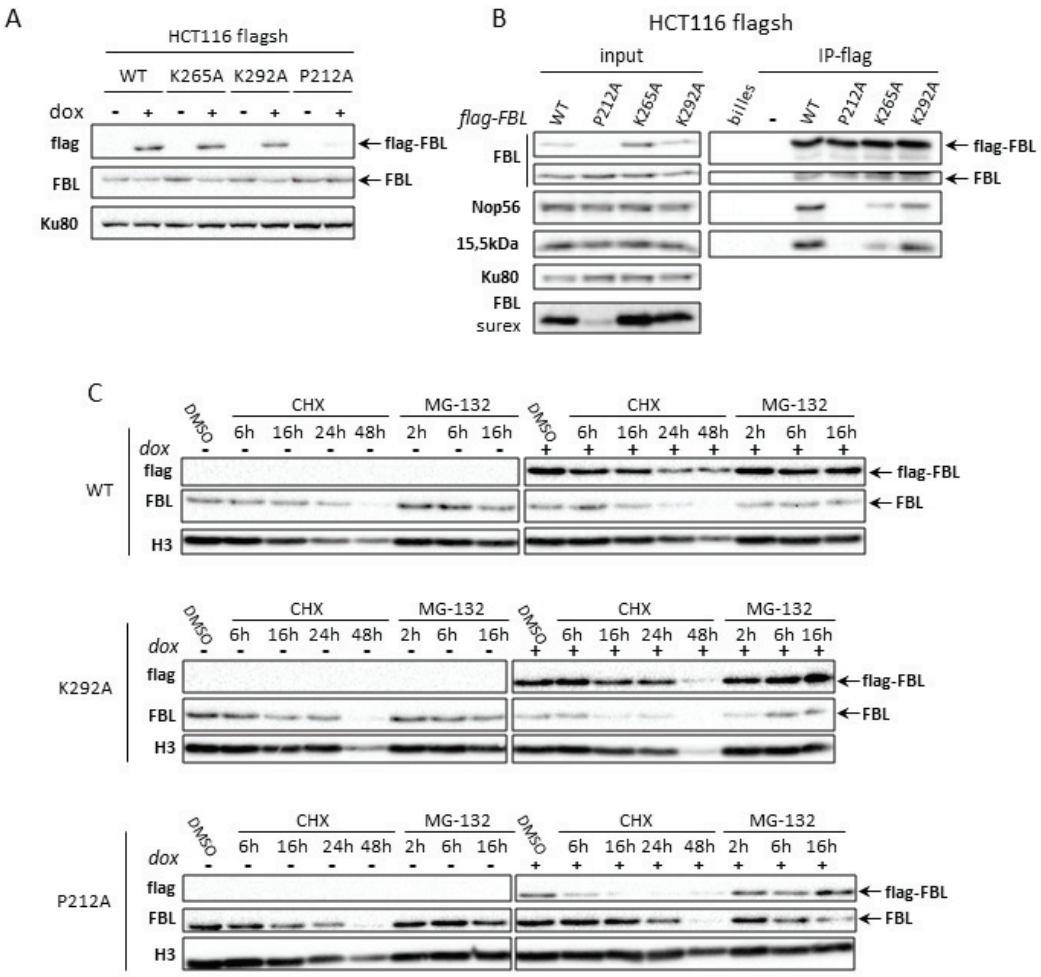


Figure 42 : Le résidus K292 n'est pas indipensable pour la stabilité et l'association de FBL dans le complexe de méthylation.

A, Western blot montrant le niveau d'expression de la flag-FBL (anticorps anti-flag) et de la FBL endogène (anticorps anti-FBL) dans des cellule HCT116 et HeLa sh1090-flag-FBL (flagsh) exprimant différent mutant ponctuels de FBL, induites ou non à la doxycyline pendant 72h. Ku80 a été utilisé comme contrôle de charge. FBL, fibrillarine, dox, doxycycline

B, La flag-FBL a été immunoprécipitée depuis des lysats de cellules HCT116, induites ou non à la doxycycline avec un anticorps anti-flag. Un mock (billes) a été réalisé avec du lysat de cellules induites obtenu du lysat incubation avec les billes, en absence d'anticorps. Une fraction totale (input) de chaque lysat a également été déposée. Les échantillons ont ensuite été analysés par western blot avec pour la présence de FBL, et de Nop56, Nop58 et 15,5kDa.

C, Western blot montrant le niveau d'expression de la flag-FBL (anticorps anti-flag) et de la FBL endogène (anticorps anti-FBL) dans des cellule HCT116 sh1090-flag-FBL (flagsh) WT, K292A et P212A, induites ou non à la doxycyline pendant 72h, traitée ou non au cycloheximide ou au MG-132.

Histone H3 et Ku80 ont été utilisés comme contrôles de charge. FBL, fibrillarine ; dox, doxycycline ; CHX, cycloheximide ; H3, hitone H3.

immunoprécipiter la faible quantité de flag-FBL-P212A et montre que le système d'immunoprécipitation utilisé est en condition limitante en anticorps et/ou en billes magnétiques. Cela convient puisque que cela permet de normaliser la quantité de FBL dans toutes les conditions et d'analyser efficacement l'interaction avec les partenaires. En particulier, on observe un défaut d'interaction entre la flag-FBL-P212A et Nop56, en cohérence avec les résultats de transfection pour ce mutant (données non montrées). Cette observation est renforcée par l'IP de Nop56 présentée figure 46B, où le mutants P212A ne co-immunoprécipite pas avec Nop56. Une baisse d'interaction avec 15.5kDa est aussi remarquée. Le mutant K292A ne présente pas de défaut d'interaction avec ces deux partenaires, tandis que le mutant K265A est légèrement moins lié à Nop56 et 15.5kDa.

Ces résultats suggèrent que l'acétylation en position 292 n'est pas nécessaire à l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation. De plus, il ressort de cette expérience que le mutant P212A est déficient pour l'interaction avec Nop56, tel qu'il avait été prédit par le modèle structural présenté en partie 1 de la section « résultats ». Enfin, ces données indiquent également que la mutation du résidu K265 en alanine induit une légère baisse d'interaction de FBL avec les membres du complexe de méthylation.

II.4.5.3. Rôle de la lysine K292 dans la stabilité de FBL

Le résidu K292 a également été identifié comme site d'ubiquitinylation (Mertins et al. 2013), il est donc possible que les modifications post-traductionnelles de ce résidu soient impliquées dans la stabilité de FBL, notamment via ubiquitinylation et dégradation par le protéasome. Ainsi, afin de déterminer si l'acétylation à la position 292 est impliquée dans le contrôle de la stabilité de FBL, la stabilité des mutants ponctuels a été analysée. Pour cela, des cellules HCT116 flagsh-WT, P212A, et K292A ont été traitées pendant différents temps au cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la traduction, et les niveaux de FBL et Flag-FBL ont été analysés par western-blot. Les résultats présentés figure 42C montrent une baisse du niveau de FBL endogène en fonction du temps, avec une demie vie estimée inférieure à 16h. Les résultats concernant la flag-FBL-WT indiquent une baisse similaire dans ces conditions, avec également une demi-vie inférieure à 16h. Cela suggère que la présence du flag n'altère pas de façon significative la stabilité de FBL. D'autre part, le mutant flag-FBL-K292A ne présente pas de différence significative de stabilité sous traitement au CHX, tandis que le

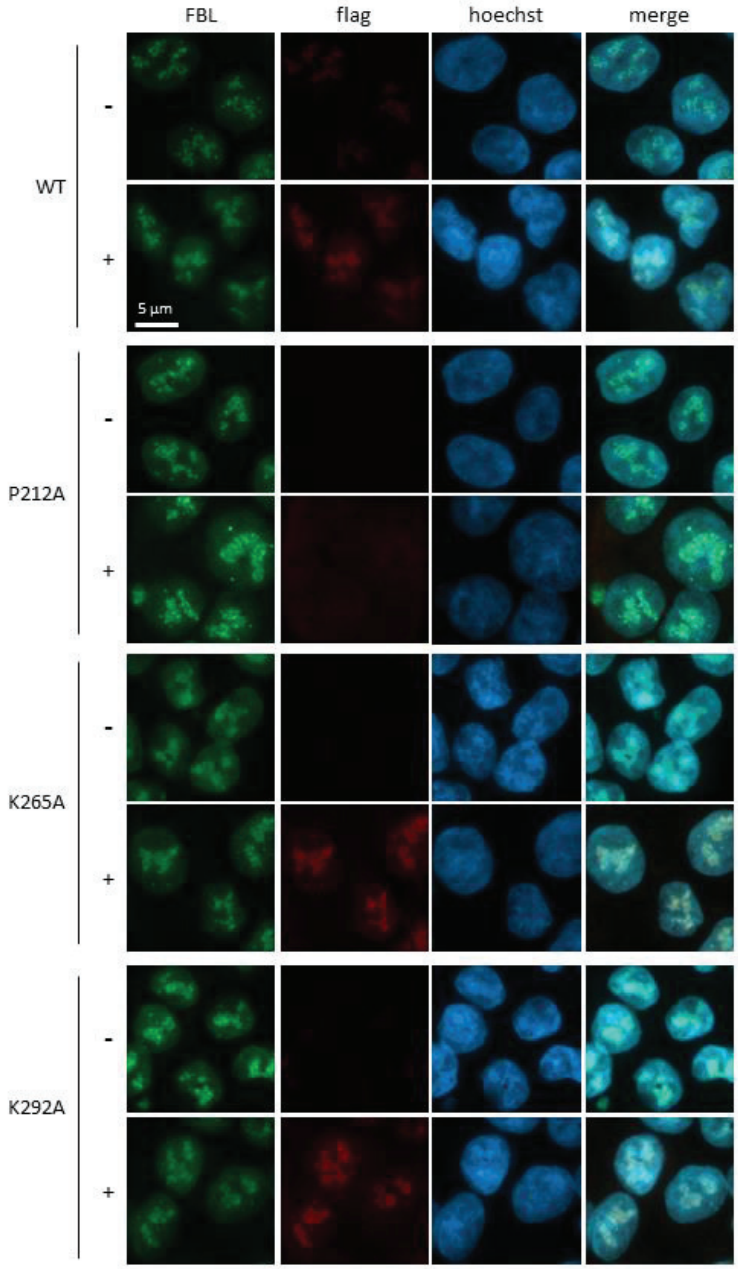


Figure 43 : Localisation des flag-FBL mutants

Immunofluorescence montrant des cellules HCT116 flagsh induites ou non à la doxycycline, pendant 72h. En vert, signal de l'anticorps anti-FBL ; en rouge, signal de l'anticorps anti-flag ; en bleu Hoechst marquant les noyaux. L'image la plus à droite correspond au merge des trois signaux. Dox, doxycycline ; NT, non traitées ; FBL, fibrillarine.

mutant flag-FBL-P212A présente une baisse nettement plus rapide au cours du temps. Ces résultats suggèrent que l'introduction de la mutation P212A diminue la stabilité de FBL, et que le résidu K292 n'est pas impliqué dans la régulation de ce paramètre.

L'une des voies de dégradation des protéines les plus importantes est la dégradation par le protéasome après poly-ubiquitinylation. D'après la littérature, FBL est ubiquitinylée a plusieurs sites (Mertins et al. 2013; Woong Kim et al. 2011; Wagner et al. 2011) et cette voie pourrait être responsable de sa dégradation. Afin de voir dans quelle mesure le protéasome affecte le niveau d'expression protéique de FBL, et de déterminer le rôle du résidu K292 dans ce processus, des cellules HCT116 flagsh-WT induites ou non à la doxycycline ont été traitées ou non avec du MG-132, un inhibiteur du protéasome (figures 42C). La quantification des western blots présentés (non montrée) montrent que le niveau de FBL endogène et de flag-FBL-WT ne sont pas altérés après traitement. De même, le MG-132, n'affecte pas le niveau des flag-FBL-K292A. Cependant, le MG-132 induit une augmentation du niveau de flag-FBL-P212A après 16h de traitement. Ces résultats montrent que le mutant flag-FBL-P212A est plus sensible à la dégradation par le protéasome que la flag-FBL-WT et suggèrent que le résidu K292 n'est pas impliqué dans la régulation de ce processus.

L'ensemble de ces manipulation indiquent que la mutation de la lysine 292 de FBL en alanine n'influe, pas sur l'expression, ni sur la stabilité, la localisation et l'assemblage de la protéine dans le complexe de méthylation.

II.4.6. Impact de l'induction de l'acétylation sur FBL

L'étude de la flag-FBL-K292A, ne montre pas d'altération de localisation, de stabilité et d'assemblage, suggérant que l'acétylation à ce site n'est pas requise pour ces fonctions. Afin de poursuivre l'étude du rôle de l'acétylation de cette lysine, dans un second temps je me suis focalisé sur l'induction de l'acétylation.

L'acétylation est une modification post-traductionnelle ajoutée par des acétyl-transférases, et hydrolysée par des déacétylases, initialement identifiées comme ciblant les histones, et ainsi nommées histones acétyle transférases (HAT) et histones déacétylases (HDACs). L'inhibition des HDACs est une voie largement employée pour induire l'acétylation globale dans la cellule. Les HDACs sont nombreuses et leur inhibition peut être induite par

Inhibiteur de HDAC	Classe de HDAC ciblée
Nicotinamide (NAM)	HDACs III (Sitruin)
Butyrate de Sodium (NaB)	HDACs I
Trichostatine A (TSA)	HDACs I et II
SAHA	HDACs I et II
MS-275	HDACs I

Tableau 4 : Classe de HDACs ciblées par les différents inhibiteurs de HDACs utilisés

des inhibiteurs de spécificité plus ou moins large (cf. tableau 4, ci-dessous) (inhibiteurs de HDACs, HDIs).

II.4.6.1. Mise au point de traitements avec les inhibiteurs d'HDACs

Pour induire l'acétylation de FBL, plusieurs HDIs disponibles dans le commerce ont été testés, afin d'avoir un large spectre d'inhibition des HDACs. Les traitements avec ces différents HDIs ont d'abord été mis au point, en analysant leur impact sur l'acétylation global en western blot avec un anticorps anti acétyl-lysine. 5 HDIs, ciblant différentes classes de HDACs (Cf. tableau 4) ont été testés sur des cellules HeLa, selon plusieurs concentrations et temps de traitement, en se basant sur les données disponibles dans la littérature.

Tous les inhibiteurs testés, excepté le nicotinamide, augmentent significativement l'acétylation des protéines, principalement visible au niveau des histones (figure 44A). Les effets observés étaient dépendant de la dose appliquée. Pour le butyrate de sodium (NaB), la concentration 5 mM présente le meilleur effet, tandis que pour le TSA, le SAHA et le MS-275, les concentrations donnant un effet optimal sont respectivement à 400 nM, 10 µM et 10 µM. L'efficacité de ces traitements sur l'acétylation globale est d'avantage montrée par l'IF réalisée avec l'anticorps anti-acétyl-lysine (figure 44B). Les images montrent une augmentation du signal d'acétylation dans les noyaux avec le NaB, le TSA, le SAHA et le MS-275. En revanche, l'absence d'augmentation d'acétylation sous traitement au nicotinamide confirme les résultats obtenus avec ce HDI en western blot. Les résultats montrent que les

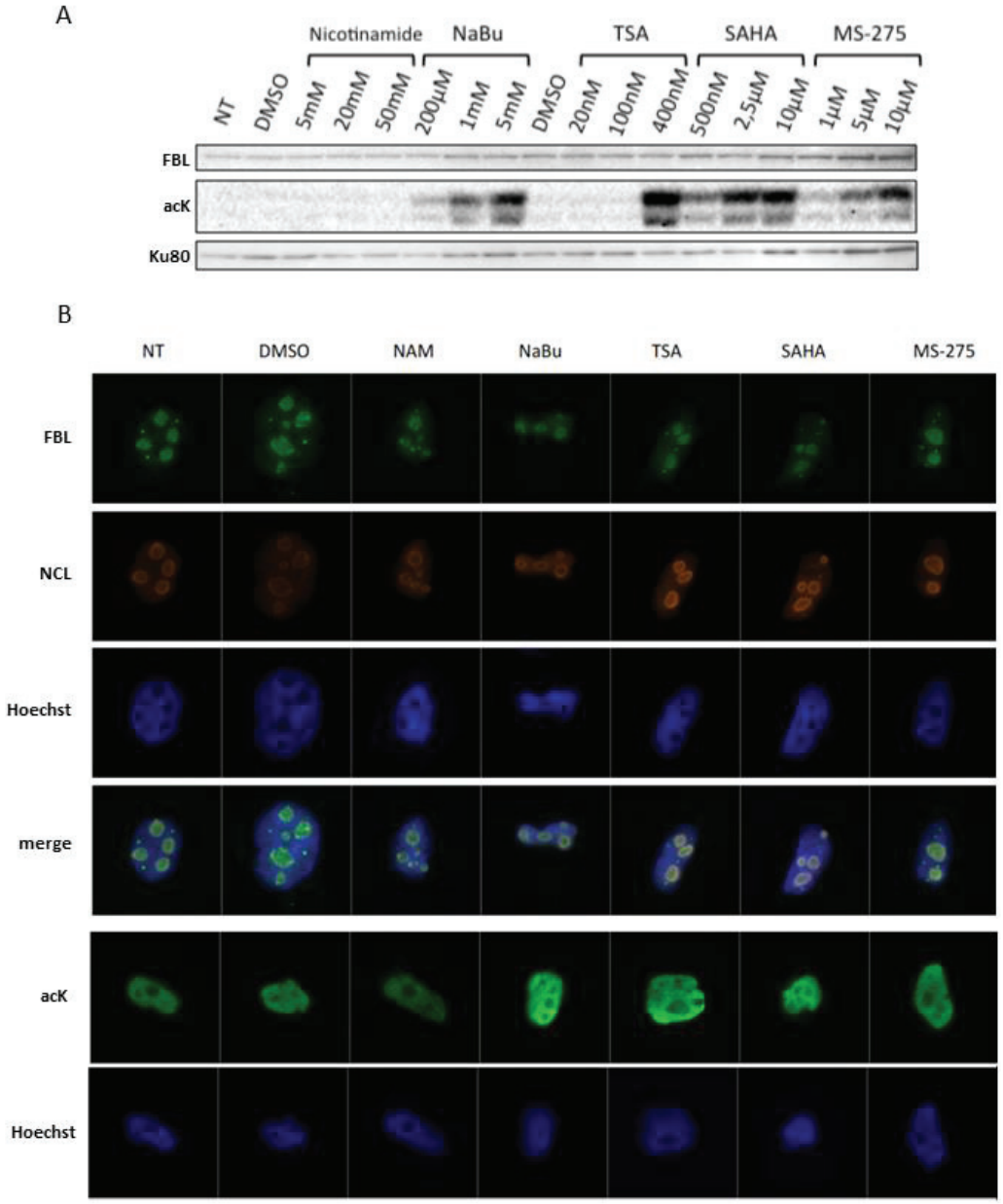


Figure 44 : Induction de l'acétylation globale par des inhibiteurs de HDAC et impact sur l'expression et la localisation de FBL.

A, Des cellules HeLa ont été traité ou non avec des inhibiteurs de HDAC (nicotinamide, butyrate de sodium, trichostatine A, SAHA, MS-275) à différentes concentrations, et le niveau d'acétylation des histones ainsi que le niveau de FBL ont été analysés en western blot avec un anticorps anti-FBL et pan anti acétyl-lysine. Ku80 a été utilisé comme contrôle de charge.

B, Immunofluorescence montrant des cellules HeLa traitées ou non avec des inhibiteurs de HDAC. La localisation de FBL est indiquée en vert (en haut) tandis que la nucléoline utilisée comme contrôle de la structure du nucléole est représentée en rouge. Le niveau et localisation de l'acétylation cellulaire est indiquée en vert (en bas). Bleu, hoechst, marquant le noyaux. L'image la plus à gauche correspond au merge des trois signaux.

NT, non traitées ; DMSO, diméthylsulfoxyde, NAM, nicotinamide ; NaBu, butyrate de sodium ; TSA, trichostatine A ; SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid ; FBL, fibrillarine ; NCL, nucléoline.

traitements avec ces HDI ne modifient pas l'expression de FBL (figure 44A). De plus, la localisation de FBL n'est pas altérée, d'après les résultats d'IF, ni la localisation de la nucléoline (figure 44B), un autre marqueur nucléolaire couramment utilisé en IF, suggérant que les traitements n'affectent pas la structure du nucléole.

II.4.6.2. Impact des inhibiteurs d'HDAC sur l'acétylation de FBL

Afin d'induire l'acétylation de FBL, des cellules HCT116 flagsh-WT ont été traitées avec différents HDIs, et l'impact de ces traitements sur les niveaux d'acétylation de la FBL endogène et de la flag-FBL ont été analysés avec l'anticorps anti-acK292-FBL. Les cellules ont été traitées avec du nicotinamide ou avec une combinaison de TSA + NaB. Le traitement au TSA + NaB a été sélectionné car il permet une inhibition efficace et large des HDACs de classes I et II. Le nicotinamide a été choisi car cet inhibiteur est le seul HDI que nous ayons testé qui cible les HDACs de classe III (famille de sitruin). Les résultats présentés figure 45 montrent que ces traitements n'altèrent pas le niveau d'acétylation de la FBL endogène en K292, dans les cellules non induites. De plus, dans les cellules induites, aucun signal n'est observé au niveau de la flag-FBL-WT, excepté dans les cellules traitées au TSA et NaB. Dans ces cellules, le niveau de flag-FBL augmente drastiquement tandis que le niveau de FBL endogène reste inchangé, suggérant que ces inhibiteurs sur-activent la transcription du promoteur CMV présent dans le vecteur. Mis à part ce traitement, le niveau global de FBL (flag ou endogène) n'est pas modifié dans les différentes conditions testées.

Afin de confirmer l'absence de variations de l'acétylation de FBL lors des traitements avec les inhibiteurs TSA + NaB, l'acétylation a été analysée en immunoprécipitation. De plus, pour déterminer si l'induction de l'acétylation par le 5-FU dépend de voies impliquant des HDACs, les traitements avec les HDIs ont été combinés ou non avec le 5-FU. L'IP permet de s'affranchir d'éventuelles variations du niveau total de FBL, puisqu'en IP, les quantités de flag-FBL sont identiques d'une condition à l'autre. La flag-FBL a donc été immunoprécipitée à partir de cellules traitées ou non avec TSA + NaB et/ou 5-FU. Comme montré précédemment, malgré la variation du niveau de total de flag-FBL, la quantité de flag-FBL immunoprécipitée est peu variable d'une condition à l'autre, permettant d'évaluer efficacement la variation de signal de FBL acétylée. Les produits d'IP ont ainsi permis

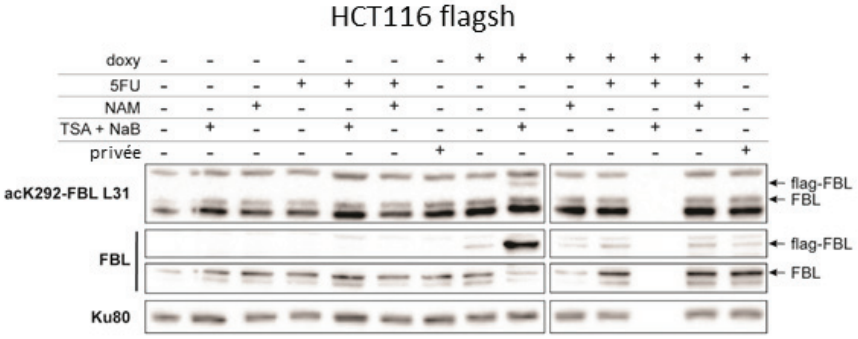


Figure 45 : impact des inhibiteurs de HDAC sur l'acétylation de FBL.
Des cellules HCT116 flagsh-WT induites ou non à la doycycline ont été traitées ou non avec des inhibiteurs de HDAC (nicotinamide, butyrate de sodium + trichostatine A et/ou avec du 5-FU. Les niveaux de FBL acétylée en K292 puis de FBL totale a été analysés en western blot. Ku80 a été utilisé comme contrôle de charge.
NAM, nicotinamide ; NaB, butyrate de sodium ; TSA, trichostatine A ;FBL, fibrillarine ; 5FU, 5-fluorouracile ; doxy, doxycycline.

d’analyser d’une part, le niveau total de flag-FBL immunoprécipitée, d’autre part le niveau de FBL acétylée en K292 avec l’anti acK292-FBL, et enfin le niveau global d’acétylation de FBL avec un anticorps pan anti acétyl-lysine (figure 46A). Le traitement TSA + NaB n'a pas d'impact sur le niveau de K292 acétylé, ni sur le niveau d'acétylation globale de FBL (anti- pan acK), en accord avec les résultats présentés figure 45. Néanmoins, le signal acK292-FBL est une nouvelle fois légèrement plus élevé dans les cellules traitées aux 5-FU. Notons qu’en combinaison avec le traitement TSA + NaB, le 5-FU n'induit plus d'augmentation de l’acétylation en K292. Le traitement au 5-FU n’induit pas non plus d’augmentation du signal avec l’anticorps pan anti acétyl-lysine. Les résultats obtenus dans le contexte des traitements TSA + NaB sont à interpréter avec précaution. En effet, Le niveau total de flag-FBL (panneau " input") indique une forte augmentation du niveau d’expression de la flag-FBL sous TSA + NaB (figure 46A), confirmant ainsi les observations précédentes (figure 45). La surexpression de flag-FBL induite par le traitement au TSA + NaB est susceptible de générer de la FBL en excès. Il est donc probable que la (les) acétyl-transférase(s) responsable(s) de l’acétylation de FBL ne puissent acétyler qu’une petite fraction de flag-FBL. Ainsi, l’inhibition potentielle de HDACs ciblant FBL par ce traitement ne pourrait induire d’augmentation détectable de l’acétylation de FBL. Dans ces conditions, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur le niveau d’acétylation de FBL dans les cellules traitées par les HDIs.

II.4.6.3. Impact des inhibiteurs d'HDAC sur l’assemblage de FBL dans le complexe de méthylation

D’autre part, afin de déterminer l’impact de l’induction globale de l’acétylation sur l’assemblage de FBL dans le complexe de méthylation, la présence des partenaires de FBL au sein de ce complexe a aussi été analysée dans les produits d’IP. Le western blot Nop56 et 15.5kDa (figure 46A) montrent que le traitement au 5-FU induit une baisse d’interaction de FBL avec Nop56. On n’observe pas de variation de la quantité de flag-FBL dans les fractions totales, suggérant que cette baisse d’interaction n’est pas due à un changement de quantité de celle-ci. Un effet identique est observé pour 15.5kDa, suggérant que sous 5-FU la flag-FBL est moins associée aux protéines du complexe de méthylation. De plus, on constate une quasi

absence de Nop56 et 15.5kDa dans les cellules traitées avec les HDIs. La surexposition du western blot Nop56 révèle un très léger signal de Nop56. Ce résultat suggère qu'une très

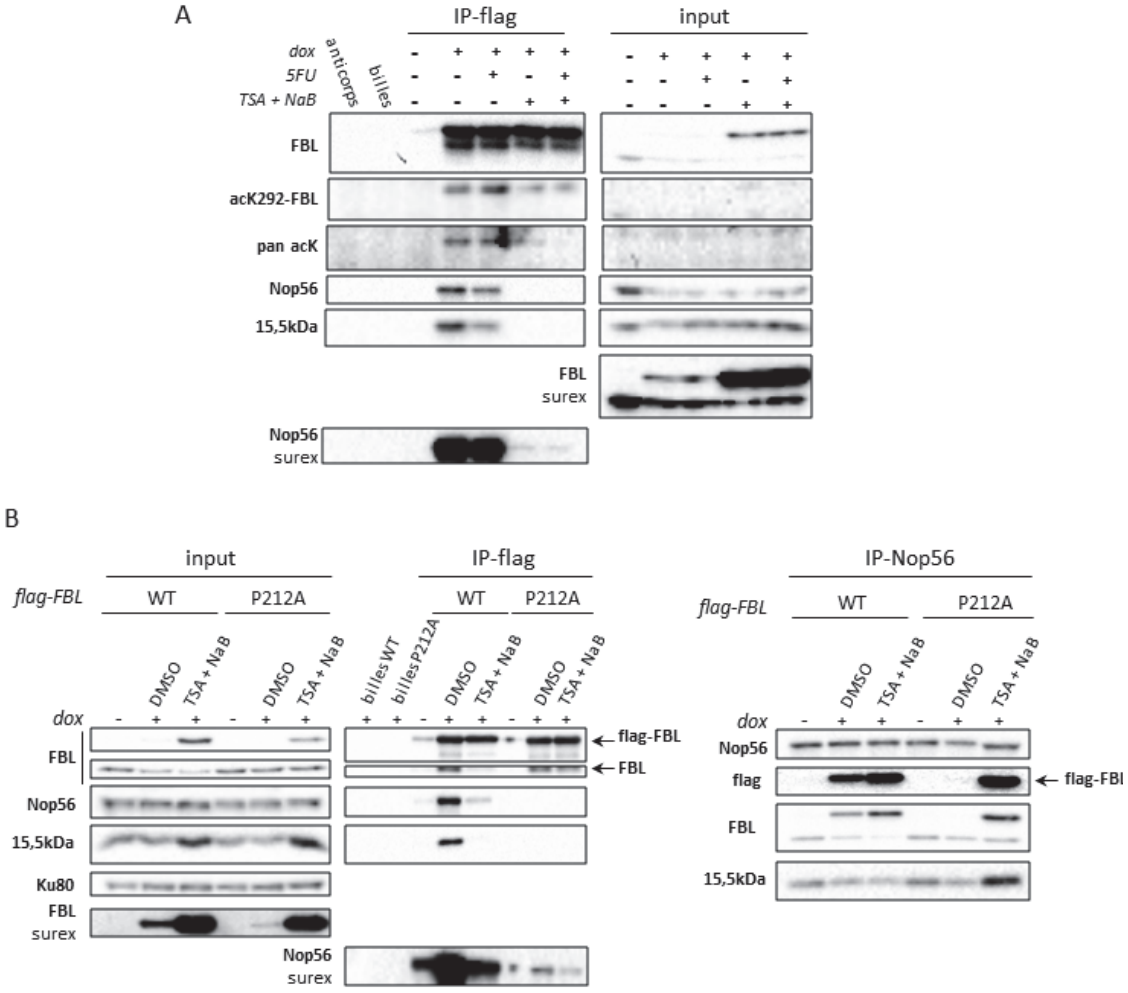


Figure 46 : impact des inhibiteurs de HDAC et du 5-FU sur l'acétylation de la flag-FBL et son assemblage dans le complexe snoRNP C/D.

A, La flag-FBL a été immunoprécipitée à partir de lysats de cellules HCT116 flagsh-WT induites ou non à la doxycycline et traitées ou non avec des inhibiteurs de HDAC (butyrate de sodium + trichostatine A) et/ou avec du 5-FU. Les produits d'IP ont été déposés trois fois de manière à analyser le niveau de FBL acétylée en K292, de FBL totale, et de FBL acétylée avec l'anti acétyl-lysine en western blot.

B, La flag-FBL ou Nop56 ont été immunoprécipitées depuis des lysats de cellules HCT116 flagsh-WT ou -P212A, induites ou non à la doxycycline et traitées non avec des inhibiteurs de HDAC (butyrate de sodium + trichostatine A).

Pour chaque manipulation, un mock (billes) a été réalisé avec du lysat incubé avec les billes, en absence d'anticorps. Un contrôle avec des billes liées à l'anti-flag (anticorps) a été effectué en incubant les billes et l'anti-flag dans du tampon de lyse (sans lysat) (A). Une fraction totale (input) de chaque lysat a également été déposée. Les échantillons ont été analysés par western blot pour la présence de 15,5kDa, et de Nop56. Ku80 a été utilisé comme contrôle de charge pour les inputs. NaB, butyrate de sodium ; TSA, trichostatine A ;FBL, fibrillarine ; 5FU, 5-fluorouracile ; dox, doxycycline ; surex, surexposition.

faible fraction de flag-FBL est liée à Nop56 dans les cellules traitées TSA + NaB. Ceci pourrait être un biais de ce test résultant de la forte augmentation du niveau de flag-FBL dans les cellules traitées.

Ainsi, deux effets permettraient d'expliquer la baisse d'interaction entre flag-FBL et Nop56 et 15.5kDa. D'une part, il est possible que sous traitement TSA + NaB, la flag-FBL-WT interagisse très faiblement avec Nop56 et 15.5kDa. D'autre part, il est possible qu'un excès de flag-FBL dans les cellules traitées soit libre, et par conséquent en co-IP, à quantités de flag-FBL précipitée égales, seule une petite fraction de flag-FBL co-précipite avec Nop56 et 15.5kDa. Pour tester ces hypothèses, la flag-FBL et Nop56 ont été immunoprécipitées en parallèle, dans des cellules HCT116 flagsh-WT traitées ou non avec TSA + NaB, ainsi que dans les cellules HCT116 flagsh-P212A, le défaut d'interaction entre la flag-FBL-P212A et Nop56 servant de contrôle négatif (figure 46B). L'IP-flag révèle des résultats identiques à ce qui a été observé précédemment : une forte baisse des quantités de Nop56 et 15.5kDa co-immunoprécipitées avec la flag-FBL-WT sous traitement TSA + NaB et un défaut d'interaction avec Nop56 de la flag-FBL-P212A. Les résultats d'IP-Nop56 montrent une IP efficace, avec des quantités similaires de Nop56 dans les différentes conditions et lignées. Dans les cellules HCT116 flagsh-WT, on observe la co-immunoprécipitation de la flag-FBL-WT avec Nop56 dans les cellules contrôles (DMSO) et une augmentation de cette quantité sous traitement TSA + NaB. Ces résultats indiquent que le traitement avec les HDIs TSA et NaB n'induit pas une baisse d'interaction entre flag-FBL et Nop56. L'augmentation de flag-FBL dans ces cellules semble donc résulter en l'accumulation de FBL qui n'est pas associée en complexe. Dans les cellules HCT116 flagsh-P212A, comme attendu, on n'observe pas de flag-FBL immunoprécipitée. En revanche, lorsque ces cellules sont traitées TSA + NaB, une forte quantité de flag-FBL-P212A co-immunoprécipite avec Nop56, indiquant que l'augmentation de la quantité de flag-FBL-P212A sous TSA + NaB est telle qu'elle masque le défaut d'interaction du mutant avec Nop56. Ces résultats montrent que l'excès de flag-FBL libre, généré par le traitement TSA + NaB, est en majorité libre d'interaction avec Nop56. Ces données montrent donc que le traitement TSA + NaB n'altère pas l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation.

II.4.6.4. Impact de SIRT1 sur l'acétylation de FBL

SIRT1 est une déacétylase de la famille des Sitruin qui, lors de la privation de glucose, s'active et se relocalise dans les nucléoles (Murayama et al. 2008; L. Yang et Chen 2014). Afin d'explorer l'impact de cette déacétylase sur l'acétylation de FBL, le niveau d'acétylation en position K292 a été analysé en fonction de l'expression de SIRT1. En collaboration avec le Dr. Davide Gaglio de l'équipe de Peter Mulligan (CRCL) j'ai analysé le niveau de FBL acétylée dans des lignées cellulaires humaines (HEK293) et de souris (MEF) exprimant ou non SIRT1, avec l'anticorps anti acK292-FBL. Les résultats présentés figure 47, ne montrent pas de variation de l'acétylation de FBL en position K292 dans les lignées SIRT1 knock out, en comparaison aux lignées contrôle. De plus, d'après la littérature, la privation de glucose recrute SIRT1 dans les nucléoles et active d'avantage son activité (Murayama et al. 2008). Le niveau d'acétylation de FBL n'est pas modifié entre les cellules privées et les cellules contrôles. Ces résultats indiquent que SIRT1 n'a pas d'impact sur le niveau d'acétylation de FBL au site K292.

II.4.6.5. Impact de SIRT7 et CBP sur l'acétylation de FBL

Le groupe des Drs. I. Grummt et R. Voit a identifié la déacétylase SIRT7 comme un régulateur de la biogenèse des ribosomes, et en particulier du clivage des ARNr (S. Chen et al. 2016). Cette enzyme interagit avec FBL (« FBL Result Summary | BioGRID » 2016; Y.-C. Tsai et al. 2012), et les travaux de ce groupe les ont mené à étudier le rôle de SIRT7 dans l'acétylation de FBL. En particulier, les résultats préliminaires d'Aishwarya Iyer, doctorante au sein de ce groupe, indiquent que cette protéine est une acétylase de FBL (Iyer A. congrès EMBO, 2015).

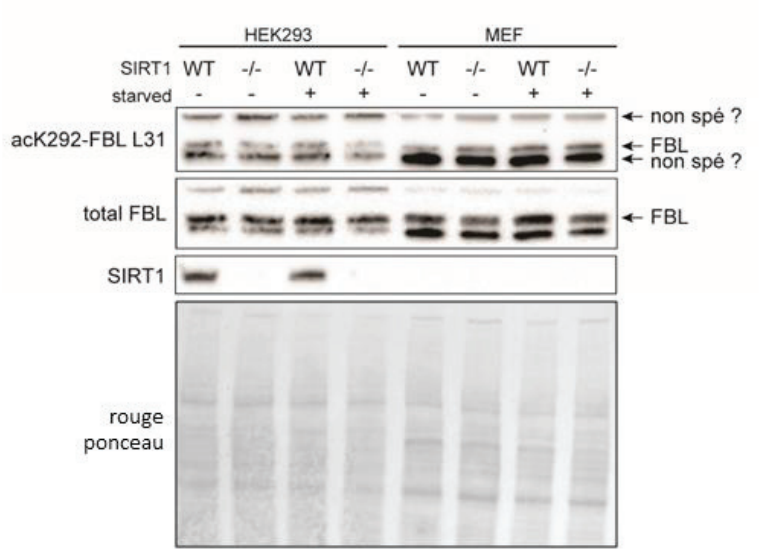


Figure 47 : SIRT1 n'a pas d'effet détectable sur l'acétylation de la lysine 292 de FBL.
Western blot montrant le niveau de FBL acétylée sur la lysine 292 (anticorps anti acK292-FBL) et de la FBL endogène (anticorps anti-FBL) dans des cellule HEK293 et MEF, WT et SIRT1-KO, privée ou nonde sérum pendant 16h. Le rouge ponceau a été utilisé comme contrôle de charge. L'anti SIRT1 utilisé ne reconnait pas SIRT1 dans les cellules de souris (MEF).

Par ailleurs, leurs données montrent que la sur-expression de l'acétyl-transférase CBP induit une acétylation d'une FBL tagguée avec la GFP. Sur la base de ces résultats, j'ai étendu mon analyse à ces deux enzymes. De plus, afin de déterminer si SIRT7 et/ou CBP jouent un rôle dans l'acétylation induite par le 5-FU, la modulation de l'expression de ces deux enzymes a été combinée avec le traitement au 5-FU. Pour ce travail, nous avons utilisé les même outils que le groupe de Voit/Grummt, à savoir leur plasmides permettant la surexpression de la HA-CBP, et le même siARN dirigé contre SIRT7. Une première étape de mise au point a permis de fixer les conditions d'expression de HA-CBP et de ciblage de SIRT7 dans notre modèle HCT116 flagsh-WT, et de valider le changement d'expression de HA-CBP et de SIRT7 (donnée non montrées). Ces conditions de transfection ont ensuite été utilisées afin d'analyser en immunoprécipitation, l'impact de la baisse d'expression de SIRT7 et de la surexpression de HA-CBP sur l'acétylation de FBL. Pour cela la flag-FBL-WT a été immunoprécipitée à partir de cellules HCT116 flagsh-WT induites, transfectées ou non avec les siARN SIRT7 et pcDNA-HA-CBP. L'immunoprécipitation a permis d'analyser le niveau de FBL acétylée en K292 avec l'anti acK292-FBL, et le niveau global d'acétylation de FBL avec un anticorps pan anti-acétyl-lysine. Les résultats présentés figure 48, montrent que la quantité de FBL totale n'est pas altérée par les traitements visant à induire l'acétylation de FBL. En comparant les signaux obtenus avec les anticorps anti acK292-FBL, pan anti-acétyl-lysine, et anti FBL, on constate qu'aucune différence d'acétylation de FBL n'est détectée sous siSIRT7, ou lorsque HA-CBP est surexprimée, ni en présence de 5-FU. De même, lorsque l'on combine l'approche avec ces outils, aucune variation n'est observée. Ces résultats suggèrent que dans nos conditions soit l'acétylation de FBL n'est pas modifiée, soit notre technique ne permet pas de détecter une telle variation. De même, le niveau d'acétylation apparaît inchangé lorsqu'il est analysé par immunoprécipitation de flag-FBL (figure 48, panneau de droite). Ainsi, les résultats du groupe Grummt/Voit ne sont pas reproduits. Nos résultats indiquent également que l'induction de l'acétylation de FBL n'est pas renforcée en combinant le traitement au 5-FU avec la surexpression de CBP et l'inhibition de SIRT7, suggérant que l'acétylation induite par le 5-FU n'est pas régulée par ces enzymes.

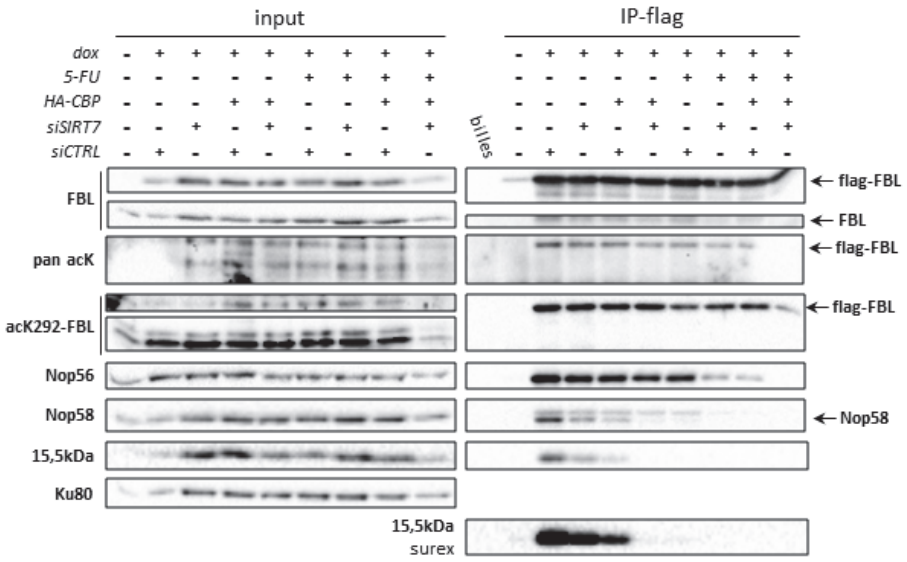


Figure 48 : impact des inhibiteurs de HDAC sur l'acétylation de la flag-FBL et son assemblage dans le complexe snoRNP C/D.

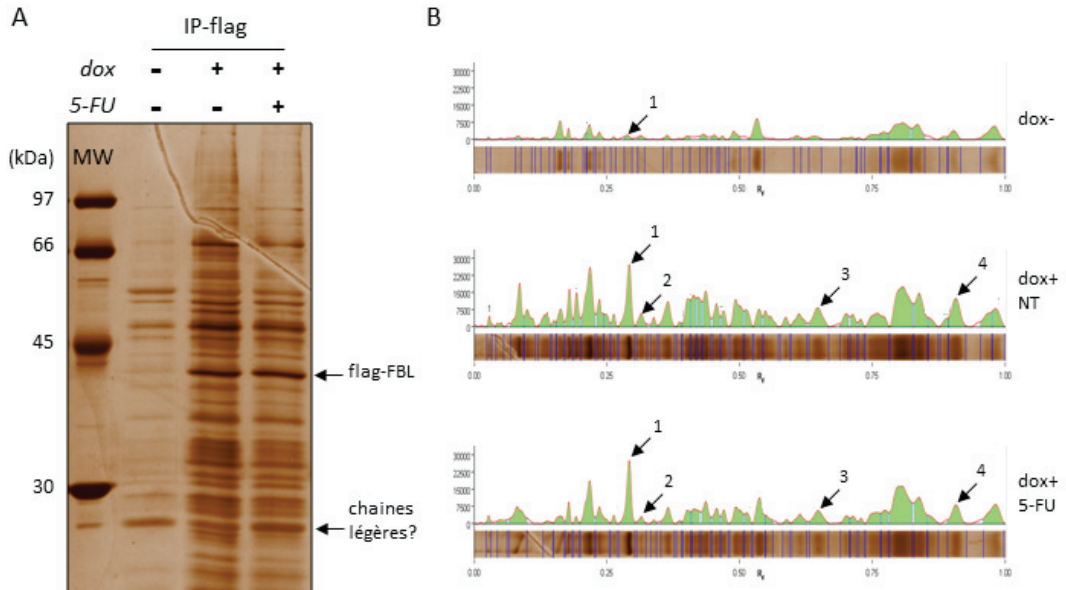
La flag-FBL a été immunoprécipiée à partir de lysats de cellules HCT116 flagsh-WT induites ou non à la doxycycline et transfectées non avec un siARN SIRT7 et/ou le plasmide pcDNA-HA-CBP, et/ou traitées au 5-FU. Les produits d'IP ont été déposés trois fois de manière à analyser le niveau de FBL acétylée en K292, de FBL totale, et de FBL acétylée avec l'anti acétyl-lysine en western blot. Un mock (billes) a été réalisé avec du lysat obtenu après lyse avec le tampon R+ et incubation avec les billes, en absence d'anticorps. Une fraction (input) de chaque lysat a également été déposée. Les échantillons ont aussi été analysés par western blot pour la présence de 15,5kDa, et de Nop56. Ku80 a été utilisé comme contrôle de charge pour les inputs.
FBL, fibrillarine ; 5FU, 5-fluorouracile ; dox, doxycycline ; surex, surexposition ; siCTRL, siARN contrôle.

II.4.6.6. Impact de SIRT7 et CBP sur l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation

Afin de déterminer l'impact de l'altération de l'acétylation par modulation de l'expression de SIRT7 et CBP sur l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation, la présence de Nop56, Nop58 et 15.5kDa a été analysée dans les produits d'IP présentés dans le paragraphe précédent. Nop56, Nop58 et 15.5kDa sont moins co-immunoprécipitées dans les cellules transfectées avec le siARN SIRT7, sur-exprimant HA-CBP, et dans les cellules combinant ces traitements au 5-FU. Dans le cas du triple traitement siRNA-SIRT7, HA-CBP et 5-FU, les partenaires de FBL ne sont plus du tout co-purifiés. Ces données, reproduites dans une expérience indépendante, indiquent que ces deux enzymes interviendraient dans la formation du complexe de méthylation, et supportent que le 5-FU perturbe la formation de ce complexe en interférant avec des mécanismes d'acétylation.

II.4.6.7. Rôle du 5-FU dans les interactions formées par FBL

Sur la base des résultats montrant une baisse d'interaction de FBL avec les partenaires protéiques du complexe de méthylation, nous nous sommes intéressés, à plus large échelle, aux interactions impliquant FBL, et leur potentielle altération par le 5-FU. A cette fin, les produits d'IP issus de cellules traitée ou non au 5-FU ont été séparés en SDS-PAGE et les gels ont été colorés à l'argent afin de révéler la présence de toutes les protéines ayant co-précipité avec FBL (figure 49A). L'analyse du gel coloré montre une grande quantité de bandes dans les fractions immunoprécipitées, mais aussi dans le contrôle avec les HCT116 flagsh non induites. Les précédents western blot avec un anticorps anti-FBL montrent régulièrement dans les lignées non induites un signal résiduel au niveau de la flag-FBL. De plus, on distingue, dans les cellules non induites (figure 49A), une bande de faible intensité (flèche n°1) correspondant à la taille attendue pour la flag-FBL (42 kDa). L'IP de la flag-FBL dans les cellules non induites pourrait être en partie responsable de l'IP de certaines bandes observées pour cette condition. La grande quantité de protéines co-précipitées n'est pas liée à la stringence du tampon de lavage (données non-montrées). Ce profil riche en protéine pourrait être en partie lié à des interactions indirectes impliquant des ARN, comme indiqué dans l'article (Yanagida et al. 2004). Ce point sera vérifié en incluant des cellules HCT116



C

Bande n°	Intensité relative	
	Dox + NT	Dox + 5-FU
1	1	0,97
2	1	0,44
3	1	0,67
4	1	0,64

Figure 49 : impact des inhibiteurs de HDAC sur l'acétylation de la flag-FBL en immunoprécipitation.
La flag-FBL a été immunoprécipitée à partir de lysats de cellules HCT116 induites ou non à la doxycycline et traitées non au 5-FU à 10 µM pendant 24h, avec un anticorps anti-flag. Une fraction totale (input) de chaque lysat a également été déposée.
A, Les produits d'IP ont été séparés en SDS-PAGE et le gel a été coloré à l'argent.
B, Profil de chaque piste du gel présenté en A, montrant l'intensité des bande détectées e ordonnée. Les flèches numérotées indiquent quatre bandes facilement identifiables et les bandes équivalentes dans les différentes conditions.
C, Intensité de relative à l'intensité de la bande équivalente dans la piste contrôle.
MW, marqueur de masse moléculaire. 5-FU, 5-fluorouracile ; dox, doxycycline.

sauvages dans les prochaines manipulations. Dans les cellules induites, on peut voir une bande intense (n°1) à 42 kDa dans toutes les conditions indiquant que l'IP permet d'immunoprécipiter la flag-FBL en quantité suffisante pour que la bande correspondante soit très visible en coloration à l'argent. Dans les cellules induites on observe l'apparition ou l'enrichissement (par rapport aux cellules non induites) de plusieurs bandes. Notamment les bandes correspondant aux histones sont particulièrement enrichies par rapport aux cellules non induites. On remarque aussi l'enrichissement d'une bande à 68 kDa qui pourrait correspondre à Nop56. Entre les pistes correspondant aux cellules non traitées et celles traitées au 5-FU, certaines bandes présentent des intensités différentes, tandis que la quantité de la flag-FBL immunoprécipité varie très peu entre les deux conditions. En effet, l'intensité de la bande issue des cellules traitées au 5-FU est équivalente à 97% de l'intensité de la bande issue des cellules non traitées (figure 49B). Bien que la différence entre les quantités de flag-FBL immunoprécipitées soit mineure, l'analyse du profil des deux pistes montre une baisse globale de l'intensité des bandes (excepté la bande correspondant à la flag-FBL) dans la piste des cellules traitées au 5-FU. Cette baisse est visuellement évidente sur l'image du gel et sur l'analyse des profils des pistes (figures 49B et 49C).

Ces résultats montrent que le traitement au 5-FU induit une baisse globale des interactions impliquant la flag-FBL, et suggèrent donc qu'un changement induit par le 5-FU directement au niveau de FBL est responsable de cette altération.

II.4.7. Impact de l'expression de FBL sur la cytotoxicité du 5-FU.

Les résultats présentés jusqu'ici montrent un impact du 5-FU sur les modifications post-traductionnelles de FBL, sur sa localisation et sa fonction. Afin de déterminer si FBL joue un rôle dans la réponse cellulaire au 5-FU, nous avons utilisé des lignées HCT116 exprimant de manière stable et inductible un shARN FBL (HCT116-shFBL1 et HCT116-shFBL2), mises au point dans le laboratoire. La mise au point de l'induction de l'expression du shARN-FBL à la doxycycline dans ces lignées est présentée figure 50. Les résultats montrent que l'inhibition de l'expression de FBL par induction des shARN-FBL1 et 2 est efficace et dépendante de la concentration en doxycycline (figure 50A) et du temps d'induction entre 24h et 72h (figure

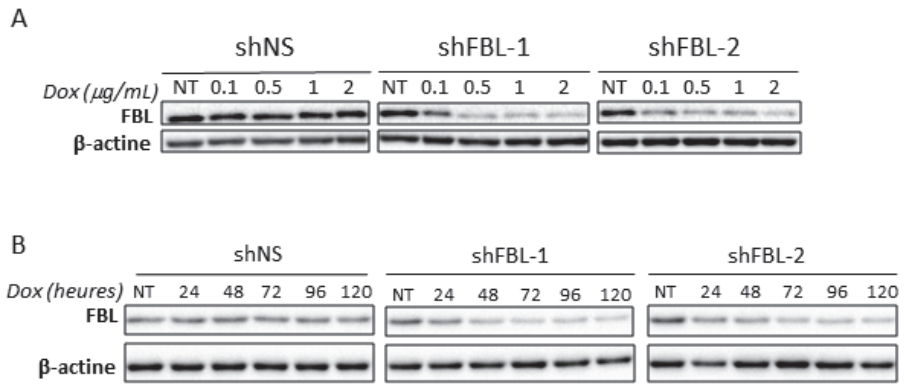


Figure 50 : Mise au point de l'induction des shARN FBL à la doxycycline.
Western blots montrant l'impact de la concentration (A, traitement pendant 72h) et du temps de traitement (B, traitement à 1 µg/mL) à la sur le niveau d'expression de FBL dans des lignées shNS, shFBL1 et shFBL2 inductibles à la doxycycline. NT, non traitées ; shNS, shARN non-silencing

50B). Au-delà de 72h l'induction n'augmente pas en efficacité. Ces résultats indiquent que la meilleure baisse d'expression de FBL est obtenue avec 2µg/mL de doxycyline pendant 72h.

Les lignées HCT116-shFBL1 et HCT116-shFBL2 ainsi que la lignée contrôle HCT116-shNS exprimant le shARN contrôle « non-silencing » ont ensuite été utilisées pour déterminer l'impact de l'expression de FBL sur la réponse des cellules au 5-FU en utilisant le système xCELLigence. Ces lignées ont été induites ou non à la doxycycline et traitées ou non avec 10 µM de 5-FU, et leur prolifération a été mesurée en temps réel (figure 51A). La prolifération sur trois jours de la lignée contrôle HCT116-shNS est similaire à celle observée pour les cellules HCT116 sauvages (figure 36A). Le traitement à 10 µM de 5-FU de ces cellules induit d'abord une forte augmentation de l'impédance électrique jusqu'à 24h après le traitement, puis le nombre de cellules diminue de manière importante jusqu'à 72h. Le traitement à la doxycycline des cellules contrôles ne montre pas de variation de la prolifération dans les cellules non traitées, ni du nombre de cellules sous traitement au 5-FU. Ainsi, ni l'expression d'un shARN ni le traitement à la doxycycline n'altère la réponse des HCT116 au 5-FU.

Les lignées HCT116-shFBL1 et HCT116-shFBL2 présentent une légère baisse de la prolifération lorsqu'elles sont induites à la doxycycline, ce qui peut être attribué à la diminution d'expression de la FBL. L'induction à la doxycycline des lignées shFBL traitées au 5-FU montre une baisse significative du nombre de cellules par rapport aux lignées traitées non induites. En particulier, lorsque l'index cellulaire à 48h post-traitement est normalisé sur les cellules non traitées et non induites (figure 51B) on constate une baisse significative du nombre de cellules dans les lignées shFBL1 et 2 induites et traitées au 5-FU. Cet écart est plus important que la somme des écarts observés pour les lignées induites non traitées et les lignées non induites traitée au 5-FU, et suggèrent donc un léger effet synergique de l'inhibition de FBL et du traitement au 5-FU sur la mortalité des cellules HCT116. Ces données indiquent que la FBL n'est pas requise pour toxicité du 5-FU, et suggèrent que le 5-FU cible une voie cellulaire fonctionnellement liée à celle de FBL.

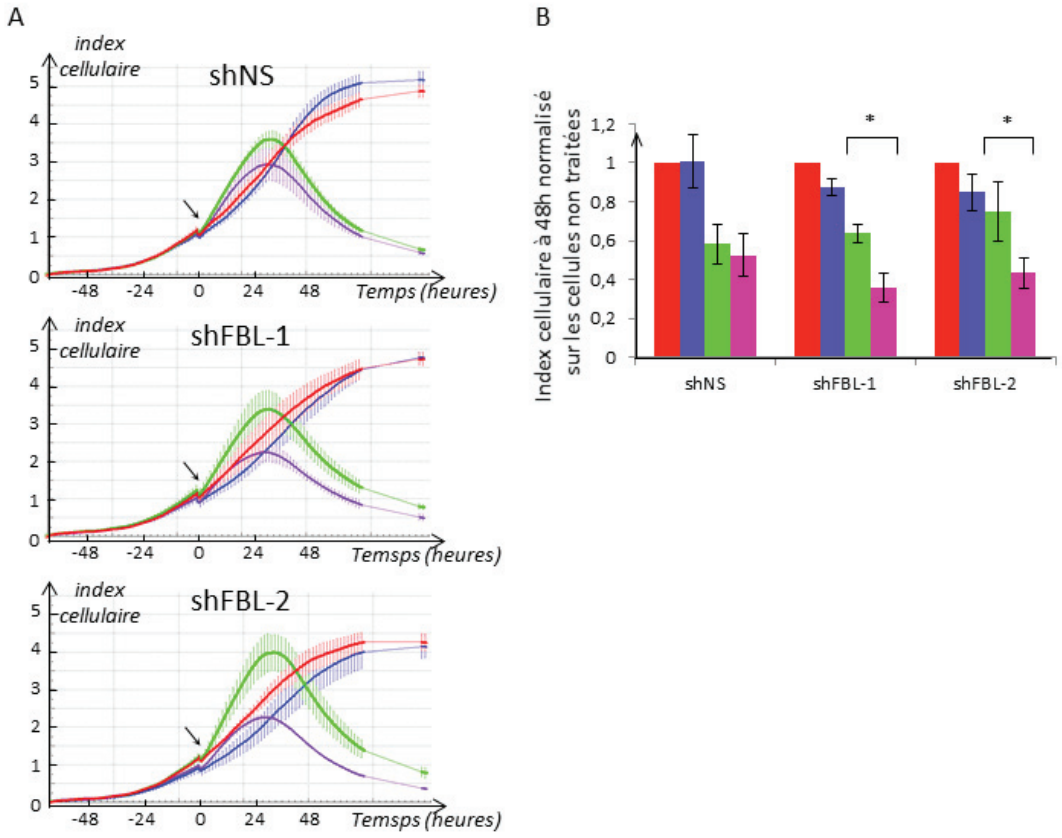


Figure 51 : Mesure de la prolifération cellulaire de HCT116-shFBL en temps réel en réponse au 5-FU.

A, les courbes indiquent l'évolution en temps réel de la prolifération de cellules HCT116-shNS contrôles (haut), HCT116-shFBL1 (milieu) et HCT116-shFBL2 (bas), induites ou non à la doxycycline, et traitées ou non au 5-FU à 10 µM. Pour chacune des conditions la manipulation a été effectuée en duplicats, les résultats montrés correspondent à la moyenne et à l'écart-type sur ces duplicats.

B, Indexes cellulaires à 48h normalisés sur les cellules non traitées. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes. * : $p < 0,05$, d'après un test *t* de student.

Non traitées (rouge), doxycycline (bleu), 5-FU (vert), doxycycline + 5-FU (violet). Les flèches indiquent le moment du raitement au 5-FU. NS, non-silencing.

III. Discussion

La régulation de la traduction par les modifications post-transcriptionnelles des ARNr est un concept émergent pour lequel nous disposons de plus en plus d'informations (Marcel et al. 2013; Bellodi et al. 2013; Jack et al. 2011; Yoon et al. 2006; King et al. 2003; Liang, Liu, et Fournier 2007; Baudin-Baillieu et al. 2009; Erales et al, en préparation) et qui présente le ribosome comme un nouvel acteur majeur de la régulation génique. Ainsi, de nombreux efforts sont investis pour comprendre la régulation de ces modifications post-transcriptionnelles. Par ailleurs, le développement de nouvelles méthodes d'analyse des modifications des ARNr, en particulier pseudouridylation et 2'-O-méthylation, basées sur la spectrométrie de masse et le séquençage NGS (Psy-Seq, RiboMeth-Seq) confirment que ces modifications sont présentes en quantités variables et donc vraisemblablement régulées. De façon intéressante, bien qu'elles soient diverses, les deux modifications post-transcriptionnelles majeures des ARNr, la pseudouridylation et la 2'-O-méthylation, partagent de forte similitudes mécanistiques. En effet, leur addition est catalysée par des complexes ribonucléoprotéiques au sein desquels un snoARN guide la modification de manière site-spécifique sur le nucléotide cible. Cette ressemblance est d'autant plus remarquée que d'autres modifications des ARNr, moins représentées (méthylations et acétylation de bases), sont ajoutées via des mécanismes plus "classiques" de reconnaissance par une enzyme. Aujourd'hui, très peu d'informations sont disponibles concernant le fonctionnement et la régulation de l'activité des complexes snoRNP, en particulier chez l'homme. Pourtant, dans différents contextes physiologiques ou pathologies (développement, différenciation, cancer, dyskératose congénitale) l'expression et/ou l'activité des composants de ces machineries est modulée, montrant qu'une régulation de la modification des ARNr a lieu (Belin et al. 2009; Recher et al. 2013; Watanabe-Susaki et al. 2014; Yoon et al. 2006; Ruggero et al. 2003; Koh et al. 2011; Su et al. 2013). Cette régulation témoigne de l'existence de voies permettant de réguler l'activité de ces complexes.

Ce travail avait pour objectif d'apporter de nouvelles informations concernant la régulation de l'activité de la machinerie de méthylation des ARNr, à travers l'étude de la fibrillarine humaine, enzyme responsable de la catalyse de la 2'-O-méthylation, et en particulier le rôle de ses modifications post-traductionnelles.

III.1. Mise en place d'un modèle structural de la fibrillarine humaine

Bien que nous ne disposions pas d'information concernant la structure du complexe snoRNP à boîtes C/D humain et la position de la fibrillarine au sein de ce complexe, les informations disponibles sur la structure des complexes sRNP chez les archées sont abondantes. Ces données issues des archées ont été exploitées afin de mettre en place un modèle structural de FBL humaine et d'extrapoler des données structurales et fonctionnelles sur le complexe humain. Ce travail s'est appuyé sur des études au cours desquelles les données structurales disponibles sur les sRNP archées ont été utilisées pour comparer les complexes snoRNP homologues eucaryotes, et également pour extrapoler des informations structurales (Watkins et Bohnsack 2012; J. P. Bachellerie, Cavaillé, et Hüttenhofer 2002; Hamma et al. 2005; Charron et al. 2004)

III.1.1. Conservation de la structure de FBL

La comparaison des structures tridimensionnelles a révélé une extrême conservation de structure de FBL entre les versions archées et humaine. La conservation est non seulement apparente visuellement (figure 22), mais est en plus renforcée par les scores d'alignement 2 à 3 fois inférieurs à ceux obtenus pour l'alignement des histones H4 (figure 21) dont la conservation est déjà connue (Pereira et Reeve 1998). Notamment, cette conservation est bien plus importante qu'entre les séquences en acide animé, indiquant que le mécanisme de fonctionnement de FBL soit très proche entre les archées et les eucaryotes. Ainsi, nous pouvons postuler que les modalités de positionnement de la FBL face à son substrat ARNr au sein du complexe de méthylation soit bien plus conservées que ne l'évoque la conservation de séquence des protéines et des snoARN C/D.

Ces résultats ont permis de mettre en place un véritable modèle de travail permettant de modéliser le fonctionnement de la FBL humaine. Ce modèle a été exploité pour l'analyse des MPT de FBL, pour mettre à jour la carte de ses domaines fonctionnels (partie II.1.2) et proposer un mécanisme de transméthylation par la FBL humaine (II.1.3).

III.1.2. Nouvelle carte linéaire de la structure de la FBL humaine

Le modèle d'alignement des FBL humaine et archées permet de mieux cartographier la FBL humaine. Il permet de modéliser la position de ses domaines fonctionnels vis-à-vis des partenaires protéiques et ARN au sein du complexe snoRNP, et ainsi de prédire ou confirmer le rôle des différents domaines dans l'interaction avec Nop56/Nop58, 15.5kDa, le pré-ARNr substrat, le snoARN ou le S-adénosyl-méthionine (figure 52). On a ainsi constaté que seuls quatre résidus de FBL font contact avec 15.5kDa, tandis que Nop58 (dans le cas d'une FBL positionnée au niveau des boîtes C/D) forme des contacts avec plusieurs régions de FBL, dont certaines sont étendues (environ une vingtaine de résidus). Les contacts potentiellement formés par Nop56, incluent une région formant des contacts avec Nop58, suggérant que cette région est capable d'établir une interface avec trois protéines différentes. Des modifications post-traductionnelles sont présentes dans cette région (figure 52B), indiquant un rôle potentiel de ces MPT dans la régulation de ces interactions.

D'autre part, ce modèle structural permet de prédire les points de contacts entre FBL et le duplexe formé entre le snoARN C/D et le pré-ARNr (figure 52 C). Les données de la littérature argumentent en faveur d'un domaine de liaison à l'ARNr en deux parties (chez les plantes), avec une partie centrale et une partie C-terminale (Rakitina et al. 2011). Le modèle structurale prédit cependant 6 points de contacts directs avec les ARN. Ces informations n'excluent pas la possibilité de deux domaines principaux d'interaction avec les ARN, puisque les régions de FBL n'interagissant pas directement avec l'ARN peuvent malgré tout être requises pour la bonne conformation des points de contact. C'est notamment ce qui a été suggéré pour le motif caractéristique de liaison aux ARN GL/VVYAVEF, localisé dans le région centrale de FBL (Aris et Blobel 1991; Rakitina et al. 2011). De plus, ces régions pourraient être liées à l'interaction de FBL avec des ARN dans le contexte d'autres mécanismes moléculaires impliquant FBL tels que les ARNm (Yoshikawa et al. 2011; Yanagida et al. 2004; Tollervey D, personal communication, EMBO conference, 2015).

Par ailleurs, on remarque la présence d'un cluster de MPT dans une zone du complexe pour laquelle aucune interaction ou rôle particulier n'a été rapporté. Ces MPT, d'après le modèle, ne sont pas en position pour interagir avec Nop56 ou Nop58, ni avec 15.5kDa ou les ARN du complexe. Il est possible que la conformation du complexe snoRNP à boîtes C/D

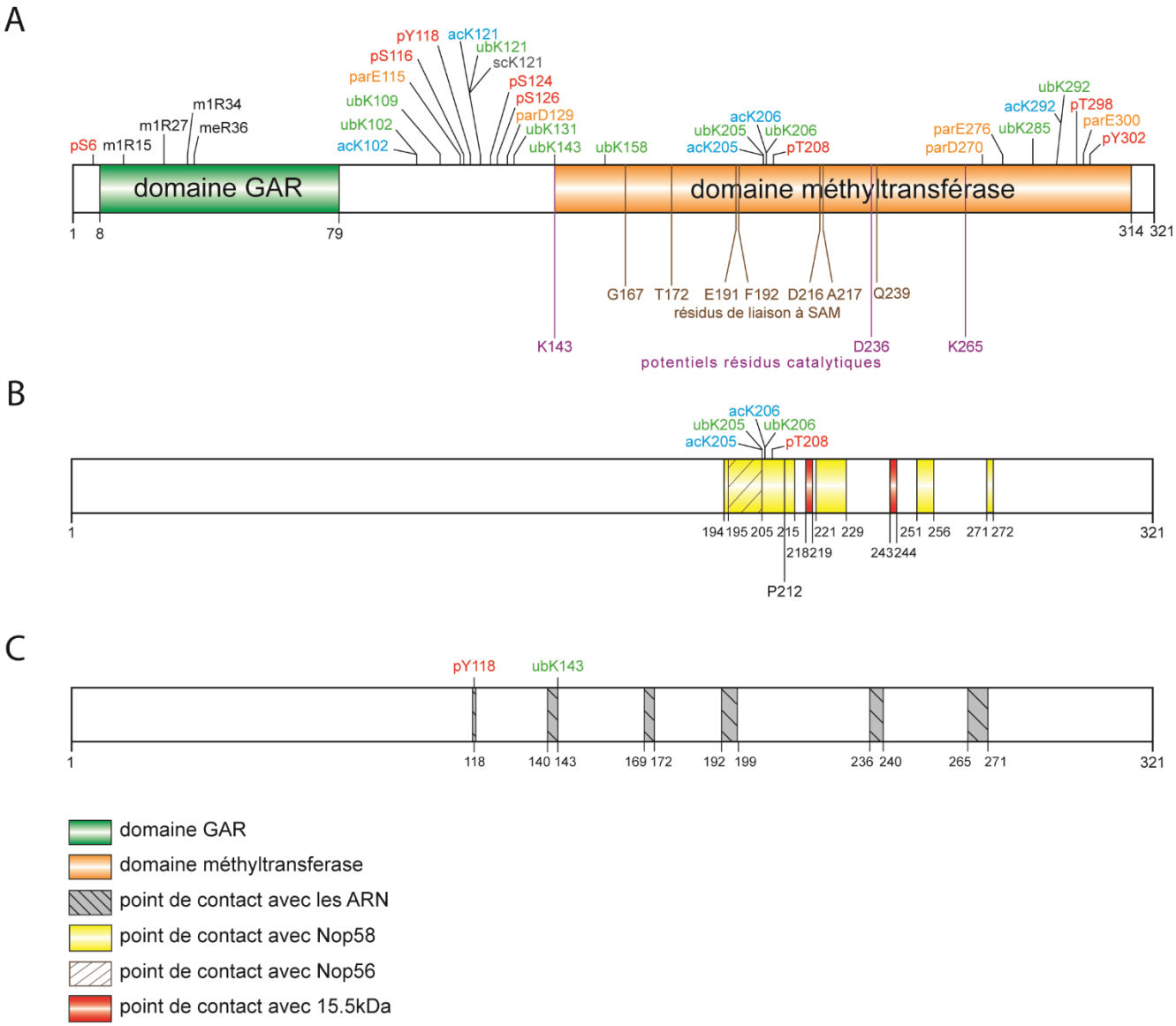


Figure 52 : Domaines de la fibrillarine humaine et surfaces de contacts au sein du complexe snoRNP C/D

A, Représentaion linéaire de la structure de la fibrillarine humaine et de ses domaines structuraux. Au dessus de la structures sont indiquées les modifications post-traductionnelles de FBL référencées à ce jour dans la littérature, et mises à jour avec les données obtenues au cours de ce travail de thèse. En dessous sont indiqués les résidus ayant une potentielle implication dans l'activité de FBL : ceux jouant une rôle dans la liaison au S-adénosyl-méthionine (SAM), et les potentiels résidus catalytiques, d'après la littérature et le données de ce travail.

B, Représentation linéaire de FBL montrant les régions de contact avec Nop58 (jaune), Nop56 (vert hachuré), et 15.5kDa, pour une FBL position sur les boîtes C/D.

C, Représentation linéaire de FBL montrant les régions de contact avec le duplex snoARN-ARNr.

Phosphorylations (p, rouge), acétylations (ac, bleu claire), ubiquitinylations (ub, vert claire), poly(ARD-ribose)ylation (par, oange claire dans la structure linéaire, orange pâle dans la structure tertiare), succinylation (sc, gris).

humain diffère de celle présentée par ce modèle, et que chez l'homme ces résidus soient en réalité placés pour interagir avec les différents partenaires ARN et protéines. Il est également possible que ces résidus régulent l'interaction avec d'autres partenaires que les protéines essentielles au complexe, ou simplement qu'ils impactent sur la conformation de la FBL, ou contrôlent les interactions de FBL avec des protéines au cours de l'assemblage du complexe. Cependant, même d'après la structure du pré-complexe publiées par Bizarro et al., ces résidus ne présentent pas d'interaction connues avec les facteurs de l'assemblage (Bizarro et al. 2014; ce travail).

III.1.3. Proposition d'un mécanisme de transméthylation pour la FBL humaine

Le mécanisme de transméthylation de FBL est aujourd'hui inconnu quel que soit l'espèce. D'après les données de la littérature (Woodard et al. 1980; Aittaleb et al. 2003; Motorin et Helm 2011), la réaction de transméthylation serait une substitution nucléophile de type II déclenchée par un groupement basique. Notre modèle structural suggère que la lysine 265 serait le résidu déclenchant la réaction dans la FBL humaine.

Ce travail montre que la lysine 143 chez l'homme (K60 chez *S. Solfataricus*) est également un bon candidat pour déclencher la transméthylation. Son groupement NH_2 est localisé plus proche du groupement OH que celui de K265, mais plus loin du groupement méthyl de la SAM. Il est donc possible que K143 déclenche la réaction et que K265, localisé à distances égales des groupements substrats stabilise l'état de transition. Quoiqu'il en soit, d'après le modèle, la lysine 265 participerait à la réaction de transméthylation, soit en la déclenchant, soit en stabilisant son état de transition.

Les données concernant le mutant flag-FBL-K265A montrent que ce résidu n'est pas requis pour la stabilité ni de localisation de FBL dans les nucléoles et les corps de Cajal. Par ailleurs, l'analyse de l'assemblage de la flag-FBL-K265A dans le complexe de méthylation a révélé une moins bonne association de cette dernière avec Nop56 et 15.5kDa. Ce résultat devra être reproduit avant de conclure sur un défaut d'assemblage de ce mutant.

La caractérisation de ce mutant, en particulier de ses fonctions de clivage des ARNr et de méthylation sera importante, car disposer d'une forme de la FBL défective uniquement

pour la méthylation sera un outil très informatif pour explorer le rôle de la méthylation dans le fonctionnement du ribosome et le contrôle de la traduction.

Ce modèle structural pourra être utilisé pour identifier d'autres acides-aminés dont la mutation pourrait répondre à ce besoin de disposer d'une FBL ayant perdu sélectivement sa fonction de méthylation.

III.2. Régulation de la fibrillarine

La fibrillarine est une protéine aux fonctions multiples, impliquée de façon claire dans la méthylation des ARNr voire d'autres ARN, dans la méthylation de protéines et dans le clivage des pré-ARNr. FBL établit des interactions avec de nombreux partenaires y compris des partenaires dont le lien fonctionnel avec la biogenèse des ribosomes n'est aujourd'hui pas évident, suggérant qu'elle soit impliquée dans d'autres mécanismes cellulaires. Il ne fait aucun doute que ces diverses activités de FBL soient régulées. Les modifications post-traductionnelles identifiées ou proposées pour la FBL sont assez nombreuses et représentent une source de mécanismes de régulation à explorer. Ce travail avait pour objectif d'initier cette exploration.

III.2.1. Mise en place d'une modèle d'étude de FBL

L'étude des relations structure-fonction et des modifications post-traductionnelles sont classiquement basées sur l'utilisation de mutants ponctuels. L'utilisation de FBL taguée avec la GFP dans au moins trois études (Marcel et al. 2013; Snaar et al. 2000; Lechertier et al. 2009) nous a conforté dans ce choix et nous avons développé un modèle basé sur le 3xflag. Afin d'analyser les aspects fonctionnels de flag-FBL mutants, un modèle cellulaire a été développé, exprimant de manière inductible la 3xflag-FBL, sauvage ou mutée, ainsi qu'un shARN ciblant la région 3'UTR de l'ARNm de la FBL endogène. Les résultats montrent une expression modérée, et une stabilité ainsi qu'une localisation de la flag-FBL-WT semblable à celle de la FBL endogène dans les cellules HCT116 flagsh. De plus, la flag-FBL-WT s'assemble correctement dans les particules snoRNP. Ces résultats montrent que la flag-FBL-WT se comporte comme la FBL endogène et indique que la lignée cellulaire HCT116 flagsh est un modèle pertinent pour l'étude de la fonction de FBL.

III.2.2. Existence d'un rétrocontrôle négatif du niveau de fibrillarine cellulaire

De façon intéressante, l'expression forcée d'une flag-FBL (sans le shARN) a eu pour conséquence de diminuer l'expression de la FBL endogène. L'idée d'une régulation du niveau de FBL avait également émergé dans l'équipe après l'établissement de lignées stables GFP-FBL par transfection (données non montrées). Dans cette expérience, seuls les clones exprimant au plus 2-3 fois le niveau de FBL endogène ont pu être sélectionnés. Des données de la littérature ont également montré une baisse de l'expression de la FBL endogène dans des conditions de surexpression de la GFP-FBL dans des cellules HeLa (Lechertier et al. 2009). Le résultat obtenu avec des flag-FBL inductibles montrent qu'il existe un rétrocontrôle permettant de limiter l'expression de la FBL en fonction de la quantité disponible dans la cellule. Le mécanisme, qu'il soit transcriptionnel ou post-transcriptionnel reste à explorer. Les données de stabilité indiquent un comportement similaire entre flag-FBL et la FBL endogène suggérant que les mécanismes en place ne s'appuient pas sur la dégradation de FBL.

III.2.3. Rôle de Nop56 dans la fonction de FBL

Tollervey et al. ont précédemment décrit un mutant de Nop1 (homologue de FBL chez la levure), Nop1.3, portant deux mutations ponctuelles, et totalement défaillant pour l'activité de 2'-O-methylation des ARNr. Ce mutant conserve cependant son activité de clivage des ARNr (David Tollervey et al. 1993). Ces résultats indiquent que les différentes fonctions de Nop1 sont portées par différents domaines structuraux. Dans l'objectif de tirer profit de ces données chez la levure, et d'apporter des informations nouvelles sur les relations structure-fonction de la FBL humaine, j'ai étudié le mutant Nop1.3 et la position des résidus mutés vis-à-vis du modèle d'étude structural de FBL. En particulier, un de ces deux résidus, une proline (P212 chez l'homme), est prédit pour être positionnée directement à l'interface avec Nop56 ou Nop58 (figures 26B et 26C).

Les résultats obtenus avec le mutant flag-FBL-P212A en transfection et dans les lignées flagsh inductibles vérifient l'hypothèse faite avec le modèle structural, et montrent que ce mutant est partiellement déficient pour l'interaction avec Nop56 (figures 42B et 46B). En l'état, nous ne pouvons cependant pas conclure sur l'importance de la P212 elle-même ou de

son impact sur la structure de FBL. En effet, la proline est un "briseur d'hélices" et il est possible que le défaut d'interaction ne survienne pas simplement de la mutation du résidu lui-même, mais plutôt d'un changement de conformation du brin β3 qui empêche ainsi l'interaction avec Nop56. Bien que nous n'ayons pas testé l'activité méthyltransférase de la flag-FBL-P212A, on peut prédire qu'elle sera au moins fortement diminuée puisque Nop56 est requis pour la 2'-O-méthylation des ARNr.

En plus de la baisse d'interaction avec Nop56, le mutant flag-FBL-P212A interagit moins avec 15.5kDa (figure 42B). Le fait qu'un mutant interagissant peu avec Nop56 interagisse peu avec 15.5kDa, confirme les travaux de Lechertier et al, qui montrent que FBL et Nop56 interagissent avant d'être co-assemblées dans le complexe (Lechertier et al. 2009). Ces résultats permettent donc de renforcer les données disponibles sur l'assemblage du complexe snoRNP C/D et renforcent l'hypothèse que FBL est intégrée à ce complexe via son interaction avec Nop56 et Nop58 (Lechertier et al. 2009; Bizarro et al. 2014), et suggèrent que l'interaction de FBL avec Nop56 et un prérequis à son assemblage dans le complexe de méthylation.

Par ailleurs, le mutant flag-FBL-P212A, présente une expression plus faible que la flag-FBL-WT et les autres mutants analysés (figures 42A, 42B et données non montrées). Ce faible niveau d'expression est probablement dû à une stabilité significativement plus faible et à une dégradation plus rapide par le protéasome de ce mutant (figure 42C). Ces données, ainsi que le défaut d'interaction du mutant flag-FBL-P212A avec Nop56, permettent de faire l'hypothèse que l'interaction de FBL avec Nop56 joue un rôle dans la régulation de la stabilité et de la dégradation de FBL. L'étude de la demi-vie de FBL en fonction de l'expression de Nop56 (siARN ou surexpression) permettrait de valider cette hypothèse.

Enfin, la littérature rapporte que la délocalisation de FBL du DFC vers le GC induit une délocalisation similaire de Nop56 et réciproquement (Lechertier et al. 2009). L'interaction de ces deux protéines permet donc un contrôle mutuel de leur localisation nucléolaire. Les résultats obtenus dans ce travail de thèse montrent que le mutant flag-FBL-P212A n'est pas entièrement localisé dans les nucléoles et les corps de Cajal, et qu'une majeure partie est localisée dans le nucléoplasme. Il serait donc intéressant, à ce stade de déterminer si le défaut d'interaction de FBL avec Nop56 est responsable de cette délocalisation.

III.2.4. Les modifications post-traductionnelles de la fibrillarine

III.2.4.1. La fibrillarine humaine est majoritairement modifiée

Plusieurs études protéomiques rapportent l'existence de MPT de FBL et ont posé le principe que la FBL est une protéine portant vraisemblablement un nombre important de modifications (Mertins et al. 2013; Choudhary et al. 2009; Grosstessner-Hain et al. 2011; Stuart et al. 2015). Ces modifications n'ont cependant pas été validées par d'autres approches et leur rôle n'a pas été exploré. Par ailleurs, les approches protéomiques utilisées n'ont pas permis de préciser la représentation de chaque modification. Dans la phase préliminaire de ce travail, l'ambition était d'identifier les modifications les plus représentées en combinant électrophorèse bidimensionnelle et protéomique. Malheureusement, diverses difficultés techniques, dont certaines ont été exposées (IP, qualité des 2D en pI basique), m'ont poussé à reconsidérer ces objectifs, et à me focaliser sur une approche candidat.

Les résultats obtenus en 2D-western blot permettent de montrer l'existence de modifications post-traductionnelles multiples de la FBL humaine dans trois lignées de cellules cancéreuses, et montrent qu'une large proportion de FBL est modifiée (figure 31). Les formes modifiées de FBL sont conservées dans différentes lignées dont les HCT116 et HeLa. Le fait que la majorité de FBL apparaisse modifiée suggère un rôle fonctionnel important des MPT. Les formes les plus abondantes sont également conservées dans les cellules MCF7 et pourraient être importantes du point de vue fonctionnel.

Le nombre élevé de formes modifiées de FBL et leur abondance suggère que la FBL fonctionnelle est porteuse de plusieurs modifications post-traductionnelles et renforce l'intérêt d'investiguer leur rôle.

III.2.4.2. PARylation de FBL

La PARylation est une modification multifonctionnelle impliquée dans plusieurs processus cellulaires. 50% de la PARylation cellulaire est localisée dans les nucléoles. L'altération de l'activité de PARP1 cause une délocalisation de FBL, ainsi qu'un blocage de la maturation des ARNr (Kotova, Jarnik, et Tulin 2009; Abd Elmageed et al. 2012; Boamah et al. 2012).

Les résultats obtenus suggèrent que la FBL humaine est PARylée (figure 34). Il conviendra de confirmer l'identité de la bande en combinant la surexpression de la flag-FBL avec le traitement à l'H_2O_2 et l'inhibition de l'expression de PARG par siARN. Par ailleurs, l'immunoprécipitation de la flag-FBL dans des cellules exprimant la flag-FBL, traitées ou non à l'H_2O_2 permettra d'analyser la présence de PARylation avec un anticorps anti-PAR dans les produits d'IP en western blot.

La taille et l'encombrement stérique généré par la PARylation suggère que la PARylation de FBL pourrait inhiber l'interaction de FBL avec ses partenaires. Cependant, les résidus PARylés sont positionnés de manière externe dans le modèle d'alignement des FBL humaine et archées, assez loin des partenaires, et ne sont probablement pas susceptibles d'inhiber les interactions essentielles au complexe. Au contraire, la PARylation est impliquée dans la formation de complexes multi-protéiques via son activité de « scaffold » (Malanga et Althaus 2011). Cela suggère que la PARylation de FBL peut avoir un rôle dans le recrutement de protéines partenaires, et dans sa rétention par interactions protéine-protéine dans les corps de Cajal et le nucléole. Les résidus rapportés PARylés ne sont pas tous conservés entre les différentes FBL, notamment peu chez les archées. Cela suggère des divergences fonctionnelles à ce niveau de régulation de FBL.

III.3. Impact de l'acétylation sur l'assemblage du complexe de méthylation.

Comme mentionné précédemment, ce travail de thèse vise à apporter de nouvelles données sur la régulation de FBL. Parmi les nombreuses modifications post-traductionnelles connues pour FBL, cette étude s'est en partie focalisée sur l'acétylation, avec pour objectif de décrypter les voies responsables de cette modification, et son rôle dans la fonction de FBL.

III.3.1. Acétylation de FBL

Les manipulations effectuées au cours de ce travail de thèse ont montré par plusieurs approches que FBL est acétylée. Pour la première fois une acétylation en position K292 a été identifiée. Cette MPT n'a jusqu'à aujourd'hui pas été rapportée dans la littérature chez l'homme. Elle a cependant été détectée chez la souris (Weinert et al. 2013). Cette conservation suggère une fonction conservée entre les deux espèces.

De façon intéressante, le niveau d'acétylation de la lysine 292 apparait très peu variable, malgré plusieurs approches employées pour altérer cette modification. Notamment, le niveau d'acétylation en position K292 reste inchangé malgré une baisse du niveau total de FBL dans les cellules transfectées avec un siARN FBL (annexe, figure A1D). Cela suggère soit que le niveau d'acétylation est très régulé, et par conséquent qu'un plus fort taux de FBL est acétylé lorsque l'expression de celle-ci diminue, soit que la FBL acétylée en position K292 est plus stable que la FBL non acétylée. Ces résultats rejoignent les observations faites en 2D western blot, où après siARN FBL une petite fraction des spots observés ne présente qu'une très faible diminution d'intensité (figure 30B). Ces résultats permettent de faire l'hypothèse que l'acétylation de FBL en position 292 augmente sa stabilité. L'analyse de la stabilité du mutant FBL-K292A n'a cependant pas révélé de variation par rapport à la flag-FBL-WT. Il faudra donc analyser la stabilité des flag-FBL-WT et K292A dans des conditions ou l'acétylation de FBL est induite, pour tester cette hypothèse.

De plus, nos résultats montrent l'absence d'altération de l'acétylation de FBL par les traitements aux HDIs ou par inhibition de SIRT7 et surexpression de CBP. Cela suggère que ces conditions sont inadaptées à l'induction de l'acétylation de FBL, ou que le niveau d'acétylation

est très régulé et est difficilement modifiable. Afin de confirmer ces résultats, la flag-FBL dans des cellules surexprimant CBP et où SIRT7 est inhibée est en cours d'analyse par spectrométrie de masse.

Ainsi, les voies contrôlant l'acétylation de FBL restent à caractériser. L'importance de l'acétylation dans le métabolisme des ARN et la formation de complexes protéiques (Choudhary et al. 2009) renforce l'intérêt et la pertinence d'explorer cette modification. De plus, plusieurs lysines acétylées (K205 et K206) ont des positions cruciales dans le complexe de méthylation (observation du modèle structural), et leur modification pourrait être régulatrice de la fonction de FBL.

III.3.2. Impact de SIRT7 et CBP sur l'assemblage du complexe de méthylation

Bien que l'induction de l'acétylation de la flag-FBL n'ait pas été détectée dans notre modèle cellulaire, l'interaction de FBL avec les protéines du complexe snoRNP C/D sont apparues diminuées dans les cellules sous-exprimant SIRT7 ou sur-exprimant CBP. En effet, l'inhibition de l'expression de SIRT7 et la surexpression de CBP induisent une baisse de l'interaction de FBL avec Nop56, Nop58 et 15.5kDA. Il est donc possible que l'acétylation de FBL soit induite de manière non détectable en IP et western blot, mais suffisante pour altérer son assemblage dans le complexe. Il est également possible que SIRT7 et CBP régulent l'acétylation d'autres protéines, soit celles du complexe de méthylation soit d'autres facteurs impliqués dans la maturation du complexe. Par exemple, Nop56, Nop58 et 15.5kDa sont également acétylées (www.phosphositeplus.org). Dans la même idée, SIRT7 participerait à la régulation de la biogenèse des ribosomes, et déacétyle notamment la protéine U3-55k, membre du complexe snoRNP C/D U3, dont fait aussi partie FBL (S. Chen et al. 2016).

Afin de déterminer si CBP et SIRT7 régulent l'interaction de FBL avec ses partenaires, leur impact sur l'interactome de FBL est en cours d'analyse par spectrométrie de masse, à partir des produits d'IP-flag de cellules HCT116 flagsh-WT ou K292A, transfectées ou non avec le siARN SIRT7 et/ou surexprimant CBP.

Les mécanismes d'assemblage du complexe snoRNP à boîtes C/D *in vivo* est en cours d'élucidation et mettent en évidence la complexité et l'abondance des facteurs requis (Bizarro et al. 2014). Les voies de régulations de l'assemblage de ce complexe, ainsi que de son désassemblage ne sont pas encore connues. SIRT7 et CBP sont des enzymes régulant l'acétylation de nombreuses protéines, et l'activité de SIRT7 a notamment été liée à la régulation de la biogenèse des ribosome (Y.-C. Tsai, Greco, et Cristea 2014; S. Chen et al. 2016). Il est donc probable, que de manière directe ou non ces enzymes régulent l'activité de FBL et/ou du complexe de méthylation. Afin d'approfondir l'élucidation de cette voie de régulation, la 2'-O-méthylation des ARNr dans des cellules exprimant différentiellement SIRT7 et CBP sera analysée, par la technique RiboMeth-Seq.

III.4. Altération de la biogenèse des ribosomes et de la fonction de FBL par le 5-FU

Le 5-FU est une molécule largement utilisée en chimiothérapie, mais dont les mécanismes de cytotoxicité sont encore mal connus. Cependant, son action toxique serait liée à l'altération du métabolisme des ARN. De façon intéressante, le 5-FU s'intègre dans tous les ARN de la machinerie de traduction (ARNr, ARNt, ARNm). De plus, les données de la littérature (Burger et al. 2010), ainsi qu'une étude complète de notre équipe (Thérizols et al. en préparation) montrent que le 5-FU réduit, voire inhibe, la production de ribosomes en bloquant le clivage des ARNr. Cette action du 5-FU est accompagnée d'une altération de l'ultrastructure du nucléole : le composant fibrillaire dense et le composant granulaire disparaissent, au profit d'une structure d'aspect intermédiaire, suggérant une relocalisation des particules du DFC dans ce dernier (Therizols et al. en préparation). Dans ce contexte, se posent, d'une part, la question de l'impact du 5-FU sur la FBL et son activité, et d'autre part, la question de l'intervention de FBL dans la cytotoxicité du 5-FU.

III.4.1. Impact de FBL sur la cytotoxicité du 5-FU, et rôle dans l'altération de la maturation des ARNr

L'impact du 5-FU sur la maturation des ARNr (Burger et al. 2010; Ghoshal et Jacob 1997; Thérizols et al. en préparation) suggère une contribution de ce processus dans la cytotoxicité du 5-FU. FBL étant une enzyme majeure de la biogenèse des ribosomes, elle peut être un acteur important dans la toxicité du 5-FU. L'inhibition de l'expression de FBL accélère la cytotoxicité du 5-FU (Figure 51). Ces résultats indiquent que la FBL n'est pas requise pour la cytotoxicité du 5-FU. Les nouvelles lignées produites dans ce travail seront utilisées pour analyser l'impact de la surexpression de FBL sur la réponse au 5-FU.

Dans l'équipe, G. Thérizols a analysé l'impact du 5-FU sur le clivage des pré-ARNr. Le 5-FU inhibe le clivage au niveau de l'ITS-1, probablement au niveau du site 2 (Thérizols et al. en préparation). L'analyse du clivage des pré-ARNr dans des levures ou des cellules HeLa déficientes pour la FBL montrent un défaut de maturation de l'ETS1 probablement au niveau du site A_0 (Tafforeau et al. 2013; David Tollervey et al. 1993; Erales et al en préparation). Ces

données indiquent que l'inhibition du clivage des ARNr par le 5-FU ne dépend pas de son action sur FBL.

III.4.2. Impact du 5-FU sur l'acétylation et l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation

L'induction de la délocalisation de FBL, et l'absence de variation d'expression sous 5-FU nous a conduits à analyser les modifications post-traductionnelles de FBL. Les résultats montrent que le 5-FU provoque un changement de profil de MPT de FBL, et en particulier induit l'acétylation de la lysine 292, jusqu'ici jamais montrée chez l'homme. L'analyse en spectrométrie de masse de la flag-FBL immunoprécipitée dans des cellules traitées ou non au 5-FU est en cours et permettra de renforcer ces observations.

Dans le but d'identifier les voies par lesquelles le 5-FU est susceptible d'agir sur FBL, le rôle de plusieurs HDACs et d'une acétylase sur l'induction de l'acétylation par le 5-FU a été testé. Les résultats montrent que l'effet inducteur d'acétylation du 5-FU ne se synergise pas avec l'inhibition de SIRT7 ou la surexpression de CBP, ni avec les traitements avec les inhibiteurs de HDACs TSA et NaB. Les voies responsables de l'induction de l'acétylation de FBL sont donc, pour le moment, toujours inconnues.

De façon intéressante cependant, l'induction de l'acétylation de FBL par le 5-FU est accompagnée d'un défaut d'assemblage de FBL dans le complexe snoRNP C/D (figures 46A et 48). Par ailleurs, l'inhibition de SIRT7 et la surexpression de CBP accentuent l'inhibition de l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation. De plus, la combinaison 5-FU avec l'inhibition de SIRT7 et la sur-expression de CBP induit la dissociation totale de FBL du complexe de méthylation. Cette altération peut être due à des changements de MPT de FBL (non détectés dans nos conditions) ou des changements de MPT ou d'expression d'autres protéines du complexe de méthylation ou des facteurs de son assemblage. La synergie de la perte d'interactions de FBL avec ses partenaires permet de poser l'hypothèse que le 5-FU, SIRT7 et CBP interviennent dans une même voie fonctionnelle (ex. acétylation d'une même protéine) pour altérer l'assemblage du complexe, ou qu'ils fassent partie de plusieurs voies qui se complémentent.

Il est tentant d'envisager que l'acétylation de la lysine 292, induite par le 5-FU, joue un rôle dans la perte d'interaction de FBL avec ses partenaires. Cependant, ce résidu n'est pas positionné près d'un partenaire au sein du complexe de méthylation, d'après le modèle structural, suggérant qu'il n'est pas impliqué dans l'interaction avec les différents partenaires au sein de ce complexe. Et bien qu'un rôle dans l'interaction avec d'autres partenaires ou des facteurs d'assemblage ne soit pas exclu, les dernières données disponibles sur l'assemblage du complexe ne permettent pas de prédire la position de ce résidu vis-à-vis d'un facteur d'assemblage (Bizarro et al. 2014; ce travail).

L'analyse en cours des protéines co-immunoprécipitées avec la flag-FBL, dans les cellules traitées ou non au 5-FU (sur)exprimant ou non CBP et un le siARN SIRT7, par spectrométrie de masse devrait renforcer ces observations, et apporter de nouvelles informations sur les conséquences de ces traitements sur la fonction de FBL.

III.4.3. Causes et conséquence de la perte de l'assemblage de FBL sous 5-FU

Les changements d'interaction de FBL avec ses partenaires protéiques sous 5-FU sont cohérents avec les données sur la réorganisation du nucléole et la perte du DFC. En effet, les résultats obtenus suggèrent que la délocalisation de FBL dans le GC induit la perte partielle de l'interaction avec ses partenaires protéiques, et que ce phénomène ne serait qu'un aspect d'une altération plus générale des processus de maturation des ARNr et de l'assemblage des sous-unités. L'analyse d'autres complexes bien caractérisés, tels que les snoRNP H/ACA, permettrait de mieux apprécier l'impact du 5-FU sur l'assemblage des nombreux complexes moléculaires qui régissent la biogenèse. Cette hypothèse expliquerait la baisse globale des interactions protéine-protéine de FBL sous 5-FU, observée en coloration à l'argent (figure 49). Une partie des interactions du complexe snoRNP C/D pourrait cependant être conservée, comme le suggèrent les données de la littérature sur l'interaction et la délocalisation mutuelle de FBL et Nop56 (Lechertier et al. 2009). Cette hypothèse amène également un autre questionnement : est-ce que la délocalisation de FBL est responsable de la dissociation de ses interactions, ou est-ce que cette perte d'interaction est la cause de la délocalisation de FBL ?

Une autre hypothèse concernant la dissociation de FBL du complexe snoRNP est l'intégration de 5-FU dans les ARNr et/ou snoARN. En effet, le 5-FU s'intègre massivement dans de nombreux ARN. De façon intéressante, les doses utilisées en clinique ne semblent pas bloquer la synthèse, mais altère le métabolisme des ARN correspondants (Pettersen et al. 2011). Le 5-FU s'intègre dans les ARNr, et même en partie dans les ribosomes matures (Therizols et al., en préparation), il est donc possible que certaines interactions protéine-ARNr et que certains repliements de l'ARNr ne se déroulent pas correctement en présence de 5-FU dans certaines régions du pré-ARNr. Dans ces conditions, il a été montré que le complexe snoRNP à boîtes C/D U3, dont fait partie FBL, interagit toujours avec le pré-ARNr, suggérant que l'intégration de 5-FU dans l'ARNr en cours de maturation n'est pas suffisante pour dissocier ce complexe. Cependant, la présence de FBL dans le complexe snoRNP U3 n'a pas été vérifiée (Ghoshal et Jacob 1997), et les données disponibles ne permettent pas de savoir si FBL est toujours en mesure d'exercer ses fonctions dans la maturation des ARNr. Par ailleurs, le 5-FU s'intègre vraisemblablement dans les snoARN. Aujourd'hui, les informations disponibles ne permettent pas de déterminer si cela aurait un impact sur la formation du complexe de méthylation ou sa fonction. Cependant, les études de la structure du complexe de méthylation chez les archées suggèrent que l'introduction de résidus fluorés dans le snoARN à boîtes C/D pourrait impacter sur sa structure et donc sur sa fonction.

III.5. Conclusion générale

Le manque d'informations structurales et fonctionnelles sur la fibrillarine humaine, limite aujourd'hui notre compréhension de la régulation de la 2'-O-méthylation des ARNr et du rôle de cette modification dans la régulation de la traduction. Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont permis d'apporter de nouvelles informations sur la régulation de la fibrillarine humaine.

Les données tirées du modèle structural permettent de dresser une nouvelle carte de la structure de FBL, qui pourra être exploitée pour l'étude des relations structure-fonction et de la régulation de FBL par les modifications post-traductionnelles. Les résultats obtenus valident une hypothèse faite à partir de ce modèle selon laquelle le mutant FBL-P212A est déficient pour l'interaction avec Nop56.

Une multitude de modifications post-traductionnelles de FBL ont été mises en évidence, et certaines formes de FBL sont apparues très abondantes. Le rôle de ces modifications sur l'activité de la fibrillarine, et sur la maturation et l'assemblage des ribosomes devront être explorés. De plus, l'analyse des modifications de FBL pourra être effectuée dans les tumeurs de cancers du sein et du côlon, deux pathologies pour lesquelles l'expression de la fibrillarine semble jouer un rôle significatif.

De plus, les données récoltées ont permis de proposer un mécanisme d'action du 5-FU, qui induit l'acétylation de FBL et altère son activité, via une dissociation de l'interaction avec ses partenaires protéiques. Bien que les voies qui régulent cette acétylation ne soient pas identifiées, il est apparu que SIRT7 et CBP participent au contrôle de l'assemblage du complexe de méthylation. Ce rôle de l'acétylation dans l'assemblage du complexe snoRNP à boîtes C/D est nouveau et ouvre de nouvelles pistes à explorer pour investiguer la régulation de la 2'-O-méthylation des ARNr.

Le ribosome est un champ de la biologie vivant actuellement un tournant conceptuel et qui place désormais le ribosome comme un acteur direct de la régulation de la synthèse protéique. Le concept de "ribosome spécialisé" regroupe 3 idées ayant des répercutions majeures sur notre vision du ribosome, mais également sur notre façon de l'étudier : ce ribosome régulateur est hétérogène ; ses fonctions varient selon sa composition ; et ces variations sont codées génétiquement.

Ces idées mettent en évidence la nécessité de bien comprendre quelles sont ces variations dans les contextes physiologiques et pathologiques, et comment celle-ci sont régulées. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse. Nous disposons de beaucoup de données sur les snoRNP, mais décrivant essentiellement les complexes et leurs mécanismes de fonctionnement. Les modalités de régulations de ces complexes restent à découvrir. Il est donc nécessaire aujourd'hui de poursuivre un travail de fond sur les mécanismes d'assemblage et de maturation des snoRNP, ainsi que sur les mécanismes qui régulent ces étapes de maturations.

Ce besoin est notamment marquant dans le domaine de la cancérologie, où l'altération de la biogenèse des ribosomes est devenue une marque reconnue de la cellule cancéreuse. Notre équipe, ainsi que d'autres groupes, sont en train de découvrir que FBL joue probablement un rôle dans la tumorigenèse et l'acquisition de caractères dits "d'agressivité" de la tumeur.

Le travail présenté ici s'inscrit dans ce besoin actuel de mieux comprendre, non seulement les mécanismes de fabrication des ribosomes, mais également comment leur hétérogénéité de composition est régulée. La fibrillarine, enzyme vraisemblablement unique de la 2'-O-methylation des ARNr, représente un modèle sans doute pertinent pour poursuivre ce travail.

IV. Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

Lignées

Les lignées HCT116, HeLa et MCF7 ont été obtenues auprès de l'ATCC. Les lignées HEK293, HEK293 SIRT1-KO, MEF et MEF SIRT1-KO ont gracieusement été procurées et préparées par le Dr. Davide Gaglio dans l'équipe du Dr P. Mulligan. Toutes les cellules sont cultivées à 37°C avec 5% CO_2 dans un incubateur humidifié. La lignée HCT116, a été cultivée dans du milieu DMEM Glutamax avec 10% de sérum fœtal de veau (SVF).

Les lignées HCT116 flag-FBL-WT, HCT116 sh1090, et HCT116 sh1090-flag-FBL (WT et mutants) ont été maintenues dans du DMEM Glutamax avec 10% SVF et 1µg/mL de puromycine pour la sélection, et les antibiotiques pénicilline et streptomycine. L'ensemencement de ces lignées pour une manipulation, a été effectué dans du DMEM Glutamax avec 10 % SVF.

La lignée HeLa, a été cultivée dans du milieu MEM avec de la glutamine et les acide aminés non-essentiels et avec 10% de SVF. Les lignées HeLa flag-FBL-WT et HeLa sh1090-flag-FBL (WT et mutants) ont été maintenues dans du MEM supplémenté avec de la glutamine 2mM, les acide aminés non-essentiels, 10% SVF et 2µg/mL de puromycine pour la sélection, ainsi que les antibiotiques pénicilline et streptomycine. L'ensemencement de ces lignées pour une manipulation, a été effectué dans du MEM avec de la glutamine et les acides aminés non-essentiels et avec 10% de SVF.

Les lignées MCF7 eGFP et MCF7 eGFP-FBL ont été cultivées dans du milieu DMEM Glutamax avec 10% SVF et supplémenté avec du sodium pyruvate et de l'insuline 1mM.

Transfection

Les cellules HCT116 ont été transfectées 48h après ensemencement. Les siARN ont été transfectés avec le réactif XtremeGene™ siRNA transfection (Sigma Aldrich®), selon les recommandations du fournisseur, avec les ratios 5 :1. Temps de transfection : siARN FBL, 72h ou 96h ; siARN SIRT7 (Dharmacon™), 72h. Les plasmides ont été transfectés avec le réactif XtremeGene™ HP transfection (Roche Applied Science®), avec un ratio de 3 :1. Temps de transfection : plasmides p3xflag-FBL, 48h ; plasmide pcDNA-HA-CBP, 48h.

Traitements

Les traitements au 5-FU ont été effectués à 10 µM ou 50 µM pendant 24h ou 48h. La Trichostatine A (Sigma Aldrich®) a été utilisée pendant 6h à 400 nM, le butyrate de sodium (Sigma Aldrich®) et le nicotinamide (Sigma Aldrich®) pendant 24 à 5 mM et 50 mM, respectivement. Ces traitements ont été effectués en ajoutant directement la molécule sur les cellules en culture.

Le traitement à l'H_2O_2 (Sigma Aldrich®), due à la nature éphémère de la PARylation a été effectuée sur des temps courts (Cf. section résultats), et les cellules ont été rapidement grattées sur glace dans du tampon Laemmli 1X afin d'éviter l'élimination de la PARylation.

Mesure de la prolifération cellulaire par xCELLigence

Le dispositif xCELLigence® (Roche Applied Science, Suisse), intègre une technologie dite « biosensor » qui permet de détecter la présence de cellules adhérentes grâce à la mesure de l'impédance électrique. L'impédance est une grandeur qui traduit l'opposition au courant électrique dans un matériel conducteur et dépend donc de la résistance imposée dans ce cas-là par les cellules. Les cellules sont déposées au fond d'un puits (type plaque 96 puits) tapissé d'électrodes en or. Ainsi, lorsque les cellules adhèrent aux électrodes elles génèrent un signal d'impédance électrique directement proportionnel à la surface qu'elles occupent. De cette manière, plus le nombre de cellules est élevé, plus le signal d'impédance électrique sera grand. Il devient alors possible de suivre la prolifération cellulaire en mesurant l'impédance à intervalles de temps réguliers.

Les cellules sont ensemencées à faible densité; de façon à suivre leur prolifération jusqu'à 7jours. Les cellules HCT116 et HCT116-shFBL ont été traitées 24h après ensemencement par des doses croissantes (1 à 100 µM) de 5FU. Le signal obtenu dans les cellules non traitées est utilisé comme contrôle de référence.

Fractionnement des noyaux et nucléoles

Ce protocoles est basé sur une mode opératoire mise au point et publié par notre équipe (Couté et al. 2006; Hacot et al. 2010). Toute la manipulation a lieu sur glace à moins

qu'il ne soit précisé autrement. Les cellules ont été rincées dans 500µL de PBS (50mM Na_2HPO_4, 150mM NaCl, pH 7.2) froid, puis grattées dans 500µL PBS froid. Une petite fraction de la suspension a été prélevée pour la fraction totale. Les suspensions ont été centrifugées 5 min à 500g à 4°C. Le volume du culot obtenu a été mesuré (Vol). Pour la suite du protocole, chaque volume a été calculé sur la base du volume initial du culot de cellules. Les culots de cellules ont été repris dans 15 vol. de tampon RSB (Tris-HCl 50mM pH7.4 ; NaCl 0.01M ; $MgCl_2$ 1.5 mM) froid et incuber 10 min dans la glace. 0,6 vol. de NP-40 à 10% (soit 0,2 - 0,3 % final) ont été ajoutés puis après homogénéisation, les cellules ont été lysés dans un Dounce de 0,4 mm de clairance (loose), en laissant les noyaux intacts (10 A/R). La suspension de cytoplasme et noyaux a été centrifugée 5 min à 1200g à 4°C. Une partie du surnageant a été prélevée pour la fraction cytoplasmes. Après élimination du surnageant restant, le culot de noyaux a été repris avec 10 vol. de tampon saccharose 0,25M (saccharose 0.25M, $MgCl_2$ 10mM). 10 vol. de tampon saccharose 0,88M (0.88M ; 0.05mM) ont été déposés sous la suspension de noyaux, et les suspensions ont été centrifugée 10 min à 1200g à 4°C. Le culot de noyaux résultant est ensuite repris dans le tampon de lyse Laemmli 1X (Tris-HCl 0.5M pH 6.8 ; SDS 1% ; DTE 10mM ; glycérol 10%) pour la purification des noyaux. Pour la purification des nucléoles, le culot de noyaux a été repris dans 10 vol. de tampon saccharose 0,34 M (saccharose 0,34M ; $MgCl_2$ 0.05mM) et une petite partie de la suspension de noyaux est prélevée pour la fraction nucléaire. La suspension de noyaux a ensuite été soniquées pendant 60 secondes, réglage à 40% d'amplitude. 10 vol. de tampon saccharose 0,88 M ont été déposés sous le sonicat, et la suspension a été centrifugée 20 min à 2000g à 4°C. Une partie du surnageant a été prélevée pour la fraction nucléoplasmique, et le culot de nucléoles a été repris purifiés dans un petit volume de tampon saccharose 0,34 M, puis dans un volume égal de tampon Laemmli 2X.

Extraction et dosage des protéines.

A moins qu'il ne soit précisé autrement (immunoprécipitation, fractionnement etc.) les protéines ont été extraites de manière à obtenir des extraits totaux. Pour chaque lignée, les cellules sont été lavées dans 500 µL (pour 1 boîte de 10 cm soit 7-10^6 cellules) de PBS (50mM Na_2HPO_4, 150mM NaCl, pH 7.2) froid, puis grattées dans 500-1000µL de tampon de lyse Laemmli (Tris HCl pH 6,8 ; 62,5 mM ; SDS 1% ; glycérol 10%; DTE 0,1M). Les lysats ont ensuite été chauffés à 95°C pendant 10 min. Les dosages de protéines des lysats ont été effectués par

la méthode de Bradford (Boira Protéine Assa), ou par mesure de l'absorbance à 280nm (Nano Drop 2000, ThermoScientific).

Western blot

Les protéines ont été séparées en conditions dénaturantes, par SDS-PAGE à 12.5% (ratio acryl : bis 37.5 :1), à raison de 20µg de protéines par puits. La séparation a été effectuée dans un système d'électrophorèse BioRad ou CBS. Pendant 1h30 à 170V. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham™ Protean™ 0.45µm) (40V, 150mA, pendant 1h30), puis fixées par une solution de rouge ponceau (Sigma Aldrich®). Enfin, la membrane a été saturée par incubation dans TBS-Tween 1X, 5% en lait pendant 30 minutes à température ambiante, puis incubée avec les anticorps primaires et secondaires décrits ci-dessous, dilués dans du TBST 1% lait.

Après transfert les membranes de nitrocellulose ont été incubée dans une solution de rouge ponceau (BioRad), puis saturées dans du TBST-5% lait.

La PARylation est une modification arborescente de protéine altérant parfois drastiquement la taille de ces dernières. Pour cette raison de nombreuses protéines PARylée sont de taille importante. Afin de contourner la difficulté liée à l'étude de protéines de grandes tailles, dans le contexte de l'étude de la PARylation de FBL, des gels de polyacrylamide gradient 4%-20% ont été utilisés, permettant de mieux séparer les protéine de grande taille, et nous avons adopté un protocole de transfert en liquide suggéré pour ces protéines, mentionné dans la littérature (Bolt et Mahoney 1997).

Electrophorèse bidimensionnelle

Lyse cellules :

Les cellules ont été lavées dans 500µL de PBS froid, puis grattée sur glace dans 500-1000µL de tampon de lyse urée-thiourée (urée 7M, thiourée 2M, CHAPS 4%, Tris 40mM). Pour faciliter la solubilisation des échantillons 1 à 3 µL de Benzonase (250-750U) ont été ajoutés aux lysats. Les lysats ont ensuite été soumis à 10 cycles de congélation-décongélation dans l'azote liquide. Les échantillons ont été dosés par la méthode de Bradford.

Préparation des échantillons pour l'isoélectrofocalisation

Les lysats ont été préparés de manière à avoir 100-250 µg de protéines totales par échantillon, repris dans du tampon de réhydratation (urée 8M, CHAPS 2%, bleu de bromophénol, et ajouté extemporanément pour une concentration finale de 0.5% IPG buffer pH6-11 (GE Healthcare®), DTE 25mM) dans un volume final de 220µL par échantillon. Les protéines ont été séparées selon leur point isoélectrique sur gel (strip) de gradient de pH immobilisé (IPG) de 11 cm. de pH 6 à pH 11 (GE Healthcare®), dans un IPG Phor (Pharmacia Biotech) selon le programme de séparation suivant :

- Réhydratation 1h à 0 V, 0 V.h
- 13h à 20V, 260 V.h
- 1h à 500V, 500v.h
- 1h à 1000V, 1000V.h
- Xh à 8000V, 38250V.h

Préparation des échantillons pour la 2e dimension (SDS-PAGE) :

Après isoélectrofocalisation, les strips sont équilibrés dans avec un bain de 15 min sous agitation lente dans un tampon d'équilibration-DTE (Tris-HCl 50mM pH 8.8 ; urée 6M ; 2% SDS, bleu de bromophénol, ajouté extemporanément : DTE 65 mM), puis dans un bain dans le tampon d'équilibration-IAA (Tris-HCl 50mM pH 8.8 ; urée 6M ; 2% SDS, bleu de bromophénol, ajouté extemporanément : iodoacétamide 135 mM). Les strips sont ensuite rapidement rincés dans le tampon de migration du SDS-PAGE (glycine 200 mM, 25 mM Tris, 0.05 % SDS), puis déposé sur le gel de polyacrylamide 12.5%.

2e dimension (SDS-PAGE) :

Les protéines ont été séparées en conditions dénaturantes, par SDS-PAGE à 12.5% (ratio acryl : bis 37.5:1), dans un système d'électrophorèse réfrigérée à 20°C, avec des gels de grande taille (13 cm x 13 cm). Sur le gel de polyacrylamide est déposé le strip IPG, et un gel d'agarose (agarose 0.5%, glycine 200 mM, 25 mM Tris, 0.05 % SDS) est coulé par-dessus celui-ci. La migration a lieu pendant 2h30 à 500V, 400 mA, 600V.h. Le transfert a été effectué en condition semi-sec, telle que décrit dans le paragraphe « western blot ».

Coloration Bleu de Coomassie et à argent

Les gels de polyacrylamide ont été colorés dans du bleu de Coomassie (Brillant blue R-250 0.025%, méthanol 30%, acide acétique 7.5%) pendant 45 min, puis décolorés dans des bains successif de décolorant (méthanol 30%, acide acétique 7.5%), de 10 min puis sur la nuit. Les protéines ont été fixées dans le décolorant du bleu de Coomassie (méthanol 30%, acide acétique 7.5%), pendant 1h, puis les gels ont été rincés 3 fois 5 min dans l'éthanol 10%. La fixation a été poursuivie dans du glutaraldéhyde 1% pendant 30 min. Les gels ont ensuite été rincés 5 fois 5 min dans l'éthanol 10% avant d'être incubés 30 min avec la solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$ 0.2%, NaOH 0.2%, NH_4OH 0.28%). Les gels ont ensuite été rincés 4 fois dans l'éthanol 10% puis incubés dans la solution de révélation (acide citrique 0.005% ; formaldéhyde 0.02%) jusqu'à ce que la coloration soit suffisante. La coloration a ensuite été arrêtée par incubation des gels dans l'acide acétique 1%. Pour finir les gels ont été rincés puis conservée dans le décolorant du bleu de Coomassie ((méthanol 30%, acide acétique 7.5%).

Spectrométrie de masse

Digestion sur Gel

Les bandes de gel ont été excisées à la main et découpées en morceaux avant d'être décolorées par incubation dans 100 µL de 50 mM de bicarbonate d'ammonium et 30% d'acétonitrile (AcN) pendant 30 min à température ambiante. La solution de décoloration a été éliminée et les fragments ont été ensuite mis en incubation pendant 35 min. à 56 ° C dans 100 µL de DTT 10 mM et bicarbonate 50 mM d'ammonium. La solution de DTT a ensuite été remplacée par 100 µL de 55 mM d'iodoacétamide à 50 mM de bicarbonate d'ammonium et a été incubée pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Les morceaux de gel ont ensuite été lavés pendant 30 min avec 100 µL de bicarbonate d'ammonium 50 mM pendant 30 min avec 100 µL de 50 mM de bicarbonate d'ammonium et 30% d'ACN. Les morceaux de gel ont ensuite été séchés pendant 45 min sous vide (centrifugeuse Centrivap (Labconco, Kansas City, États-Unis)). Les morceaux de gel séchés ont été réhydratés pendant 45 minutes à 4 ° C dans 70 µL de trypsine (Promega, 6,25 ng/µL dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium), puis incubées à 37°C pendant une nuit. L'extraction des peptides a été réalisée avec 50µL de TFA à 1% pendant 30 min à température ambiante avec agitation occasionnelle

par secousses. La solution de TFA contenant les protéines a été transférée dans un tube en polypropylène. Une deuxième extraction des peptides a été réalisée avec 70 µL de TFA 0,1% dans ACN à 50% pendant 30 min à température ambiante avec agitation occasionnelle par secousses. La seconde extraction TFA a été mise en commun avec la première. Le volume des extraits regroupés a été complètement séché par évaporation sous vide.

Analyse en spectrométrie de masse (MS)

La LC-ESI-MS / MS a été réalisée sur un quadripôle piège linéaire (LTQ) Orbitrap Velos (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) équipé d'un système de nanoACQUITY (Waters, Milford, MA, USA). Les peptides ont été piégés sur une 5 µm 200 Å Magic C18 AQ (Michrom) 0,1 x 20 mm pré-colonne et séparés sur une nanocolonne analytique commerciale 0,075 x 150 mm Nikkyo (Nikkyo Technology) (C18, 5 um, 100 Å). La séparation analytique a été effectuée pendant 19 min en utilisant un gradient H2O / FA 99,9% / 0,1% (solvant A) et CH3CN / FA 99,9% / 0,1% (solvant B). Le gradient a été effectué comme suit: la composition initiale à 95% de A et 5% de B, puis à 35% de B après 14 min, 80% de B après 19 min à un débit de 220 Nl / min. Pour l'analyse MS, la résolution de l'Orbitrap (OT) réglée à 60 000, et la population d'ions a été réglée à 5 × 105 avec une fenêtre m / z de 400 à 2000. Jusqu'à cinq ions précurseurs ont été sélectionnés pour la dissociation induite par collision (CID) dans le LTQ en utilisant un mode dépendant des données. La population d'ions a été réglée à 1 x 104 (largeur d'isolement de 2 m / z) et les énergies de collision normalisées ont été fixées à 35%.

Identification des protéines

Les listes des pics (format de fichier FMG) ont été générées à partir des données brutes en utilisant l'outil de conversion EasyProtConv de la plate-forme logicielle EasyProt (Gluck F. et al ; Journal of Proteomics 2013, 79, pp.146-160). Les fichiers peaklist ont été recherchés dans la base de données SwissProt (UniProtKB , presse - 2011_09) en utilisant Mascot v2.2.07 (Sciences Matrix, Londres , Royaume-Uni). Homo sapiens a été choisi comme la taxonomie et la trypsine a été choisie comme enzyme, avec deux coupures manquées potentielles. La tolérance de l'ion parent a été réglée à 10 ppm. Les acides aminés variables modifiés correspondent à l'oxydation de méthionine ainsi qu'à l'acétylatio de lysine en n -terminal. La modification d'acide aminé fixe correspond à la cystéine carbamidomethylée. La recherche

par Mascot a été validée en utilisant Scaffold 4.0.4 (Proteome Software, Portland, OR). Seules les protéines correspondant à deux peptides différents et avec un score minimum de probabilité de 95% ont été considérées comme identifiées.

Immunofluorescence

Les cellules été ensemencées dans les plaques 24 puits sur des lamelles de verre stériles de 12 mm de diamètre. Après avoir retiré le milieu, les cellules ont été fixées dans du PBS-PFA 3% pendant 5 min puis lavées dans du PBS-glycine 20 mM. Les cellules ont ensuite été perméabilisée dans du PBS-0.5% triton X-100, puis lavées trois fois 5 min avec du PBS glycine 20mM, avant d'être saturée 30 min dans du PBS-SVF 3%. Les cellules ont ensuite été incubée 1h avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-SVF3 %, et après 3 lavage dans le PBS-Glycine 20 mM, elles ont été incubées 30 min avec l'anticorps secondaires également dilué dans du PBS-SVF 3%. Afin de marquer les noyaux les cellules ont ensuite été incubées dans du PBS-Hoechst 33258 à 0.5µg/mL, puis lavées trois fois 5 min dans du PBS. Avant d'être montée dans le milieu de montage Fluoromount G (Electron Microscopy Science®).

Les images ont été collectées sur un Nikon NiE avec un objectif Plan-Apo x63 N.A 1.40, équipé d'une caméra Hamamatsu Orca Flash 4.0. Les filtres utilisés sont les suivants : Vert : Ex 472/30nm DM 495 Em 520/35 ; Rouge : Ex 531/40nm Dm 562 Em 593/40 ; Bleu : Ex 377/50nm DM 409

Immunoprécipitation

Les cellules ont été grattées sur glace dans le tampon de lyse Ripa + (NaCl 500 mM, CHAPS 0.1%, Tris-HCl pH 7.4 50mM, Triton X-100 0.1%, SDS 0.1%, cocktail d'inhibiteur de protéase cOmplete, Roche). Lors des manipulations visant à analyser l'acétylation de FBL, le tampon Ripa + a été supplémenté avec des inhibiteurs de HDAC (TSA 400 nM, Butyrate de sodium 5 mM, Nicotinamide 50 mM). La suite de la manipulation a lieu en chambre froide, à 4°C. La lyse a été effectuée pendant 30 min dans la glace. Les lysats ont ensuite été soumis à 4 A/R à la seringue équipée d'une aiguille 26 pour casser l'ADN et diminuer la viscosité. Pour d'avantage diminuer la viscosité, les lysats ont ensuite été soumis à 15 cycles de sonication

(Bioruptor, 30 ON / 30s OFF). Les débris cellulaires ont été éliminés par 30 min de centrifugation à 17 105g.

Les billes magnétiques dynabeads (ThermoScientific) couplées aux protéines G ont été utilisées en accord avec les recommandations du fournisseur, à raison de 25µL de billes par boîte de 10 cm (cellules HCT116), et couplée à 1g d'anticorps. Les billes magnétique ont été préalablement incubées 10 min avec un anticorps anti tag HA (pour le « pré-clearing »), ou avec l'anticorps anticorps d'intérêt, puis reprise dans le tampon ripa +. Elles ont ensuite été incubées pendant 30 minutes avec les surnageants obtenus après centrifugation des lysats, afin d'éliminer les interactions non spécifiques. Après élimination des billes couplées à l'anticorps anti-HA sur support magnétiques, les lysats ont été incubés 2h avec les billes couplées à l'anticorps d'intérêt. Après élimination du surnageant sur support magnétique les billes ont été lavée trois fois avec le tampon Ripa – (NaCl 150 mM, CHAPS 0.1%, Tris-HCl pH 7.4 50mM, Triton X-100 0.1%, cocktail d'inhibiteur de protéase cOmplete, Roche). Un soin particulier a été apporté pour éliminer la totalité du surnageant lors du dernier lavage. Les billes ont ensuite été reprise dans 17 µL de tampon Laemmli 1X (Tris-HCl 0.5M pH 6.8 ; SDS 1% ; DTE 10mM ; glycérol 10%), et incubées à 70°C pendant 10 minutes. Les produits d'IP ont enfin été récupérés en éliminant les billes sur support magnétique.

Pour les manipulations de spectrométrie de masse, après incubation des lysats avec les billes couplée à l'anticorps d'intérêt, les billes ont été lavées 3 fois dans le tampon Ripa + au lieu du tampon Ripa -

Anticorps :

Cible	Fournisseur / Référence	Espèce clonalité	Dilution - utilisation		
			WB	IF	IP
FBL	Abcam / ab5821	lapin polyclonal		1/1000 1h à RT	1/1000 O/N à 4°C
	Abcam / ab166630	Lapin monoclonal	1/1000 1h à RT		
Flag	Sigma / F1804	souris monoclonal	1/1000 30min à RT	1/1000 1h à RT	1/1000 2h à 4°C
Nop56	Bethyl A302-720A	lapin polyclonal	1/500 1h à RT		1/1000 2h à 4°C
Nop58	proteintech / 14409-1-AP	lapin polyclonal	1/500 1h à RT		
15,5kDa	proteintech / 15802-1-AP	lapin polyclonal	1/1000 1h à RT		
PAR	Abcam / ab14459	souris monoclonal	1/1000 1h à RT		
acétyl-lysine	Cell Signaling / 9441S	lapin polyclonal	1/1000 1h O/N à 4°C		
Ku80	Abcam / ab3715	souris monoclonal	1/2000 1h à RT		
β-actine	Sigma / A5441	souris monoclonal	1/2000 1h à RT		
PARG	Abnova / H00008505-B01P	souris polyclonal	1/1000 1h à RT		
acK292-FBL	Covalab	lapin polyclonal	2,5µg/mL		
SIRT1	MBL international Corp	lapin polyclonal	1/1000 1h à RT		
SIRT7	Cell Signaling / #5360	lapin monoclonal	1/1000 1h à RT		
CBP	Cell Signaling / #7389	lapin monoclonal	1/1000 1h à RT		
NCL	Abcam / ab13541	souris monoclonal		1/500 1h à RT	

Vecteurs

Le plasmide pc-DNA-HA CBP a gracieusement été fourni par A. Iyer doctorante dans le groupe Voit/Grummt.

Mutagénèse dirigée

Les mutations ponctuelle de FBL ont été introduit dans l'ADNc de FBL dans un plasmide p3xflag-FBL-WT par PCR avec la DNA polymérase PrimeStar® (Takara) selon le protocole recommandé par le fournisseur, avec des primer contenant la mutation à introduire :

K292A : sens : 5'-GCAACAGGAGAACATG**GCG**CCGCAGGAGCAGTTG-3' %GC=62 N=34 T_m=81.18
antisens : 5'-CAACTGCTCCTGCGG**CGC**CATGTTCTCCTGTTGC-3'
E115A : sens : 5'-CCTGGTCCCTGGG**GCC**TCAGTTTATGGAGAG-3' %GC=61 N=31 T_m=81.51
antisens : 5'- CTCTCCATAAACTGA**GGC**CCCAGGGACCAGG-3'
D129A : sens : 5'- GTCTCGATTTCGGAAGGA**GCT**GACAAAATTGAGTACCGAGCC -3' %GC= 50 N=42 T_m=83.54
antisens : 5'- GGCTCGGTACTCAATTTTGTCAGCTCCTTCCGAAATCGAGAC -3'
D270A : sens : 5'- GGCCAACTGCATT**GCC**TCCACAGCCTCAGCC-3' %GC=64 N=31 T_m=82.74
antisens : 5'- GGCTGAGGCTGTGGA**GGC**AATGCAGTTGGCC-3'
E276A : sens : 5'- CCACAGCCTCAGCC**GCG**GCCGTGTTTGCCTCC-3' %GC=72 N=32 T_m=86.92
antisens : 5'- GGAGGCAAACACGGC**CGC**GGCTGAGGCTGTGG-3'
E300A : sens : 5'- GGAGCAGTTGACCCTT**GCG**CCATATGAAAGAGACC-3' %GC=54 N=35 T_m=81.49
antisens : 5'-GGTCTCTTTCATATGG**CGC**AAGGGTCAACTGCTCC-3'
P212A: sens: 5'- GAGGACCAACATCATT**GCT**GTGATCGAGGATGCTC- 3' %GC= 51.4 N=35 T_m= 80.43°C
antisens: 5' –GAGCATCCTCGATCAC**AGC**AATGATGTTGGTCCTC- 3'
K265A: sens: 5-' GGACACTTTGTGATTTCCATT**GCG**GCCAACTGCATTGACTCC -3' %GC= 50 N=42 T_m= 81.16°C
antisens: 5'- GGAGTCAATGCAGTTGGC**CGC**AATGGAAATCACAAAGTGTCC- 3'

Les produits de PCR ont ensuite été digérés par DpnI (New England Biolabs®) afin d'éliminer le plasmide matrice. L'ADN issus des produit de digestion a été précipité par la méthode acétate de sodium (pH5.2) et éthanol 100% froid, puis transformé dans des bactéries compétentes DH5α afin de produire et purifier par miniprep et maxiprep les plasmide p3xflag-FBL-mutants. La bonne insertion de la mutation a été vérifiée par séquençage.

Construction des vecteur lentiviral pTRIPZ-shARN1090-flag-FBL-WT :

La séquence du shARN FBL 1090 a été synthétisée (Eurogentec®) puis sous-clonée dans un plasmide puc57. Les séquences du shARN FBL 1090 et de l'ADNc de la flag-FBL-WT ont été sous-clonées par PCR depuis les plasmides puc57-shARN1090FBL et p3xflag-FBL-WT, respectivement, puis par recombinaison dans le vecteur pTRIPZ par la société GeneWiz®. Les séquences flag-FBL mutées ont été sous-clonées dans le plasmide pTRIPZ-shARN1090-flag-FBL-WT par digestions/ligation par la plateforme TEFOR (plateforme de biologie Moléculaire du Centre de Recherche de GIF – CNRS)

Etablissement des lignées inductibles

Les lignées HCT116 et HeLa exprimant de façon inductible des shARN ou les différentes formes de Flag-FBL ont été obtenues par infection lentivirale, suivant les méthodologies utilisées par Anne-Pierre Morel (Equipe Alain Puisieux, CRCL) qui nous a fourni les différents vecteurs. L'ensemble des phases de production de virus, d'infection et de mise en sélection des lignées ont été effectuées en laboratoire de sécurité L3, selon les procédures de sécurité établies au sein du CRCL. Un test ELISA pour la détection de la protéine p24 de HIV-1 (INNOTEST HIV Antigen mAb INNOGENETICS) est effectué avant de transférer les lignées en laboratoire L2.Les productions de virus ont été effectuées dans des lignées 293T, par co-transfection du vecteur pTRIPZ (décrits dans la partie précédente) et de deux vecteurs d'empaquetage, le pCMV-VSVG codant la glycoprotéine du virus VSV, et le pCMV-ΔR8.91 codant pour les protéines Gag et Pol d'HIV-1. Les conditions de transfections sont les suivantes : transfection avec le réactif XtremeGene HP de Roche, à un ratio ADN:réactif de 3:1. Le ratio entre les différents vecteurs était pTRIPZ:pCMV-ΔR8.91:pCMV-VSVG = 2:2:1 (µg). Les virus issus de surnageants de 3 boîtes de 10cm ont été récoltés après 18h de production, filtrés, concentrés et directement utilisés pour infecter 100 000 cellules HeLa ou HCT116. Les cellules infectées ont été mise en sélection sous 1µg/mL de puromycine 36h après infection. La sélection est terminée en 4 jours. Les cellules sont ensuite maintenues sous sélection pour l'entretien courant.

V. Annexes

V.1. Mises au point et validations expérimentales

V.1.1. Validation de l'anticorps anti acK292-FBL

Pour étudier le rôle de l'acétylation de la lysine 292 de FBL, Nous avons fait produire deux anticorps anti acK292-FBL. Ces anticorps ont été produits à partir de deux lapins, par injection du peptide acétylé contenant le résidu K292. Seul un des deux lapins a répondu à l'injection, et les sérums des deux lapins ont été immunopurifiés (cf. section matériels et méthodes). Ce sont les anticorps issus de cette purification qui ont été utilisés pour la mise au point décrite ci-après.

La concentration optimale permettant de détecter une bande de la taille de FBL (37kDa) à partir d'extrait de cellules HeLa a été évaluée à 2.5µg/mL par dilutions sériées.

Afin de vérifier que cet anticorps est spécifique de la FBL acétylée, un test de compétition a été réalisé avec le peptide acétylé utilisé pour produire l'anticorps. Différents ratios anti-acK292FBL:peptide acétylé ont été analysés (Figure A1A). Afin d'analyser la sensibilité de l'anticorps au peptide acétylé, le peptide non acétylé a été utilisé dans un ratio ou ce dernier est en excès. Les résultats présentés figure A1A montrent une diminution du signal obtenu avec l'anti-acK292FBL en fonction du ratio acK292FBL:peptide acétylé, tandis que la compétition avec un excès de peptide non acétylé ne présente pas de diminution de signal. Ces résultats montrent que l'anticorps testé est bien spécifique de la FBL acétylée. Il est à noter que le dispositif utilisé pour tester de nombreuses conditions limite le mélange des solutions et génère souvent des signaux bruités et non-spécifiques. Pour confirmer les résultats, le test de compétition a été refait avec une procédure de western blot classique, et les résultats valident l'observation de spécificité de l'anti acK292-FBL (figure A1B).

Par ailleurs, les résultats présentés figure 51C montrent que l'anti acK292-FBL reconnait flag-FBL-WT, mais pas le mutant K292A exprimés dans des cellules HeLa par transfection, et confirment la spécificité de l'anticorps anti-acK292-FBL pour la FBL sous sa forme acétylée.

Pour finir afin de montrer la spécificité de l'anti acK292-FBL pour FBL, en particulier au regard des bandes non spécifiques localisées à proximité de la taille attendue pour les FBL flag et endogène, un mix de siARN spécifiques de FBL déjà bien validé dans l'équipe dans des

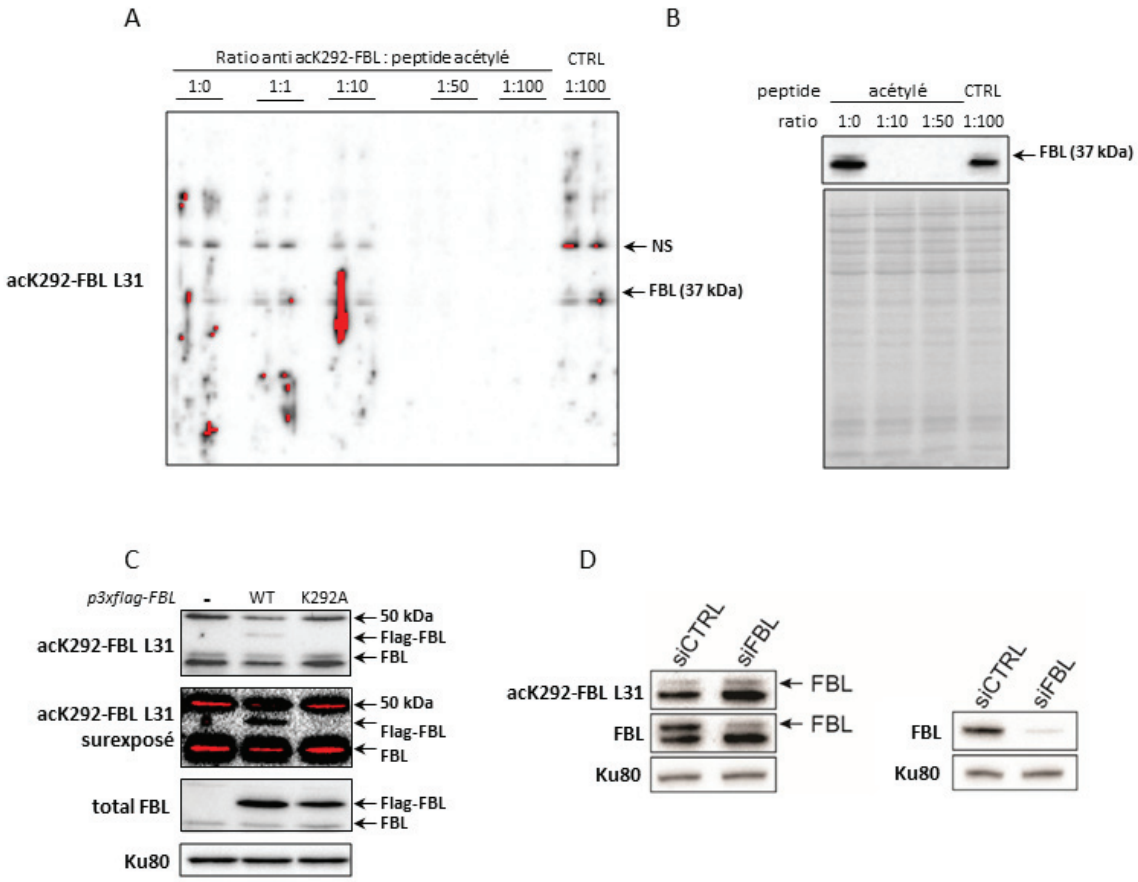


Figure A1 : Validation de l'anticorps anti acétyl-K292-FBL.

A, B Un extrait total de cellules HCT116 a été analysé en western blot. La membrane avec un seul échantillon séparé sur toute la largeur (**A**), ou déposé dans des puits séparés (**B**) a été incubée avec l'anticorps anti acK-292-FBL, préalablement incubé ou non avec le peptide acétylé selon plusieurs ratios peptide acétylé-anticorps, ou avec le peptide contrôle (CTRL) non acétylé. Un signal non spécifique (NS) est observé à environ 50 kDa et juste en dessous de la taille attendue pour FBL.

C, Des cellules HCT116 ont été transfectées ou non avec les plasmides p3xflag-FBL-WT et p3xflag-FBL-K292A, et les lysats ont été analysés en western blot avec les anticorps anti acK292-FBL puis anti-FBL. Ku80 a été utilisé comme contrôle de charge.

D, Des lysats de cellules HeLa transfectée ou non avec un siARN FBL ont été analysés en western blot avec les anticorps anti acK292-FBL puis anti-FBL (panneau de gauche) ou avec l'anti-FBL (panneau de droite). Ku80 a été utilisé comme contrôle de charge.

cellules HeLa, a été utilisé. Les résultats montrent une baisse de la FBL, comparée au siARN contrôle (figure 51D). Les mêmes lysats utilisés pour ce western blot ont été analysés avec l'anti acK292-FBL. Les résultats présentés figure 51D montrent un maintien du signal de FBL acétylée, et lorsque que la membrane est ensuite révélée avec l'anticorps anti-FBL on remarque de nouveau la baisse de quantité de FBL totale. Puisque les données obtenues montrent que bien que le niveau global de FBL diminue sous siARN et que le niveau de FBL acétylé en position K292 reste inchangé, ces résultats suggèrent que la bande observée au niveau de la taille attendue pour FBL correspond à la FBL acétylée, mais que le niveau de cette dernière ne change pas.

V.1.2. Mises au point de l'immunoprécipitation de FBL

Les questions posées au cours de mon travail de thèse nécessitaient l'utilisation de l'immunoprécipitation, soit pour analyser le complexe de méthylation, soit pour enrichir en FBL pour des analyses biochimiques ou protéomiques. La mise au point de l'immunoprécipitation a ainsi constitué une part non négligeable de mon travail de thèse. Les manipulations qui ont mené à l'élaboration du protocole utilisé en IP dans les manipulations présentées dans la section résultats sont résumées ci-après.

V.1.2.1. Difficultés liées à l'immunoprécipitation de la FBL endogène

Historiquement, l'immunoprécipitation de FBL a été beaucoup utilisée pour isoler et analyser les complexes snoRNP C/D, voir identifier de nouveau snoARN associés à FBL. Au début du projet, l'IP FBL semblait ainsi une approche réalisable. Néanmoins, celle-ci s'est révélée très peu efficace, quelques soient les conditions testées (résumées ci-après). Bien que les raisons exactes restent obscures, il est probable que les anticorps soient à l'origine du problème puisque les IP dirigées contre des formes tagguées de FBL (GFP et 3xflag) se sont, elles, révélées efficaces.

Plusieurs tampons de lyse ont été testés : un tampon peu stringent (Ripa -), contenant 0.1% Triton X-100, 0.1% CHAPS, 50 mM Tris HCl pH 7.4 et 150mM NaCl, qui avait été adapté dans notre équipe à partir du tampon Ripa classiquement utilisé en immunoprécipitation (Ripa

C), et un tampon plus stringent qui a été mis au point pour cette IP, en augmentant la concentration en NaCl et en ajoutant 0.1% SDS (Ripa +). Les résultats (non montrés) montrent un meilleur rendement avec le tampon Ripa + en termes de quantité de FBL endogène immunoprécipitée. De plus 15.5kDa co-immunoprécipite de manière plus efficace avec la FBL endogène avec ce tampon. Aucun signal n'est observé pour FBL ou 15.5kDa avec le tampon Ripa C. Dans ces conditions aucun signal en IP n'a été obtenu pour Nop56 et Nop58.

Afin d'améliorer l'IP de la FBL endogène, 6 anticorps anti-FBL ont été testés dans les conditions d'IP mises au point et décrites ci-dessus (tampon Ripa +). Les résultats (non montrés) montrent que FBL est immunoprécipitée par tous les anticorps utilisés, mais faiblement. Ils montrent que 15.5kDa est co-immunoprécipitée avec FBL mais présente un signal faible également. Aucun signal n'a été obtenu pour Nop56 et Nop58 lors de ces IP (non montré).

Ces manipulations témoignent du faible rendement en FBL endogène lors de l'IP de cette dernière, et de la difficulté de co-immunoprécipiter les partenaires protéiques. Cela suggère que cette approche, n'est pas adaptée pour enrichir en FBL en vue d'analyses en spectrométrie de masse, ni pour analyser l'assemblage de FBL dans le complexe de méthylation

V.1.2.2. Mise au point de l'immunoprécipitation de la flag-FBL

Devant la difficulté d'immunoprécipiter efficacement la FBL endogène et ses partenaires, j'ai décidé d'effectuer ces manipulations avec la FBL portant un tag. Ce choix a été fait pour plusieurs raisons, et notamment parce que l'IP avec un anticorps anti-tag donnait la possibilité d'un meilleur rendement de FBL et donc d'une co-IP plus efficace. Dans un premier temps, l'IP de l'eGFP-FBL a été testée dans des lignées de cancer du sein (MCF7), exprimant l'eGFP-FBL de manière stable, disponibles au laboratoire, pour tester cette approche. L'IP avec les tampons Ripa - et Ripa + a donc été testée dans les lignées MCF7-eGFP-FBL et MCF7-eGFP (contrôles). Les résultats présentés figure A2A montrent une bande d'environ 63kDa, correspondant à la taille attendue pour l'eGFP-FBL présente après IP dans les lignées MCF7-eGFP-FBL et absente des lignées contrôle. De plus, les résultats montrent

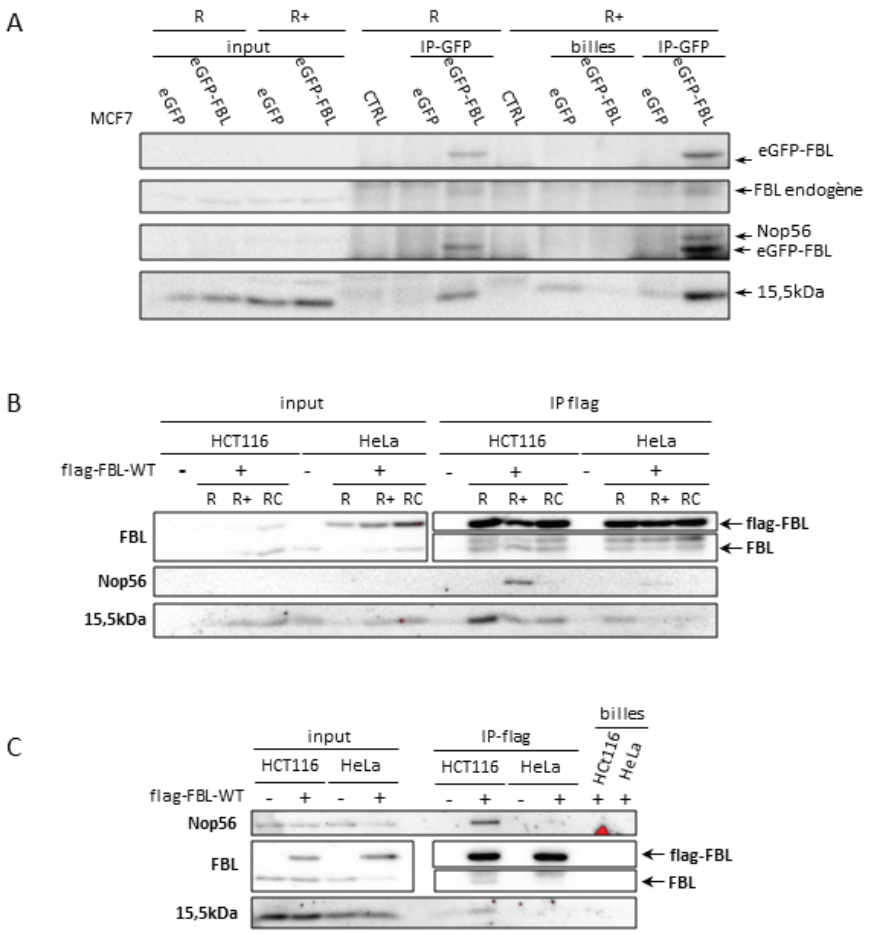


Figure A2 : Mise au point de l'immunoprécipitation de FBL.

A, Des cellules MCF7 eGFP-FBL et MCF7 eGFP ont été lysées avec les tampon Ripa Soler (R) ou Ripa+ (R+) puis l'eGFP-FBL a été immunoprécipitée depuis ces lysats avec une anticorps anti-GFP.

B, Des cellules HCT116 ou HeLa, transfectées ou non avec le plasmide p3xflag-FBL-WT ont été lysées avec les tampon Ripa Soler (R), Ripa+ (R+) ou Ripa classique (RC) puis la flag-FBL a été immunoprécipitée depuis ces lysats avec un anticorps anti-flag. Un contrôle avec des billes liée à l'anti-FBL (CTRL) a été effectué en incubant avec du tampon de lyse R ou R+ (sans lysat).

C, Confirmation des conditions déterminées en **B.** Des cellules HCT116 ou HeLa, transfectées ou non avec le plasmide p3xflag-FBL-WT ont été lysées avec le tampon Ripa+ (R+) puis la flag-FBL a été immunoprécipitée depuis ces lysats avec un anticorps anti-flag.

Pour chaque manipulation, nn mock (billes) a été réalisé avec du lysat de cellules transfectées, obtenu après lyse avec le tampon R+ et incubation avec les billes en absence d'anticorps. Une fraction totale (input) du lysat a également été déposée. Les échantillons ont ensuite été analysés par western blot pour la présence de FBL, et de Nop56, Nop58 et 15,5kDa.

une IP plus efficace avec le tampon Ripa +, et la co-IP de 15.5kDa avec ce tampon. Pour la première fois Nop56 était efficacement co-immunoprécipitée avec FBL, uniquement dans le tampon Ripa +, confirmant ainsi ce tampon comme le meilleur candidat pour une co-IP du complexe de méthylation. Il est intéressant de noter qu'on peut aussi observer une bande au niveau de la FBL endogène dans les MCF7-eGFP-FBL. Cette bande étant absente des lignées contrôles, on peut raisonnablement conclure que la FBL endogène co-immunoprécipite avec l'eGFP-FBL. Ces résultats indiquent que l'utilisation d'une FBL tagguée permettrait d'analyser le complexe dans de bonnes conditions d'IP. Pour la suite, nous avons donc travaillé avec cette approche, en utilisant une fibrillarine flaguée (le tag flag étant plus petit et déjà disponible au laboratoire).

Afin de pouvoir continuer ces manipulations dans le modèle cellulaire HCT116, un plasmide exprimant une flag-FBL a été utilisé. Pour mettre au point l'IP avec l'anti-flag, les trois tampons testés en IP de la FBL endogène ont de nouveau été comparés, et ces tests ont été effectués en transfectant de manière transitoire un plasmide p3xflag-FBL-WT dans les lignées HCT116. Malgré l'absence de contrôle, la transfection pendant 24h de ce plasmide montre une bonne expression de la flag-FBL, avec un signal plus intense que la FBL endogène, indiquant une surexpression. L'IP avec l'anticorps anti-flag après transfection ou non du plasmide p3xflag-FBL-WT montre un bon signal flag-FBL avec les trois tampons utilisés (figure 52B), ainsi qu'une bande au niveau de la FBL endogène dans les HCT116, et une bande de taille intermédiaire entre cette dernière et la flag-FBL (figure A2B et A2C). Cette bande pourrait correspondre à un produit de dégradation. Là encore, seul le tampon Ripa + permet la co-IP de Nop56 dans les HCT116. 15.5kDa est immunoprécipitée de manière plus efficace par le tampon Ripa -. Cependant le tampon Ripa + permet aussi la co-IP de ce partenaire, bien que de manière moindre. Le tampon Ripa C ne permet pas la co-IP de Nop56 et ne permet qu'une co-IP faible de 15.5kDa. Aucun signal n'a été obtenu pour Nop58 dans ces conditions. Ces résultats montrent de nouveau que le tampon Ripa + est le plus adapté pour co-immunoprécipiter les partenaires de FBL

Par ailleurs, les conditions de lyse des cellules se sont révélées importantes. En effet, la lyse avec le tampon Ripa + donne systématiquement un lysat très visqueux dans les HCT116. Ainsi il était non seulement difficile d'éliminer les débris cellulaires après centrifugation du lysat, mais en plus le surnageant retenait malgré tout une forte viscosité. Cela posait à la fois

un problème d'homogénéisation moins efficace lors de l'agitation des billes couplées aux protéines G utilisées en IP, mais aussi risquait d'entrainer des débris cellulaires après centrifugation et rend moins efficace les lavages des billes couplées à l'anticorps anti-flag après incubation avec lysat, risquant donc d'entrainer des interactions non spécifiques. Pour pallier ce problème, le volume de tampon de lyse utilisé a d'abord été doublé. Cela n'ayant pas entièrement résolu le problème, l'effet de la sonication sur les lysats ainsi que l'effet du passage des lysats en seringue 26G (fine aiguille), ont ensuite été comparés. L'utilisation seule de chacune de ces techniques n'a résolu le problème que partiellement. Cependant le passage des lysats par les seringues suivie de 15 cycle de sonication de 30s à forte intensité a permis d'éliminer la viscosité.

Références Bibliographiques

Abd Elmageed, Zakaria Y., Amarjit S. Naura, Youssef Errami, et Mourad Zerfaoui. 2012. « The Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs): New roles in intracellular transport ». *Cellular Signalling* 24 (1): 1‑8. doi:10.1016/j.cellsig.2011.07.019.

Aggarwal, Rohit, Mary Lucas, Noreen Fertig, Chester V. Oddis, et Thomas A. Medsger. 2009. « Anti-U3 RNP Autoantibodies in Systemic Sclerosis ». *Arthritis and Rheumatism* 60 (4): 1112‑18. doi:10.1002/art.24409.

Ai, L. S., C. H. Lin, M. Hsieh, et C. Li. 1999. « Arginine Methylation of a Glycine and Arginine Rich Peptide Derived from Sequences of Human FMRP and Fibrillarin ». *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences* 23 (4): 175‑80.

Aittaleb, Mohamed, Rumana Rashid, Qiong Chen, John R. Palmer, Charles J. Daniels, et Hong Li. 2003. « Structure and Function of Archaeal Box C/D sRNP Core Proteins ». *Nature Structural Biology* 10 (4): 256‑63. doi:10.1038/nsb905.

Aittaleb, Mohamed, Thomas Visone, Marcia O Fenley, et Hong Li. 2004. « Structural and Thermodynamic Evidence for a Stabilizing Role of Nop5p in S-Adenosyl-L-methionine Binding to Fibrillarin ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (40): 41822‑29. doi:10.1074/jbc.M406209200.

Al-Sohaily, Sam, Andrew Biankin, Rupert Leong, Maija Kohonen-Corish, et Janindra Warusavitarne. 2012. « Molecular Pathways in Colorectal Cancer ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27 (9): 1423‑31. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x.

Amador, Maria L., et Manuel Hidalgo. 2004. « Epidermal Growth Factor Receptor as a Therapeutic Target for the Treatment of Colorectal Cancer ». *Clinical Colorectal Cancer* 4 (1): 51‑62.

Amiri, K A. 1994. « Fibrillarin-like proteins occur in the domain Archaea. » *Journal of Bacteriology* 176 (7): 2124‑27.

Amunts, Alexey, Alan Brown, Xiao-chen Bai, Jose L. Llácer, Tanweer Hussain, Paul Emsley, Fei Long, Garib Murshudov, Sjors H. W. Scheres, et V. Ramakrishnan. 2014. « Structure of the Yeast Mitochondrial Large Ribosomal Subunit ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6178): 1485‑89. doi:10.1126/science.1249410.

Anderlid, Britt-Marie, Johanna Lundin, Helena Malmgren, Mikael Lehtihet, et Ann Nordgren. 2014. « Small Mosaic Deletion Encompassing the snoRNAs and SNURF-SNRPN Results in an Atypical Prader-Willi Syndrome Phenotype ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 164A (2): 425‑31. doi:10.1002/ajmg.a.36307.

Andreyev, H. J., A. R. Norman, D. Cunningham, J. R. Oates, et P. A. Clarke. 1998. « Kirsten Ras Mutations in Patients with Colorectal Cancer: The multicenter “RASCAL” study ». *Journal of the National Cancer Institute* 90 (9): 675‑84.

Angelov, Dimitar, Vladimir A. Bondarenko, Sébastien Almagro, Hervé Menoni, Fabien Mongélard, Fabienne Hans, Flore Mietton, et al. 2006. « Nucleolin Is a Histone Chaperone with FACT-like Activity and Assists Remodeling of Nucleosomes ». *The EMBO Journal* 25 (8): 1669. doi:10.1038/sj.emboj.7601046.

Anger, Andreas M., Jean-Paul Armache, Otto Berninghausen, Michael Habeck, Marion Subklewe, Daniel N. Wilson, et Roland Beckmann. 2013. « Structures of the Human and Drosophila 80S Ribosome ». *Nature* 497 (7447): 80‑85. doi:10.1038/nature12104.

Arabi, Azadeh, Siqin Wu, Karin Ridderstråle, Holger Bierhoff, Chiounan Shiue, Karoly Fatyol, Sara Fahlén, et al. 2005. « C-Myc Associates with Ribosomal DNA and Activates RNA Polymerase I Transcription ». *Nature Cell Biology* 7 (3): 303‑10. doi:10.1038/ncb1225.

Aris, J P, et G Blobel. 1991. « cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (3): 931‑35.

Arnett, Frank C., John D. Reveille, Rose Goldstein, K. Michael Pollard, Kimberly Leaird, Edwin A. Smith, E. Carwile Leroy, et Marvin J. Fritzler. 1996. « Autoantibodies to Fibrillarin in Systemic Sclerosis

(Scleroderma). An Immunogenetic, Serologic, and Clinical Analysis ». *Arthritis & Rheumatism* 39 (7): 1151‑60. doi:10.1002/art.1780390712.

Ayrault, O., L. Andrique, D. Fauvin, B. Eymin, S. Gazzeri, et P. Séité. 2006. « Human Tumor Suppressor p14ARF Negatively Regulates rRNA Transcription and Inhibits UBF1 Transcription Factor Phosphorylation ». *Oncogene* 25 (58): 7577‑86. doi:10.1038/sj.onc.1209743.

Ayrault, Olivier, Laetitia Andrique, Christian-Jacques Larsen, et Paule Seite. 2004. « Human Arf Tumor Suppressor Specifically Interacts with Chromatin Containing the Promoter of rRNA Genes ». *Oncogene* 23 (49): 8097‑8104. doi:10.1038/sj.onc.1207968.

Bachellerie, Jean Pierre, Jérôme Cavaillé, et Alexander Hüttenhofer. 2002. « The Expanding snoRNA World ». *Biochimie* 84 (8): 775‑90.

Bachellerie, Jean-Pierre, et Jérôme Cavaillé. 1997. « Guiding ribose methylation of rRNA ». *Trends in Biochemical Sciences* 22 (7): 257‑61. doi:10.1016/S0968-0004(97)01057-8.

Bachellerie, Jean-Pierre, Bernard Michot, Monique Nicoloso, Andrey Balakin, Jingwei Ni, et Maurille J Fournier. 1995. « Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA ». *Trends in Biochemical Sciences* 20 (7): 261‑64. doi:10.1016/S0968-0004(00)89039-8.

Bäckström, Stefan, Nils Elfving, Robert Nilsson, Gunnar Wingsle, et Stefan Björklund. 2007. « Purification of a Plant Mediator from Arabidopsis thaliana Identifies PFT1 as the Med25 Subunit ». *Molecular Cell* 26 (5): 717‑29. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.007.

Balakin, A. G., R. A. Lempicki, G. M. Huang, et M. J. Fournier. 1994. « Saccharomyces Cerevisiae U14 Small Nuclear RNA Has Little Secondary Structure and Appears to Be Produced by Post-Transcriptional Processing. » *Journal of Biological Chemistry* 269 (1): 739‑46.

Balasubramanian, Suganthi, Deyou Zheng, Yuen-Jong Liu, Gang Fang, Adam Frankish, Nicholas Carriero, Rebecca Robilotto, Philip Cayting, et Mark Gerstein. 2009. « Comparative Analysis of Processed Ribosomal Protein Pseudogenes in Four Mammalian Genomes ». *Genome Biology* 10 (1): R2. doi:10.1186/gb-2009-10-1-r2.

Ballarino, Monica, Mariangela Morlando, Francesca Pagano, Alessandro Fatica, et Irene Bozzoni. 2005. « The Cotranscriptional Assembly of snoRNPs Controls the Biosynthesis of H/ACA snoRNAs in Saccharomyces Cerevisiae ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (13): 5396 ‑ 5403. doi:10.1128/MCB.25.13.5396-5403.2005.

Balvay, Laurent, Ricardo Soto Rifo, Emiliano P. Ricci, Didier Decimo, et Théophile Ohlmann. 2009. « Structural and functional diversity of viral IRESes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Structure and Function of Regulatory RNA Elements, 1789 (9–10): 542‑57. doi:10.1016/j.bbagrm.2009.07.005.

Barna, Maria, Aya Pusic, Ornella Zollo, Maria Costa, Nadya Kondrashov, Eduardo Rego, Pulivarthi H Rao, et Davide Ruggero. 2008. « Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency ». *Nature* 456 (7224): 971‑75. doi:10.1038/nature07449.

Barneche, Frédy, Florence Steinmetz, et Manuel Echeverria. 2000. « Fibrillarin Genes Encode Both a Conserved Nucleolar Protein and a Novel snoRNA Involved in rRNA Methylation in Arabidopsis Thaliana ». *Journal of Biological Chemistry*, mai. doi:10.1074/jbc.M002996200.

Basu, Abhijit, Priyanka Das, Sujan Chaudhuri, Elena Bevilacqua, Joel Andrews, Sailen Barik, Maria Hatzoglou, Anton A. Komar, et Barsanjit Mazumder. 2011. « Requirement of rRNA Methylation for 80S Ribosome Assembly on a Cohort of Cellular Internal Ribosome Entry Sites▽ ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (22): 4482‑99. doi:10.1128/MCB.05804-11.

Baudin-Baillieu, Agnès, Céline Fabret, Xue-Hai Liang, Dorota Piekna-Przybylska, Maurille J Fournier, et Jean-Pierre Rousset. 2009. « Nucleotide modifications in three functionally important regions of the Saccharomyces cerevisiae ribosome affect translation accuracy ». *Nucleic Acids Research* 37 (22): 7665‑77. doi:10.1093/nar/gkp816.

Behrens, J. 2005. « The Role of the Wnt Signalling Pathway in Colorectal Tumorigenesis ». *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 4): 672‑75. doi:10.1042/BST0330672.

Belin, Stéphane, Anne Beghin, Eduardo Solano-Gonzàlez, Laurent Bezin, Stéphanie Brunet-Manquat, Julien Textoris, Anne-Catherine Prats, Hichem C Mertani, Charles Dumontet, et Jean-Jacques Diaz. 2009. « Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells ». *PloS One* 4 (9): e7147. doi:10.1371/journal.pone.0007147.

Bellodi, Cristian, Olya Krasnykh, Nikesha Haynes, Marily Theodoropoulou, Guang Peng, Lorenzo Montanaro, et Davide Ruggero. 2010. « Loss of function of the tumor suppressor DKC1 perturbs p27 translation control and contributes to pituitary tumorigenesis ». *Cancer research* 70 (14): 6026‑35. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4730.

Bellodi, Cristian, Mary McMahon, Adrian Contreras, Dayle Juliano, Noam Kopmar, Tomoka Nakamura, David Maltby, et al. 2013. « H/ACA Small RNA Dysfunctions in Disease Reveal Key Roles for Noncoding RNA Modifications in Hematopoietic Stem Cell Differentiation ». *Cell Reports* 3 (5): 1493‑1502. doi:10.1016/j.celrep.2013.04.030.

Beltrame, M, et D Tollervey. 1995. « Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. » *The EMBO Journal* 14 (17): 4350‑56.

Ben-Shem, Adam, Lasse Jenner, Gulnara Yusupova, et Marat Yusupov. 2010. « Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome ». *Science* 330 (6008): 1203‑9. doi:10.1126/science.1194294.

Berger, Caroline Madeleine, Xavier Gaume, et Philippe Bouvet. 2015. « The roles of nucleolin subcellular localization in cancer ». *Biochimie* 113 (juin): 78 ‑ 85. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.023.

Bierhoff, Holger, Miroslav Dundr, Annemieke A. Michels, et Ingrid Grummt. 2008. « Phosphorylation by Casein Kinase 2 Facilitates rRNA Gene Transcription by Promoting Dissociation of TIF-IA from Elongating RNA Polymerase I ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (16): 4988. doi:10.1128/MCB.00492-08.

Birkedal, Ulf, Mikkel Christensen-Dalsgaard, Nicolai Krogh, Radhakrishnan Sabarinathan, Jan Gorodkin, et Henrik Nielsen. 2015. « Profiling of Ribose Methylations in RNA by High-Throughput Sequencing ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54 (2): 451 ‑ 55. doi:10.1002/anie.201408362.

Biswas, Shyamasri, Greg Buhrman, Keith Gagnon, Carla Mattos, Bernard A Brown 2nd, et E Stuart Maxwell. 2011. « Comparative analysis of the 15.5kD box C/D snoRNP core protein in the primitive eukaryote Giardia lamblia reveals unique structural and functional features ». *Biochemistry* 50 (14): 2907‑18. doi:10.1021/bi1020474.

Bizarro, Jonathan, Christophe Charron, Séverine Boulon, Belinda Westman, Bérengère Pradet-Balade, Franck Vandermoere, Marie-Eve Chagot, et al. 2014. « Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control ». *The Journal of Cell Biology* 207 (4): 463‑80. doi:10.1083/jcb.201404160.

Blanchard, S. C., et J. D. Puglisi. 2001. « Solution Structure of the A Loop of 23S Ribosomal RNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (7): 3720 ‑25. doi:10.1073/pnas.051608498.

Bleichert, Franziska, Keith T. Gagnon, Bernard A. Brown, II, E. Stuart Maxwell, Andres E. Leschziner, Vinzenz M. Unger, et Susan J. Baserga. 2009. « A Di-sRNP Structure for Archaeal Box C/D sRNPs ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5946): 1384. doi:10.1126/science.1176099.

Boamah, Ernest K., Elena Kotova, Mikael Garabedian, Michael Jarnik, et Alexei V. Tulin. 2012. « Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) Regulates Ribosomal Biogenesis in Drosophila Nucleoli ». *PLoS Genetics* 8 (1): e1002442. doi:10.1371/journal.pgen.1002442.

Boisvert, François-Michel, Silvana van Koningsbruggen, Joaquín Navascués, et Angus I. Lamond. 2007. « The Multifunctional Nucleolus ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (7): 574 ‑ 85. doi:10.1038/nrm2184.

Bolt, Mark W., et Paul A. Mahoney. 1997. « High-Efficiency Blotting of Proteins of Diverse Sizes Following Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis ». *Analytical Biochemistry* 247 (2): 185‑92. doi:10.1006/abio.1997.2061.

Bonacci, Thomas, Stéphane Audebert, Luc Camoin, Emilie Baudelet, Ghislain Bidaut, Maxime Garcia, Ini-Isabée Witzel, et al. 2014. « Identification of New Mechanisms of Cellular Response to Chemotherapy by Tracking Changes in Post-Translational Modifications by Ubiquitin and Ubiquitin-like Proteins ». *Journal of Proteome Research* 13 (5): 2478‑94. doi:10.1021/pr401258d.

Boon, Kathy, Huib N. Caron, Ronald van Asperen, Linda Valentijn, Marie-Christine Hermus, Peter van Sluis, Ilja Roobeek, et al. 2001. « N-Myc Enhances the Expression of a Large Set of Genes Functioning in Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis ». *The EMBO Journal* 20 (6): 1383. doi:10.1093/emboj/20.6.1383.

Borovjagin, Anton V, et Susan A Gerbi. 1999. « U3 small nucleolar RNA is essential for cleavage at sites 1, 2 and 3 in pre-rRNA and determines which rRNA processing pathway is taken in Xenopus oocytes1 ». *Journal of Molecular Biology* 286 (5): 1347‑63. doi:10.1006/jmbi.1999.2527.

BOROVJAGIN, ANTON V., et SUSAN A. GERBI. 2004. « Xenopus U3 snoRNA docks on pre-rRNA through a novel base-pairing interaction ». *RNA* 10 (6): 942‑53. doi:10.1261/rna.5256704.

Bortolin-Cavaille, M.-L., et J. Cavaille. 2012. « The SNORD115 (H/MBII-52) and SNORD116 (H/MBII-85) gene clusters at the imprinted Prader-Willi locus generate canonical box C/D snoRNAs ». *Nucleic Acids Research* 40 (14): 6800‑6807. doi:10.1093/nar/gks321.

Bortoluzzi, S., F. d'Alessi, C. Romualdi, et G. A. Danieli. 2001. « Differential Expression of Genes Coding for Ribosomal Proteins in Different Human Tissues ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 17 (12): 1152‑57.

Boulon, Séverine, Nathalie Marmier-Gourrier, Bérengère Pradet-Balade, Laurence Wurth, Céline Verheggen, Beáta E. Jády, Benjamin Rothé, et al. 2008. « The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery ». *The Journal of Cell Biology* 180 (3): 579‑95. doi:10.1083/jcb.200708110.

Boulon, Séverine, Belinda J. Westman, Saskia Hutten, François-Michel Boisvert, et Angus I. Lamond. 2010. « The Nucleolus under Stress ». *Molecular Cell* 40 (2): 216‑27. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.024.

Bousquet-Antonelli, C., Y. Henry, J. P. G'elugne, M. Caizergues-Ferrer, et T. Kiss. 1997. « A Small Nucleolar RNP Protein Is Required for Pseudouridylation of Eukaryotic Ribosomal RNAs. » *The EMBO Journal* 16 (15): 4770. doi:10.1093/emboj/16.15.4770.

Bratkovič, Tomaž, et Boris Rogelj. 2011. « Biology and Applications of Small Nucleolar RNAs ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (23): 3843‑51. doi:10.1007/s00018-011-0762-y.

Buchhaupt, Markus, Sunny Sharma, Stefanie Kellner, Stefanie Oswald, Melanie Paetzold, Christian Peifer, Peter Watzinger, Jens Schrader, Mark Helm, et Karl-Dieter Entian. 2014. « Partial Methylation at Am100 in 18S rRNA of Baker's Yeast Reveals Ribosome Heterogeneity on the Level of Eukaryotic rRNA Modification ». *PloS One* 9 (2): e89640. doi:10.1371/journal.pone.0089640.

Burger, Kaspar, Bastian Mühl, Thomas Harasim, Michaela Rohrmoser, Anastassia Malamoussi, Mathias Orban, Markus Kellner, et al. 2010. « Chemotherapeutic Drugs Inhibit Ribosome Biogenesis at Various Levels ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (16): 12416‑25. doi:10.1074/jbc.M109.074211.

Caburet, Sandrine, Chiara Conti, Catherine Schurra, Ronald Lebofsky, Stuart J. Edelstein, et Aaron Bensimon. 2005. « Human Ribosomal RNA Gene Arrays Display a Broad Range of Palindromic Structures ». *Genome Research* 15 (8): 1079. doi:10.1101/gr.3970105.

Cahill, Niamh M, Kyle Friend, Wayne Speckmann, Zhu-Hong Li, Rebecca M Terns, Michael P Terns, et Joan A Steitz. 2002. « Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP ». *The EMBO Journal* 21 (14): 3816‑28. doi:10.1093/emboj/cdf376.

Caldwell, Christine M., et Kenneth B. Kaplan. 2009. « The Role of APC in Mitosis and in Chromosome Instability ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 656: 51‑64.

Carson, D. A., et A. Lois. 1995. « Cancer progression and p53 ». *The Lancet* 346 (8981): 1009‑11. doi:10.1016/S0140-6736(95)91693-8.

Cassidy, Suzanne B., Stuart Schwartz, Jennifer L. Miller, et Daniel J. Driscoll. 2012. « Prader-Willi Syndrome ». *Genetics in Medicine* 14 (1): 10‑26. doi:10.1038/gim.0b013e31822bead0.

Cavaillé, J., K. Buiting, M. Kiefmann, M. Lalande, C. I. Brannan, B. Horsthemke, J. P. Bachellerie, J. Brosius, et A. Hüttenhofer. 2000. « Identification of Brain-Specific and Imprinted Small Nucleolar RNA Genes Exhibiting an Unusual Genomic Organization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (26): 14311‑16. doi:10.1073/pnas.250426397.

Cavaillé, Jérôme, Monique Nicoloso, et Jean-Pierre Bachellerie. 1996. « Targeted Ribose Methylation of RNA in Vivo Directed by Tailored Antisense RNA Guides ». *Nature* 383 (6602): 732‑35. doi:10.1038/383732a0.

Cavaillé, Jérôme, Hervé Seitz, Martina Paulsen, Anne C. Ferguson-Smith, et Jean-Pierre Bachellerie. 2002. « Identification of Tandemly-Repeated C/D snoRNA Genes at the Imprinted Human 14q32 Domain Reminiscent of Those at the Prader–Willi/Angelman Syndrome Region ». *Human Molecular Genetics* 11 (13): 1527‑38. doi:10.1093/hmg/11.13.1527.

Charette, M, et M W Gray. 2000. « Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why ». *IUBMB Life* 49 (5): 341‑51. doi:10.1080/152165400410182.

Charron, C., X. Manival, A. Cléry, V. Senty-Ségault, B. Charpentier, N. Marmier-Gourrier, C. Branlant, et A. Aubry. 2004. « The Archaeal sRNA Binding Protein L7Ae has a 3D Structure Very Similar to that of its Eukaryal Counterpart While Having a Broader RNA-binding Specificity ». *Journal of Molecular Biology* 342 (3): 757‑73. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.046.

Chatr-aryamontri, Andrew, Bobby-Joe Breitkreutz, Sven Heinicke, Lorrie Boucher, Andrew Winter, Chris Stark, Julie Nixon, et al. 2013. « The BioGRID interaction database: 2013 update ». *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue): D816‑23. doi:10.1093/nar/gks1158.

Chaudhuri, S., K. Vyas, P. Kapasi, A. A. Komar, J. D. Dinman, S. Barik, et B. Mazumder. 2007. « Human ribosomal protein L13a is dispensable for canonical ribosome function but indispensable for efficient rRNA methylation ». *RNA* 13 (12): 2224‑37. doi:10.1261/rna.694007.

Chen, Chun-Long, Roland Perasso, Liang-Hu Qu, et Laurence Amar. 2007. « Exploration of pairing constraints identifies a 9 base-pair core within box C/D snoRNA-rRNA duplexes ». *Journal of Molecular Biology* 369 (3): 771‑83. doi:10.1016/j.jmb.2007.03.052.

Chen, M., et A. von Mikecz. 2000. « Specific Inhibition of rRNA Transcription and Dynamic Relocation of Fibrillarin Induced by Mercury ». *Experimental Cell Research* 259 (1): 225‑38. doi:10.1006/excr.2000.4923.

Chen, Min, Thomas Rockel, Gabriele Steinweger, Peter Hemmerich, Jakob Risch, et Anna von Mikecz. 2002. « Subcellular Recruitment of Fibrillarin to Nucleoplasmic Proteasomes: Implications for Processing of a Nucleolar Autoantigen ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (10): 3576‑87. doi:10.1091/mbc.02-05-0083.

Chen, Sifan, Maximilian Felix Blank, Aishwarya Iyer, Bingding Huang, Lin Wang, Ingrid Grummt, et Renate Voit. 2016. « SIRT7-Dependent Deacetylation of the U3-55k Protein Controls Pre-rRNA Processing ». *Nature Communications* 7 (février). doi:10.1038/ncomms10734.

Cheng, X, et R J Roberts. 2001. « AdoMet-Dependent Methylation, DNA Methyltransferases and Base Flipping ». *Nucleic Acids Research* 29 (18): 3784‑95.

Choi, Y.-W., Y.-W. Kim, S.-M. Bae, S.-Y. Kwak, H.-J. Chun, S.Y. Tong, H.N. Lee, et al. 2007. « Identification of Differentially Expressed Genes Using Annealing Control Primer-based GeneFishing in Human Squamous Cell Cervical Carcinoma ». *Clinical Oncology* 19 (5): 308‑18. doi:10.1016/j.clon.2007.02.010.

Choudhary, Chunaram, Chanchal Kumar, Florian Gnad, Michael L Nielsen, Michael Rehman, Tobias C Walther, Jesper V Olsen, et Matthias Mann. 2009. « Lysine acetylation targets protein

complexes and co-regulates major cellular functions ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5942): 834‑40. doi:10.1126/science.1175371.

Christensen, M E, A L Beyer, B Walker, et W M Lestourgeon. 1977. « Identification of NG, NG-Dimethylarginine in a Nuclear Protein from the Lower Eukaryote Physarum Polycephalum Homologous to the Major Proteins of Mammalian 40S Ribonucleoprotein Particles ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 74 (2): 621‑29.

Coller, Hilary A., Carla Grandori, Pablo Tamayo, Trent Colbert, Eric S. Lander, Robert N. Eisenman, et Todd R. Golub. 2000. « Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (7): 3260‑65.

Cong, Rong, Sadhan Das, Iva Ugrinova, Sanjeev Kumar, Fabien Mongelard, Jiemin Wong, et Philippe Bouvet. 2012. « Interaction of Nucleolin with Ribosomal RNA Genes and Its Role in RNA Polymerase I Transcription ». *Nucleic Acids Research* 40 (19): 9441 ‑ 54. doi:10.1093/nar/gks720.

Couté, Yohann, Jennifer A Burgess, Jean-Jacques Diaz, Christine Chichester, Frédérique Lisacek, Anna Greco, et Jean-Charles Sanchez. 2006. « Deciphering the human nucleolar proteome ». *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2): 215‑34. doi:10.1002/mas.20067.

Cowling, V. H., S. A. Turner, et M. D. Cole. 2014. « Burkitt|[rsquo]|s Lymphoma-Associated c-Myc Mutations Converge on a Dramatically Altered Target Gene Response and Implicate Nol5a|[sol]|Nop56 in Oncogenesis ». *Oncogene* 33 (27): 3519‑27. doi:10.1038/onc.2013.338.

Dai, Mu-Shui, et Hua Lu. 2008. « Crosstalk between c-Myc and Ribosome in Ribosomal Biogenesis and Cancer ». *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (3): 670. doi:10.1002/jcb.21895.

Dalmay, Tamas. 2013. « Mechanism of miRNA-Mediated Repression of mRNA Translation ». *Essays In Biochemistry* 54 (mai): 29‑38. doi:10.1042/bse0540029.

Darzacq, Xavier, Beáta E. Jády, Céline Verheggen, Arnold M. Kiss, Edouard Bertrand, et Tamás Kiss. 2002. « Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2’-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs ». *The EMBO Journal* 21 (11): 2746 ‑ 56. doi:10.1093/emboj/21.11.2746.

Darzacq, Xavier, Nupur Kittur, Sujayita Roy, Yaron Shav-Tal, Robert H. Singer, et U. Thomas Meier. 2006. « Stepwise RNP Assembly at the Site of H/ACA RNA Transcription in Human Cells ». *The Journal of Cell Biology* 173 (2): 207‑18. doi:10.1083/jcb.200601105.

David, E, J B McNeil, V Basile, et R E Pearlman. 1997. « An unusual fibrillarin gene and protein: structure and functional implications ». *Molecular Biology of the Cell* 8 (6): 1051‑61.

Davis, D. R. 1995. « Stabilization of RNA Stacking by Pseudouridine ». *Nucleic Acids Research* 23 (24): 5020‑26.

de Silva, Udesh, Zhaoli Zhou, et Bernard A Brown 2nd. 2012. « Structure of Aeropyrum pernix fibrillarin in complex with natively bound S-adenosyl-L-methionine at 1.7 Å resolution ». *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 68 (Pt 8): 854‑59. doi:10.1107/S1744309112026528.

de Smith, Adam J., Carolin Purmann, Robin G. Walters, Richard J. Ellis, Susan E. Holder, Mieke M. Van Haelst, Angela F. Brady, et al. 2009. « A Deletion of the HBII-85 Class of Small Nucleolar RNAs (snoRNAs) Is Associated with Hyperphagia, Obesity and Hypogonadism ». *Human Molecular Genetics* 18 (17): 3257‑65. doi:10.1093/hmg/ddp263.

Decatur, Wayne A, et Maurille J Fournier. 2002. « rRNA modifications and ribosome function ». *Trends in Biochemical Sciences* 27 (7): 344‑51.

Deffrasnes, Celine, Glenn A. Marsh, Chwan Hong Foo, Christina L. Rootes, Cathryn M. Gould, Julian Grusovin, Paul Monaghan, et al. 2016. « Genome-Wide siRNA Screening at Biosafety Level 4 Reveals a Crucial Role for Fibrillarin in Henipavirus Infection ». *PLoS Pathogens* 12 (3): e1005478. doi:10.1371/journal.ppat.1005478.

Delcros, Jean-Guy, et Patrick Mehlen. 2013. « Les récepteurs à dépendance : carrefours entre vie et mort ». *Bulletin du Cancer* 100 (12): 1261‑74. doi:10.1684/bdc.2013.1858.

Delloye-Bourgeois, Céline, David Goldschneider, Andrea Paradisi, Gabriel Therizols, Stéphane Belin, Sabine Hacot, Manuel Rosa-Calatrava, et al. 2012. « Nucleolar Localization of a Netrin-1 Isoform Enhances Tumor Cell Proliferation ». *Sci. Signal.* 5 (236): ra57-ra57. doi:10.1126/scisignal.2002456.

Deng, Lu, Natalia G Starostina, Zhi-Jie Liu, John P Rose, Rebecca M Terns, Michael P Terns, et Bi-Cheng Wang. 2004. « Structure determination of fibrillarin from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus ». *Biochemical and biophysical research communications* 315 (3): 726‑32. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.114.

Dennis, Patrick P., Arina Omer, et Todd Lowe. 2001. « A Guided Tour: Small RNA Function in Archaea ». *Molecular Microbiology* 40 (3): 509‑19. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02381.x.

Dephoure, Noah, Chunshui Zhou, Judit Villén, Sean A Beausoleil, Corey E Bakalarski, Stephen J Elledge, et Steven P Gygi. 2008. « A Quantitative Atlas of Mitotic Phosphorylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10762‑67. doi:10.1073/pnas.0805139105.

Derenzini, Massimo, Lorenzo Montanaro, et Davide Treré. 2009. « What the nucleolus says to a tumour pathologist ». *Histopathology* 54 (6): 753‑62. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03168.x.

Di Fiore, Riccardo, Antonella D'Anneo, Giovanni Tesoriere, et Renza Vento. 2013. « RB1 in Cancer: Different Mechanisms of RB1 Inactivation and Alterations of pRb Pathway in Tumorigenesis ». *Journal of Cellular Physiology* 228 (8): 1676‑87. doi:10.1002/jcp.24329.

Dieci, Giorgio, Milena Preti, et Barbara Montanini. 2009. « Eukaryotic snoRNAs: A Paradigm for Gene Expression Flexibility ». *Genomics* 94 (2): 83‑88. doi:10.1016/j.ygeno.2009.05.002.

Dinman, Jonathan D. 2016. « Pathways to Specialized Ribosomes: The Brussels Lecture ». *Journal of Molecular Biology*. Consulté le février 26. doi:10.1016/j.jmb.2015.12.021.

Dokal, I. 2000. « Dyskeratosis Congenita in All Its Forms ». *British Journal of Haematology* 110 (4): 768‑79.

Dong, Xue-Yuan, Peng Guo, Jeff Boyd, Xiaodong Sun, Qunna Li, Wei Zhou, et Jin-Tang Dong. 2009. « Implication of snoRNA U50 in human breast cancer ». *Journal of Genetics and Genomics* 36 (8): 447‑54. doi:10.1016/S1673-8527(08)60134-4.

Dong, Xue-Yuan, Carmen Rodriguez, Peng Guo, Xiaodong Sun, Jeffrey T. Talbot, Wei Zhou, John Petros, et al. 2008. « SnoRNA U50 Is a Candidate Tumor Suppressor Gene at 6q14.3 with a Mutation Associated with Clinically Significant Prostate Cancer ». *Human Molecular Genetics* 17 (7): 1031. doi:10.1093/hmg/ddm375.

Dorrello, N. Valerio, Angelo Peschiaroli, Daniele Guardavaccaro, Nancy H. Colburn, Nicholas E. Sherman, et Michele Pagano. 2006. « S6K1- and betaTRCP-Mediated Degradation of PDCD4 Promotes Protein Translation and Cell Growth ». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5798): 467‑71. doi:10.1126/science.1130276.

Dragon, François, Jennifer E. G. Gallagher, Patricia A. Compagnone-Post, Brianna M. Mitchell, Kara A. Porwancher, Karen A. Wehner, Steven Wormsley, et al. 2002. « A Large Nucleolar U3 Ribonucleoprotein Required for 18S Ribosomal RNA Biogenesis ». *Nature* 417 (6892): 967‑70. doi:10.1038/nature00769.

Dresios, John, Stephen A. Chappell, Wei Zhou, et Vincent P. Mauro. 2006. « An mRNA-rRNA Base-Pairing Mechanism for Translation Initiation in Eukaryotes ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (1): 30‑34. doi:10.1038/nsmb1031.

Drygin, Denis, William G. Rice, et Ingrid Grummt. 2010. « The RNA Polymerase I Transcription Machinery: An Emerging Target for the Treatment of Cancer ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50 (1): 131 - 56. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105844.

Duan, Jingqi, Ling Li, Jing Lu, Wei Wang, et Keqiong Ye. 2009. « Structural Mechanism of Substrate RNA Recruitment in H/ACA RNA-Guided Pseudouridine Synthase ». *Molecular Cell* 34 (4): 427‑39. doi:10.1016/j.molcel.2009.05.005.

Duker, Angela L, Blake C Ballif, Erawati V Bawle, Richard E Person, Sangeetha Mahadevan, Sarah Alliman, Regina Thompson, et al. 2010. « Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader–Willi syndrome ». *European Journal of Human Genetics* 18 (11): 1196 ‑ 1201. doi:10.1038/ejhg.2010.102.

Dundr, Miroslav, Urs Hoffmann-Rohrer, Qiyue Hu, Ingrid Grummt, Lawrence I. Rothblum, Robert D. Phair, et Tom Misteli. 2002. « A Kinetic Framework for a Mammalian RNA Polymerase in Vivo ». *Science* 298 (5598): 1623‑26. doi:10.1126/science.1076164.

Durut, Nathalie, et Julio Sáez-Vásquez. 2015. « Nucleolin: Dual roles in rDNA chromatin transcription ». *Gene*, SI: RNA Polymerases I,III,IV, &V, 556 (1): 7‑12. doi:10.1016/j.gene.2014.09.023.

Engel, Christoph, Sarah Sainsbury, Alan C. Cheung, Dirk Kostrewa, et Patrick Cramer. 2013. « RNA Polymerase I Structure and Transcription Regulation ». *Nature* 502 (7473): 650 ‑ 55. doi:10.1038/nature12712.

Enright, C. A., E. S. Maxwell, G. L. Eliceiri, et B. Sollner-Webb. 1996. « 5'ETS rRNA Processing Facilitated by Four Small RNAs: U14, E3, U17, and U3. » *RNA* 2 (11): 1094.

Falaleeva, Marina, Justin Surface, Manli Shen, Pierre de la Grange, et Stefan Stamm. 2015. « SNORD116 and SNORD115 Change Expression of Multiple Genes and Modify Each Other's Activity ». *Gene* 572 (2): 266‑73. doi:10.1016/j.gene.2015.07.023.

Fatica, A, S Galardi, F Altieri, et I Bozzoni. 2000. « Fibrillarin binds directly and specifically to U16 box C/D snoRNA. » *RNA* 6 (1): 88‑95.

« FBL - rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin - Homo sapiens (Human) - FBL gene & protein ». 2016. Consulté le janvier 28. http://www.uniprot.org/uniprot/P22087.

« FBL Result Summary | BioGRID ». 2016. Consulté le février 15. http://thebiogrid.org/108399/summary/homo-sapiens/fbl.html.

Fearon, Eric R., et Bert Vogelstein. 1990. « A genetic model for colorectal tumorigenesis ». *Cell* 61 (5): 759‑67. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I.

Feder, Marcin, Jakub Pas, Lucjan S. Wyrwicz, et Janusz M. Bujnicki. 2003. « Molecular phylogenetics of the RrmJ/fibrillarin superfamily of ribose 2'-O-methyltransferases ». *Gene* 302 (1–2): 129‑38. doi:10.1016/S0378-1119(02)01097-1.

Filipowicz, Witold, et Vanda Pogacić. 2002. « Biogenesis of Small Nucleolar Ribonucleoproteins ». *Current Opinion in Cell Biology* 14 (3): 319‑27.

Forrester, Kathleen, Concepcion Almoguera, Kyuhyung Han, William E. Grizzle, et Manuel Perucho. 1987. « Detection of High Incidence of K-Ras Oncogenes during Human Colon Tumorigenesis ». *, Published Online: 28 May 1987; | doi:10.1038/327298a0* 327 (6120): 298 ‑ 303. doi:10.1038/327298a0.

Franchin, Cinzia, Luca Cesaro, Mauro Salvi, Renato Millioni, Elisabetta Iori, Paolo Cifani, Peter James, Giorgio Arrigoni, et Lorenzo Pinna. 2015. « Quantitative Analysis of a Phosphoproteome Readily Altered by the Protein Kinase CK2 Inhibitor Quinalizarin in HEK-293T Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1854 (6): 609‑23. doi:10.1016/j.bbapap.2014.09.017.

Friedrich, J. Karsten, Kostya I. Panov, Pavel Cabart, Jackie Russell, et Joost C. B. M. Zomerdijk. 2005. « TBP-TAF Complex SL1 Directs RNA Polymerase I Pre-Initiation Complex Formation and Stabilizes Upstream Binding Factor at the rDNA Promoter ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (33). doi:10.1074/jbc.M501595200.

Fukai, F., M. Mashimo, K. Akiyama, T. Goto, S. Tanuma, et T. Katayama. 1998. « Modulation of Apoptotic Cell Death by Extracellular Matrix Proteins and a Fibronectin-Derived Antiadhesive Peptide ». *Experimental Cell Research* 242 (1): 92‑99.

Gagné, Jean-Philippe, Emilie Pic, Maxim Isabelle, Jana Krietsch, Chantal Ethier, Eric Paquet, Isabelle Kelly, et al. 2012. « Quantitative Proteomics Profiling of the poly(ADP-Ribose)-Related Response to Genotoxic Stress ». *Nucleic Acids Research* 40 (16): 7788 - 7805. doi:10.1093/nar/gks486.

Galardi, Silvia, Alessandro Fatica, Angela Bachi, Andrea Scaloni, Carlo Presutti, et Irene Bozzoni. 2002. « Purified Box C/D snoRNPs Are Able To Reproduce Site-Specific 2'-O-Methylation of Target RNA In Vitro ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (19): 6663‑68. doi:10.1128/MCB.22.19.6663-6668.2002.

Ganot, Philippe, Marie-Line Bortolin, et Tamás Kiss. 1997. « Site-Specific Pseudouridine Formation in Preribosomal RNA Is Guided by Small Nucleolar RNAs ». *Cell* 89 (5): 799 - 809. doi:10.1016/S0092-8674(00)80263-9.

Garnett, Mathew J., et Richard Marais. 2004. « Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene ». *Cancer Cell* 6 (4): 313‑19. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.022.

Gaspin, C., J. Cavaillé, G. Erauso, et J. P. Bachellerie. 2000. « Archaeal Homologs of Eukaryotic Methylation Guide Small Nucleolar RNAs: Lessons from the Pyrococcus Genomes ». *Journal of Molecular Biology* 297 (4): 895‑906. doi:10.1006/jmbi.2000.3593.

Gatta, G., R. Capocaccia, M. Sant, C. Bell, J. Coebergh, R. Damhuis, J. Faivre, et al. 2000. « Understanding Variations in Survival for Colorectal Cancer in Europe: A EUROCARE High Resolution Study ». *Gut* 47 (4): 533. doi:10.1136/gut.47.4.533.

Gautier, T, T Bergès, D Tollervey, et E Hurt. 1997. « Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. » *Molecular and Cellular Biology* 17 (12): 7088‑98.

Ge, Junhui, et Yi-Tao Yu. 2013. « RNA pseudouridylation: new insights into an old modification ». *Trends in biochemical sciences* 38 (4): 210‑18. doi:10.1016/j.tibs.2013.01.002.

Ghoshal, Kalpana, et Samson T. Jacob. 1997. « An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug ». *Biochemical Pharmacology* 53 (11): 1569 - 75. doi:10.1016/S0006-2952(97)00040-3.

Gilbert, Wendy V. 2011. « Functional Specialization of Ribosomes? » *Trends in biochemical sciences* 36 (3): 127‑32. doi:10.1016/j.tibs.2010.12.002.

Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, et P. Bouvet. 1999. « Structure and Functions of Nucleolin ». *Journal of Cell Science* 112 (6): 761‑72.

Ginisty, Hervé, François Amalric, et Philippe Bouvet. 1998. « Nucleolin Functions in the First Step of Ribosomal RNA Processing ». *The EMBO Journal* 17 (5): 1476 - 86. doi:10.1093/emboj/17.5.1476.

Girard, J. P., H. Lehtonen, M. Caizergues-Ferrer, F. Amalric, D. Tollervey, et B. Lapeyre. 1992. « GAR1 Is an Essential Small Nucleolar RNP Protein Required for Pre-rRNA Processing in Yeast. » *The EMBO Journal* 11 (2): 673.

Girardot, Michael, Jérôme Cavaillé, et Robert Feil. 2012. « Small regulatory RNAs controlled by genomic imprinting and their contribution to human disease ». *Epigenetics* 7 (12): 1341 - 48. doi:10.4161/epi.22884.

Gonzales, Fernando A., Nilson I. T. Zanchin, Juliana S. Luz, et Carla C. Oliveira. 2005. « Characterization of Saccharomyces cerevisiae Nop17p, a Novel Nop58p-Interacting Protein that is Involved in Pre-rRNA Processing ». *Journal of Molecular Biology* 346 (2): 437 - 55. doi:10.1016/j.jmb.2004.11.071.

Gonzalez, I. L., J. E. Sylvester, et R. D. Schmickel. 1988. « Human 28S Ribosomal RNA Sequence Heterogeneity ». *Nucleic Acids Research* 16 (21): 10213‑24.

Goodrich, David W. 2006. « The Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene, the Exception That Proves the Rule ». *Oncogene* 25 (38): 5233. doi:10.1038/sj.onc.1209616.

Goudarzi, Kaveh M., et Mikael S. Lindström. 2016. « Role of Ribosomal Protein Mutations in Tumor Development (Review) ». *International Journal of Oncology* 48 (4): 1313. doi:10.3892/ijo.2016.3387.

Grandi, Paola, Vladimir Rybin, Jochen Baßler, Elisabeth Petfalski, Daniela Strauß, Martina Marzioch, Thorsten Schäfer, et al. 2002. « 90S Pre-Ribosomes Include the 35S Pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S Subunit Processing Factors but Predominantly Lack 60S Synthesis Factors ». *Molecular Cell* 10 (1): 105‑15. doi:10.1016/S1097-2765(02)00579-8.

Grandori, Carla, Natividad Gomez-Roman, Zoe A. Felton-Edkins, Celine Ngouenet, Denise A. Galloway, Robert N. Eisenman, et Robert J. White. 2005. « C-Myc Binds to Human Ribosomal DNA and Stimulates Transcription of rRNA Genes by RNA Polymerase I ». *Nature Cell Biology* 7 (3): 311‑18. doi:10.1038/ncb1224.

Granneman, Sander, Grzegorz Kudla, Elisabeth Petfalski, et David Tollervey. 2009. « Identification of Protein Binding Sites on U3 snoRNA and Pre-rRNA by UV Cross-Linking and High-Throughput Analysis of cDNAs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (24): 9613. doi:10.1073/pnas.0901997106.

Greber, Basil J., Daniel Boehringer, Alexander Leitner, Philipp Bieri, Felix Voigts-Hoffmann, Jan P. Erzberger, Marc Leibundgut, Ruedi Aebersold, et Nenad Ban. 2014. « Architecture of the Large Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome ». *Nature* 505 (7484): 515‑19. doi:10.1038/nature12890.

Grisendi, Silvia, Cristina Mecucci, Brunangelo Falini, et Pier Paolo Pandolfi. 2006. « Nucleophosmin and Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 6 (7): 493‑505. doi:10.1038/nrc1885.

Grosstessner-Hain, Karin, Björn Hegemann, Maria Novatchkova, Jonathan Rameseder, Brian A. Joughin, Otto Hudecz, Elisabeth Roitinger, et al. 2011. « Quantitative Phospho-Proteomics to Investigate the Polo-like Kinase 1-Dependent Phospho-Proteome ». *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (11): M111.008540. doi:10.1074/mcp.M111.008540.

Grummt, Ingrid. 2013. « The Nucleolus—guardian of Cellular Homeostasis and Genome Integrity ». *Chromosoma* 122 (6): 487‑97. doi:10.1007/s00412-013-0430-0.

Guo, Ailan, Hongbo Gu, Jing Zhou, Daniel Mulhern, Yi Wang, Kimberly A. Lee, Vicky Yang, et al. 2014. « Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation ». *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 13 (1): 372‑87. doi:10.1074/mcp.O113.027870.

Hacot, Sabine, Yohann Coute, Stéphane Belin, Marie Alexandra Albaret, Hichem C. Mertani, Jean-Charles Sanchez, Manuel Rosa-Calatrava, et Jean-Jacques Diaz. 2010. « Isolation of Nucleoli ». *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al.]* Chapter 3 (juin): Unit3.36. doi:10.1002/0471143030.cb0336s47.

Hamma, Tomoko, Steve L. Reichow, Gabriele Varani, et Adrian R. Ferré-D'Amaré. 2005. « The Cbf5-Nop10 Complex Is a Molecular Bracket That Organizes Box H/ACA RNPs ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (12): 1101‑7. doi:10.1038/nsmb1036.

Hannan, Katherine M., Yves Brandenburger, Anna Jenkins, Kerith Sharkey, Alice Cavanaugh, Lawrence Rothblum, Tom Moss, et al. 2003. « mTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Nucleolar Transcription Factor UBF† ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (23): 8862. doi:10.1128/MCB.23.23.8862-8877.2003.

Hardingham, J. E., W. J. Butler, D. Roder, A. Dobrovic, R. B. Dymock, R. E. Sage, et I. C. Roberts-Thomson. 1998. « Somatic Mutations, Acetylator Status, and Prognosis in Colorectal Cancer ». *Gut* 42 (5): 669‑72.

Hayakumo, T., T. Azuma, M. Nakajima, K. Yasuda, E. Cho, H. Mukai, Y. Mizuma, T. Ashihara, S. Mizuno, et S. Hirano. 1991. « [Prevalence of K-ras gene mutations in human colorectal cancers] ». *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi = The Japanese Journal of Gastro-Enterology* 88 (8): 1539‑44.

Hegemann, Bjorn, James R. A. Hutchins, Otto Hudecz, Maria Novatchkova, Jonathan Rameseder, Martina M. Sykora, Sihan Liu, et al. 2011. « Systematic Phosphorylation Analysis of Human Mitotic Protein Complexes ». *Science Signaling* 4 (198): rs12. doi:10.1126/scisignal.2001993.

Heidelberger, C., N. K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Pleven, et J. Scheiner. 1957. « Fluorinated Pyrimidines, a New Class of Tumour-Inhibitory Compounds ». *Nature* 179 (4561): 663‑66.

Heiss, N. S., S. W. Knight, T. J. Vulliamy, S. M. Klauck, S. Wiemann, P. J. Mason, A. Poustka, et I. Dokal. 1998. « X-Linked Dyskeratosis Congenita Is Caused by Mutations in a Highly Conserved Gene with Putative Nucleolar Functions ». *Nature Genetics* 19 (1): 32‑38. doi:10.1038/ng0598-32.

Heix, J., A. Vente, R. Voit, A. Budde, T. M. Michaelidis, et I. Grummt. 1998. « Mitotic Silencing of Human rRNA Synthesis: Inactivation of the Promoter Selectivity Factor SL1 by cdc2/cyclin B-Mediated Phosphorylation. » *The EMBO Journal* 17 (24): 7373. doi:10.1093/emboj/17.24.7373.

Henras, A. K., J. Soudet, M. Gérus, S. Lebaron, M. Caizergues-Ferrer, A. Mougin, et Y. Henry. 2008. « The Post-Transcriptional Steps of Eukaryotic Ribosome Biogenesis ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (15): 2334‑59. doi:10.1007/s00018-008-8027-0.

Henríquez, R., G. Blobel, et J. P. Aris. 1990. « Isolation and Sequencing of NOP1. A Yeast Gene Encoding a Nucleolar Protein Homologous to a Human Autoimmune Antigen ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (4): 2209‑15.

Higa-Nakamine, Sayomi, Takeo Suzuki, Tamayo Uechi, Anirban Chakraborty, Yukari Nakajima, Mikako Nakamura, Naoko Hirano, Tsutomu Suzuki, et Naoya Kenmochi. 2012. « Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish ». *Nucleic Acids Research* 40 (1): 391‑98. doi:10.1093/nar/gkr700.

Hinnebusch, Alan G., et Jon R. Lorsch. 2012. « The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (10). doi:10.1101/cshperspect.a011544.

Hirose, Tetsuro, Mei-Di Shu, et Joan A Steitz. 2003. « Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells ». *Molecular cell* 12 (1): 113‑23.

Ho, S B, P S Yan, R Dahiya, B A Neuschwander-Tetri, C Basbaum, et Y S Kim. 1994. « Stable differentiation of a human colon adenocarcinoma cell line by sodium butyrate is associated with multidrug resistance ». *Journal of Cellular Physiology* 160 (2): 213 ‑ 26. doi:10.1002/jcp.1041600202.

Holz, Marina K., Bryan A. Ballif, Steven P. Gygi, et John Blenis. 2005. « mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events ». *Cell* 123 (4): 569‑80. doi:10.1016/j.cell.2005.10.024.

Horiguchi, Gorou, Mieke Van Lijsebettens, Héctor Candela, José Luis Micol, et Hirokazu Tsukaya. 2012. « Ribosomes and Translation in Plant Developmental Control ». *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* 191 ‑ 192 (août): 24 ‑ 34. doi:10.1016/j.plantsci.2012.04.008.

Hoskins, Jason, et J. Scott Butler. 2007. « Evidence for Distinct DNA- and RNA-Based Mechanisms of 5-Fluorouracil Cytotoxicity in Saccharomyces Cerevisiae ». *Yeast (Chichester, England)* 24 (10): 861‑70. doi:10.1002/yea.1516.

Hsieh, Jan-Sing, Shiu-Ru Lin, Mei-Yin Chang, Fang-Ming Chen, Chien-Yu Lu, Tsung-Jen Huang, Yu-Sheng Huang, Che-Jen Huang, et Jaw-Yuan Wang. 2005. « APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance ». *The American Surgeon* 71 (4): 336‑43.

Huang, Chao, John Karijolich, et Yi-Tao Yu. 2016. « Detection and Quantification of RNA 2'-O-Methylation and Pseudouridylation ». *Methods (San Diego, Calif.)*, février. doi:10.1016/j.ymeth.2016.02.003.

Huang, L., M. Pookanjanatavip, X. Gu, et D. V. Santi. 1998. « A Conserved Aspartate of tRNA Pseudouridine Synthase Is Essential for Activity and a Probable Nucleophilic Catalyst ». *Biochemistry* 37 (1): 344‑51. doi:10.1021/bi971874+.

Huang, Ruimin, Tangming Wu, Liang Xu, Aihua Liu, Yuan Ji, et Gengxi Hu. 2002. « Upstream Binding Factor up-Regulated in Hepatocellular Carcinoma Is Related to the Survival and Cisplatin-Sensitivity of Cancer Cells ». *The FASEB Journal* 16 (3): 293‑301. doi:10.1096/fj.01-0687com.

Information, National Center for Biotechnology, U. S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, et 20894 Usa. 1995. « A Perinucleolar Compartment Contains Several RNA Polymerase III Transcripts as Well as the Polypyrimidine Tract-Binding Protein, hnRNP I [Published Erratum Appears in J Cell Biol 1995 Jul;130(2):497-500] ». *The Journal of Cell Biology* 129 (5): 1181.

Ionov, Y, H Yamamoto, S Krajewski, J C Reed, et M Perucho. 2000. « Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (20): 10872‑77. doi:10.1073/pnas.190210897.

Jack, Karen, Cristian Bellodi, Dori M Landry, Rachel O Niederer, Arturas Meskauskas, Sharmishtha Musalgaonkar, Noam Kopmar, et al. 2011. « rRNA Pseudouridylation Defects Affect Ribosomal Ligand Binding and Translational Fidelity from Yeast to Human Cells ». *Molecular Cell* 44 (4): 660‑66. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.017.

James, Allison, Yubo Wang, Himanshu Raje, Raphyel Rosby, et Patrick DiMario. 2014. « Nucleolar stress with and without p53 ». *Nucleus* 5 (5): 402‑26. doi:10.4161/nucl.32235.

Jansen, R P, E C Hurt, H Kern, H Lehtonen, M Carmo-Fonseca, B Lapeyre, et D Tollervey. 1991. « Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast ». *The Journal of cell biology* 113 (4): 715‑29.

Jen, J., S. M. Powell, N. Papadopoulos, K. J. Smith, S. R. Hamilton, B. Vogelstein, et K. W. Kinzler. 1994. « Molecular Determinants of Dysplasia in Colorectal Lesions ». *Cancer Research* 54 (21): 5523‑26.

Jones, Jeffrey, Kenneth Wu, Yingying Yang, Cortnie Guerrero, Nadinath Nillegoda, Zhen-Qiang Pan, et Lan Huang. 2008. « A Targeted Proteomic Analysis of the Ubiquitin-Like Modifier Nedd8 and Associated Proteins ». *Journal of proteome research* 7 (3): 1274‑87. doi:10.1021/pr700749v.

Jones, Kevin W., Karen Gorzynski, Chadwick M. Hales, Utz Fischer, Farah Badbanchi, Rebecca M. Terns, et Michael P. Terns. 2001. « Direct Interaction of the Spinal Muscular Atrophy Disease Protein SMN with the Small Nucleolar RNA-Associated Protein Fibrillarin ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (42): 38645‑51. doi:10.1074/jbc.M106161200.

Jungmichel, Stephanie, Florian Rosenthal, Matthias Altmeyer, Jiri Lukas, Michael O. Hottiger, et Michael L. Nielsen. 2013. « Proteome-wide Identification of Poly(ADP-Ribosyl)ation Targets in Different Genotoxic Stress Responses ». *Molecular Cell* 52 (2): 272 ‑ 85. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.026.

Kaiser, Ivan I., Myron Jacobson, et Charles Hedgcoth. 1969. « Studies on 5-Fluorouracil-Containing Ribonucleic Acid III. GREATLY REDUCED LEVEL OF 5,6-DIHYDROURIDINE IN FLUOROURACIL-CONTAINING TRANSFER RIBONUCLEIC ACID FROM ESCHERICHIA COLI ». *Journal of Biological Chemistry* 244 (24): 6707‑8.

Kass, Susan, Kazimierz Tyc, Joan A. Steitz, et Barbara Sollner-Webb. 1990. « The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing ». *Cell* 60 (6): 897‑908. doi:10.1016/0092-8674(90)90338-F.

Keating, Gillian M. 2014. « Bevacizumab: A Review of Its Use in Advanced Cancer ». *Drugs* 74 (16): 1891‑1925. doi:10.1007/s40265-014-0302-9.

Kellis, Manolis, Bruce W. Birren, et Eric S. Lander. 2004. « Proof and Evolutionary Analysis of Ancient Genome Duplication in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae ». *Nature* 428 (6983): 617‑24. doi:10.1038/nature02424.

Kettenbach, Arminja N., Devin K. Schweppe, Brendan K. Faherty, Dov Pechenick, Alexandre A. Pletnev, et Scott A. Gerber. 2011. « Quantitative Phosphoproteomics Identifies Substrates and

Functional Modules of Aurora and Polo-Like Kinase Activities in Mitotic Cells ». *Science signaling* 4 (179). doi:10.1126/scisignal.2001497.

Khatter, Heena, Alexander G. Myasnikov, S. Kundhavai Natchiar, et Bruno P. Klaholz. 2015. « Structure of the Human 80S Ribosome ». *Nature* 520 (7549): 640‑45. doi:10.1038/nature14427.

Killian, Audrey, Nasrin Sarafan-Vasseur, Richard Sesboüé, Florence Le Pessot, France Blanchard, Aude Lamy, Michelle Laurent, Jean-Michel Flaman, et Thierry Frébourg. 2006. « Contribution of the BOP1 Gene, Located on 8q24, to Colorectal Tumorigenesis ». *Genes, Chromosomes & Cancer* 45 (9): 874‑81. doi:10.1002/gcc.20351.

Kim, Sang Hyon, Stuart MacFarlane, Natalia O. Kalinina, Daria V. Rakitina, Eugene V. Ryabov, Trudi Gillespie, Sophie Haupt, John W. S. Brown, et Michael Taliansky. 2007. « Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (26): 11115‑20. doi:10.1073/pnas.0704632104.

Kim, W., et J. E. Kim. 2013. « SIRT7 an Emerging Sirtuin: Deciphering Newer Roles ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 64 (5): 531‑34.

Kim, Woong, Eric J Bennett, Edward L Huttlin, Ailan Guo, Jing Li, Anthony Possemato, Mathew E Sowa, et al. 2011. « Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome ». *Molecular Cell* 44 (2): 325‑40. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.025.

King, Thomas H., Ben Liu, Ryan R. McCully, et Maurille J. Fournier. 2003. « Ribosome Structure and Activity Are Altered in Cells Lacking snoRNPs That Form Pseudouridines in the Peptidyl Transferase Center ». *Molecular Cell* 11 (2): 425‑35.

Kipnis, R. J., J. Craft, et J. A. Hardin. 1990. « The Analysis of Antinuclear and Antinucleolar Autoantibodies of Scleroderma by Radioimmunoprecipitation Assays ». *Arthritis and Rheumatism* 33 (9): 1431‑37.

Kiran, Shashi, Tarique Anwar, Manjari Kiran, et Gayatri Ramakrishna. 2015. « Sirtuin 7 in cell proliferation, stress and disease: Rise of the Seventh Sirtuin! » *Cellular Signalling* 27 (3): 673‑82. doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.026.

Kirsch, J. F., P. Siekevitz, et G. E. Palade. 1960. « Amino Acid Incorporation in Vitro by Ribonucleoprotein Particles Detached from Guinea Pig Liver Microsomes ». *Journal of Biological Chemistry* 235 (5): 1419‑24.

Kishore, S., et S. Stamm. 2006. « Regulation of Alternative Splicing by snoRNAs ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 71: 329‑34. doi:10.1101/sqb.2006.71.024.

Kiss, Tamás, Eléonore Fayet-Lebaron, et Beáta E. Jády. 2010. « Box H/ACA Small Ribonucleoproteins ». *Molecular Cell* 37 (5): 597‑606. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.032.

Kiss-László, Z, Y Henry, J P Bachellerie, M Caizergues-Ferrer, et T Kiss. 1996. « Site-Specific Ribose Methylation of Preribosomal RNA: A Novel Function for Small Nucleolar RNAs ». *Cell* 85 (7): 1077‑88.

Kiss-László, Z, Y Henry, et T Kiss. 1998. « Sequence and Structural Elements of Methylation Guide snoRNAs Essential for Site-Specific Ribose Methylation of Pre-rRNA ». *The EMBO Journal* 17 (3): 797‑807. doi:10.1093/emboj/17.3.797.

Knight, S. W., T. J. Vulliamy, B. Morgan, K. Devriendt, P. J. Mason, et I. Dokal. 2001. « Identification of Novel DKC1 Mutations in Patients with Dyskeratosis Congenita: Implications for Pathophysiology and Diagnosis ». *Human Genetics* 108 (4): 299‑303.

Koh, Cheryl M, Bora Gurel, Siobhan Sutcliffe, Martin J Aryee, Denise Schultz, Tsuyoshi Iwata, Motohide Uemura, et al. 2011. « Alterations in nucleolar structure and gene expression programs in prostatic neoplasia are driven by the MYC oncogene ». *The American Journal of Pathology* 178 (4): 1824‑34. doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.040.

Komili, Suzanne, Natalie G. Farny, Frederick P. Roth, et Pamela A. Silver. 2007. « Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression ». *Cell* 131 (3): 557‑71. doi:10.1016/j.cell.2007.08.037.

Kondrashov, Nadya, Aya Pusic, Craig R Stumpf, Kunihiko Shimizu, Andrew C Hsieh, Shifeng Xue, Junko Ishijima, Toshihiko Shiroishi, et Maria Barna. 2011. « Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning ». *Cell* 145 (3): 383‑97. doi:10.1016/j.cell.2011.03.028.

Kotova, Elena, Michael Jarnik, et Alexei V. Tulin. 2009. « Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 Is Required for Protein Localization to Cajal Body ». *PLoS Genetics* 5 (2). doi:10.1371/journal.pgen.1000387.

Krieg, J., J. Hofsteenge, et G. Thomas. 1988. « Identification of the 40 S Ribosomal Protein S6 Phosphorylation Sites Induced by Cycloheximide ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (23): 11473‑77.

Krogan, Nevan J., Gerard Cagney, Haiyuan Yu, Gouqing Zhong, Xinghua Guo, Alexandr Ignatchenko, Joyce Li, et al. 2006. « Global Landscape of Protein Complexes in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae ». *Nature* 440 (7084): 637‑43. doi:10.1038/nature04670.

Kruger, K., P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, et T. R. Cech. 1982. « Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena ». *Cell* 31 (1): 147‑57.

Kufe, D. W., et P. P. Major. 1981. « 5-Fluorouracil Incorporation into Human Breast Carcinoma RNA Correlates with Cytotoxicity ». *The Journal of Biological Chemistry* 256 (19): 9802‑5.

Kuhn, Jeffrey F., Elizabeth J. Tran, et E. Stuart Maxwell. 2002. « Archaeal ribosomal protein L7 is a functional homolog of the eukaryotic 15.5kD/Snu13p snoRNP core protein ». *Nucleic Acids Research* 30 (4): 931‑41.

Kuo, B. A., I. L. Gonzalez, D. A. Gillespie, et J. E. Sylvester. 1996. « Human Ribosomal RNA Variants from a Single Individual and Their Expression in Different Tissues ». *Nucleic Acids Research* 24 (23): 4817‑24.

Lafontaine, Denis L. J., Cécile Bousquet-Antonelli, Yves Henry, Michèle Caizergues-Ferrer, et David Tollervey. 1998. « The Box H+ACA snoRNAs Carry Cbf5p, the Putative rRNA Pseudouridine Synthase ». *Genes & Development* 12 (4): 527‑37.

Lafontaine, Denis L. J, et David Tollervey. 1998. « Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs ». *Trends in Biochemical Sciences* 23 (10): 383‑88. doi:10.1016/S0968-0004(98)01260-2.

Landry, Dori M., Marla I. Hertz, et Sunnie R. Thompson. 2009. « RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs ». *Genes & Development* 23 (23): 2753‑64. doi:10.1101/gad.1832209.

Lanza, G., M. Matteuzzi, R. Gafá, E. Orvieto, I. Maestri, A. Santini, et L. del Senno. 1998. « Chromosome 18q Allelic Loss and Prognosis in Stage II and III Colon Cancer ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 79 (4): 390‑95.

Lapeyre, B, P Mariottini, C Mathieu, P Ferrer, F Amaldi, F Amalric, et M Caizergues-Ferrer. 1990. « Molecular cloning of Xenopus fibrillarin, a conserved U3 small nuclear ribonucleoprotein recognized by antisera from humans with autoimmune disease ». *Molecular and Cellular Biology* 10 (1): 430‑34.

Lapinaite, Audrone, Bernd Simon, Lars Skjaerven, Magdalena Rakwalska-Bange, Frank Gabel, et Teresa Carlomagno. 2013. « The Structure of the Box C/D Enzyme Reveals Regulation of RNA Methylation ». *Nature* advance online publication (octobre). doi:10.1038/nature12581.

Lechertier, Tanguy, Alice Grob, Danièle Hernandez-Verdun, et Pascal Roussel. 2009. « Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs ». *Experimental Cell Research* 315 (6): 928‑42. doi:10.1016/j.yexcr.2009.01.016.

Lee, Amy Si-Ying, Rebeca Burdeinick-Kerr, et Sean P. J. Whelan. 2013. « A Ribosome-Specialized Translation Initiation Pathway Is Required for Cap-Dependent Translation of Vesicular Stomatitis Virus mRNAs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (1): 324‑29. doi:10.1073/pnas.1216454109.

Leng, Ling, Changming Xu, Chao Wei, Jiyang Zhang, Boya Liu, Jie Ma, Ning Li, et al. 2014. « A Proteomics Strategy for the Identification of FAT10-Modified Sites by Mass Spectrometry ». *Journal of Proteome Research* 13 (1): 268‑76. doi:10.1021/pr400395k.

Lestrade, Laurent, et Michel J. Weber. 2006a. « snoRNA-LBME-Db, a Comprehensive Database of Human H/ACA and C/D Box snoRNAs ». *Nucleic Acids Research* 34 (Database issue): D158-162. doi:10.1093/nar/gkj002.

———. 2006b. « snoRNA-LBME-Db, a Comprehensive Database of Human H/ACA and C/D Box snoRNAs ». *Nucleic Acids Research* 34 (Database issue): D158. doi:10.1093/nar/gkj002.

Lesuffleur, T, A Barbat, E Dussaulx, et A Zweibaum. 1990. « Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells ». *Cancer Research* 50 (19): 6334‑43.

Lesuffleur, T, S Violette, I Vasile-Pandrea, E Dussaulx, A Barbat, M Muleris, et A Zweibaum. 1998. « Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 76 (3): 383‑92.

Levitskiĭ, S. A., K. Sh Mukhar'iamova, V. P. Veĭko, et O. V. Zatsepina. 2004. « [Identification of signal sequences determining the specific nucleolar localization of fibrillarin in HeLa cells] ». *Molekuliarnaia Biologiia* 38 (3): 483‑92.

Li, Ling, et Keqiong Ye. 2006. « Crystal Structure of an H/ACA Box Ribonucleoprotein Particle ». *Nature* 443 (7109): 302‑7. doi:10.1038/nature05151.

Li, S., J. Duan, D. Li, B. Yang, M. Dong, et K. Ye. 2011. « Reconstitution and Structural Analysis of the Yeast Box H/ACA RNA-Guided Pseudouridine Synthase ». *Genes & Development* 25 (22): 2409‑21. doi:10.1101/gad.175299.111.

Liang, Bo, Song Xue, Rebecca M. Terns, Michael P. Terns, et Hong Li. 2007. « Substrate RNA Positioning in the Archaeal H/ACA Ribonucleoprotein Complex ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (12): 1189‑95. doi:10.1038/nsmb1336.

Liang, Bo, Jing Zhou, Elliot Kahen, Rebecca M. Terns, Michael P. Terns, et Hong Li. 2009. « Structure of a Functional Ribonucleoprotein Pseudouridine Synthase Bound to a Substrate RNA ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (7): 740‑46. doi:10.1038/nsmb.1624.

Liang, Xue-hai, Qing Liu, et Maurille J. Fournier. 2007. « rRNA Modifications in an Intersubunit Bridge of the Ribosome Strongly Affect Both Ribosome Biogenesis and Activity ». *Molecular Cell* 28 (6): 965‑77. doi:10.1016/j.molcel.2007.10.012.

———. 2009. « Loss of rRNA Modifications in the Decoding Center of the Ribosome Impairs Translation and Strongly Delays Pre-rRNA Processing ». *RNA* 15 (9): 1716‑28. doi:10.1261/rna.1724409.

Liao, Jipei, Lei Yu, Yuping Mei, Maria Guarnera, Jun Shen, Ruiyun Li, Zhenqiu Liu, et Feng Jiang. 2010. « Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell lung cancer ». *Molecular Cancer* 9: 198. doi:10.1186/1476-4598-9-198.

Lim, Mi Jung, et Xin Wei Wang. 2006. « Nucleophosmin and human cancer ». *Cancer Detection and Prevention* 30 (6): 481‑90. doi:10.1016/j.cdp.2006.10.008.

Lin, Chih-Yin, Sonia Navarro, Sita Reddy, et Lucio Comai. 2006. « CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF–SL1 interaction ». *Nucleic Acids Research* 34 (17): 4752‑66. doi:10.1093/nar/gkl581.

Lin, Jinzhong, Shaomei Lai, Ru Jia, Anbi Xu, Liman Zhang, Jing Lu, et Keqiong Ye. 2011. « Structural Basis for Site-Specific Ribose Methylation by Box C/D RNA Protein Complexes ». *Nature* 469 (7331): 559‑63. doi:10.1038/nature09688.

Lips, Esther H., Ronald van Eijk, Eelco J. R. de Graaf, Jan Oosting, Noel F. C. C. de Miranda, Tom Karsten, Cornelis J. van de Velde, et al. 2008. « Integrating Chromosomal Aberrations and Gene Expression Profiles to Dissect Rectal Tumorigenesis ». *BMC Cancer* 8: 314. doi:10.1186/1471-2407-8-314.

Lischwe, M A, R L Ochs, R Reddy, R G Cook, L C Yeoman, E M Tan, M Reichlin, et H Busch. 1985. « Purification and Partial Characterization of a Nucleolar Scleroderma Antigen (Mr = 34,000; pI, 8.5) Rich in NG,NG-Dimethylarginine ». *The Journal of Biological Chemistry* 260 (26): 14304‑10.

Liu, Sunbin, Ping Li, Olexandr Dybkov, Stephanie Nottrott, Klaus Hartmuth, Reinhard Lührmann, Teresa Carlomagno, et Markus C. Wahl. 2007. « Binding of the Human Prp31 Nop Domain to a Composite RNA-Protein Platform in U4 snRNP ». *Science* 316 (5821): 115‑20. doi:10.1126/science.1137924.

Liu, Y., H. Huang, B. Yuan, L. Y. Zhuang, T. P. Luo, et Q. Zhang. 2014. « Lentivirus-Mediated Knockdown of NOB1 Suppresses the Proliferation of Colon Cancer Cells ». *Zeitschrift Für Gastroenterologie* 52 (5): 429‑35. doi:10.1055/s-0033-1356338.

Longley, Daniel B., D. Paul Harkin, et Patrick G. Johnston. 2003. « 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies ». *Nature Reviews Cancer* 3 (5): 330‑38. doi:10.1038/nrc1074.

Lopes, Alexandra M., Ricardo N. Miguel, Carole A. Sargent, Peter J. Ellis, António Amorim, et Nabeel A. Affara. 2010. « The Human RPS4 Paralogue on Yq11.223 Encodes a Structurally Conserved Ribosomal Protein and Is Preferentially Expressed during Spermatogenesis ». *BMC Molecular Biology* 11: 33. doi:10.1186/1471-2199-11-33.

Louvet, Emilie, Henriette Roberte Junéra, Isabelle Berthuy, et Danièle Hernandez-Verdun. 2006. « Compartmentation of the Nucleolar Processing Proteins in the Granular Component Is a CK2-Driven Process ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (6): 2537. doi:10.1091/mbc.E05-10-0923.

Maggi Jr., Leonard B., Crystal L. Winkeler, Alexander P. Miceli, Anthony J. Apicelli, Suzanne N. Brady, Michael J. Kuchenreuther, et Jason D. Weber. 2014. « ARF tumor suppression in the nucleolus ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Role of the nucleolus in human disease, 1842 (6): 831‑39. doi:10.1016/j.bbadis.2014.01.016.

Majzoub, Karim, Mohamed Lamine Hafirassou, Carine Meignin, Akira Goto, Stefano Marzi, Antonina Fedorova, Yann Verdier, et al. 2014. « RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses ». *Cell* 159 (5): 1086‑95. doi:10.1016/j.cell.2014.10.041.

Malanga, Maria, et Felix R. Althaus. 2011. « The Role of poly(ADP-Ribose) in the DNA Damage Signaling Network ». *Biochemistry and Cell Biology*, janvier. doi:10.1139/o05-038.

Malarkey, K., K. J. Coker, et T. W. Sturgill. 1998. « Ribosomal S6 Kinase Is Activated as an Early Event in Preemergence Development of Encysted Embryos of Artemia Salina ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 251 (1‑2): 269‑74.

Malik, Rainer, René Lenobel, Anna Santamaria, Albert Ries, Erich A. Nigg, et Roman Körner. 2009. « Quantitative Analysis of the Human Spindle Phosphoproteome at Distinct Mitotic Stages ». *Journal of Proteome Research* 8 (10): 4553‑63. doi:10.1021/pr9003773.

Manival, Xavier, Christophe Charron, Jean-Baptiste Fourmann, François Godard, Bruno Charpentier, et Christiane Branlant. 2006. « Crystal Structure Determination and Site-Directed Mutagenesis of the Pyrococcus Abyssi aCBF5–aNOP10 Complex Reveal Crucial Roles of the C-Terminal Domains of Both Proteins in H/ACA sRNP Activity ». *Nucleic Acids Research* 34 (3): 826. doi:10.1093/nar/gkj482.

Mannoor, Kaiissar, Jipei Liao, et Feng Jiang. 2012. « Small Nucleolar RNAs in Cancer ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1826 (1): 121‑28. doi:10.1016/j.bbcan.2012.03.005.

Marcel, Virginie, Sandra E. Ghayad, Stéphane Belin, Gabriel Therizols, Anne-Pierre Morel, Eduardo Solano-Gonzàlez, Julie A. Vendrell, et al. 2013. « p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer ». *Cancer Cell* 24 (3): 318‑30. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.013.

Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, et al. 1995. « Inactivation of the Type II TGF-Beta Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability ». *Science* 268 (5215): 1336‑38. doi:10.1126/science.7761852.

Martín, Mercè, Patricia Simon-Assmann, Michèle Kedinger, Marianne Martin, Paul Mangeat, Francisco X. Real, et Myriam Fabre. 2006. « DCC Regulates Cell Adhesion in Human Colon Cancer Derived HT-29 Cells and Associates with Ezrin ». *European Journal of Cell Biology* 85 (8): 769‑83. doi:10.1016/j.ejcb.2006.02.013.

Maser, R L, et J P Calvet. 1989. « U3 small nuclear RNA can be psoralen-cross-linked in vivo to the 5' external transcribed spacer of pre-ribosomal-RNA. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (17): 6523‑27.

Mathers, John C., Ian Mickleburgh, Pam C. Chapman, D. Tim Bishop, John Burn, et Concerted Action Polyp Prevention (CAPP) 1 Study. 2003. « Can Resistant Starch And/or Aspirin Prevent the Development of Colonic Neoplasia? The Concerted Action Polyp Prevention (CAPP) 1 Study ». *The Proceedings of the Nutrition Society* 62 (1): 51‑57. doi:10.1079/PNS2002236.

Mauro, Vincent P., et Gerald M. Edelman. 2002. « The Ribosome Filter Hypothesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19): 12031‑36. doi:10.1073/pnas.192442499.

———. 2007. « The Ribosome Filter Redux ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (18): 2246‑51.

Maxwell, E S, et M J Fournier. 1995. « The Small Nucleolar RNAs ». *Annual Review of Biochemistry* 64 (1): 897‑934. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.004341.

Mayer, C., et I. Grummt. 2006. « Ribosome Biogenesis and Cell Growth: mTOR Coordinates Transcription by All Three Classes of Nuclear RNA Polymerases ». *Oncogene* 25 (48): 6384‑91. doi:10.1038/sj.onc.1209883.

Mayer, Christine, Jian Zhao, Xuejun Yuan, et Ingrid Grummt. 2004. « mTOR-Dependent Activation of the Transcription Factor TIF-IA Links rRNA Synthesis to Nutrient Availability ». *Genes & Development* 18 (4): 423. doi:10.1101/gad.285504.

McCubrey, James A., Linda S. Steelman, William H. Chappell, Steven L. Abrams, Ellis WT Wong, Fumin Chang, Brian Lehmann, et al. 2007. « ROLES OF THE RAF/MEK/ERK PATHWAY IN CELL GROWTH, MALIGNANT TRANSFORMATION AND DRUG RESISTANCE ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 (8): 1263. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.

McDermott, U., D. B. Longley, et P. G. Johnston. 2002. « Molecular and Biochemical Markers in Colorectal Cancer ». *Annals of Oncology* 13: 235‑45. doi:10.1093/annonc/mdf665.

McMahon, Mary, Adrian Contreras, et Davide Ruggero. 2015. « Small RNAs with Big Implications: New Insights into H/ACA snoRNA Function and Their Role in Human Disease ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 6 (2): 173‑89. doi:10.1002/wrna.1266.

McQuillen, Kenneth, Richard B. Roberts, et Roy J. Britten. 1959. « SYNTHESIS OF NASCENT PROTEIN BY RIBOSOMES IN ESCHERICHIA COLI ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45 (9): 1437.

Mehlen, P., S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, et D. E. Bredesen. 1998. « The DCC Gene Product Induces Apoptosis by a Mechanism Requiring Receptor Proteolysis ». *Nature* 395 (6704): 801‑4. doi:10.1038/27441.

Melén, Krister, Janne Tynell, Riku Fagerlund, Pascal Roussel, Danièle Hernandez-Verdun, et Ilkka Julkunen. 2012. « Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin ». *Virology Journal* 9 (août): 167. doi:10.1186/1743-422X-9-167.

Meng, Zheng, Nateka L. Jackson, Hyoungsoo Choi, Peter H. King, Peter D. Emanuel, et Scott W. Blume. 2008. « Alterations in RNA-binding Activities of IRES-regulatory Proteins as a Mechanism for Physiological Variability and Pathological Dysregulation of IGF-IR Translational Control in Human Breast Tumor Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 217 (1): 172‑83. doi:10.1002/jcp.21486.

Meng, Zheng, Nateka L. Jackson, Oleg D. Shcherbakov, Hyoungsoo Choi, et Scott W. Blume. 2010. « The Human IGF1R IRES Likely Operates through a Shine-Dalgarno-like Interaction with the G961 Loop (E-Site) of the 18S rRNA and Is Kinetically Modulated by a Naturally-Polymorphic polyU Loop ». *Journal of Cellular Biochemistry* 110 (2): 531. doi:10.1002/jcb.22569.

Meng, Zheng, Peter H. King, L. Burt Nabors, Nateka L. Jackson, Ching-Yi Chen, Peter D. Emanuel, et Scott W. Blume. 2005. « The ELAV RNA-Stability Factor HuR Binds the 5'-Untranslated Region of the Human IGF-IR Transcript and Differentially Represses Cap-Dependent and IRES-Mediated Translation ». *Nucleic Acids Research* 33 (9): 2962. doi:10.1093/nar/gki603.

Meraner, Joachim, Markus Lechner, Adele Loidl, Maria Goralik-Schramel, Renate Voit, Ingrid Grummt, et Peter Loidl. 2006. « Acetylation of UBF Changes during the Cell Cycle and Regulates the Interaction of UBF with RNA Polymerase I ». *Nucleic Acids Research* 34 (6): 1798. doi:10.1093/nar/gkl101.

Meredith, J. E., B. Fazeli, et M. A. Schwartz. 1993. « The Extracellular Matrix as a Cell Survival Factor ». *Molecular Biology of the Cell* 4 (9): 953‑61.

Mertins, Philipp, Jana W Qiao, Jinal Patel, Namrata D Udeshi, Karl R Clauser, D R Mani, Michael W Burgess, Michael A Gillette, Jacob D Jaffe, et Steven A Carr. 2013. « Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment ». *Nature methods* 10 (7): 634‑37. doi:10.1038/nmeth.2518.

Michel, Carlos I., Christopher L. Holley, Benjamin S. Scruggs, Rohini Sidhu, Rita T. Brookheart, Laura L. Listenberger, Mark A. Behlke, Daniel S. Ory, et Jean E. Schaffer. 2011. « Small Nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a Are Critical Mediators of Metabolic Stress ». *Cell Metabolism* 14 (1): 33‑44. doi:10.1016/j.cmet.2011.04.009.

Michot, B., N. Joseph, S. Mazan, et J. P. Bachellerie. 1999. « Evolutionarily Conserved Structural Features in the ITS2 of Mammalian Pre-rRNAs and Potential Interactions with the snoRNA U8 Detected by Comparative Analysis of New Mouse Sequences. » *Nucleic Acids Research* 27 (11): 2271.

Miller, Gail, Kostya I. Panov, J. Karsten Friedrich, Laura Trinkle-Mulcahy, Angus I. Lamond, et Joost C. B. M. Zomerdijk. 2001. « hRRN3 Is Essential in the SL1-Mediated Recruitment of RNA Polymerase I to rRNA Gene Promoters ». *The EMBO Journal* 20 (6): 1373. doi:10.1093/emboj/20.6.1373.

Mirjolet, J.-F., M. Barberi-Heyob, C. Didelot, J.-P. Peyrat, J. Abecassis, R. Millon, et J.-L. Merlin. 2000. « Bcl-2/Bax Protein Ratio Predicts 5-Fluorouracil Sensitivity Independently of p53 Status ». *British Journal of Cancer* 83 (10): 1380. doi:10.1054/bjoc.2000.1455.

Mojardín, Laura, Javier Botet, Luis Quintales, Sergio Moreno, et Margarita Salas. 2013. « New Insights into the RNA-Based Mechanism of Action of the Anticancer Drug 5'-fluorouracil in Eukaryotic Cells ». *PloS One* 8 (11): e78172. doi:10.1371/journal.pone.0078172.

Mongelard, Fabien, et Philippe Bouvet. 2007. « Nucleolin: A multiFACeTed Protein ». *Trends in Cell Biology* 17 (2): 80‑86. doi:10.1016/j.tcb.2006.11.010.

Montanaro, Lorenzo. 2010. « Dyskerin and cancer: more than telomerase. The defect in mRNA translation helps in explaining how a proliferative defect leads to cancer ». *The Journal of Pathology* 222 (4): 345‑49. doi:10.1002/path.2777.

Montanaro, Lorenzo, Maria Calienni, Sara Bertoni, Laura Rocchi, Pasquale Sansone, Gianluca Storci, Donatella Santini, et al. 2010. « Novel Dyskerin-Mediated Mechanism of p53 Inactivation through Defective mRNA Translation ». *Cancer Research* 70 (11): 4767‑77. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4024.

Morency, Eric, Mirna Sabra, Frédéric Catez, Pascale Texier, et Patrick Lomonte. 2007. « A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability ». *The Journal of Cell Biology* 177 (5): 757‑68. doi:10.1083/jcb.200612107.

Morlando, Mariangela, Monica Ballarino, Paolo Greco, Elisa Caffarelli, Bernhard Dichtl, et Irene Bozzoni. 2004. « Coupling between snoRNP Assembly and 3' Processing Controls Box C/D

snoRNA Biosynthesis in Yeast ». *The EMBO Journal* 23 (12): 2392. doi:10.1038/sj.emboj.7600254.

Mosgoeller, Wilhelm. 2004. « Nucleolar ultrastructure in vertebrates ». In *The Nucleolus*, Springer Science & Business Media, 364. MarK O. J. Olson.

Motorin, Yuri, et Mark Helm. 2011. « RNA Nucleotide Methylation ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2 (5): 611‑31. doi:10.1002/wrna.79.

Motorin, Yuri, Sébastien Muller, Isabelle Behm-Ansmant, et Christiane Branlant. 2007. « Identification of Modified Residues in RNAs by Reverse Transcription-Based Methods ». *Methods in Enzymology* 425: 21‑53. doi:10.1016/S0076-6879(07)25002-5.

Mouaikel, John, Céline Verheggen, Edouard Bertrand, Jamal Tazi, et Rémy Bordonné. 2002. « Hypermethylation of the Cap Structure of Both Yeast snRNAs and snoRNAs Requires a Conserved Methyltransferase That Is Localized to the Nucleolus ». *Molecular Cell* 9 (4): 891‑901.

Muhs, Margarita, Hiroshi Yamamoto, Jochen Ismer, Hiroaki Takaku, Masayuki Nashimoto, Toshio Uchiumi, Nobuhiko Nakashima, et al. 2011. « Structural Basis for the Binding of IRES RNAs to the Head of the Ribosomal 40S Subunit ». *Nucleic Acids Research* 39 (12): 5264‑75. doi:10.1093/nar/gkr114.

Mullineux, Sahra-Taylor, et Denis L. J. Lafontaine. 2012. « Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? » *Biochimie*, RNA in all its forms, 94 (7): 1521‑32. doi:10.1016/j.biochi.2012.02.001.

Murano, Kensaku, Mitsuru Okuwaki, Miharu Hisaoka, et Kyosuke Nagata. 2008. « Transcription Regulation of the rRNA Gene by a Multifunctional Nucleolar Protein, B23/Nucleophosmin, through Its Histone Chaperone Activity ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (10): 3114. doi:10.1128/MCB.02078-07.

Murayama, Akiko, Kazuji Ohmori, Akiko Fujimura, Hiroshi Minami, Kayoko Yasuzawa-Tanaka, Takao Kuroda, Shohei Oie, et al. 2008. « Epigenetic Control of rDNA Loci in Response to Intracellular Energy Status ». *Cell* 133 (4): 627‑39. doi:10.1016/j.cell.2008.03.030.

Nakamoto, Ken'i, Akihiko Ito, Kenji Watabe, Yu-ichiro Koma, Hideo Asada, Kunihiko Yoshikawa, Yasuhisa Shinomura, Yuji Matsuzawa, Hiroshi Nojima, et Yukihiko Kitamura. 2001. « Increased Expression of a Nucleolar Nop5/Sik Family Member in Metastatic Melanoma Cells: Evidence for Its Role in Nucleolar Sizing and Function ». *The American Journal of Pathology* 159 (4): 1363‑74. doi:10.1016/S0002-9440(10)62523-0.

Newman, D. R., J. F. Kuhn, G. M. Shanab, et E. S. Maxwell. 2000. « Box C/D snoRNA-Associated Proteins: Two Pairs of Evolutionarily Ancient Proteins and Possible Links to Replication and Transcription ». *RNA (New York, N.Y.)* 6 (6): 861‑79.

Newton, Kathryn, Elisabeth Petfalski, David Tollervey, et Javier F Cáceres. 2003. « Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (23): 8519‑27.

Nieminen, Taina T., Marie-Françoise O'Donohue, Yunpeng Wu, Hannes Lohi, Stephen W. Scherer, Andrew D. Paterson, Pekka Ellonen, et al. 2014. « Germline Mutation of RPS20, Encoding a Ribosomal Protein, Causes Predisposition to Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Without DNA Mismatch Repair Deficiency ». *Gastroenterology* 147 (3): 595. doi:10.1053/j.gastro.2014.06.009.

Nissen, P, J Hansen, N Ban, P B Moore, et T A Steitz. 2000. « The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis ». *Science (New York, N.Y.)* 289 (5481): 920‑30.

Nita, M. E., H. Nagawa, O. Tominaga, N. Tsuno, S. Fujii, S. Sasaki, C. G. Fu, T. Takenoue, T. Tsuruo, et T. Muto. 1998. « 5-Fluorouracil Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines with Modulation of Bcl-2 Family Proteins. » *British Journal of Cancer* 78 (8): 986.

« NOL5A (human) ». 2016. Consulté le février 23. http://www.phosphosite.org/proteinAction?id=10647&showAllSites=true.

Nolivos, Sophie, Agamemnon J Carpousis, et Béatrice Clouet-d'Orval. 2005. « The K-Loop, a General Feature of the Pyrococcus C/D Guide RNAs, Is an RNA Structural Motif Related to the K-Turn ». *Nucleic Acids Research* 33 (20): 6507‑14. doi:10.1093/nar/gki962.

« NOP5, N-terminal (IPR012974) < InterPro < EMBL-EBI ». 2016. Consulté le février 23. http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR012974.

« Nop domain (IPR002687) < InterPro < EMBL-EBI ». 2016. Consulté le février 23. http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR002687.

Nousiainen, Marjaana, Herman H. W. Silljé, Guido Sauer, Erich A. Nigg, et Roman Körner. 2006. « Phosphoproteome Analysis of the Human Mitotic Spindle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (14): 5391 ‑ 96. doi:10.1073/pnas.0507066103.

Nues, Robert Willem van, Sander Granneman, Grzegorz Kudla, Katherine Elizabeth Sloan, Matthew Chicken, David Tollervey, et Nicholas James Watkins. 2011. « Box C/D snoRNP Catalysed Methylation Is Aided by Additional Pre-rRNA Base-Pairing ». *The EMBO Journal* 30 (12): 2420. doi:10.1038/emboj.2011.148.

Ochs, R. L., M. A. Lischwe, W. H. Spohn, et H. Busch. 1985. « Fibrillarin: A New Protein of the Nucleolus Identified by Autoimmune Sera ». *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 54 (2): 123‑33.

Odintsova, Tatyana I., Eva-Christina Müller, Anton V. Ivanov, Tsezi A. Egorov, Ralf Bienert, Serguei N. Vladimirov, Susanne Kostka, Albrecht Otto, Brigitte Wittmann-Liebold, et Galina G. Karpova. 2003. « Characterization and Analysis of Posttranslational Modifications of the Human Large Cytoplasmic Ribosomal Subunit Proteins by Mass Spectrometry and Edman Sequencing ». *Journal of Protein Chemistry* 22 (3): 249‑58.

Oettel, S., F. Härtel, I. Kober, S. Iben, et K. H. Seifart. 1997. « Human Transcription Factors IIIC2 , IIIC1 and a Novel Component IIIC0 Fulfil Different Aspects of DNA Binding to Various Pol III Genes. » *Nucleic Acids Research* 25 (12): 2440.

Ogunbiyi, O. A., P. J. Goodfellow, K. Herfarth, G. Gagliardi, P. E. Swanson, E. H. Birnbaum, T. E. Read, J. W. Fleshman, I. J. Kodner, et J. F. Moley. 1998. « Confirmation That Chromosome 18q Allelic Loss in Colon Cancer Is a Prognostic Indicator ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 16 (2): 427‑33.

Ogura, E., H. Senzaki, D. Yamamoto, R. Yoshida, H. Takada, K. Hioki, et A. Tsubura. 1999. « Prognostic Significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak Expressions in Colorectal Carcinomas ». *Oncology Reports* 6 (2): 365‑69.

Oh, Chang-Kyu, Seung Joon Lee, Seong-Hwan Park, et Yuseok Moon. 2016. « Acquisition of Chemoresistance and Other Malignancy-Related Features of Colorectal Cancer Cells Are Incremented by Ribosome-Inactivating Stress ». *Journal of Biological Chemistry*, mars, jbc.M115.696609. doi:10.1074/jbc.M115.696609.

Olsen, Jesper V., Michiel Vermeulen, Anna Santamaria, Chanchal Kumar, Martin L. Miller, Lars J. Jensen, Florian Gnad, et al. 2010. « Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis ». *Science Signaling* 3 (104): ra3. doi:10.1126/scisignal.2000475.

O'Mahony, D. J., W. Q. Xie, S. D. Smith, H. A. Singer, et L. I. Rothblum. 1992. « Differential Phosphorylation and Localization of the Transcription Factor UBF in Vivo in Response to Serum Deprivation. In Vitro Dephosphorylation of UBF Reduces Its Transactivation Properties. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (1): 35‑38.

Omer, Arina D., Todd M. Lowe, Anthony G. Russell, Holger Ebhardt, Sean R. Eddy, et Patrick P. Dennis. 2000. « Homologs of Small Nucleolar RNAs in Archaea ». *Science* 288 (5465): 517 ‑ 22. doi:10.1126/science.288.5465.517.

Omer, Arina D, Sonia Ziesche, Holger Ebhardt, et Patrick P Dennis. 2002. « In vitro reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex ». *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 99 (8): 5289‑94. doi:10.1073/pnas.082101999.

Oruganti, Sri, Yanming Zhang, Hongzhi Li, Howard Robinson, Michael P Terns, Rebecca M Terns, Wei Yang, et Hong Li. 2007. « Alternative conformations of the archaeal Nop56/58-fibrillarin complex imply flexibility in box C/D RNPs ». *Journal of Molecular Biology* 371 (5): 1141‑50. doi:10.1016/j.jmb.2007.06.029.

Oskarsson, Thordur, et Andreas Trumpp. 2005. « The Myc Trilogy: Lord of RNA Polymerases ». *Nature Cell Biology* 7 (3): 215‑17. doi:10.1038/ncb0305-215.

« p53 Represses Ribosomal Gene Transcription ». 1999. *, Published Online: 04 February 1999; | doi:10.1038/sj.onc.1202402* 18 (4). doi:10.1038/sj.onc.1202402.

Pacilli, Annalisa, Claudio Ceccarelli, Davide Treré, et Lorenzo Montanaro. 2013. « SnoRNA U50 Levels Are Regulated by Cell Proliferation and rRNA Transcription ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (7): 14923‑35. doi:10.3390/ijms140714923.

Palade, G. 1975. « Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis ». *Science* 189 (4200): 347‑58. doi:10.1126/science.1096303.

Panova, Tatiana B., Kostya I. Panov, Jackie Russell, et Joost C. B. M. Zomerdijk. 2006. « Casein Kinase 2 Associates with Initiation-Competent RNA Polymerase I and Has Multiple Roles in Ribosomal DNA Transcription ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (16): 5957. doi:10.1128/MCB.00673-06.

Parenteau, Julie, Mathieu Durand, Geneviève Morin, Jules Gagnon, Jean-François Lucier, Raymund J. Wellinger, Benoit Chabot, et Sherif Abou Elela. 2011. « Introns within Ribosomal Protein Genes Regulate the Production and Function of Yeast Ribosomes ». *Cell* 147 (2): 320‑31. doi:10.1016/j.cell.2011.08.044.

Parker, W. B., et Y. C. Cheng. 1990. « Metabolism and Mechanism of Action of 5-Fluorouracil ». *Pharmacology & Therapeutics* 48 (3): 381‑95.

Parsons, R., L. L. Myeroff, B. Liu, J. K. Willson, S. D. Markowitz, K. W. Kinzler, et B. Vogelstein. 1995. « Microsatellite Instability and Mutations of the Transforming Growth Factor Beta Type II Receptor Gene in Colorectal Cancer ». *Cancer Research* 55 (23): 5548‑50.

Peculis, Brenda. 1997. « RNA processing: Pocket guides to ribosomal RNA ». *Current Biology* 7 (8): R480‑82. doi:10.1016/S0960-9822(06)00242-9.

Peculis, Brenda A., et Joan A. Steitz. 1993. « Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the Xenopus oocyte ». *Cell* 73 (6): 1233‑45. doi:10.1016/0092-8674(93)90651-6.

Pederson, T. 1998. « The Plurifunctional Nucleolus. » *Nucleic Acids Research* 26 (17): 3871.

Pederson, Thoru. 2011. « The nucleolus ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (3). doi:10.1101/cshperspect.a000638.

Pellizzoni, Livio, Jennifer Baccon, Bernard Charroux, et Gideon Dreyfuss. 2001. « The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1 ». *Current Biology* 11 (14): 1079‑88. doi:10.1016/S0960-9822(01)00316-5.

Peng, Wen Tao, Mark D. Robinson, Sanie Mnaimneh, Nevan J. Krogan, Gerard Cagney, Quaid Morris, Armaity P. Davierwala, et al. 2003. « A Panoramic View of Yeast Noncoding RNA Processing ». *Cell* 113 (7): 919‑33.

Penzo, Marianna, Laura Rocchi, Sabine Brugiere, Domenica Carnicelli, Carmine Onofrillo, Yohann Couté, Maurizio Brigotti, et Lorenzo Montanaro. 2015. « Human Ribosomes from Cells with Reduced Dyskerin Levels Are Intrinsically Altered in Translation ». *The FASEB Journal* 29 (8): 3472‑82. doi:10.1096/fj.15-270991.

Pereira, Suzette L., et J. N. Reeve. 1998. « Histones and Nucleosomes in Archaea and Eukarya: A Comparative Analysis ». *Extremophiles* 2 (3): 141‑48. doi:10.1007/s007920050053.

Peters, W. H., et H. M. Roelofs. 1992. « Biochemical Characterization of Resistance to Mitoxantrone and Adriamycin in Caco-2 Human Colon Adenocarcinoma Cells: A Possible Role for Glutathione S-Transferases ». *Cancer Research* 52 (7): 1886‑90.

Petersen-Mahrt, S K, C Estmer, C Ohrmalm, D A Matthews, W C Russell, et G Akusjärvi. 1999. « The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. » *The EMBO Journal* 18 (4): 1014 ‑ 24. doi:10.1093/emboj/18.4.1014.

Pettersen, Henrik Sahlin, Torkild Visnes, Cathrine Broberg Vågbø, Eva K. Svaasand, Berit Doseth, Geir Slupphaug, Bodil Kavli, et Hans E. Krokan. 2011. « UNG-Initiated Base Excision Repair Is the Major Repair Route for 5-Fluorouracil in DNA, but 5-Fluorouracil Cytotoxicity Depends Mainly on RNA Incorporation ». *Nucleic Acids Research* 39 (19): 8430. doi:10.1093/nar/gkr563.

Phair, Robert D., et Tom Misteli. 2000. « High Mobility of Proteins in the Mammalian Cell Nucleus ». *Nature* 404 (6778): 604‑9. doi:10.1038/35007077.

Pianese, Giuseppe. 1896. *Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms : Pianese, Giuseppe, 1864-1933 : Free Download & Streaming*. ColumbiaUniversityLibraries. https://archive.org/details/beitragzurhistol00pian.

Piekna-Przybylska, Dorota, Wayne A. Decatur, et Maurille J. Fournier. 2008. « The 3D rRNA Modification Maps Database: With Interactive Tools for Ribosome Analysis ». *Nucleic Acids Research* 36 (Database issue): D178-183. doi:10.1093/nar/gkm855.

Pih, K. T., M. J. Yi, Y. S. Liang, B. J. Shin, M. J. Cho, I. Hwang, et D. Son. 2000. « Molecular Cloning and Targeting of a Fibrillarin Homolog from Arabidopsis ». *Plant Physiology* 123 (1): 51‑58.

Polikanov, Yury S., Sergey V. Melnikov, Dieter Söll, et Thomas A. Steitz. 2015. « Structural Insights into the Role of rRNA Modifications in Protein Synthesis and Ribosome Assembly ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (4): 342‑44. doi:10.1038/nsmb.2992.

Ponti, Donatella, Maria Troiano, Gian Carlo Bellenchi, Piero A Battaglia, et Franca Gigliani. 2008. « The HIV Tat protein affects processing of ribosomal RNA precursor ». *BMC Cell Biology* 9 (juin): 32. doi:10.1186/1471-2121-9-32.

Pópulo, Helena, José Manuel Lopes, et Paula Soares. 2012. « The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 13 (2): 1886. doi:10.3390/ijms13021886.

Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton, S. N. Thibodeau, B. Vogelstein, et K. W. Kinzler. 1992. « APC Mutations Occur Early during Colorectal Tumorigenesis ». *Nature* 359 (6392): 235‑37. doi:10.1038/359235a0.

Preiss, Thomas. 2016. « All Ribosomes Are Created Equal. Really? » *Trends in Biochemical Sciences* 41 (2): 121‑23. doi:10.1016/j.tibs.2015.11.009.

Pritchard, D. M., A. J. Watson, C. S. Potten, A. L. Jackman, et J. A. Hickman. 1997. « Inhibition by Uridine but Not Thymidine of p53-Dependent Intestinal Apoptosis Initiated by 5-Fluorouracil: Evidence for the Involvement of RNA Perturbation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (5): 1795‑99.

Qu, Guosheng, Rob W van Nues, Nicholas J Watkins, et E Stuart Maxwell. 2011. « The Spatial-Functional Coupling of Box C/D and C'/D' RNPs Is an Evolutionarily Conserved Feature of the Eukaryotic Box C/D snoRNP Nucleotide Modification Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (2): 365‑74. doi:10.1128/MCB.00918-10.

Qu, L. H., M. Nicoloso, et J. P. Bachellerie. 1991. « A Sequence Dimorphism in a Conserved Domain of Human 28S rRNA. Uneven Distribution of Variant Genes among Individuals. Differential Expression in HeLa Cells. » *Nucleic Acids Research* 19 (5): 1015.

Rakitina, D V, Michael Taliansky, J W S Brown, et N O Kalinina. 2011. « Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates ». *Nucleic Acids Research*, juillet. doi:10.1093/nar/gkr594.

Ramakrishnan, V. 2002. « Ribosome Structure and the Mechanism of Translation ». *Cell* 108 (4): 557‑72.

Rampino, N, H Yamamoto, Y Ionov, Y Li, H Sawai, J C Reed, et M Perucho. 1997. « Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype ». *Science (New York, N.Y.)* 275 (5302): 967‑69.

Rashid, Rumana, Bo Liang, Daniel L Baker, Osama A Youssef, Yang He, Kathleen Phipps, Rebecca M Terns, Michael P Terns, et Hong Li. 2006. « Crystal structure of a Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications in RNA-guided pseudouridylation and dyskeratosis congenita ». *Molecular Cell* 21 (2): 249‑60. doi:10.1016/j.molcel.2005.11.017.

Raška, Ivan, Karel Koberna, Jan Malínský, Helena Fidlerová, et Martin Mašata. 2004. « The nucleolus and transcription of ribosomal genes ». *Biology of the Cell*, Functional Architecture of the Cell Nucleus, 96 (8): 579‑94. doi:10.1016/j.biolcel.2004.04.015.

Recher, Gaëlle, Julia Jouralet, Alessandro Brombin, Aurélie Heuzé, Emilie Mugniery, Jean-Michel Hermel, Sophie Desnoulez, et al. 2013. « Zebrafish Midbrain Slow-Amplifying Progenitors Exhibit High Levels of Transcripts for Nucleotide and Ribosome Biogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 140 (24): 4860‑69. doi:10.1242/dev.099010.

Reichow, Steve L, Tomoko Hamma, Adrian R Ferré-D'Amaré, et Gabriele Varani. 2007. « The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins ». *Nucleic Acids Research* 35 (5): 1452‑64. doi:10.1093/nar/gkl1172.

Rigbolt, Kristoffer T. G., Tatyana A. Prokhorova, Vyacheslav Akimov, Jeanette Henningsen, Pia T. Johansen, Irina Kratchmarova, Moustapha Kassem, Matthias Mann, Jesper V. Olsen, et Blagoy Blagoev. 2011. « System-Wide Temporal Characterization of the Proteome and Phosphoproteome of Human Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Science Signaling* 4 (164): rs3. doi:10.1126/scisignal.2001570.

Rodriguez-Corona, Ulises, Margarita Sobol, Luis Carlos Rodriguez-Zapata, Pavel Hozak, et Enrique Castano. 2015. « Fibrillarin from Archaea to Human ». *Biology of the Cell* 107 (6): 159‑74. doi:10.1111/boc.201400077.

Ronchetti, D., K. Todoerti, G. Tuana, L. Agnelli, L. Mosca, M. Lionetti, S. Fabris, et al. 2012. « The Expression Pattern of Small Nucleolar and Small Cajal Body-Specific RNAs Characterizes Distinct Molecular Subtypes of Multiple Myeloma ». *Blood Cancer Journal* 2 (11): e96. doi:10.1038/bcj.2012.41.

Rorbach, Joanna, et Michal Minczuk. 2012. « The Post-Transcriptional Life of Mammalian Mitochondrial RNA ». *Biochemical Journal* 444 (3): 357‑73. doi:10.1042/BJ20112208.

Rothé, Benjamin, Jean-Michel Saliou, Marc Quinternet, Régis Back, Decebal Tiotiu, Clémence Jacquemin, Christine Loegler, et al. 2014. « Protein Hit1, a Novel Box C/D snoRNP Assembly Factor, Controls Cellular Concentration of the Scaffolding Protein Rsa1 by Direct Interaction ». *Nucleic Acids Research*, août. doi:10.1093/nar/gku612.

Ruggero, Davide. 2013. « Translational Control in Cancer Etiology ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2). doi:10.1101/cshperspect.a012336.

Ruggero, Davide, Silvia Grisendi, Francesco Piazza, Eduardo Rego, Francesca Mari, Pulivarthi H. Rao, Carlos Cordon-Cardo, et Pier Paolo Pandolfi. 2003. « Dyskeratosis Congenita and Cancer in Mice Deficient in Ribosomal RNA Modification ». *Science* 299 (5604): 259 ‑ 62. doi:10.1126/science.1079447.

Ruggero, Davide, et Pier Paolo Pandolfi. 2003. « Does the Ribosome Translate Cancer? » *Nature Reviews Cancer* 3 (3): 179‑92. doi:10.1038/nrc1015.

Russell, Anthony G., Yoh-ichi Watanabe, J. Michael Charette, et Michael W. Gray. 2005. « Unusual features of fibrillarin cDNA and gene structure in Euglena gracilis: evolutionary conservation of core proteins and structural predictions for methylation-guide box C/D snoRNPs throughout the domain Eucarya ». *Nucleic Acids Research* 33 (9): 2781‑91. doi:10.1093/nar/gki574.

Russell, Jackie, et Joost C. B. M. Zomerdijk. 2005. « RNA-Polymerase-I-Directed rDNA Transcription, Life and Works ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (2). doi:10.1016/j.tibs.2004.12.008.

Ruvinsky, Igor, Nitzan Sharon, Tal Lerer, Hannah Cohen, Miri Stolovich-Rain, Tomer Nir, Yuval Dor, Philip Zisman, et Oded Meyuhas. 2005. « Ribosomal Protein S6 Phosphorylation Is a

Determinant of Cell Size and Glucose Homeostasis ». *Genes & Development* 19 (18): 2199‑2211. doi:10.1101/gad.351605.

Ruzzene, Maria, Giovanni Di Maira, Kendra Tosoni, et Lorenzo A. Pinna. 2010. « Ttwenty-Four - Assessment of CK2 Constitutive Activity in Cancer Cells ». In *Methods in Enzymology*, édité par P. Michael Conn, 484:495‑514. Constitutive Activity in Receptors and Other Proteins, Part A. Academic Press. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123812988000241.

Sáez-Vasquez, Julio, David Caparros-Ruiz, Fredy Barneche, et Manuel Echeverría. 2004. « A Plant snoRNP Complex Containing snoRNAs, Fibrillarin, and Nucleolin-Like Proteins Is Competent for both rRNA Gene Binding and Pre-rRNA Processing In Vitro ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (16): 7284‑97. doi:10.1128/MCB.24.16.7284-7297.2004.

Sahin, Fikret, Wanglong Qiu, Robb E. Wilentz, Christine A. Iacobuzio-Donahue, Andres Grosmark, et Gloria H. Su. 2005. « RPL38, FOSL1, and UPP1 Are Predominantly Expressed in the Pancreatic Ductal Epithelium ». *Pancreas* 30 (2): 158‑67.

Sahoo, Trilochan, Daniela del Gaudio, Jennifer R German, Marwan Shinawi, Sarika U Peters, Richard E Person, Adolfo Garnica, Sau Wai Cheung, et Arthur L Beaudet. 2008. « Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster ». *Nature genetics* 40 (6): 719‑21. doi:10.1038/ng.158.

Santamaria, Anna, Bin Wang, Sabine Elowe, Rainer Malik, Feng Zhang, Manuel Bauer, Alexander Schmidt, Herman H. W. Silljé, Roman Körner, et Erich A. Nigg. 2011. « The Plk1-Dependent Phosphoproteome of the Early Mitotic Spindle ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 10 (1): M110.004457. doi:10.1074/mcp.M110.004457.

Sato, Manabu, Cheong Jit Kong, Hideji Yoshida, Taro Nakamura, Akira Wada, Chikashi Shimoda, et Yasufumi Kaneda. 2003. « Ribosomal Proteins S0 and S21 Are Involved in the Stability of 18S rRNA in Fission Yeast, Schizosaccharomyces Pombe ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 (4): 942‑47.

Savino, R., et S. A. Gerbi. 1990. « In Vivo Disruption of Xenopus U3 snRNA Affects Ribosomal RNA Processing. » *The EMBO Journal* 9 (7): 2299.

Scherl, Alexander, Yohann Couté, Catherine Déon, Aleth Callé, Karine Kindbeiter, Jean-Charles Sanchez, Anna Greco, Denis Hochstrasser, et Jean-Jacques Diaz. 2002. « Functional Proteomic Analysis of Human Nucleolus ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (11): 4100 ‑ 4109. doi:10.1091/mbc.E02-05-0271.

Schlosser, Isabel, Michael Hölzel, Marlies Mürnseer, Helmut Burtscher, Ulrich H. Weidle, et Dirk Eick. 2003. « A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing ». *Nucleic Acids Research* 31 (21): 6148‑56. doi:10.1093/nar/gkg794.

Schmidmaier, R., et P. Baumann. 2008. « ANTI-ADHESION Evolves to a Promising Therapeutic Concept in Oncology ». *Current Medicinal Chemistry* 15 (10): 978‑90.

Schwartz, Martin A. 2010. « Remembrance of Dead Cells Past: Discovering That the Extracellular Matrix Is a Cell Survival Factor ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (4): 499‑500. doi:10.1091/mbc.E09-07-0602.

Scopa, C. D., C. Vagianos, D. Kardamakis, T. G. Kourelis, H. P. Kalofonos, et A. C. Tsamandas. 2001. « Bcl-2/bax Ratio as a Predictive Marker for Therapeutic Response to Radiotherapy in Patients with Rectal Cancer ». *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 9 (4): 329‑34.

Sharif, Roozbeh, Marvin J. Fritzler, Maureen D. Mayes, Emilio B. Gonzalez, Terry A. McNearney, Hilda Draeger, Murray Baron, et al. 2011. « Anti-Fibrillarin Antibody in African American Patients with Systemic Sclerosis: Immunogenetics, Clinical Features, and Survival Analysis ». *The Journal of rheumatology* 38 (8): 1622‑30. doi:10.3899/jrheum.110071.

Sharma, Kirti, Rochelle C. J. D'Souza, Stefka Tyanova, Christoph Schaab, Jacek R. Wiśniewski, Jürgen Cox, et Matthias Mann. 2014. « Ultradeep Human Phosphoproteome Reveals a Distinct

Regulatory Nature of Tyr and Ser/Thr-Based Signaling ». *Cell Reports* 8 (5): 1583‑94. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.036.

Sharma, Sunny, et Denis L. J. Lafontaine. 2015. « 'View From A Bridge': A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification ». *Trends in Biochemical Sciences* 40 (10): 560‑75. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.008.

Shevtsov, Sergey P., et Miroslav Dundr. 2011. « Nucleation of Nuclear Bodies by RNA ». *Nature Cell Biology* 13 (2): 167‑73. doi:10.1038/ncb2157.

Sigal, Alex, et Varda Rotter. 2000. « Oncogenic Mutations of the p53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome ». *Cancer Research* 60 (24): 6788‑93.

Slavov, Nikolai, Stefan Semrau, Edoardo Airoldi, Bogdan Budnik, et Alexander van Oudenaarden. 2015. « Differential Stoichiometry among Core Ribosomal Proteins ». *Cell Reports* 13 (5): 865‑73. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.056.

Snaar, Sabine, Karien Wiesmeijer, Aart G. Jochemsen, Hans J. Tanke, et Roeland W. Dirks. 2000. « Mutational Analysis of Fibrillarin and Its Mobility in Living Human Cells ». *The Journal of Cell Biology* 151 (3): 653.

« snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box RNAs ». 2012. Consulté le mai 9. http://www-snorna.biotoul.fr/.

Sobol, Margarita, Sukriye Yildirim, Vlada V Philimonenko, Pavel Marášek, Enrique Castaño, et Pavel Hozák. 2013. « UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity ». *Nucleus* 4 (6): 478‑86. doi:10.4161/nucl.27154.

Sonenberg, Nahum, et Alan G Hinnebusch. 2009. « Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets ». *Cell* 136 (4): 731‑45. doi:10.1016/j.cell.2009.01.042.

Soreide, K., E. a. M. Janssen, H. Soiland, H. Korner, et J. P. A. Baak. 2006. « Microsatellite Instability in Colorectal Cancer ». *British Journal of Surgery* 93 (4): 395‑406. doi:10.1002/bjs.5328.

Sørensen, P. D., et S. Frederiksen. 1991. « Characterization of Human 5S rRNA Genes. » *Nucleic Acids Research* 19 (15): 4147.

Sørensen, P. D., B. Lomholt, S. Frederiksen, et N. Tommerup. 1991. « Fine Mapping of Human 5S rRNA Genes to Chromosome 1q42.11----q42.13 ». *Cytogenetics and Cell Genetics* 57 (1): 26‑29.

Speckmann, Wayne A., Rebecca M. Terns, et Michael P. Terns. 2000. « The Box C/D Motif Directs snoRNA 5'-Cap Hypermethylation ». *Nucleic Acids Research* 28 (22): 4467.

Staub, Eike, Petko Fiziev, André Rosenthal, et Bernd Hinzmann. 2004. « Insights into the Evolution of the Nucleolus by an Analysis of Its Protein Domain Repertoire ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 26 (5): 567‑81. doi:10.1002/bies.20032.

Stefanovsky, Victor Y., Guillaume Pelletier, David P. Bazett-Jones, Colyn Crane-Robinson, et Tom Moss. 2001. « DNA Looping in the RNA Polymerase I Enhancesome Is the Result of Non-Cooperative in-Phase Bending by Two UBF Molecules ». *Nucleic Acids Research* 29 (15): 3241.

Steffensen, D. M., E. H. Chu, D. P. Speert, P. M. Wall, K. Meilinger, et R. P. Kelch. 1977. « Partial Trisomy of the Long Arm of Human Chromosome 1 as Demostrated by in Situ Hybridization with 5S Ribosomal RNA ». *Human Genetics* 36 (1): 25‑33.

Steffensen, D. M., W. Prensky, D. Mutton, et J. L. Hamerton. 1975. « Mapping the Human 5S RNA Genes on Chromosome 1 Using Translocations ». *Birth Defects Original Article Series* 11 (3): 264‑68.

Stryker, S. J., J. A. Carney, et R. R. Dozois. 1987. « Multiple Adenomatous Polyps Arising in a Continent Reservoir Ileostomy ». *International Journal of Colorectal Disease* 2 (1): 43‑45.

Stuart, Scott A., Stephane Houel, Thomas Lee, Nan Wang, William M. Old, et Natalie G. Ahn. 2015. « A Phosphoproteomic Comparison of B-RAFV600E and MKK1/2 Inhibitors in Melanoma Cells ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 14 (6): 1599‑1615. doi:10.1074/mcp.M114.047233.

Sturm, I., C. H. Köhne, G. Wolff, H. Petrowsky, T. Hillebrand, S. Hauptmann, M. Lorenz, B. Dörken, et P. T. Daniel. 1999. « Analysis of the p53/BAX Pathway in Colorectal Cancer: Low BAX Is a Negative

Prognostic Factor in Patients with Resected Liver Metastases ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (5): 1364‑74.

Su, H, T Xu, S Ganapathy, M Shadfan, M Long, T H-M Huang, I Thompson, et Z-M Yuan. 2013. « Elevated snoRNA Biogenesis Is Essential in Breast Cancer ». *Oncogene*, avril. doi:10.1038/onc.2013.89.

Sugihara, Yoshihiko, Hiroki Honda, Tomoharu Iida, Takuma Morinaga, Shingo Hino, Tetsuya Okajima, Tsukasa Matsuda, et Daita Nadano. 2010. « Proteomic Analysis of Rodent Ribosomes Revealed Heterogeneity Including Ribosomal Proteins L10-Like, L22-like 1, and L39-Like ». *Journal of Proteome Research* 9 (3): 1351‑66. doi:10.1021/pr9008964.

Tafforeau, Lionel, Christiane Zorbas, Jean-Louis Langhendries, Sahra-Taylor Mullineux, Vassiliki Stamatopoulou, Romain Mullier, Ludivine Wacheul, et Denis L. J. Lafontaine. 2013. « The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors ». *Molecular Cell* 51 (4): 539 ‑ 51. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.011.

Tatham, Michael H., Ivan Matic, Matthias Mann, et Ronald T. Hay. 2011. « Comparative Proteomic Analysis Identifies a Role for SUMO in Protein Quality Control ». *Sci. Signal.* 4 (178): rs4-rs4. doi:10.1126/scisignal.2001484.

Tedesco, Karen L., A. Craig Lockhart, et Jordan D. Berlin. 2004. « The Epidermal Growth Factor Receptor as a Target for Gastrointestinal Cancer Therapy ». *Current Treatment Options in Oncology* 5 (5): 393‑403.

Tessarz, Peter, Helena Santos-Rosa, Sam C. Robson, Kathrine B. Sylvestersen, Christopher J. Nelson, Michael L. Nielsen, et Tony Kouzarides. 2014. « Glutamine Methylation in Histone H2A Is an RNA-Polymerase-I-Dedicated Modification ». *Nature* 505 (7484): 564 ‑ 68. doi:10.1038/nature12819.

Thakor, Nehal, et Martin Holcik. 2012. « IRES-Mediated Translation of Cellular Messenger RNA Operates in eIF2α- Independent Manner during Stress ». *Nucleic Acids Research* 40 (2): 541. doi:10.1093/nar/gkr701.

Thomson, Emma, Sébastien Ferreira-Cerca, et Ed Hurt. 2013. « Eukaryotic Ribosome Biogenesis at a Glance ». *J Cell Sci* 126 (21): 4815‑21. doi:10.1242/jcs.111948.

Tol, Jolien, et Cornelis J. A. Punt. 2010. « Monoclonal Antibodies in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review ». *Clinical Therapeutics* 32 (3): 437 ‑ 53. doi:10.1016/j.clinthera.2010.03.012.

Tollervey, D, et T Kiss. 1997. « Function and Synthesis of Small Nucleolar RNAs ». *Current Opinion in Cell Biology* 9 (3): 337‑42.

Tollervey, D, H Lehtonen, M Carmo-Fonseca, et E C Hurt. 1991. « The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast ». *The EMBO Journal* 10 (3): 573‑83.

Tollervey, David, Hanna Lehtonen, Ralf Jansen, Hildegard Kern, et Eduard C. Hurt. 1993. « Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly ». *Cell* 72 (3): 443 ‑ 57. doi:10.1016/0092-8674(93)90120-F.

Tone, Yoshiko, et Akio Toh-E. 2002. « Nob1p Is Required for Biogenesis of the 26S Proteasome and Degraded upon Its Maturation in Saccharomyces Cerevisiae ». *Genes & Development* 16 (24): 3142‑57. doi:10.1101/gad.1025602.

Tran, Elizabeth J., Xinxin Zhang, et E.Stuart Maxwell. 2003. « Efficient RNA 2|[prime]|-O-methylation requires juxtaposed and symmetrically assembled archaeal box C/D and C|[prime]|/D|[prime]| RNPs ». *The EMBO Journal* 22 (15): 3930 ‑ 40. doi:10.1093/emboj/cdg368.

Tsai, Robert Y. L., et Thoru Pederson. 2014. « Connecting the Nucleolus to the Cell Cycle and Human Disease ». *The FASEB Journal* 28 (8): 3290‑96. doi:10.1096/fj.14-254680.

Tsai, Yuan-Chin, Todd M. Greco, Apaporn Boonmee, Yana Miteva, et Ileana M. Cristea. 2012. « Functional Proteomics Establishes the Interaction of SIRT7 with Chromatin Remodeling

Complexes and Expands Its Role in Regulation of RNA Polymerase I Transcription ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11 (5): 60‑76. doi:10.1074/mcp.A111.015156.

Tsai, Yuan-Chin, Todd M. Greco, et Ileana M. Cristea. 2014. « Sirtuin 7 Plays a Role in Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (1): 73‑83. doi:10.1074/mcp.M113.031377.

Tseng, Hung, Weichin Chou, Junwen Wang, Xiaohong Zhang, Shengliang Zhang, et Richard M. Schultz. 2008. « Mouse Ribosomal RNA Genes Contain Multiple Differentially Regulated Variants ». Édité par Peter Fraser. *PLoS ONE* 3 (3): e1843. doi:10.1371/journal.pone.0001843.

Tyc, K., et J. A. Steitz. 1989. « U3, U8 and U13 Comprise a New Class of Mammalian snRNPs Localized in the Cell Nucleolus ». *The EMBO Journal* 8 (10): 3113‑19.

Tycowski, K. T., M. D. Shu, et J. A. Steitz. 1993. « A Small Nucleolar RNA Is Processed from an Intron of the Human Gene Encoding Ribosomal Protein S3 ». *Genes & Development* 7 (7A): 1176‑90.

———. 1994. « Requirement for Intron-Encoded U22 Small Nucleolar RNA in 18S Ribosomal RNA Maturation ». *Science* 266 (5190): 1558‑61. doi:10.1126/science.7985025.

———. 1996. « A Mammalian Gene with Introns instead of Exons Generating Stable RNA Products ». *Nature* 379 (6564): 464‑66. doi:10.1038/379464a0.

Tycowski, K T, et J A Steitz. 2001. « Non-Coding snoRNA Host Genes in Drosophila: Expression Strategies for Modification Guide snoRNAs ». *European Journal of Cell Biology* 80 (2): 119‑25. doi:10.1078/0171-9335-00150.

Tycowski, Kazimierz T, Zhi-Hao You, Paul J Graham, et Joan A Steitz. 1998. « Modification of U6 Spliceosomal RNA Is Guided by Other Small RNAs ». *Molecular Cell* 2 (5): 629 ‑ 38. doi:10.1016/S1097-2765(00)80161-6.

Valleron, W., E. Laprevotte, E-F Gautier, C. Quelen, C. Demur, E. Delabesse, X. Agirre, F. Pr|[oacute]|sper, T. Kiss, et P. Brousset. 2012. « Specific Small Nucleolar RNA Expression Profiles in Acute Leukemia ». *Leukemia*, avril. doi:10.1038/leu.2012.111.

van Kouwenhove, Marieke, Martijn Kedde, et Reuven Agami. 2011. « MicroRNA Regulation by RNA-Binding Proteins and Its Implications for Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 11 (9): 644‑56. doi:10.1038/nrc3107.

Venema, Jaap, et David Tollervey. 1999. « Ribosome Synthesis in Saccharomyces cerevisiae ». *Annual Review of Genetics* 33 (1): 261‑311. doi:10.1146/annurev.genet.33.1.261.

Verheggen, C. 2002. « Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments ». *The EMBO Journal* 21 (11): 2736‑45. doi:10.1093/emboj/21.11.2736.

Vidovic, Ivan, Stephanie Nottrott, Klaus Hartmuth, Reinhard Lührmann, et Ralf Ficner. 2000. « Crystal Structure of the Spliceosomal 15.5kD Protein Bound to a U4 snRNA Fragment ». *Molecular Cell* 6 (6): 1331‑42. doi:10.1016/S1097-2765(00)00131-3.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, et J. L. Bos. 1988. « Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development ». *The New England Journal of Medicine* 319 (9): 525 ‑ 32. doi:10.1056/NEJM198809013190901.

Vogelstein, Bert, David Lane, et Arnold J. Levine. 2000. « Surfing the p53 network ». *Nature* 408 (6810): 307‑10. doi:10.1038/35042675.

Voit, R., A. Schnapp, A. Kuhn, H. Rosenbauer, P. Hirschmann, H. G. Stunnenberg, et I. Grummt. 1992. « The Nucleolar Transcription Factor mUBF Is Phosphorylated by Casein Kinase II in the C-Terminal Hyperacidic Tail Which Is Essential for Transactivation. » *The EMBO Journal* 11 (6): 2211.

Wagner, S. A., P. Beli, B. T. Weinert, M. L. Nielsen, J. Cox, M. Mann, et C. Choudhary. 2011. « A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles ». *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (10): M111.013284-M111.013284. doi:10.1074/mcp.M111.013284.

Wang, Chen, et U. Thomas Meier. 2004. « Architecture and Assembly of Mammalian H/ACA Small Nucleolar and Telomerase Ribonucleoproteins ». *The EMBO Journal* 23 (8): 1857. doi:10.1038/sj.emboj.7600181.

Wang, H, D Boisvert, K K Kim, R Kim, et S H Kim. 2000. « Crystal structure of a fibrillarin homologue from Methanococcus jannaschii, a hyperthermophile, at 1.6 A resolution ». *The EMBO Journal* 19 (3): 317‑23. doi:10.1093/emboj/19.3.317.

Wang, Jaw-Yuan, Yung-Hsin Wang, Shu-Wen Jao, Chien-Yu Lu, Chao-Hung Kuo, Huang-Ming Hu, Jan-Sing Hsieh, Inn-Wen Chong, Tian-Lu Cheng, et Shiu-Ru Lin. 2006. « Molecular Mechanisms Underlying the Tumorigenesis of Colorectal Adenomas: Correlation to Activated K-Ras Oncogene ». *Oncology Reports* 16 (6): 1245‑52.

Watanabe-Susaki, Kanako, Hitomi Takada, Kei Enomoto, Kyoko Miwata, Hisako Ishimine, Atsushi Intoh, Manami Ohtaka, et al. 2014. « Biosynthesis of Ribosomal RNA in Nucleoli Regulates Pluripotency and Differentiation Ability of Pluripotent Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, septembre. doi:10.1002/stem.1825.

Watkins, Nicholas J, et Markus T Bohnsack. 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 (3): 397‑414. doi:10.1002/wrna.117.

Watkins, Nicholas J, Achim Dickmanns, et Reinhard Lührmann. 2002. « Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (23): 8342‑52.

Watkins, Nicholas J, Ira Lemm, Dierk Ingelfinger, Claudia Schneider, Markus Hossbach, Henning Urlaub, et Reinhard Lührmann. 2004. « Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex ». *Molecular cell* 16 (5): 789 ‑ 98. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.012.

Watkins, Nicholas J, Véronique Ségault, Bruno Charpentier, Stephanie Nottrott, Patrizia Fabrizio, Angela Bachi, Matthias Wilm, Michael Rosbash, Christiane Branlant, et Reinhard Lührmann. 2000. « A Common Core RNP Structure Shared between the Small Nucleoar Box C/D RNPs and the Spliceosomal U4 snRNP ». *Cell* 103 (3): 457‑66. doi:10.1016/S0092-8674(00)00137-9.

Wei, Q., Y. Shui, S. Zheng, K. Wester, H. Nordgren, P. Nygren, B. Glimelius, et J. Carlsson. 2011. « EGFR, HER2 and HER3 Expression in Primary Colorectal Carcinomas and Corresponding Metastases: Implications for Targeted Radionuclide Therapy ». *Oncology Reports* 25 (1): 3‑11.

Weinert, Brian T., Christian Schölz, Sebastian A. Wagner, Vytautas Iesmantavicius, Dan Su, Jeremy A. Daniel, et Chunaram Choudhary. 2013. « Lysine Succinylation Is a Frequently Occurring Modification in Prokaryotes and Eukaryotes and Extensively Overlaps with Acetylation ». *Cell Reports* 4 (4): 842‑51. doi:10.1016/j.celrep.2013.07.024.

Weingarten-Gabbay, Shira, Shani Elias-Kirma, Ronit Nir, Alexey A. Gritsenko, Noam Stern-Ginossar, Zohar Yakhini, Adina Weinberger, et Eran Segal. 2016. « Systematic Discovery of Cap-Independent Translation Sequences in Human and Viral Genomes ». *Science* 351 (6270): aad4939. doi:10.1126/science.aad4939.

Wen, Donghua, Zhijian Xu, Li Xia, Xinyi Liu, Yaoyao Tu, Hu Lei, Weiwei Wang, et al. 2014. « Important Role of SUMOylation of Spliceosome Factors in Prostate Cancer Cells ». *Journal of Proteome Research* 13 (8): 3571‑82. doi:10.1021/pr4012848.

Westman, Belinda J, Céline Verheggen, Saskia Hutten, Yun Wah Lam, Edouard Bertrand, et Angus I Lamond. 2010. « A proteomic screen for nucleolar SUMO targets shows SUMOylation modulates the function of Nop5/Nop58 ». *Molecular cell* 39 (4): 618 ‑ 31. doi:10.1016/j.molcel.2010.07.025.

Whittaker, Steven, Matthew Martin, et Richard Marais. 2010. « All Roads Lead to the Ribosome ». *Cancer Cell* 18 (1): 5‑6. doi:10.1016/j.ccr.2010.06.008.

Williams, D J, J L Boots, et K B Hall. 2001. « Thermodynamics of 2'-ribose substitutions in UUCG tetraloops. » *RNA* 7 (1): 44‑53.

Williams, Gwyn T., et Farzin Farzaneh. 2012. « Are snoRNAs and snoRNA Host Genes New Players in Cancer? » *Nature Reviews Cancer* 12 (2): 84‑88. doi:10.1038/nrc3195.

Wilson, Daniel N., et Jamie H. Doudna Cate. 2012. « The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (5). doi:10.1101/cshperspect.a011536.

Wong, Siu-Fun. 2005. « Cetuximab: An Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody for the Treatment of Colorectal Cancer ». *Clinical Therapeutics* 27 (6): 684 ‑ 94. doi:10.1016/j.clinthera.2005.06.003.

Woodard, R. W., M. D. Tsai, H. G. Floss, P. A. Crooks, et J. K. Coward. 1980. « Stereochemical Course of the Transmethylation Catalyzed by Catechol O-Methyltransferase. » *Journal of Biological Chemistry* 255 (19): 9124‑27.

Worthley, Daniel-L, Vicki-L Whitehall, Kevin-J Spring, et Barbara-A Leggett. 2007. « Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer ». *World Journal of Gastroenterology: WJG* 13 (28): 3784 ‑91.

Wu, P., J. S. Brockenbrough, A. C. Metcalfe, S. Chen, et J. P. Aris. 1998. « Nop5p Is a Small Nucleolar Ribonucleoprotein Component Required for Pre-18 S rRNA Processing in Yeast ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (26): 16453‑63.

Wurm, Jan Philip, Britta Meyer, Ute Bahr, Martin Held, Olga Frolow, Peter Kötter, Joachim W. Engels, et al. 2010. « The Ribosome Assembly Factor Nep1 Responsible for Bowen–Conradi Syndrome Is a Pseudouridine-N1-Specific Methyltransferase ». *Nucleic Acids Research* 38 (7): 2387‑98. doi:10.1093/nar/gkp1189.

Xie, Wei, Qin Feng, Yahui Su, Bin Dong, Jian Wu, Lin Meng, Like Qu, et Chengchao Shou. 2012. « Transcriptional Regulation of PES1 Expression by c-Jun in Colon Cancer ». *PloS One* 7 (7): e42253. doi:10.1371/journal.pone.0042253.

Xue, Shifeng, et Maria Barna. 2012. « Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (6): 355 ‑ 69. doi:10.1038/nrm3359.

Yanagida, Mitsuaki, Toshiya Hayano, Yoshio Yamauchi, Takashi Shinkawa, Tohru Natsume, Toshiaki Isobe, et Nobuhiro Takahashi. 2004. « Human Fibrillarin Forms a Sub-Complex with Splicing Factor 2-Associated p32, Protein Arginine Methyltransferases, and Tubulins α3 and β1 That Is Independent of Its Association with Preribosomal Ribonucleoprotein Complexes ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (3): 1607‑14. doi:10.1074/jbc.M305604200.

Yang, Hsin-Sheng, Aaron P. Jansen, Anton A. Komar, Xiaojing Zheng, William C. Merrick, Sylvain Costes, Stephen J. Lockett, Nahum Sonenberg, et Nancy H. Colburn. 2003. « The Transformation Suppressor Pdcd4 Is a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A Binding Protein That Inhibits Translation ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (1): 26‑37.

Yang, Leixiang, et Jiandong Chen. 2014. « SirT1 and rRNA in the nucleolus: regulating the regulator ». *Oncoscience* 1 (2): 111‑12.

Yang, Pok Kwan, Coralie Hoareau, Carine Froment, Bernard Monsarrat, Yves Henry, et Guillaume Chanfreau. 2005. « Cotranscriptional Recruitment of the Pseudouridylsynthetase Cbf5p and of the RNA Binding Protein Naf1p during H/ACA snoRNP Assembly ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (8): 3295‑3304. doi:10.1128/MCB.25.8.3295-3304.2005.

Yarom, Nirit, Celia Marginean, Terence Moyana, Ivan Gorn-Hondermann, H. Chaim Birnboim, Horia Marginean, Rebecca C. Auer, et al. 2010. « EGFR Expression Variance in Paired Colorectal Cancer Primary and Metastatic Tumors ». *Cancer Biology & Therapy* 10 (5): 416‑21.

Ye, Keqiong, Ru Jia, Jinzhong Lin, Minghua Ju, Jin Peng, Anbi Xu, et Liman Zhang. 2009. « Structural Organization of Box C/D RNA-Guided RNA Methyltransferase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (33): 13808‑13. doi:10.1073/pnas.0905128106.

Yildirim, Sukriye, Enrique Castano, Margarita Sobol, Vlada V. Philimonenko, Rastislav Dzijak, Tomáš Venit, et Pavel Hozák. 2013. « Involvement of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in RNA Polymerase I Transcription ». *J Cell Sci* 126 (12): 2730‑39. doi:10.1242/jcs.123661.

Yin, Qing-Fei, Li Yang, Yang Zhang, Jian-Feng Xiang, Yue-Wei Wu, Gordon G. Carmichael, et Ling-Ling Chen. 2012. « Long Noncoding RNAs with snoRNA Ends ». *Molecular Cell* 48 (2): 219‑30. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.033.

Yoo, Dongwan, Sarah K. Wootton, Gang Li, Cheng Song, et Raymond R. Rowland. 2003. « Colocalization and Interaction of the Porcine Arterivirus Nucleocapsid Protein with the Small Nucleolar RNA-Associated Protein Fibrillarin ». *Journal of Virology* 77 (22): 12173 ‑ 83. doi:10.1128/JVI.77.22.12173-12183.2003.

Yoon, Andrew, Guang Peng, Yves Brandenburg, Ornella Zollo, Wei Xu, Eduardo Rego, et Davide Ruggero. 2006. « Impaired Control of IRES-Mediated Translation in X-Linked Dyskeratosis Congenita ». *Science* 312 (5775): 902‑6. doi:10.1126/science.1123835.

Yoshikawa, Harunori, Hideaki Ishikawa, Keiichi Izumikawa, Yutaka Miura, Toshiya Hayano, Toshiaki Isobe, Richard J. Simpson, et Nobuhiro Takahashi. 2015. « Human nucleolar protein Nop52 (RRP1/NNP-1) is involved in site 2 cleavage in internal transcribed spacer 1 of pre-rRNAs at early stages of ribosome biogenesis ». *Nucleic Acids Research* 43 (11): 5524 ‑ 36. doi:10.1093/nar/gkv470.

Yoshikawa, Harunori, Wataru Komatsu, Toshiya Hayano, Yutaka Miura, Keiichi Homma, Keiichi Izumikawa, Hideaki Ishikawa, et al. 2011. « Splicing factor 2-associated protein p32 participates in ribosome biogenesis by regulating the binding of Nop52 and fibrillarin to preribosome particles ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 10 (8): M110.006148. doi:10.1074/mcp.M110.006148.

Yu, Yi-Tao, et U. Thomas Meier. 2014. « RNA-Guided Isomerization of Uridine to Pseudouridine—pseudouridylation ». *RNA Biology* 11 (12): 1483. doi:10.4161/15476286.2014.972855.

Yu, Yonghao, Hong Ji, Jennifer A. Doudna, et Julie A. Leary. 2005. « Mass Spectrometric Analysis of the Human 40S Ribosomal Subunit: Native and HCV IRES-Bound Complexes ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 14 (6): 1438‑46. doi:10.1110/ps.041293005.

Zebarjadian, Yeganeh, Tom King, Maurille J. Fournier, Louise Clarke, et John Carbon. 1999. « Point Mutations in Yeast CBF5 Can Abolish In Vivo Pseudouridylation of rRNA ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (11): 7461‑72. doi:10.1128/MCB.19.11.7461.

Zebisch, A., et J. Troppmair. 2006. « Back to the Roots: The Remarkable RAF Oncogene Story ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63 (11): 1314‑30. doi:10.1007/s00018-006-6005-y.

Zemp, Ivo, Franziska Wandrey, Sanjana Rao, Caroline Ashiono, Emanuel Wyler, Christian Montellese, et Ulrike Kutay. 2014. « CK1δ and CK1ε Are Components of Human 40S Subunit Precursors Required for Cytoplasmic 40S Maturation ». *J Cell Sci* 127 (6): 1242 ‑ 53. doi:10.1242/jcs.138719.

Zemp, Ivo, Thomas Wild, Marie-Françoise O'Donohue, Franziska Wandrey, Barbara Widmann, Pierre-Emmanuel Gleizes, et Ulrike Kutay. 2009. « Distinct Cytoplasmic Maturation Steps of 40S Ribosomal Subunit Precursors Require hRio2 ». *The Journal of Cell Biology* 185 (7): 1167‑80. doi:10.1083/jcb.200904048.

Zeng, Chenjie, Koichi Matsuda, Wei-Hua Jia, Jiang Chang, Sun-Seog Kweon, Yong-Bing Xiang, Aesun Shin, et al. 2016. « Identification of Susceptibility Loci and Genes for Colorectal Cancer Risk ». *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2016.02.076.

Zhang, Biliang, et Thomas R. Cech. 1997. « Peptide Bond Formation by in Vitro Selected Ribozymes ». *Nature* 390 (6655): 96‑100. doi:10.1038/36375.

Zhang, Qian, Gerrit J. Bouma, Kristy McClellan, et Stuart Tobet. 2012. « Hypothalamic Expression of snoRNA Snord116 Is Consistent with a Link to the Hyperphagia and Obesity Symptoms of Prader-Willi Syndrome ». *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official*

Journal of the International Society for Developmental Neuroscience 30 (6): 479‑85. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.05.005.

Zhang, Yajie, Jianqi Wang, Ming Ding, et Yonghao Yu. 2013. « Site-Specific Characterization of the Asp- and Glu-ADP-Ribosylated Proteome ». *Nature Methods* 10 (10): 981 - 84. doi:10.1038/nmeth.2603.

Zhang, Yi-Jun, Jian-Hua Yang, Qiao-Su Shi, Ling-Ling Zheng, Jun Liu, Hui Zhou, Hui Zhang, et Liang-Hu Qu. 2014. « Rapid Birth-and-Death Evolution of Imprinted snoRNAs in the Prader-Willi Syndrome Locus: Implications for Neural Development in Euarchontoglires ». *PloS One* 9 (6): e100329. doi:10.1371/journal.pone.0100329.

Zhao, Rongmin, Yoshito Kakihara, Anna Gribun, Jennifer Huen, Guocheng Yang, May Khanna, Michael Costanzo, et al. 2008. « Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation ». *The Journal of Cell Biology* 180 (3): 563 ‑78. doi:10.1083/jcb.200709061.

Zhao, Xinliang, et Yi-Tao Yu. 2007. « Incorporation of 5-fluorouracil into U2 snRNA blocks pseudouridylation and pre-mRNA splicing in vivo ». *Nucleic Acids Research* 35 (2): 550‑58. doi:10.1093/nar/gkl1084.

Zhao, Yongqian, Tingjin Sherryl Soh, Siew Pheng Lim, Ka Yan Chung, Kunchithapadam Swaminathan, Subhash G. Vasudevan, Pei-Yong Shi, Julien Lescar, et Dahai Luo. 2015. « Molecular Basis for Specific Viral RNA Recognition and 2′-O-Ribose Methylation by the Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (48): 14834‑39. doi:10.1073/pnas.1514978112.

Zheng, Luping, Zhenguo Du, Chen Lin, Qianzuo Mao, Kangcheng Wu, Jianguo Wu, Taiyun Wei, Zujian Wu, et Lianhui Xie. 2014. « Rice Stripe Tenuivirus p2 May Recruit or Manipulate Nucleolar Functions through an Interaction with Fibrillarin to Promote Virus Systemic Movement ». *Molecular Plant Pathology*, novembre, n/a-n/a. doi:10.1111/mpp.12220.

Zhong, Shuping, Cheng Zhang, et Deborah L. Johnson. 2004. « Epidermal Growth Factor Enhances Cellular TATA Binding Protein Levels and Induces RNA Polymerase I- and III-Dependent Gene Activity ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (12): 5119. doi:10.1128/MCB.24.12.5119-5129.2004.

Zhou, Houjiang, Serena Di Palma, Christian Preisinger, Mao Peng, Ayse Nur Polat, Albert J. R. Heck, et Shabaz Mohammed. 2013. « Toward a Comprehensive Characterization of a Human Cancer Cell Phosphoproteome ». *Journal of Proteome Research* 12 (1): 260 - 71. doi:10.1021/pr300630k.