HAL
open science

Dynamique des facteurs pré-ribosomiques au cours de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique chez S. cerevisiae

Alice Lebreton

To cite this version:

Alice Lebreton. Dynamique des facteurs pré-ribosomiques au cours de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique chez S. cerevisiae. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2006. Français. NNT : . tel-00100381

HAL Id: tel-00100381

https://theses.hal.science/tel-00100381

Submitted on 3 Aug 2016

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

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

UFR de Biochimie
2, place Jussieu
75005 Paris

Unité de Génétique des Interactions
Macromoléculaires – URA CNRS 2171
Institut Pasteur
25, rue du Dr. Roux
75724 Paris cedex 15

Thèse de doctorat de l'Université Paris 7 – Denis Diderot

École Doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire

Spécialité : Microbiologie-Virologie

présentée par Alice LEBRETON
pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris 7

Dynamique des facteurs pré-ribosomiques au cours de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique chez *S. cerevisiae*

Soutenance le lundi 29 mai 2006 devant un jury composé de :

Philippe REGNIER	Président du jury
Yves HENRY	Rapporteur
Denis LAFONTAINE	Rapporteur
Isabelle IOST	Examinatrice
Jean-Jacques DIAZ	Examinateur
Micheline FROMONT-RACINE	Directrice de thèse

AVANT PROPOS

« Nous sommes si présomptueux que nous voudrions être connus de toute la terre et même des gens qui viendront quand nous ne seront plus. Et nous sommes si vains que l'estime de 5 ou 6 personnes qui nous environnent nous amuse et nous contente. »

Blaise Pascal, *Pensées*

L'ensemble des protéines cellulaires est synthétisé par des complexes spécialisés, les ribosomes. La demande cellulaire en protéines nécessite une grande quantité de ces complexes. Par exemple, une cellule de levure contient environ 150 000 ribosomes ; ceci implique la production d'environ 2 000 nouveaux ribosomes par minute, afin de dupliquer le stock cellulaire à chaque génération. Dans les cellules eucaryotes, la voie métabolique dédiée à la biogenèse des ribosomes est un processus élaboré, très productif, et par conséquent particulièrement coûteux sur le plan énergétique. Ainsi, dans les cellules qui se divisent activement, cette voie métabolique consomme environ 50% des ressources cellulaires (Warner, 1999). Pour limiter les pertes énergétiques, l'activité de la biogenèse des ribosomes est étroitement régulée en fonction des conditions de croissance cellulaire. Par ailleurs, l'importance fondamentale de cette voie pour la physiologie cellulaire entraîne une grande conservation des facteurs impliqués dans la biogenèse au cours de l'évolution. Ces caractéristiques font de la biogenèse des ribosomes un champ de recherches central pour la biologie cellulaire.

Les premières études portant sur cette voie métabolique remontent à la fin des années 60 (Retel et Planta, 1967; Warner et Soeiro, 1967). Elles montraient que la fabrication de la grande et la petite sous-unités ribosomiques s'effectuait au sein de gros complexes ribonucléoprotéiques, et caractérisaient les premiers intermédiaires ribosomiques. Par la suite, l'ensemble de la voie de maturation des ARN ribosomiques fut élucidé, et les enzymes et petits ARN nucléolaires qui y participent furent peu à peu identifiés.

Au début des années 2000, une nouvelle ère dans l'étude de cette voie métabolique vit le jour, lorsque des travaux de protéomique permirent l'identification quasi-exhaustive des constituants des complexes pré-ribosomiques (Gavin et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Krogan et al., 2004; Nissan et al., 2002; Saveanu et al., 2001 et pour revue Fromont-Racine et al., 2003). En plus des ARN ribosomiques, des protéines ribosomiques, des petits ARN nucléolaires et des enzymes déjà identifiées, ces travaux révélèrent l'existence d'un grand nombre de protéines impliquées dans la fabrication ou le transport des sous-unités ribosomiques, ou dans leur contrôle. La fonction exacte d'un grand nombre de ces protéines, appelées facteurs pré-ribosomiques, est encore mal comprise.

Afin de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique, les travaux de ce mémoire portent sur la caractérisation de facteurs pré-ribosomiques impliqués dans cette voie. J'ai principalement étudié plusieurs aspects de la dynamique de ces protéines au cours de la biogenèse des ribosomes. Ces recherches ont permis de préciser l'ordre d'association et de dissociation de certains facteurs pré-ribosomiques sur les précurseurs de la grande sous-unité. Ils ont également conduit à la caractérisation d'un facteur clé pour la biogenèse des ribosomes, très conservé de la levure à l'homme, qui se trouve déstabilisé lorsque la biogenèse des ribosomes est bloquée. Enfin, ils ont mis en évidence un réseau d'interactions fonctionnelles impliqué dans le recyclage des derniers facteurs pré-ribosomiques, entre la fin de la biogenèse et l'entrée des sous-unités ribosomiques matures dans la traduction.

REMERCIEMENTS

« La parole éblouit et trompe car elle est mimée par le visage. Mais les mots noirs sur la page blanche sont comme l'âme mise à nu. »

Guy de Maupassant

Je souhaite tout d'abord remercier très sincèrement Micheline Fromont-Racine pour avoir encadré ces travaux avec calme, bonne humeur et souplesse. Durant ces quatre années, j'ai pu apprécier ses grandes qualités humaines et scientifiques, qui ont permis à ce mémoire de voir le jour dans les meilleures conditions. J'ai été particulièrement sensible à son soutien attentif, aux orientations judicieuses qu'elle a su donner à mes recherches, et à ses encouragements constants à progresser et persévérer.

Je remercie Yves Henry et Denis Lafontaine pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire, ainsi que pour leurs corrections et suggestions pertinentes. Merci également à Philippe Régnier, Isabelle Iost et Jean-Jacques Diaz pour leur participation à ce jury.

Je remercie vivement Alain Jacquier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, mais aussi pour ses nombreuses remarques constructives, son regard scientifique avisé et son ouverture d'esprit, qui ont souvent jeté un nouvel éclairage sur des résultats dont l'interprétation demeurait obscure.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Cosmin Saveanu, dont l'énergie et l'enthousiasme n'ont probablement d'égale que la gentillesse. Ce fut vraiment un plaisir de travailler avec lui, tant pour sa rigueur scientifique que pour l'agrément de sa compagnie.

Merci à Laurence Decourty pour l'aide précieuse qu'elle a apporté à plusieurs projets. J'ai apprécié la qualité de son travail ainsi que sa grande disponibilité.

Je remercie également l'ensemble des membres passés et présents de l'unité de Génétique des Interactions Macromoléculaires à l'Institut Pasteur que j'ai croisés au cours de ma thèse et qui ont, chacun, contribué à développer une ambiance de travail à la fois chaleureuse et sereine.

Je remercie les collaborateurs de ces travaux : les membres de la Plateforme « Protéomique » de l'Institut Pasteur, pour leur expertise en matière de spectrométrie de masse, et Jean-Luc Jestin, pour m'avoir initiée à la technique du « Phage Display ».

Merci à mon tuteur Antoine Danchin, pour les quelques discussions bénéfiques que nous avons pu avoir et qui m'ont remise dans le droit chemin.

Je remercie mes collègues de l'équipe d'enseignants en Immunologie à l'UFR de Biochimie de l'Université Paris 7, qui m'ont accueillie pour la durée de mon monitorat. Cette expérience m'a ouvert l'esprit à un champ de la Biologie passionnant, bien que quelque peu éloigné de mes préoccupations laborantines.

Merci à ceux, enseignants ou collègues, qui ont contribué à me faire aimer ce domaine, et à me donner l'envie de poursuivre dans cette voie.

Merci à tous ceux que j'ai pu rencontrer à Stapa, pour discuter de la Science et du reste, refaire le monde… Ou tout simplement prendre un verre dans une ambiance détendue.

Merci à toute ma famille pour leur affection et leur soutien constants ; avec une petite pensée spéciale pour Capucine Lebreton, qui a bien voulu consacrer quelques heures de bibliothèque à la quête de l'oiseau rare qui figure page 36 de ce manuscrit.

Je remercie enfin, du plus profond du cœur, Roger Mansuy, dont la présence quotidienne éclaire ma vie.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS 3
REMERCIEMENTS 5
TABLE DES MATIERES 7
TABLE DES ABREVIATIONS 9
INTRODUCTION 11
0. Qu'est-ce qu'un ribosome ? 13
0.1. Découverte des ribosomes 13
0.2. Structure des ribosomes 14
0.3. Fonction des ribosomes 16
1. Pourquoi la biogenèse des ribosomes eucaryotes est-elle plus complexe que celle des ribosomes bactériens ? 23
1.1. Fabrication des ribosomes bactériens 23
1.2. Comparaison structurale des ribosomes eucaryotes et procaryotes 30
1.3. Compartimentation et nécessité d'export des pré-ribosomes chez les Eucaryotes 32
2. Voie(s) de biogenèse des ribosomes eucaryotes 35
2.1. Organisation du nucléole 36
2.2. La transcription des ARNr et ses régulations 38
2.3. Les clivages des ARNr 45
2.4. Les modifications des ARNr 47
2.5. Une voie, des voies ? 49
3. Dynamique des protéines au cours de la biogenèse des ribosomes eucaryotes 51
3.1. Composition des particules pré-ribosomiques 51
3.2. Transports nucléo-cytoplasmiques au cours de la biogenèse des ribosomes 57
3.3. Transition entre biogenèse et traduction 58
3.4. Dégradation des particules pré-ribosomiques 60
RESULTATS 63
1. Assemblage séquentiel des protéines sur les particules pré-60S 65
2. Nsa2, un facteur pré-60S extrêmement conservé, étroitement régulé, nécessaire au clivage de l'ITS2 67
3. Ordre d'assemblage des facteurs pré-60S : l'approche SILAC 71
3.1. Limites techniques de l'analyse de l'ordre d'assemblage des facteurs pré-60S par chromatographie d'affinité en tandem 71
3.2. Principe du SILAC 71

3.3. Résultats obtenus pour le couple Nog1-TAP/NSA2 73
4. Un réseau fonctionnel impliqué dans le recyclage des facteurs pré-60S nucléo-cytoplasmiques 77
4.1. Étude de l'assemblage de la protéine ribosomique tardive Rpl24 sur la grande sous-unité ribosomique. 77
4.2. Rei1, un nouveau facteur pré-60S 85
4.3. Rei1 est nécessaire au recyclage de facteurs pré-60S navettes 88
4.4. Le recyclage des facteurs navettes est Kap121-dépendant 89
4.5. Rôle du dimère Arx1-Alb1 dans le recyclage de Tif6 90
DISCUSSION 93
1. Le clivage de l'ITS2, un point de contrôle de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique ? 95
2. Le couplage TAP + SILAC : perspectives et points d'ombre 97
3. Arx1 en question 99
4. La fabrication des ribosomes est coordonnée à d'autres voies métaboliques 101
4.1. Liens avec la traduction 101
4.2. Liens avec le transport nucléo-cytoplasmique 101
4.3. Liens avec la croissance et le cycle cellulaire 102
5. Quelques remarques finalistes 104
6. Conclusion 106
BIBLIOGRAPHIE 107
ANNEXES 121
1. Assemblage séquenciel des protéines aux précurseurs des sous-unités 60S — *Sequential Protein Association with Nascent 60S Ribosomal particles* 123
2. Nsa2, facteur instable et conservé, est nécessaire à la maturation des précurseurs d'ARN 27SB — *Nsa2, an unstable, conserved factor required for the maturation of 27SB pre-rRNAs* 137
3. Un réseau fonctionnel impliqué dans le recyclage des facteurs pré-60S nucléo-cytoplasmiques — *A functional network involved in the recycling of nucleo-cytoplasmic pre-60S factors* 149
4. Souches utilisées au cours de cette étude 171
5. Plasmides utilisés au cours de cette étude 175
5.1. Vecteurs d'entrée pour le système Gateway® 175
5.2. Vecteurs d'expression modifiés pour le système Gateway® 177
5.3. Clonages dans des vecteurs d'expression « classiques » 179
6. Oligonucléotides utilisés au cours de cette étude 181

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	ADN ribosomique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messager
ARN Pol	ARN polymérase
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
CAR	*Cohesin Assiciated Region* – Région associée aux cohésines
CE	*Core element* – Élément core
CF	*Core factor* – Facteur core
EF	*Elongation Factor* – Facteur d'élongation
eIF	*eukaryotic Initiation Factor* – Facteur d'initiation eucaryote
eRF	*eukaryotic Release Factor* – Facteur de terminaison eucaryote
ETS	*External Transcribed Spacer* – Séquence séparatrice transcrite externe
FLIP	*Fluorescence Loss in Photobleaching* – Perte de fluorescence par photoinactivation
FRAP	*Fluorescence Recovery after Photobleaching* – Recouvrement de fluorescence après photoinactivation
GTP	Guanosine TriPhosphate
IR	Intermédiaire de Reconstitution
IRES	*Internal Ribosome Entry Site* – Site de recrutement interne des ribosomes
ITS	*Internal Transcribed Spacer* – Séquence séparatrice transcrite interne
MALDI-TOF	*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight*
NES	*Nuclear Export Signal* – Signal d'export nucléaire
NLS	*Nuclear localization Signal* – Signal d'import nucléaire
NTS	*Non-Transcribed Spacer* – Séquence séparatrice non-transcrite
NOR	*Nucleolus Organizer Region* – Région organisatrice du nucléole
NTP	Nucléotide TriPhosphate
PAP	Complexe Peroxydase-Anti-Peroxydase (Sigma)
pb	paire de bases
PC/QMS	*Pulse Chase coupled with Quantitative Mass Spectrometry* – Technique de marquage et chasse couplée à la spectrométrie de masse
Pol I	ARN polymérase I
RBF	*Replication Fork Blocking site* - site de blocage de la fourche de réplication

REG	Réticulum endoplasmique granuleux
RNP	Complexe RiboNucléoProtéique
RNase	Ribonucléase
SDS	Sodium Dodécyl-Sulfate
SILAC	*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture* – Marquage par des acides aminés contenant des isotopes stables en culture cellulaire
snoARN	Petits ARN nucléolaires
TAP	*Tandem Affinity Purification* – Chromatographie d'affinité en tandem
UAF	*Upstream Activating Factor* – Facteur d'activation amont
UAS	*Upstream Activating Sequence* – séquence d'activation amont
UE	*Upstream element* – Elément amont
YPD	*Yeast extract – Peptone – D-glucose* – Milieu riche pour la culture des levures

INTRODUCTION

0. Qu'est-ce qu'un ribosome ?

Un ribosome est un complexe macromoléculaire constitué d'ARN et de protéines, dont la fonction est de réaliser la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines, en déchiffrant le code génétique grâce à des ARN de transferts (ARNt).

0.1. Découverte des ribosomes

Les ribosomes et la traduction furent découverts indépendamment, pas des groupes différents au cours des années 50. La caractérisation biochimique définitive de ces complexes ribonucléoprotéiques comme acteurs de la traduction n'intervient que dans le courant des années 60.

La première description des ribosomes est attribuée à Georges E. Palade (Figure 1A). En 1955, par microscopie électronique à transmission, il décrivit, dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, des particules de haute densité, approximativement sphériques, d'un diamètre de 10 à 15 nm, (Palade, 1955). Ces corpuscules, présents dans les 40 types cellulaires de vertébrés pris en compte dans l'étude, sont plus abondants dans le cytoplasme des cellules se divisant activement. En revanche, dans les tissus moins sujets à la prolifération, ces particules sont préférentiellement associées à la face externe de la membrane du réticulum endoplasmique.

L'identification des mêmes particules dans le cytoplasme des Procaryotes (Figure 1B) intervint plus tardivement (Tissieres et Watson, 1958).

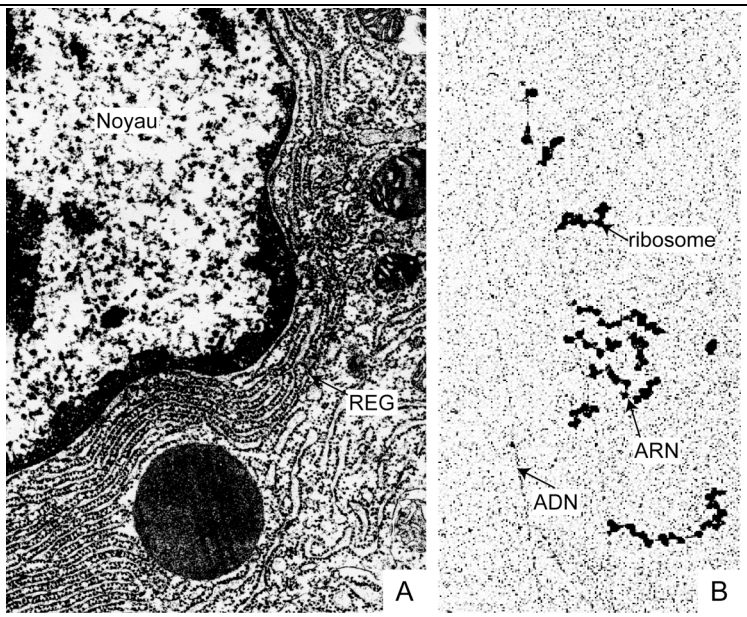


Figure 1 : (A) Cliché de microscopie électronique à transmission d'une coupe de cellule eucaryote. On observe (en haut à gauche) le noyau et, accolé à l'enveloppe nucléaire, les compartiments du réticulum endoplasmique granuleux (REG). Sur la face externe de ces saccules sont associées des particules denses : les ribosomes. (B) Cliché de microscopie électronique à transmission d'une préparation d'ADN bactérien. On y distingue les fins filaments verticaux d'ADN. Les filaments plus denses et courts sont les ARNm en cours de synthèse, auxquels sont associés les ribosomes. Ceci illustre le fait que chez les Procaryotes, transcription et traduction se produisent dans le même compartiment cellulaire, et sont donc couplées.

En parallèle, les premiers travaux de traduction *in vitro* furent réalisés par Siekevitz et Zamecnick (Siekevitz et Zamecnik, 1951). Ils montrèrent que des extraits acellulaires de foie

de rat catalysent l'incorporation d'acides aminés radiomarqués dans des protéines, et que ce processus nécessite un apport énergétique sous forme d'ATP et de GTP. Par la suite, des expériences de fractionnement cellulaire permirent d'affiner ces résultats ; la fraction microsomale, comprenant des ribosomes attachés à des fragments de membranes intracellulaires, recèle le maximum d'activité spécifique pour la traduction *in vitro*.

À cette époque, le rôle de l'ARN dans le transfert d'information était encore inconnu. Il fallut attendre 1961 pour que l'ARN messager (ARNm) soit identifié comme vecteur du message génétique, de l'ADN aux protéines (Brenner et al., 1961; Gros et al., 1961; Jacob et Monod, 1961). Le déchiffrage du code génétique débuta la même année (Nirenberg et Matthaei, 1961), pour s'achever au milieu des années 60.

Enfin, des études de biochimie plus poussées montrèrent que les ribosomes étaient les acteurs de la synthèse protéique à partir des ARNm, chez les bactéries (Tissieres et Hopkins, 1961) aussi bien que chez les Eucaryotes (Marks et al., 1962), et donnèrent un sens physiologique aux polysomes, autrefois appelés ergosomes (Warner et al., 1963). Les polysomes, détectés par fractionnement d'extraits cellulaires sur gradient de densité (Figure 2), correspondent à des ribosomes fonctionnels, participant à la traduction d'ARNm auxquels ils sont associés. On distingue, en mesurant l'absorbance à 254 nm du sommet à la base du gradient, une forêt de pics. Ceux de coefficient de sédimentation les plus faibles contiennent les sous-unités ribosomiques libres, les ribosomes libres, puis les disomes (deux ribosomes sur un ARNm), etc. jusqu'aux coefficients de sédimentation les plus élevés.

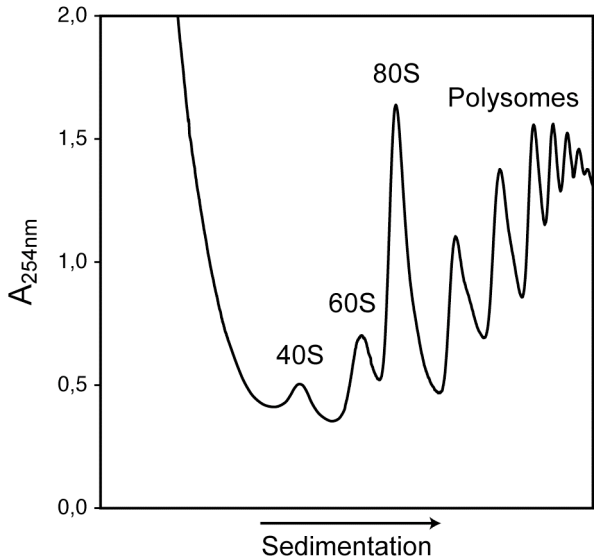


Figure 2 : Aspect des polysomes obtenus par fractionnement cellulaires de *S. cerevisiae* sur un gradient de saccharose. En mesurant l'absorbance à 254 nm le long du gradient, on observe tout d'abord un grand pic de protéines monomériques ou oligomériques, puis deux pics (40S et 60S) correspondant respectivement à la petite et la grande sous-unité ribosomique. L'association de ces deux sous-unités sur un ARNm forme un ribosome (80S). Dans les polysomes, chaque pic correspond ensuite à l'addition d'un ribosome sur l'ARNm traduit par rapport au pic précédent.

0.2. Structure des ribosomes

Les ribosomes sont constitués, dans tous les règnes du vivant, de deux sous-unités : la grande sous-unité ribosomique (60S chez les Eucaryotes - 50S chez les Procaryotes), et la petite sous-unité (40S chez les Eucaryotes – 30S chez les Procaryotes). Ces deux sous-unités

s'assemblent sur les ARNm, pour former un ribosome fonctionnel (80S chez les Eucaryotes – 70S chez les Procaryotes).

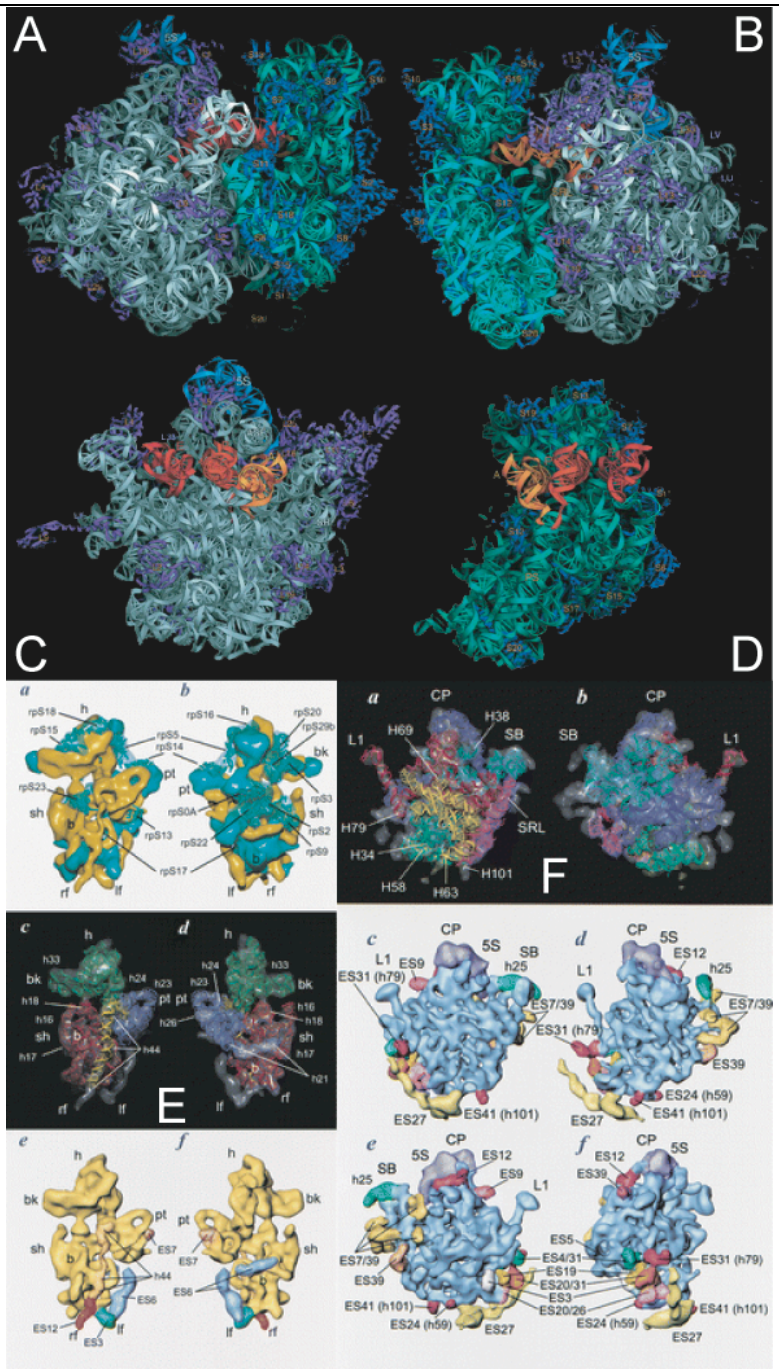


Figure 3 : Structures des ribosomes procaryotes (Yusupov et al., 2001) et eucaryotes (Spahn et al., 2001). (A-D) La structure des ribosomes de *T. thermophilus* a pu être résolue par cristallographie avec une résolution de 5,5 Å. Pour la sous-unité 60S (C), les ARN sont représentés en gris, les protéines ribosomiques en violet. Pour la sous-unité 30S (D), l'ARN est en vert, les protéines en bleu. (A) et (B) représentent les ribosomes 70S entiers. L'ARNt positionné au site $\mathcal{A}$ est coloré en orange, ceux positionnés aux sites $\mathcal{P}$ et $\mathcal{E}$ en rouge. (E-F) La structure des ribosomes de *S. cerevisiae* a été déterminée par cryoélectromicroscopie et analogie avec les structures procaryotes ; la résolution est d'environ 15 Å. Pour la sous-unité 40S (E), l'ARN est en jaune, les protéines en vert (panneau du haut). Pour la grande sous-unité (F), l'ARN est en bleu (panneaux du bas).

Chaque sous-unité ribosomique est un assemblage d'ARN ribosomiques (ARNr) et de protéines ribosomiques. Chez la levure, les ARNr sont appelés, d'après leur coefficient de sédimentation, 18S pour la petite sous-unité, 25S, 5,8S et 5S pour la grande. À ces ARNr sont associées les protéines ribosomiques, au nombre de 33 pour la petite, et 48 pour la grande.

Les ARNr occupent une position centrale dans le ribosome, formant une structure dans laquelle viennent s'enchâsser les protéines ribosomiques. En particulier, l'interface entre les deux sous-unités, où est situé le site catalytique du ribosome, est principalement constituée d'ARN. En raison de cette composition, les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Il s'agit là des RNPs les plus grandes de la cellule (environ 3 MDa), et également, de loin les plus abondantes.

Au cours de la traduction, les ribosomes se déplacent le long de l'ARNm ; ils interagissent avec les ARNt et divers facteurs protéiques, et subissent d'importants remaniements conformationnels (Druzina et Cooperman, 2004; Dudzinska-Bajorek et al., 2006; Peske et al., 2004; Rodnina et al., 2002). Malgré la complexité de ces assemblages macromoléculaires, leur structure a pu être résolue. Celle du ribosome de la bactérie thermophile *Thermus thermophilus* a pu être déterminée par cristallographie aux rayons X avec une résolution de 5,5 Å (Yusupov et al., 2001). Au-delà des données structurales de première importance qu'ont apportées ces travaux, ils ont permis de visualiser le positionnement des ARNt aux sites $\mathcal{A}$, $\mathcal{P}$ et $\mathcal{E}$ (respectivement sites Aminoacyl-ARNt, Peptidyl-ARNt et sortie (*Exit*) ; la fonction de chacun de ces sites sera détaillée par la suite) au cours de la synthèse protéique.

Au cours de l'évolution, la structure globale des ribosomes est remarquablement conservée. Ce constat a permis la résolution d'un certain nombre d'autres structures de ribosomes, dans tous les règnes du vivant. Si ce n'est par cristallographie aux rayons X et à haute résolution, la forme globale et le positionnement de la majeure partie des protéines ribosomiques ont néanmoins pu être déterminés (avec une résolution de 15 Å environ) pour les ribosomes de *S. cerevisiae,* par cryoélectromicroscopie et analogies avec la structure de procaryotes (Spahn et al., 2001).

0.3. Fonction des ribosomes

Les ribosomes sont le site de la synthèse protéique. Ils permettent de catalyser l'ajout d'un acide aminé supplémentaire à une chaîne polypeptidique en cours de synthèse, avec une efficacité sans commune mesure avec celle qu'il faudrait pour que la même réaction se produise par la rencontre aléatoire des différentes molécules mises en jeu et par conséquent, à une vitesse compatible avec la vie. En moyenne, la vitesse d'allongement d'une chaîne polypeptidique par un ribosome eucaryote est de 3 à 5 acides aminés par seconde, assurant la synthèse des protéines cellulaires en moins d'une minute pour les plus courtes, en plusieurs heures pour les plus longues.

Cet ajout d'acide aminé s'effectue en déchiffrant le code génétique porté par les ARNm, grâce à des aminoacyl-ARNt spécifiques de chaque triplet de nucléotide, ou codon.

0.3.1. L'activité peptidyltransferase

Si la reconnaissance des codons de l'ARNm est réalisée par des ARNt spécifiques, le ribosome assure le positionnement correct des aminoacyl-ARNt sur leurs codons respectifs et catalyse la réaction de transfert d'un résidu aminoacyl de l'ARNt donneur à la chaîne peptidique en cours d'allongement.

Cette dernière réaction, appelée activité peptidyltransférase, nécessite que le peptidyl-ARNt (c'est-à-dire, un ARNt portant la chaîne polypeptidique de n résidus) et l'aminoacyl-ARNt (c'est-à-dire, un ARNt chargé par l'acide aminé $n+1$ à incorporer à la chaîne) occupent

les sites $\mathcal{P}$ et $\mathcal{A}$ du ribosome respectivement (Figure 4). La réaction est endothermique, et favorisée par le confinement de ces molécules dans un espace restreint, avec une liberté de mouvements limitée.

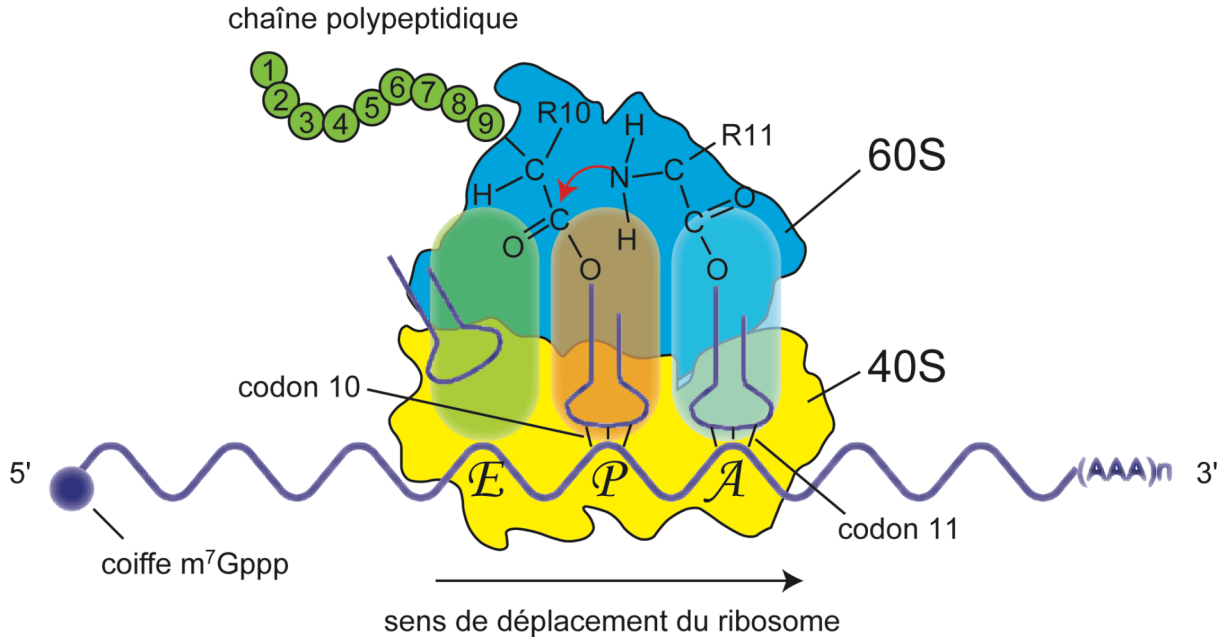


Figure 4 : La réaction peptidyltransférase. L'amine primaire de l'aminoacyl-ARNt *n+1* positionné au site $\mathcal{A}$ exerce une attaque nucléophile sur le carbone aliphatique du résidu *n* de la chaîne en cours d'allongement. Ceci induit l'allongement de la chaîne d'une unité, son transfert sur l'ARNt *n+1*, et la libération de l'ARNt *n*.

Des remaniements conformationnels de l'ensemble du site actif entraînent une flexion de l'aminoacyl-ARNt vers le site $\mathcal{P}$, de sorte que le groupement amine primaire de l'acide aminé à incorporer se trouve en position d'attaque nucléophile sur le dernier carbone aliphatique de la chaîne peptidique en cours d'élongation. La liaison entre le résidu *n* et l'ARNt au site $\mathcal{P}$ est alors rompue, et la chaîne polypeptidique, transférée sur l'ARNt occupant le site $\mathcal{A}$, compte désormais *n+1* résidus.

0.3.2. Les trois étapes de la traduction

Les étapes de la traduction sont remarquablement conservées dans les trois règnes du vivant. Nous détaillerons ici mécanismes mis en jeu chez *S. cerevisiae* (d'après Lodish et al., 2004), sans préciser les différences qui peuvent intervenir chez les Procaryotes, ni chez certains virus infectant les cellules Eucaryotes.

Chacune des trois étapes de la traduction nécessite l'intervention de facteurs spécifiques, appelés respectivement facteurs d'initiation (eIFs), d'élongation (EFs) et de terminaison (eRFs, pour *eukaryotic Release Factors*).

0.3.2.1. Initiation

L'initiation de la traduction est le mécanisme permettant la reconnaissance du premier codon d'un ARNm à traduire, et ainsi le positionnement du premier aminoacyl-ARNt au site $\mathcal{P}$ du ribosome. Le premier codon d'un ARNm est toujours un codon AUG, et l'aminoacyl-ARNt correspondant est un méthionyl-ARNt initiateur (Met-ARNt$_i^{Met}$). Ainsi, le premier résidu d'une protéine néosynthétisée est toujours une méthionine. Ce résidu peut éventuellement être éliminé de façon co-traductionnelle par les méthionine aminopeptidases cytoplasmiques Map1/Map2 (Li et Chang, 1995).

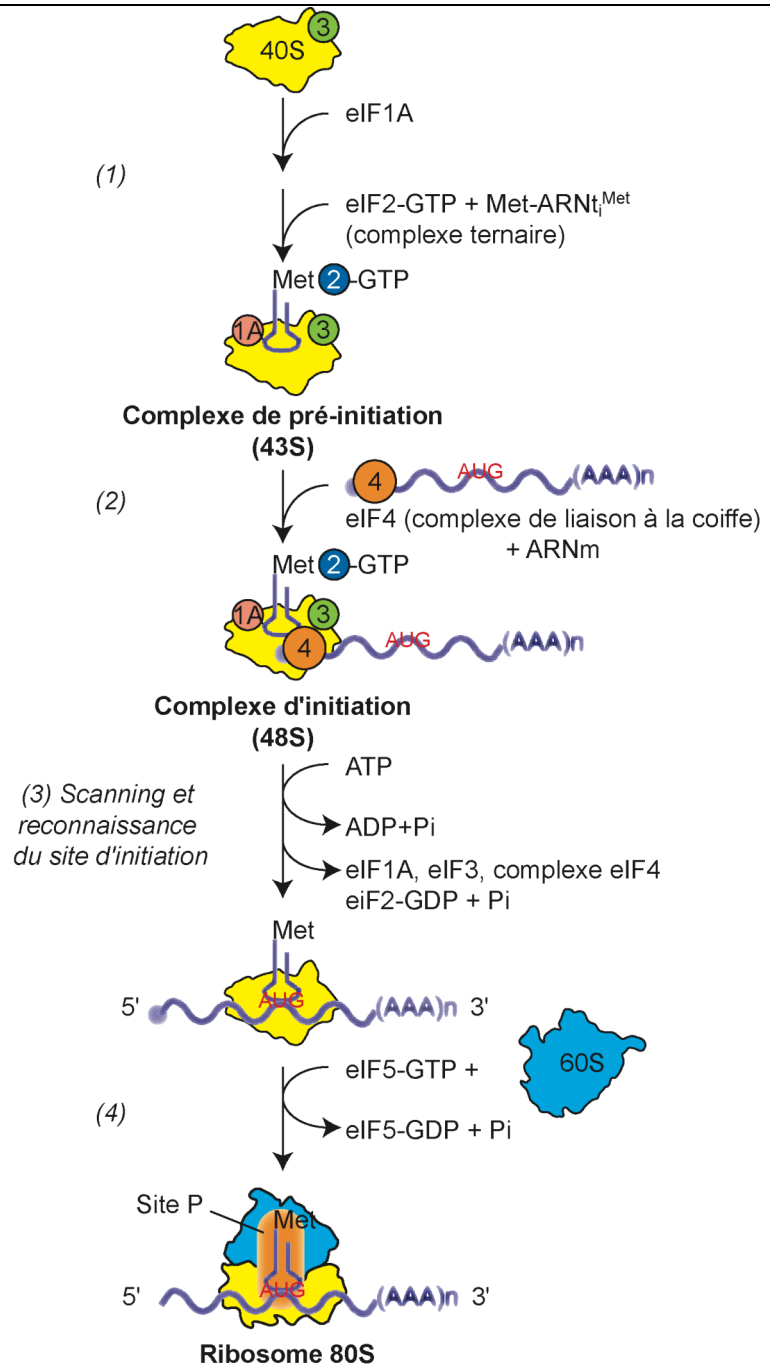


Figure 5 : Mécanismes d'initiation de la traduction chez les Eucaryotes. (*1*) La sous-unité 40S en complexe avec le facteur d'initiation eIF3 (en vert) s'associe à eIF1A et au complexe ternaire Met-ARNt$_i^{Met}$-eIF2-GTP (en bleu) pour former le complexe de pré-initiation 43S. (*2*) Le complexe eIF4 (en orange) se lie à la coiffe d'un ARNm à traduire ; l'ensemble est reconnu par le complexe de pré-initiation et forme le complexe d'initiation 48S. (*3*) Le complexe d'initiation se déplace le long de l'ARNm dans le sens 5' vers 3' jusqu'à rencontrer un codon initiateur. Ce processus, appelé *scanning*, nécessite l'activité hélicase ATP-dépendante de eIF4A pour dérouler les structures secondaires de l'ARNm. Au site d'initiation, après hydrolyse de la molécule de GTP, eIF1A, eIF3, eIF2-GDP et le complexe eIF4 sont libérés. (*4*) L'association de la grande sous-unité ribosomique permet la formation du ribosome 80S. Cette étape nécessite l'intervention de la GTPases eIF5. L'ARNt initiateur se retrouve positionné sur le codon initiateur, et au site *P* du ribosome.

Dans un premier temps, un complexe de pré-initiation est formé (Figure 5). Ce complexe, appelé 43S d'après son coefficient de sédimentation, est constitué d'une sous-unité 40S, des facteurs d'initiation eIF1A et eIF3, et du complexe ternaire comprenant le Met-$ARNt_i^{Met}$, le facteur eIF2 et une molécule de GTP.

En parallèle, le complexe eIF4 (formé des sous-unités eIF4A, B, E et G) reconnaît la coiffe 5' (m^7Gppp) d'un ARNm à traduire. La fixation du complexe de pré-initiation sur eIF4 conduit à la formation du complexe d'initiation 48S. À ce stade, plusieurs modèles co-existent, le plus répandu étant celui dit de « *scanning* » (Kozak, 1980) : le complexe d'initiation glisserait le long de l'ARNm dans le sens 5' vers 3', jusqu'à ce que le Met-$ARNt_i^{Met}$ reconnaisse un codon d'initiation. Ce mouvement nécessite l'activité hélicase de eIF4A, et par conséquent un apport énergétique sous forme d'hydrolyse d'ATP.

Le plus fréquemment (chez la levure), le codon d'initiation est le premier AUG rencontré dans la séquence de l'ARNm, à une distance en général inférieure à 100 nucléotides de la coiffe. La sélection de ce site est facilitée par la séquence nucléotidique au voisinage de l'AUG, appelée séquence Kozak (Kozak, 1978). L'initiation de la traduction serait favorisée par la présence d'une adénine en position -3 et d'une guanine en position +4. Par exemple : **A**CC<u>AUG</u>**G** constitue un motif d'initiation efficace de la traduction. eIF2 hydrolyse alors la molécule de GTP, ce qui entraîne sa libération ainsi que celles d'eIF1A, eIF3 et du complexe eIF4, et bloque toute possibilité de *scanning* ultérieure.

Notons qu'il existe des mécanismes d'initiation interne de la traduction, utilisés en particuliers par un certain nombre de virus. Les ribosomes sont alors recrutés sur des sites du messager appelés IRES (*Internal Ribosome Entry Site*).

Une fois que la petite sous-unité est correctement placée au site d'initiation de la traduction, la sous-unité 60S vient s'associer pour former un ribosome 80S fonctionnel. L'activité GTPase d'eIF5 est nécessaire à cette étape ; la réaction est irréversible, de sorte que les deux sous-unités ne peuvent se dissocier avant la terminaison de la traduction.

Le complexe ribosome-ARNm-Met-$ARNt_i^{Met}$, où le méthionyl-ARNt initiateur occupe le site $\mathcal{P}$, est alors prêt pour l'élongation. Au cours de cette deuxième étape de la traduction, l'ARNm va être traduit codon après codon, selon la phase de lecture définie par le codon initiateur.

0.3.2.2. Élongation

L'élongation est le processus itératif d'allongement de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse, en suivant la matrice que constitue l'ARNm à traduire. Chaque ajout d'un acide aminé à la chaîne nécessite l'activité peptidyltransférase du ribosome. L'énergie nécessaire à cette réaction est fournie par l'hydrolyse de deux molécules de GTP par les GTPases EF1α et EF2.

Au site $\mathcal{A}$, la structure du ribosome ménage une cavité où un ARNt chargé par son acide aminé spécifique, et lié au facteur d'élongation EF1α-GTP, peut s'insérer (Figure 6). Dans cette cavité, l'aminoacyl-ARNt *n+1* est orienté de telle sorte que le site anticodon de l'ARNt est placé face à un codon de l'ARNm. Si l'anticodon reconnaît un codon complémentaire, l'aminoacyl-ARNt est stabilisé au site $\mathcal{A}$.

Des remaniements conformationnels entraînent alors une flexion de cet aminoacyl-ARNt vers le site $\mathcal{P}$ où est positionné le peptidyl-ARNt, de sorte que le résidu *n+1* à incorporer se trouve en position d'attaque nucléophile sur le résidu *n* de la chaîne. Ce mouvement nécessite un apport énergétique, fourni par l'hydrolyse du GTP lié à EF1α. EF1α-GDP est libéré.

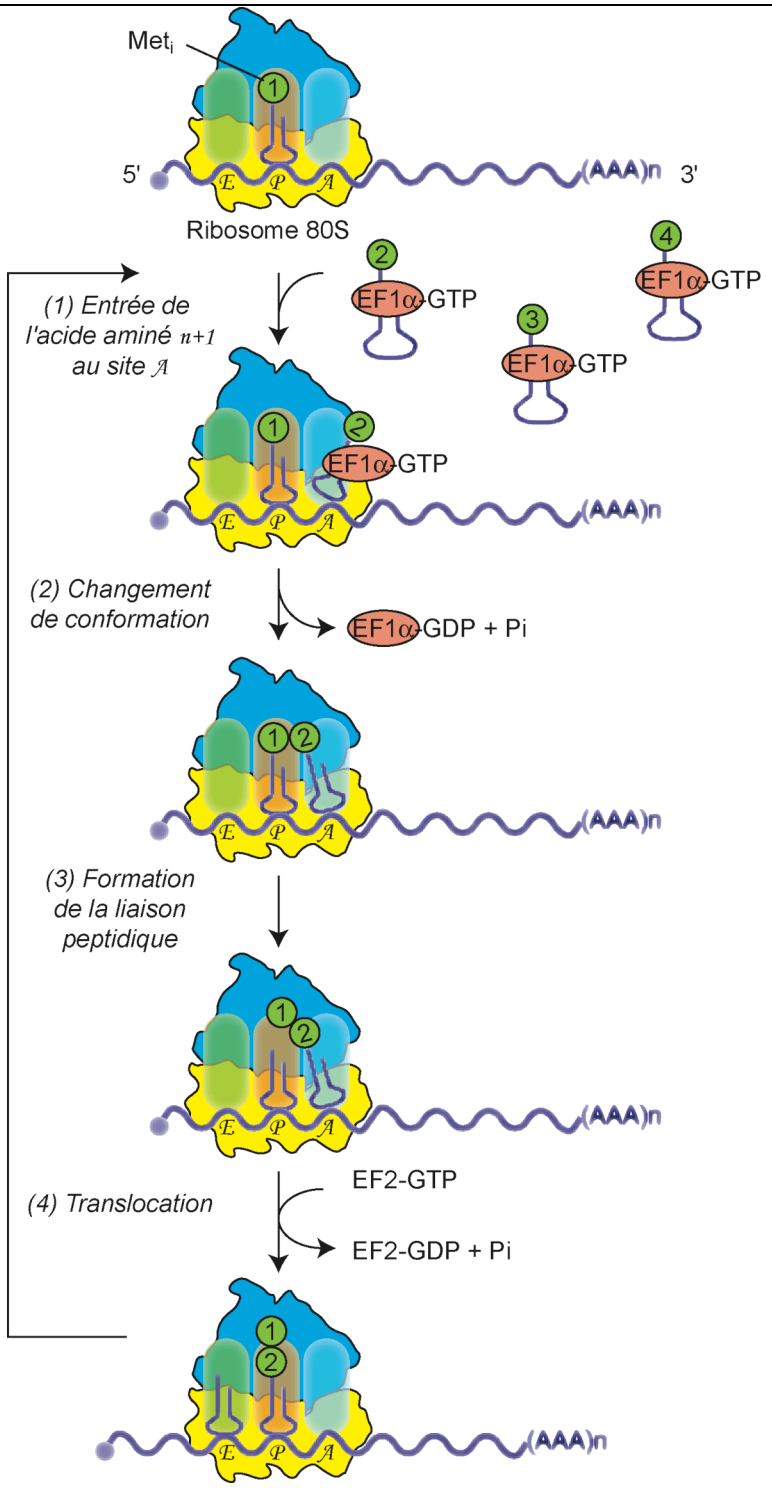


Figure 6 : Mécanismes d'élongation de la traduction chez les Eucaryotes. (*1*) Une fois le ribosome assemblé sur l'ARNm, avec le peptidyl-ARNt au site *P*, le complexe EF1α-aminoacyl-ARNt *n+1* vient se positionner au site *A*. (*2*) Sous l'effet de l'hydrolyse d'une molécule de GTP par EF1α, un changement conformationnel rapproche le résidu *n+1* de la chaîne peptidique en cours d'élongation. (*3*) La formation de la liaison peptidique entre les résidus *n* et *n+1* a lieu, dissociant la chaîne polypeptidique de l'ARNt *n*. (*4*) L'hydrolyse d'une molécule de GTP par le facteur EF2 conduit à la translocation du ribosome sur une distance de trois nucléotides. L'ARNt déchargé se retrouve au site *E* et quitte le ribosome ; le peptidyl-ARNt se retrouve au site *A*, et un nouveau cycle peut reprendre à l'étape (*1*).

La chaîne polypeptidique, qui compte désormais *n+1* résidus, se retrouve ainsi transférée sur l'ARNt *n+1* au site *A*. Un nouveau changement conformationnel, promu par l'activité GTPase du facteur EF2, conduit alors au glissement de l'ARNm de trois nucléotides dans le ribosome dans le sens *A* vers *P*, ce qui équivaut à un déplacement du ribosome sur l'ARNm dans le sens 5' vers 3'. Ces mouvements s'accompagnent de la translocation du peptidyl-ARNt du site *A* vers le site *P*, et de l'ARNt *n* du site *P* vers le site *E*. Au site *E*, la liaison entre l'ARNt et l'ARNm est déstabilisée, et une ouverture permet la sortie de l'ARNt déchargé vers le cytoplasme.

Ces étapes d'élongation se succèdent de façon récurrente, et ce jusqu'à un site de terminaison de la traduction.

0.3.2.3. Terminaison

La terminaison de la traduction est déterminée par l'apparition, dans la séquence de l'ARNm, d'un triplet de nucléotides appelé codon stop. Trois triplets de ce type existent (UGA, UGG et UAG), pour lesquels la cellule ne dispose pas d'ARNt spécifique. Lorsqu'un de ces codons entre au site *A* du ribosome, l'élongation ne peut se poursuivre.

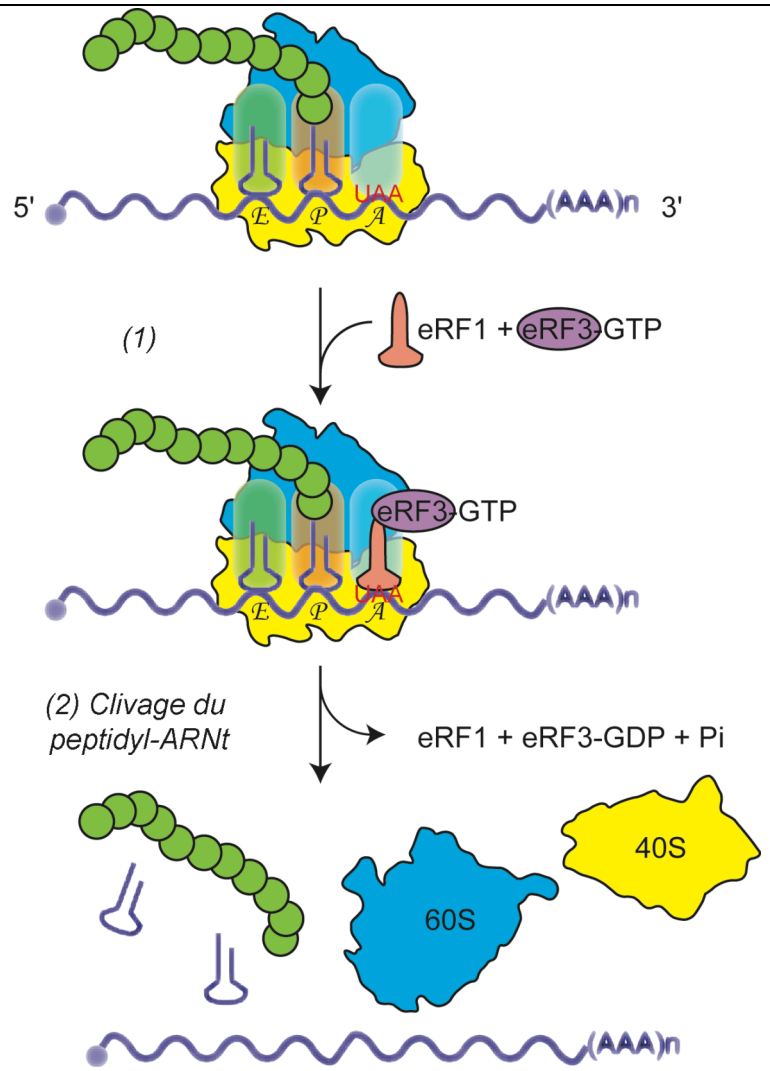


Figure 7 : Mécanismes de terminaison de la traduction chez les Eucaryotes. (*1*) Lorsque le ribosome rencontre un codon stop (UAA, UAG ou UGA), il marque une pause jusqu'à ce que le facteur eRF1 se positionne au site *A*, en complexe avec eRF3. (*2*) L'hydrolyse d'une molécule de GTP par eRF3 conduit au clivage du peptidyl-ARNt, et à la dissociation des sous-unités ribosomiques.

Le ribosome marque alors une pause, au cours de laquelle le facteur eRF1, mimant un ARNt, vient occuper le site *A* (Figure 7). La GTPase eRF3-GTP se lie à eRF1, et déclenche le clivage du peptidyl-ARNt au site *P*. La protéine néosynthétisée, eRF1 et eRF3-GDP sont libérés ; les deux sous-unités ribosomiques, le dernier ARNt et l'ARNm se séparent, moyennant l'intervention d'autres facteurs de terminaison.

0.3.3. Le recyclage des ribosomes

L'efficacité de la traduction Eucaryote est nettement accrue par deux mécanismes : La traduction simultanée d'un même ARNm par plusieurs ribosomes, formant des polysomes, et le recyclage rapide des sous-unités ribosomiques après leur décrochage de l'ARNm en fin de traduction.

Les polysomes, que l'on peut séparer dans des extraits cellulaires grâce à leur coefficient de sédimentation élevé (Figure 2), présentent souvent une forme circulaire lorsqu'on les observe par microscopie électronique. Cette forme met en jeu des interactions directes entre trois protéines : la protéine de liaison aux queues poly-A PABP1 d'une part, et d'autre part les protéines eIF4G et eIF4E appartenant au complexe de liaison à la coiffe eIF4 (Wells et al., 1998).

PABP1, qui couvre la queue de poly-A en 3' des ARNm, interagit avec la sous-unité eIF4G (Figure 8). eIF4E interagit de son côté avec la coiffe, à l'extrémité 5' des ARNm. L'ensemble permet la circularisation des ARNm. Ainsi, les sous-unités ribosomiques qui se détachent des ARNm à la fin de la traduction se retrouvent-elles à proximité de l'extrémité 5' du même ARNm ; cette situation favorise la ré-initiation par interaction de la petite sous-unité ribosomique avec eIF4 (Figure 5). Ce mécanisme permettrait d'optimiser l'efficacité de la synthèse protéique.

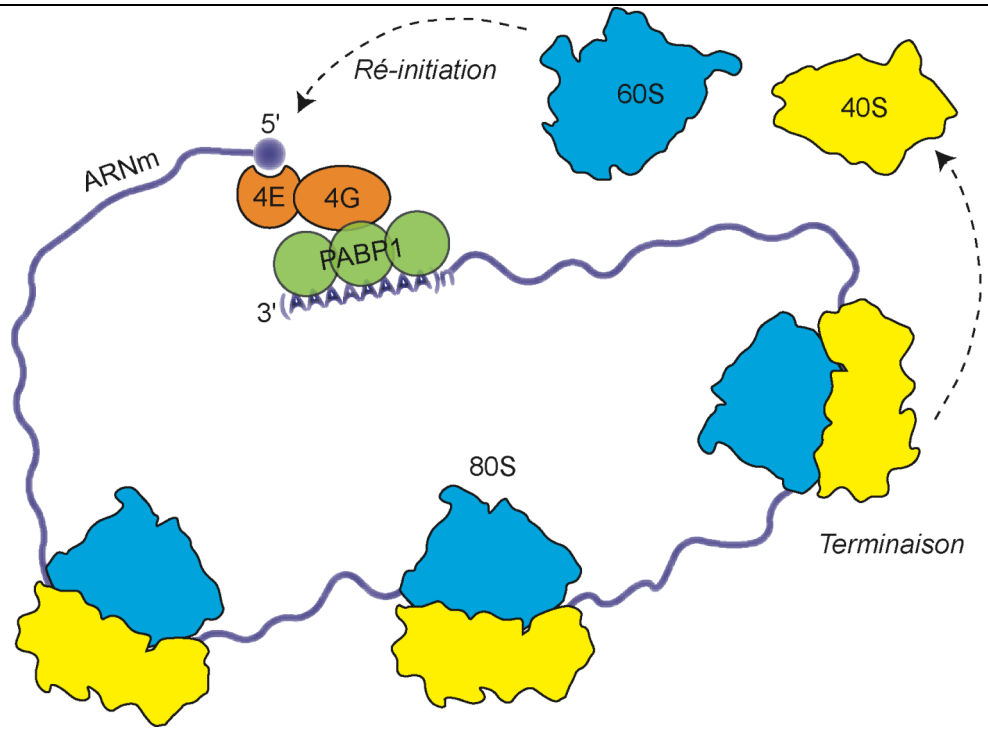


Figure 8 : Modèle de recyclage des sous-unités ribosomiques à la fin de la traduction. Plusieurs ribosomes peuvent traduire simultanément le même ARNm. Cet ARNm se circularise grâce à l'interaction entre PABP1 (en vert), liée à la queue poly-A à l'extrémité 3', et eIF4G, (en orange) appartenant au complexe de liaison à la coiffe à l'extrémité 5'. À la fin de la traduction, les sous-unités 40S et 60S seraient ainsi libérées à proximité de la coiffe, permettant une ré-initiation rapide.

1. Pourquoi la biogenèse des ribosomes eucaryotes est-elle plus complexe que celle des ribosomes bactériens ?

Avant de pouvoir assurer leur rôle traductionnel, les ribosomes doivent eux-mêmes être fabriqués, à partir de leurs constituants : ARNr et protéines ribosomiques. Si la structure finale est relativement similaire entre ribosomes Procaryotes et Eucaryotes, les mécanismes impliqués dans la biogenèse ont divergé au cours de l'évolution.

Cette partie s'attache à décrire les mécanismes moléculaires permettant la fabrication des ribosomes chez les Procaryotes, puis rend compte des particularités des cellules Eucaryotes qui requièrent une machinerie de biogenèse des ribosomes plus sophistiquée.

1.1. Fabrication des ribosomes bactériens

La fabrication des ribosomes bactériens nécessite la transcription des ARNr à partir d'opérons dédiés à cette synthèse, leur maturation par clivages et modifications de bases, et l'assemblage des sous-unités 30S et 50S, par association des ARNr avec les protéines ribosomiques. L'ensemble du processus se déroule dans un seul et même compartiment, le cytoplasme.

1.1.1. Voie de maturation des ARNr bactériens

1.1.1.1. Transcription des opérons d'ARNr

La transcription des ARN ribosomiques procaryotes est réalisée au sein d'opérons spécialisés. Si l'on considère que 50% des ARN produits par une population bactérienne en phase exponentielle de croissance sont des ARNr, ces opérons sont nécessairement exprimés avec une efficacité bien plus grande que celle des autres opérons cellulaires.

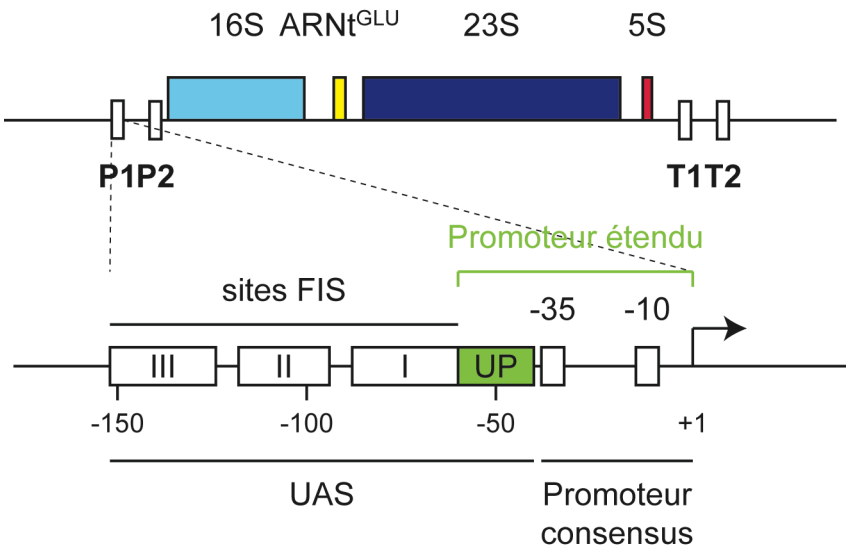


Figure 9 : Structure de l'opéron *rrnB* de *E. coli*. Les régions codant pour les ARN matures 16S, ARNt^{GLU}, 23S et 5S sont représentées respectivement en bleu clair, jaune, bleu foncé et rouge. Les régions promotrices (P1, P2) et terminatrices (T1, T2) sont indiquées. La région P1 a été agrandie ; on y distingue la région promotrice consensus avec les boîtes -10 et -35, formant avec l'élément UP (en vert) le promoteur étendu. La région UAS (*Upstream Activating Sequence*) possède trois sites de liaison de la protéine activatrice Fis.

Chez *E. coli*, on dénombre 7 opérons dédiés à la synthèse des ARNr. Leur structure varie légèrement autour d'un patron commun. À titre d'exemple, la structure du premier opéron séquencé, *rrnB* (Brosius et al., 1980), est représentée (Figure 9). On y distingue deux

séquences promotrices P1 et P2, la séquence transcrite, puis deux séquences terminatrices T1 et T2. La séquence transcrite comporte les séquences des ARNr 16S, 23S et 5S, espacées par des régions séparatrices. Entre l'ARN 16S et l'ARN 23S, la région séparatrice contient une copie du gène d'ARNt^{GLU}.

Les variations observées dans d'autres opérons affectent le nombre et la nature des ARNt qui peuvent occuper, soit une position centrale comme pour *rrnB*, soit une position terminale. Par ailleurs, l'opéron *rrnD* possède deux cistrons permettant la synthèse de l'ARNr 5S.

L'efficacité exceptionnelle de la transcription de ces opérons est assurée par deux mécanismes particuliers : d'une part, la fréquence d'initiation est accrue, et d'autre part, l'élongation de la transcription est plus processive.

La grande fréquence d'initiation de la transcription de ces opérons est permise par la présence de deux séquences promotrices fortes P1 et P2, localisées respectivement 306 et 187 nucléotides en amont du premier nucléotide de l'ARN16S mature. En plus des séquences consensus -35 et -10 des promoteurs classiques, ces régions contiennent un site de fixation supplémentaire de l'ARN polymérase (ARN Pol), la séquence UP, située entre les nucléotides -40 et -60 en amont du site d'initiation de la transcription (Ross et al., 1993). Cette séquence favorise la liaison de l'ARN Pol, et ainsi l'initiation de la transcription. De surcroît, ces opérons possèdent des séquences d'activation amont (UAS, *Upstream Activating Sequence*), qui activent l'initiation de la transcription par l'intermédiaire de la protéine Fis (Gourse et al., 1986; Nilsson et al., 1990; Ross et al., 1990).

Un site d'anti-terminaison appelé boîte A conditionne l'efficacité de l'élongation des transcrits (Holben et Morgan, 1984; Li et al., 1984). Cette séquence est essentielle à l'obtention de transcrits complets. En effet, si l'on s'affranchit des mécanismes d'anti-terminaison, les ARNr deviennent sensibles à un phénomène appelé « effet polaire », qui interrompt la transcription des ARN non traduits.

La transcription de ces opérons est modulée de manière extrêmement rapide et drastique en réponse à un certain nombre de stimuli cellulaires et extracellulaires. Les stress nutritionnels, en particulier la carence en acides aminés, déclenchent le ralentissement de la transcription des opérons d'ARNr, par un mécanisme appelé « contrôle rigoureux » (*stringent control*). En réponse à une carence, RelA entraîne la production de (p)ppGpp. Ce nucléotide a pour effet de bloquer les séquences promotrices de nombreux gènes, et en particulier P1. Cependant, la régulation de la production de ribosomes peut être observée dans des souches ne produisant pas de (p)ppGpp (Gaal et Gourse, 1990) ; par conséquent, d'autres mécanismes sont susceptibles d'intervenir. Un autre mode de régulation de la synthèse des ARNr serait un système de censeur de l'activité traductionnelle : lorsque la production de ribosomes est trop importante par rapport au métabolisme cellulaire, la trop grande activité de la traduction conduirait à une diminution des sources d'énergie libre disponibles sous formes de nucléotides triphosphates (ATP ou GTP). L'initiation au promoteur P1 serait très sensible aux concentrations de ces nucléotides, et ainsi s'exercerait un rétrocontrôle sur la production de ribosomes (Gaal et al., 1997).

La transcription des ARNr est aussi étroitement coordonnée à d'autres voies métaboliques centrales comme la synthèse des protéines ribosomiques, la synthèse des ARNt, la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques, la réplication de l'ADN, le métabolisme carboné et la voie de réponse aux chocs thermiques. *In fine*, l'activité de la transcription des opérons d'ARNr est sensible aux stress environnementaux, et reflète la vitesse de croissance de la population bactérienne.

1.1.1.2. Clivage des ARNr à partir du transcrit primaire

À partir des transcrits primaires produits par les opérons, une succession de clivages endo- et exo-nucléolytiques conduisent à la libération des ARNr matures 16S, 23S et 5S, ainsi que des ARNt, et à l'élimination des séquences séparatrices (Figure 10 pour l'opéron *rrnB*).

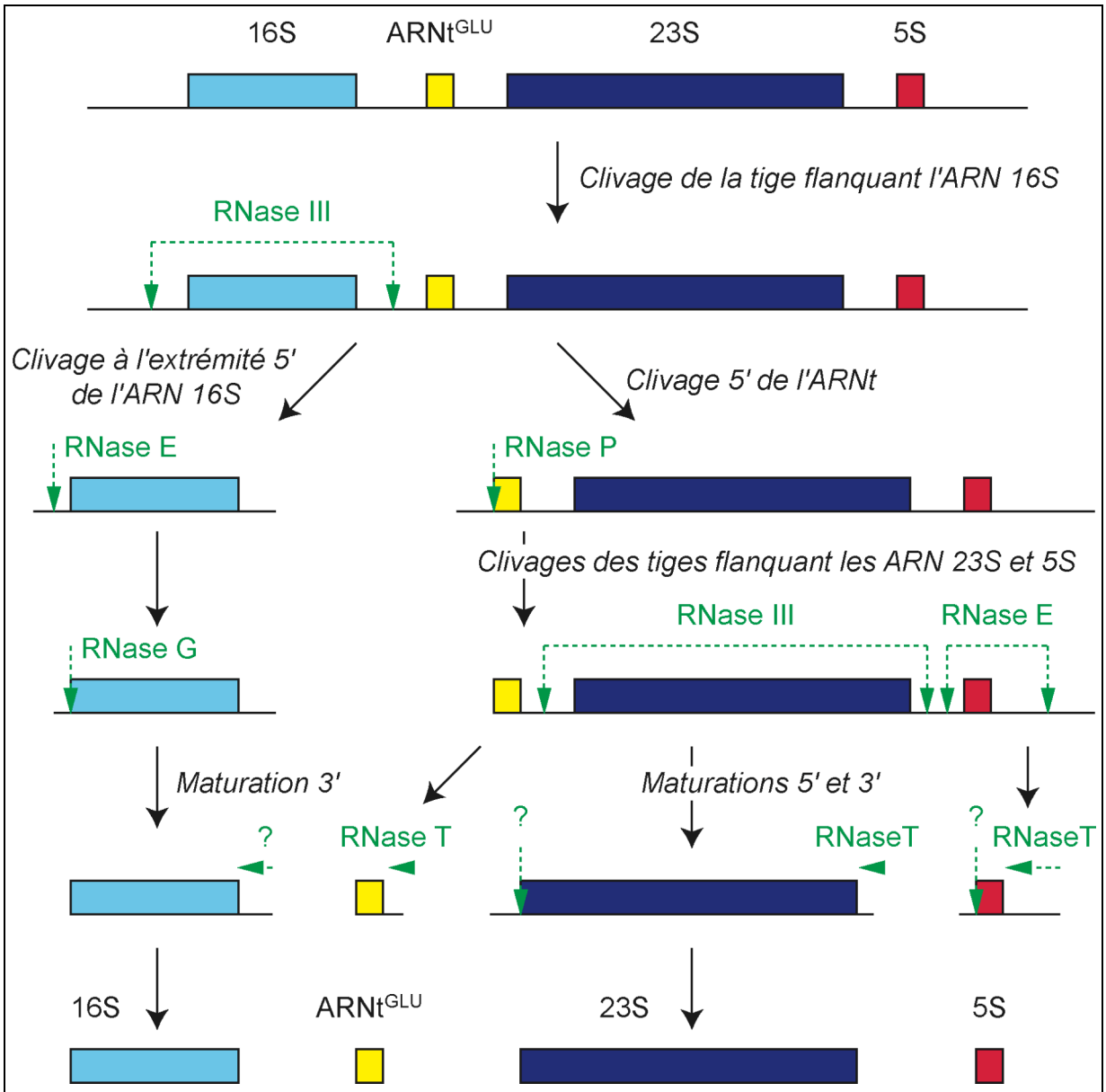


Figure 10 : Voies de clivages des précurseurs d'ARNr chez *E. coli*, pour l'opéron *rrnB* (d'après Lafontaine et Tollervey, 2001). Les enzymes impliquées dans les différents clivages sont indiquées en vert. Les sites de clivages endonucléolytiques sont indiqués par des flèches verticales ; les maturations exonucléolytiques sont représentées par des flèches horizontales.

Dans un premier temps, l'endonucléase double brin RNase III reconnaît un appariement entre la région 5' du transcrit primaire et la première séquence séparatrice, et conduit à la libération des précurseurs de l'ARN 16 S. L'extrémité 5' de l'ARN 16S est libérée par l'action endonucléolytique de la RNase M16 (maturase). L'enzyme responsable de la formation de l'extrémité 3' est encore inconnue (d'après Zimmermann et Dahlberg, 1996).

L'extrémité 5'de l'ARNt contenu dans la séquence séparant les ARN 16S et 23S est libéré par l'action d'un complexe ribonucléoprotéique, la RNase P. L'action de la RNase III conduit alors à la séparation des précurseurs de l'ARNt et des ARNr 23S et 5S. La libération

de l'ARN 5S de la partie terminale du transcrit est assurée par un double clivage endonucléolytique, exercé par la RNase E en amont et en aval de l'ARN mature. Les extrémités 3' définitives des ARN sont formées grâce aux activités exonucléolytique des RNases X (pour l'ARNt) et T (pour les ARNr). Les enzymes impliquées dans la formation des extrémités 5' des ARNr 23S et 5S sont encore inconnues.

1.1.1.3. Modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Un certain nombre de bases des ARNr 23S et 16S bactériens sont modifiées dans les ribosomes matures, soit par méthylation, soit par pseudo-uridylation (Bakin et al., 1994; Noller, 1984; Smith et al., 1992).

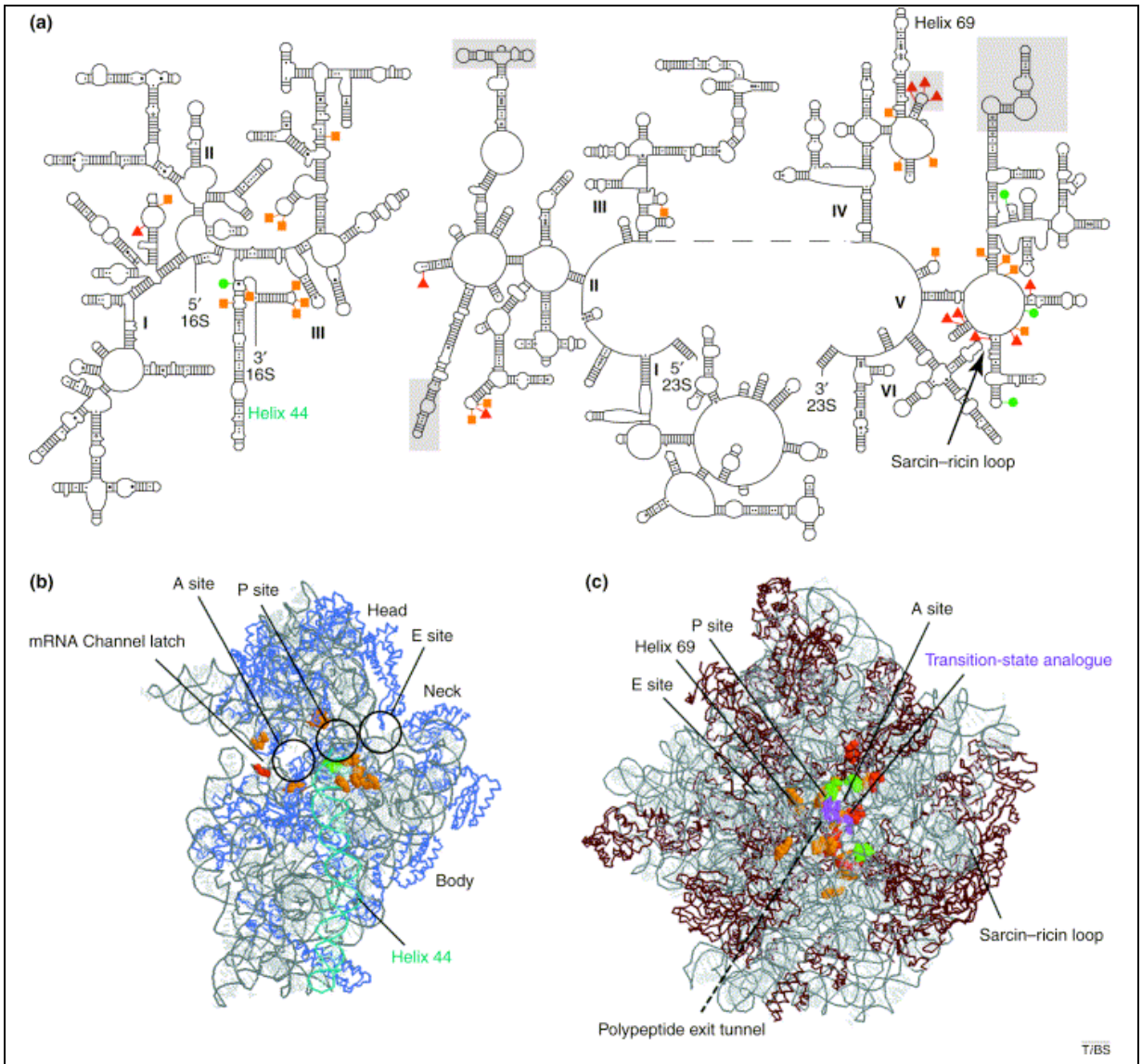


Figure 11 : Distribution des nucléotides modifiés des ARNr d'*E. coli* (Decatur et Fournier, 2002). Les pseudo-uridylations sont indiquées en rouge, les méthylations en orange ou en vert. L'ARNr est représenté en gris, les protéines ribosomiques en bleu (30S) ou en brun (60S) (a) Positions des modifications dans les ARN 16S et 23S. (b) Positions des modifications à la surface de la petite sous-unité ribosomique. (c) Positions des modifications à la surface de la grande sous-unité ribosomique.

La plupart des bases modifiées sont localisées, dans la structure finale du ribosome, au site actif, c'est-à-dire au site de décodage de l'information génétique et au site d'activité

peptidyltransférase pour la petite et la grande sous-unité ribosomiques respectivement (Figure 11).

Ces modifications sont catalysées par différentes enzymes spécifiques d'une position de l'ARNr. Les bases azotées peuvent être modifiées de façon précoce sur les ARNr libres, ou au contraire de façon plus tardive, une fois que la portion d'ARNr à méthyler est associée aux protéines ribosomiques (Weitzmann et al., 1991).

1.1.2. Ordre d'assemblage des protéines ribosomiques bactériennes

Les protéines ribosomiques bactériennes s'assemblent aux précurseurs d'ARNr et participent à leurs repliements de façon co-transcriptionnelle, et en même temps qu'ont lieu les étapes de maturation. Ce processus d'assemblage ordonné conduit à la formation de sous-unités ribosomiques matures et fonctionnelles.

Les gènes de protéines ribosomiques bactériennes sont regroupés en plusieurs opérons ; ainsi, toutes les protéines codées par un même opéron sont synthétisées en quantités stoechiométriques. La synthèse de ces protéines est principalement régulée de façon post-transcriptionnelle, par des mécanismes de rétrocontrôle dépendant de la quantité d'ARNr disponibles et de protéines ribosomiques libres : certaines protéines ribosomiques peuvent se fixer non seulement sur les ARNr pour former les ribosomes mais aussi, si elles sont en excès, sur leur propre ARNm, inhibant sa traduction et/ou favorisant sa dégradation (Nomura, 1999). De plus, les régulations de l'expression des différents opérons sont concertées. L'ensemble de la biogenèse des ribosomes bactériens est donc régulé de façon coordonnée.

Des expériences d'assemblage de ribosomes *in vitro* à partir d'ARNr matures et de protéines ribosomiques ont permis de déterminer le scénario d'assemblage des protéines ribosomiques sur la structure finale (Culver, 2003; Held et al., 1974; pour revue Nierhaus, 1991). À partir de ces expériences, le modèle proposé supposait l'existence de trois étapes majeures, dont un changement conformationnel limitant sur le plan cinétique, et nécessitant un apport énergétique sous forme de chaleur (Figure 12 pour la petite sous-unité ribosomique).

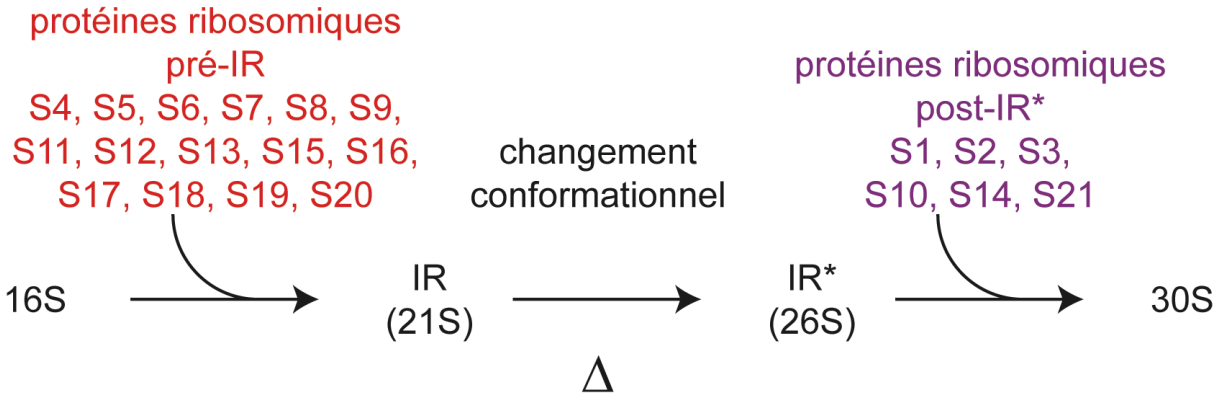


Figure 12 : Modèle proposé pour l'assemblage *in vitro* des protéines de la petite sous-unité ribosomique bactérienne. Les intermédiaires de reconstitution IR et IR* sont des conformères : ils possèdent le même contenu en protéines ribosomiques, mais des coefficients de sédimentation différents. Δ : source de chaleur (40°C). Le même type de schéma a pu être défini pour la grande sous-unité ribosomique.

Des travaux plus récents, utilisant une technique de marquage et chasse avec des isotopes stables de l'azote, suivie de spectrométrie de masse quantitative (PC/QMS), conduisent à revoir ce modèle (Talkington et al., 2005). Il y aurait, non pas un changement de conformation majeur et limitant, mais un continuum de transitions conformationnelles, conduisant à l'assemblage de la sous-unité 30S mature à partir de ses constituants libres.

Cependant, l'ordre d'assemblage des constituants tel qu'il a été décrit par Nomura reste d'actualité (Figure 13).

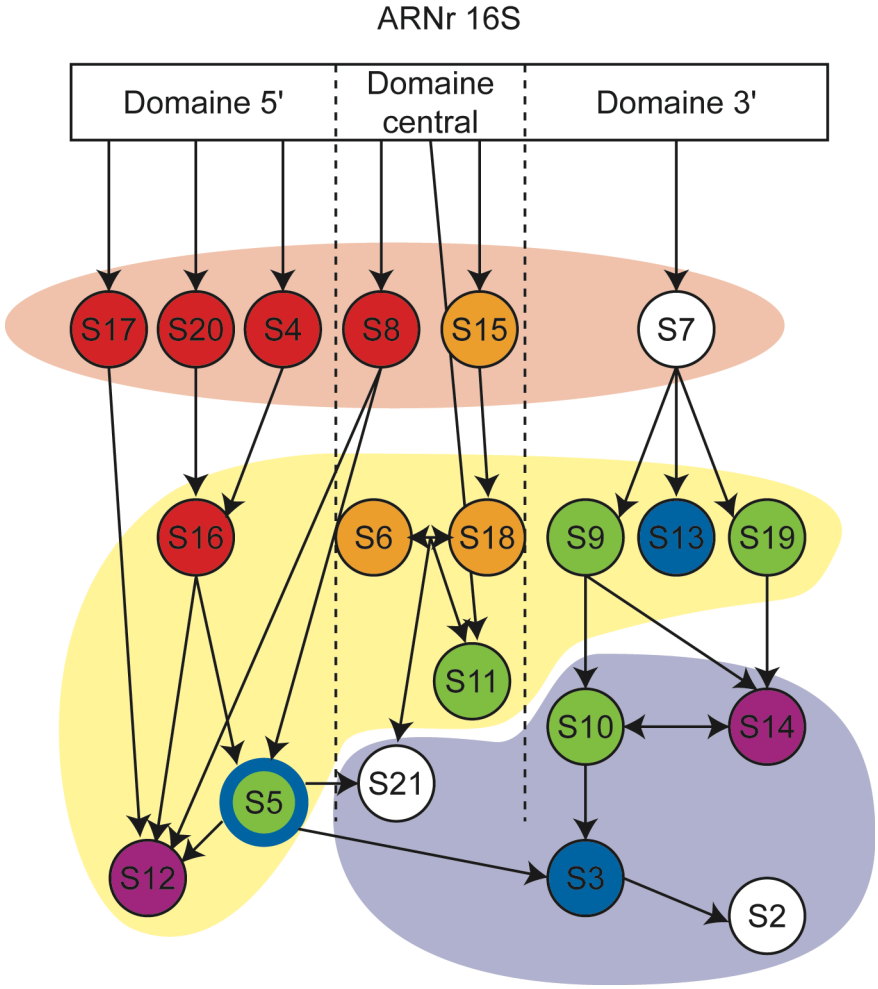


Figure 13 : « Gradient d'assemblage » de la sous-unité 30S (Culver, 2003; Talkington et al., 2005). Cette carte illustre l'ordre d'assemblage des protéines de la petite sous-unité ribosomique (représentées par des disques) sur les différents domaines de l'ARN 16S mature (représenté par un rectangle). Les flèches indiquent les interactions entre constituants. Les ensembles rose, jaune et mauve contiennent respectivement les protéines dont l'assemblage est primaire, secondaire ou tertiaire (d'après les données obtenues lors d'expériences de reconstitution partielle de ribosomes *in vitro*). La couleur des disques représente la vitesse de liaison de chaque protéine à la particule, déterminée par PC/QMS : Rouge, 20 à > 30 min^{-1} ; Orange, 8,1 à 15 min^{-1} ; Vert, 1,2 à 2,2 min^{-1} ; Bleu, 0,38 à 0,73 min^{-1} ; Violet, 0,18 à 0,26 min^{-1}. On remarquera que les deux types de données sont relativement en accord.

1.1.3. L'assemblage des ribosomes bactériens est-il spontané ?

1.1.3.1. Les expériences de Nomura : « Il suffit de chauffer… »

Les constituants des ribosomes bactériens (ARNr matures de synthèse et protéines ribosomiques) peuvent être auto-assemblés *in vitro*, en présence d'une source de chaleur, pour former des ribosomes fonctionnels (Traub et Nomura, 1969). Cependant, en comparaison à la vitesse de fabrication des ribosomes dans la cellule, le processus d'assemblage *in vitro* est relativement lent ; par ailleurs, la température pour laquelle l'assemblage est obtenu est bien supérieure aux conditions physiologiques de croissance de populations bactériennes.

L'une des hypothèses permettant d'expliquer les conditions requises pour cet assemblage *in vitro* est que les constituants sont tous pré-synthétisés séparément, ce qui gênerait leur assemblage spontané ; en revanche, dans les conditions physiologiques, la transcription, les maturations, les repliements des ARNr et l'assemblage des protéines ribosomiques ont lieu de façon concomitante.

Une autre explication est que la fabrication des ribosomes bactériens *in vivo* implique l'intervention d'un certain nombre de facteurs, qui assistent les repliements des ARNr et l'association séquentielle des protéines ribosomiques à la structure.

1.1.3.2. La vision actuelle : « C'est en définitive plus complexe ! »

Les facteurs participant *in vivo* à l'assemblage de ribosomes fonctionnels sont progressivement caractérisés, chez *E. coli* et dans d'autres espèces bactériennes. Parmi eux, on trouve un certain nombre de chaperones de protéines. Elles pourraient favoriser le positionnement correct des protéines ribosomiques sur la particule à une température compatible avec la vie, et plus rapidement que ne le permet l'assemblage *in vitro* sous l'effet de la chaleur (El Hage et al., 2001). Dans le même ordre d'idées, plusieurs hélicases d'ARN à boîte DEAD et chaperones d'ARN participent à l'assemblage, favorisant l'acquisition par les ARNr de leur structure secondaire (Bylund et al., 1998; Charollais et al., 2004; Charollais et al., 2003). D'autres études ont montré que l'activité de GTPases semblait déterminante dans le contrôle de certaines étapes de l'assemblage (Matsuo et al., 2006; Sato et al., 2005; Sharma et al., 2005).

Un panorama des facteurs « pré-ribosomiques » caractérisés chez *E. coli* ou *B. subtilis* est présenté dans la Table 1. À titre de comparaison, les protéines de *S. cerevisiae* ayant une annotation similaire ont été listées. On remarquera le nombre considérable de ces facteurs chez les Eucaryotes par opposition aux Procaryotes.

La plupart des facteurs assistant l'assemblage des ribosomes bactériens identifiés à ce jour ne sont pas essentiels *in vivo*. Il est probable que ces protéines facilitent le processus d'assemblage dans les conditions de croissance optimales, et prennent plus d'importance lorsque les conditions deviennent défavorables. Un argument en faveur de cette hypothèse est le phénotype cryosensible de souches invalidées pour les hélicases ou les chaperones d'ARN, ou à l'inverse, le phénotype thermosensible de mutants des chaperones de protéines (pour revue, El Hage et Tollervey, 2004).

Cependant, trois protéines essentielles participent à la maturation des pré-ribosomes procaryotes : ce sont les GTPases Era pour la petite sous-unité, ObgE et YlqF/RbgA pour la grande sous-unité (Inoue et al., 2003; Morimoto et al., 2002; Sato et al., 2005; Uicker et al., 2006). Ces trois facteurs jouent un rôle déterminant dans l'acquisition de la structure et de la fonction des ribosomes matures, et il est surprenant que l'on puisse s'affranchir de leur présence lors d'expérience d'assemblage de sous-unités *in vitro*.

E. coli / B. subtilis		*S. cerevisiae*	
Hélicases 30S		Hélicases 40S putatives	Dbp1 Dbp4/Hca1 Dbp8 Dhr1 Dhr2 Fal1 Has1 Prp43 Rok1 Rrp3
Hélicases 50S	DbpA CsdA SrmB	Hélicases 60S putatives	Dbp3 Dbp6 Dbp7 Dbp9 Dbp10 Drs1 Has1 Mak5 Mtr4/Dob1 Prp43 Spb4 Rrb1
GTPases 30S	Era	GTPases 40S	Bms1
GTPases 50S	ObgE EngA YlqF/RbgA	GTPases 60S putatives	Nog1 Nug1 Nog2/Nug2 Lsg1/Kre35 Efl1/Ria1
		AAA-ATPases 60S	Rea1/Mdn1 Rix7
Chaperones de protéines (ou chaperonines)	DnaK GroEL		
Chaperones d'ARN 30S	RbfA RimM	Chaperones d'ARN	Complexe Lsm2-8

Table 1 : Comparaison des facteurs impliqués en *trans* dans l'assemblage des sous-unités ribosomiques chez *E. coli* et *S. cerevisiae* (d'après El Hage et Tollervey, 2004). Les facteurs ont été classés par famille de protéine, et en fonction de leur implication dans l'assemblage de la grande ou la petite sous-unité ribosomique. Noter qu'un certain nombre des fonctions spécifiées sont encore hypothétiques. Chez les Eucaryotes, en dehors de ces quelques familles, de nombreux autres facteurs interviennent, non répertoriés ici.

1.2. Comparaison structurale des ribosomes eucaryotes et procaryotes

Les ribosomes procaryotes sont régulièrement assimilés à des ribozymes. La structure est principalement définie par les repliements de l'ARNr, où viennent s'enchâsser les protéines ribosomiques, telles des épingles maintenant la structure d'un chignon (Figure 14 A, B et C ; voir aussi Figure 3). Les ARNr forment 60% de la masse du ribosome, contre 40% pour les protéines ribosomiques.

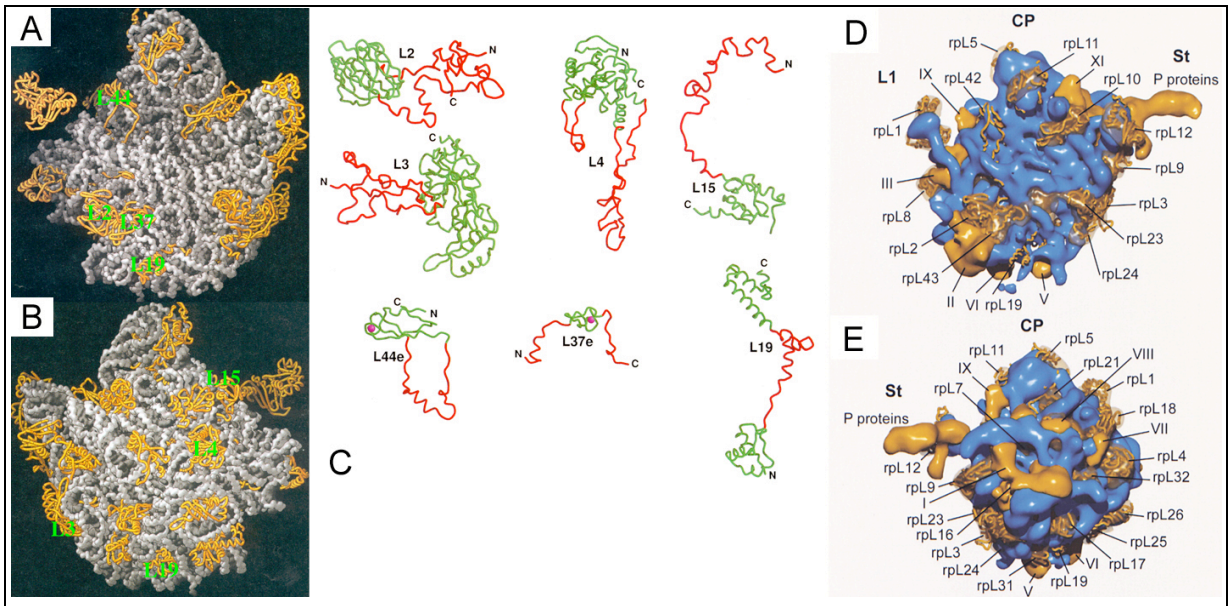


Figure 14 : Structure des grandes sous-unités ribosomiques procaryote et eucaryotes et de certaines protéines ribosomiques. (A-B) Faces interne (en haut) et externe (en bas) de la sous-unité 50S. L'ARN est coloré en gris, les protéines ribosomiques en orange. On notera que le site catalytique est principalement constitué d'ARN. (C) Structure de quelques protéines ribosomiques de la grande sous-unité. Les zones colorées en rouge sont internes au ribosome, et participent probablement au maintien de la structure tertiaire. (D-E) Faces interne (en haut) et externe (en bas) de la sous-unité 60S. L'ARN est coloré en bleu, les protéines ribosomiques en orange. Toutefois cette structure, déduite d'après la structure bactérienne, ne rend pas compte d'un certain nombre de protéines ribosomiques exclusivement eucaryotes, ni de certaines portions protéiques peu conservées. La proportion de protéines dans la structure réelle devrait donc être plus importante.

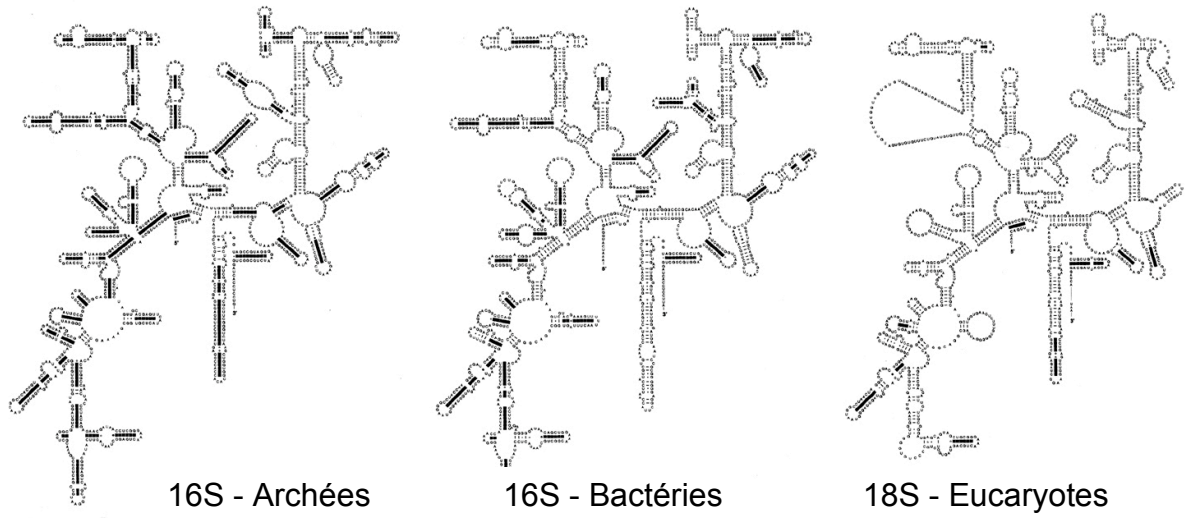


Figure 15 : Carte de repliement des ARN ribosomiques 16S et 18S dans les différents règnes du vivant (d'après Konings et Gutell, 1995). Les régions surlignées en noir correspondent aux structures secondaires correctement prédites par le programme de modélisation Mfold.

En utilisant un logiciel de modélisation des repliements de l'ARN par minimisation d'énergie (comme Mfold), il est possible de prédire environ 80% des structures des ARNr procaryotes, en tenant compte uniquement de la séquence en ribonucléotides (Konings et Gutell, 1995 ; Figure 15). Chez les Eucaryotes en revanche, les informations de séquence ne permettent de prédire qu'environ 10 à 20% des repliements. Ceci reflète le fait que la structure finale du ribosome eucaryote dépend pour une bien plus grande part de la fraction protéique du complexe.

Bien que le site catalytique soit aussi largement occupé par l'ARN chez les Eucaryotes, la proportion de protéines participant au reste de la structure est nettement plus grande que chez les Procaryotes (Figure 14 D et E ; voir aussi Figure 3). Il est généralement admis que cette modification des proportions des constituants des ribosomes va dans le sens d'un perfectionnement de la machinerie traductionnelle au cours de l'évolution. Ainsi, les ribosomes Eucaryotes sont-ils plus processifs et plus fidèles, ce qui assure la synthèse correcte de protéines de plus grande taille, en évitant la formation de produits aberrants dont l'accumulation pourrait être dommageable pour les cellules, et dont l'élimination constituerait une perte énergétique considérable.

Cependant, cette évolution vers des ribosomes plus performants se traduit par un coût énergétique non négligeable pour la cellule : celui de la biogenèse des ribosomes. En effet, alors que l'assemblage des ribosomes procaryotes paraît relativement simple, celui des ribosomes eucaryotes nécessite l'intervention de nombreux facteurs agissant en *trans* afin d'assurer la production de la grande et la petite sous-unité ribosomique. Ces facteurs, appelés facteurs pré-ribosomiques, sont susceptibles d'intervenir dans les clivages, modifications et repliement des ARNr, mais aussi dans le positionnement des protéines ribosomiques, ou dans le contrôle qualité des précurseurs de ribosomes à différents stades de la biogenèse. Chez la levure, environ 170 de ces protéines ont été mises en évidence, ainsi que près de 80 snoARN participant aux maturations post-transcriptionnelles des ARNr. À la différence des facteurs pré-ribosomiques bactériens, la plupart des facteurs pré-ribosomiques sont essentiels ; une conséquence directe est qu'aucun système de reconstitution *in vitro* de ribosomes eucaryotes n'a pu être mis au point.

1.3. Compartimentation et nécessité d'export des pré-ribosomes chez les Eucaryotes

Contrairement aux Procaryotes, chez qui les ribosomes sont directement assemblés à partir de leurs constituants sur leur site d'utilisation, dans le cytosol, les Eucaryotes doivent résoudre le problème de la compartimentation. Cette compartimentation a nécessité l'apparition de mécanismes spécifiques d'import nucléaires des constituants ribosomiques, et d'export des particules vers le cytoplasme, ainsi que de systèmes de contrôle de l'avancement de la biogenèse entre deux compartiments. Ceci vient augmenter considérablement la complexité de la voie de biogenèse. En contrepartie, il est possible que cette séparation physique des différentes étapes de la biogenèse, et surtout des particules précurseurs et matures, permette la fabrication de ribosomes plus performants que ceux produits dans le seul compartiment cytoplasmique.

Les précurseurs d'ARNr sont transcrits dans un sous-compartiment du noyau, le nucléole. Pour que l'assemblage des sous-unités ribosomiques ait lieu, les protéines ribosomiques, ainsi que les facteurs pré-ribosomiques, synthétisés dans le cytoplasme, doivent dans un premier temps être importés vers le noyau. Dans un second temps, une fois les sous-unités ribosomiques assemblées, elles doivent être exportées vers leurs sites d'utilisation, dans le cytoplasme.

Ces deux processus requièrent le recrutement de machineries de transport nucléo-cytoplasmique spécialisées. Deux karyophérines au moins semblent assez spécifiquement dédiées à l'import des protéines ribosomiques (Kap123 principalement) (Kap123 principalement Rout et al., 1997) et des facteurs pré-ribosomiques (Kap121 principalement) (Kap121 principalement Leslie et al., 2004). Les cargos pris en charge possèdent en général un signal de localisation nucléaire (NLS), ou peuvent être co-transportés grâce à leur interaction avec un autre cargo possédant ce type de séquence.

L'export des précurseurs des grande et petite sous-unités vers le cytoplasme met en jeu une voie spécifique impliquant l'exportine Crm1/Xpo1, et dépendant de la petite protéine G Ran (pour revue, Johnson et al., 2002). Les précurseurs des deux sous-unités sont exportés séparément ; le mécanisme est mieux décrit pour la grande sous-unité ribosomique : la protéine Nmd3 sert d'adaptateur entre la particule pré-60S et l'exportine, en fournissant le signal d'export nucléaire (NES) (Gadal et al., 2001b; Ho et al., 2000). À titre de comparaison avec les Procaryotes, il est intéressant de noter que Nmd3 possède un homologue chez les Archées. Cependant, la version procaryote de la protéine ne contient ni NLS, ni NES ; sa fonction est encore inconnue.

Comme l'illustre la Figure 16, les dimensions des sous-unités ribosomiques sont du même ordre de grandeur que celles du pore nucléaire ; ces cargos atteignent probablement la taille limite des particules susceptibles d'être transportées du noyau vers le cytoplasme.

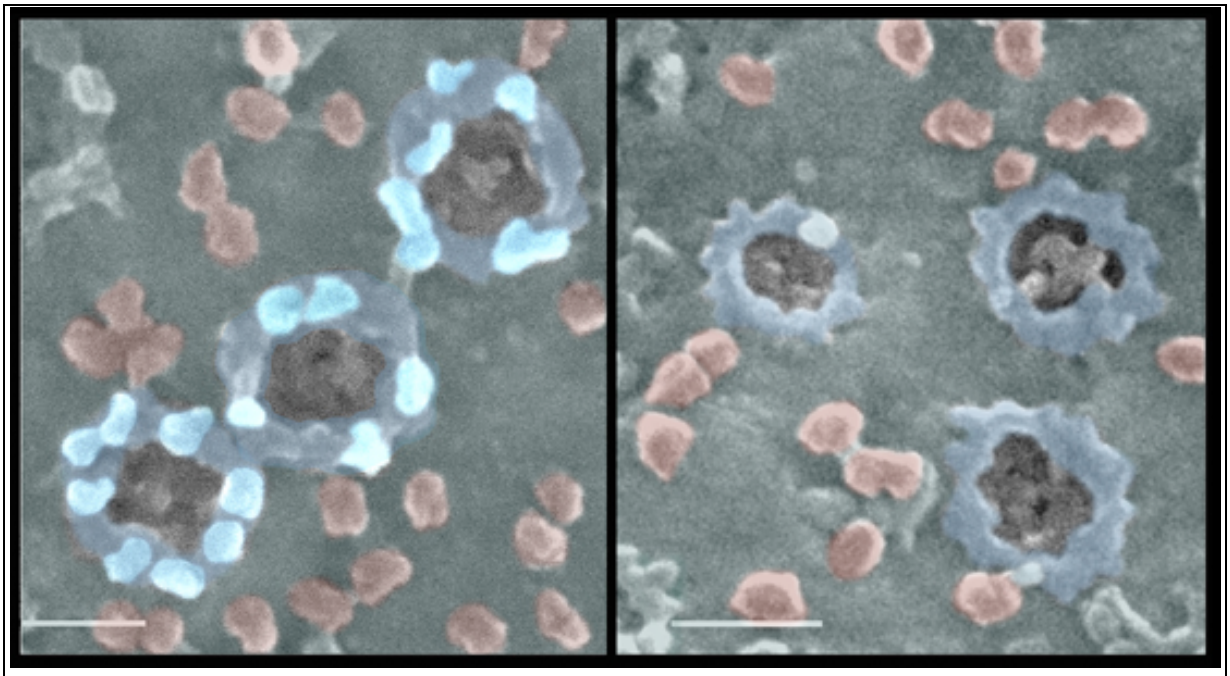


Figure 16 : Clichés de pores nucléaires en microscopie électronique à balayage. (Walther et al., 2002). Vue de la face cytoplasmique de l'enveloppe nucléaire. Les protéines du pore sont colorées en bleu, les ribosomes en rose. À gauche, pores normaux ; à droite, pores dépourvus de filaments cytoplasmiques d'une souche mutante pour RanBP2/Nup358. Les segments blancs correspondent à une taille de 100 nm.

Le passage des pré-ribosomes au travers des pores nucléaires est étroitement contrôlé ; seules des particules à un stade précis de leur maturation peuvent être transportées vers le cytoplasme. En effet, de nombreux mutants affectant la biogenèse des ribosomes à des étapes nucléaires conduisent à des défauts d'export de particules pré-ribosomiques (à titre d'exemple, voir Bassler et al., 2001; Saveanu et al., 2001; Saveanu et al., 2003). Par ailleurs, la répartition des charges à la surface des sous-unités ribosomiques constitue une entrave au

passage de ces complexes au travers de la lumière du pore ; il serait nécessaire de masquer ces charges avant l'export (Dlakic et Tollervey, 2004; Oeffinger et al., 2004).

2. Voie(s) de biogenèse des ribosomes eucaryotes

Dans les cellules eucaryotes, la biogenèse des ribosomes commence dans le nucléole, par la transcription des précurseurs d'ARN ribosomiques (Figure 17). À ces ARN, viennent s'associer deux types de protéines : d'une part, les protéines ribosomiques, qui participent à la structure des ribosomes, d'autre part les facteurs pré-ribosomiques, qui assistent la formation des sous-unités matures, mais ne se retrouvent pas dans l'architecture finale. L'ensemble forme le complexe 90S, qui se scinde au cours de la biogenèse en particules pré-60S et pré-40S, précurseurs de la grande et de la petite sous-unités respectivement. Chacune des particules suit un chemin de maturation distinct, passant par le nucléoplasme avant d'être exportée vers le cytoplasme. Au cours de ce cheminement interviennent une succession de clivages et de maturations des ARN ribosomiques, aboutissant à la formation des ARNr 18S, 25S, 5,8S et 5S.

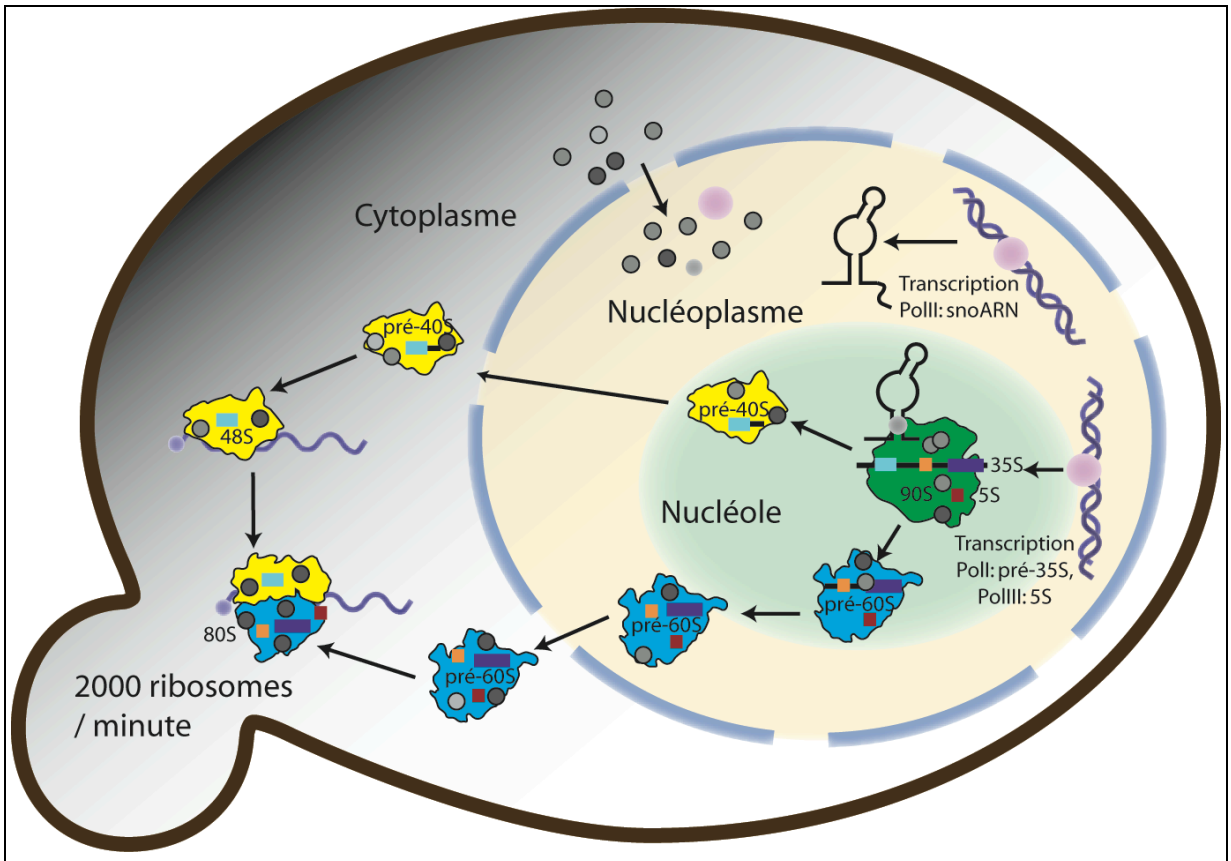


Figure 17 : Un aperçu de la biogenèse des ribosomes chez *S. cerevisiae*.

Divers types de facteurs participent à ces maturations : des endo- et exo-nucléases responsables des clivages des ARNr, des snoRNP impliquées dans des modifications de bases de l'ARN, des hélicases et des chaperones participant à l'évolution structurale des particules au cours de la maturation, etc. Un certain nombre de facteurs participent au contrôle des particules au cours de la biogenèse, ainsi qu'à leur transport. L'objet de cette partie est de décrire la voie de biogenèse des ribosomes eucaryotes dans son ensemble, ainsi que ses régulations en réponses à divers signaux intra- et extracellulaires. Les mécanismes de maturation des ARNr mis en jeu seront plus particulièrement évoqués. La partie suivante sera centrée sur la composition protéique des particules, et son évolution du nucléole au cytoplasme.

2.1. Organisation du nucléole

La majeure partie de la biogenèse des ribosomes eucaryotes a lieu dans un sous-compartiment du noyau appelé nucléole. En raison de sa taille et de sa densité particulière, cet organite a été observé très tôt par microscopie sur des cellules d'Eucaryotes supérieurs (Fontana, 1781) et Figure 18). Il fut plus précisément observé et nommé nucléole (*kernkörperchen*) dans le courant du XIXème siècle (Valentin, 1839). À cette époque, bien que sa fonction soit encore inconnue, le nombre de nucléoles visibles dans une cellule est mis en corrélation avec l'activité cellulaire (Freud, 1881). Avant le début du XXème siècle, Montgomery répertorie l'ensemble des travaux de cytologie dans un volumineux traité dédié à cet organite (Montgomery, 1898).

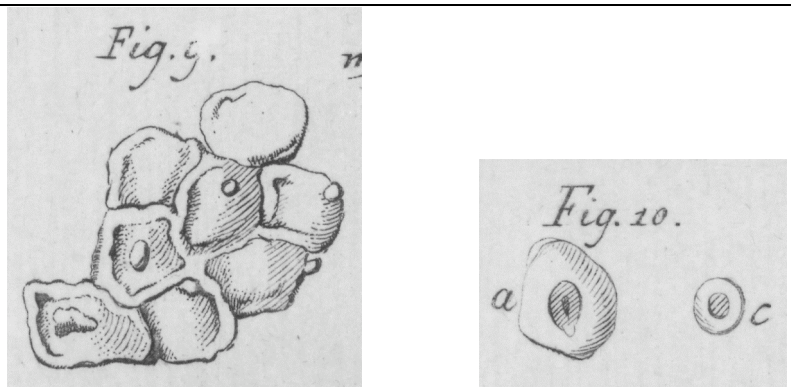


Figure 18 : Premières représentations du nucléole dans la littérature biologique (Fontana, 1781). *« La vésicule a de la Fig. 10., représente l'une des vésicules de la Fig. 9. dans laquelle on observe un corps oviforme ayant une tache dans son milieu. À côté est un globule c du sang, à fin qu'on puisse confronter leurs grosseurs relatives »*. La *Fig. 9.* représente des cellules animales au sein desquelles Fontana observe une structure ovïde, le noyau. Au sein de ce noyau, il décrit une tâche, représentée *Fig. 10. a.* D'après Montgomery, il s'agit du nucléole.

Dans les années 30, Barbara McClintock montre que le nucléole s'organise autour de loci chromosomiques, les NORs (*Nucleolus Organizer Region*) (McClintock, 1934). Ces loci correspondent aux régions d'ADN ribosomique (ADNr) permettant la transcription des ARNr. Le nombre de nucléoles dans une cellule est ainsi toujours inférieur ou égal au nombre de régions d'ADNr dans le génome. Chez la levure, les ADNr sont portés par le chromosome XII ; il n'y a donc qu'un nucléole. Chez l'homme, cinq chromosomes (13, 14, 15, 21 et 22) portent des régions codant les gènes d'ARNr ; on pourrait donc observer jusqu'à 10 nucléoles dans les cellules diploïdes. En pratique, les nucléoles fusionnent, et l'on observe en général une à 6 de ces structures par cellule.

Chez la levure, le nucléole forme un croissant accolé à l'enveloppe nucléaire. Il occupe, selon l'activité cellulaire, entre le tiers et la moitié du volume nucléaire. Une très faible proportion de l'ADN génomique pénètre dans cette portion du noyau, qui n'est donc pas marquée par les colorants de la chromatine ou les fluorophores s'intercalant entre les bases de l'ADN (DAPI, Hoechst). Le nucléole peut être observé par immunocytochimie en détectant des protéines nucléolaire telles que Nop1, ou par microscopie électronique. Cependant, les techniques de microscopie électronique chez la levure se sont longtemps heurtées à l'épaisseur de la paroi et à la petite taille des cellules, qui gênaient la préservation des structures à la fixation, ainsi que l'observation. Des techniques plus récentes de cryofixation montrent toutefois que l'architecture nucléolaire est relativement similaire à celle des cellules d'Eucaryotes supérieurs (Figure 19B-C). Chez ces derniers, les nucléoles sont des structures ovoïdes, au sein desquelles on peut distinguer, par microscopie électronique à

transmission, trois composants : le centre fibrillaire, le composant fibrillaire dense et le composant granulaire (Figure 19A).

2.1.1. Le centre fibrillaire

Il s'agit d'une zone arrondie du nucléole relativement peu dense aux électrons, située au centre dans les cellules quiescentes, plus en périphérie et moins régulière dans les cellules les plus actives. Cette zone contient les régions promotrices des gènes d'ADNr ; elle est le site de l'initiation de la transcription des ARNr.

2.1.2. Le composant fibrillaire dense

Cette zone plus dense du nucléole est adjacente au centre fibrillaire. Limitée à une faible proportion du nucléole dans les cellules quiescentes, elle prend de l'importance dans les cellules en phase de prolifération, et forme alors des filaments appelés nucléonèmes. Dans ce compartiment a lieu l'élongation de la transcription, ainsi que le début de la maturation des ARNr et de l'assemblage des particules pré-ribosomiques.

2.1.3. Le composant granulaire

Cette partie du nucléole, située en périphérie et en général proche de l'enveloppe nucléaire, apparaît très granuleuse sur les clichés de microscopie électronique. Visible principalement dans les cellules quiescentes, elle sert de lieu de stockage à des sous-unités pré-ribosomiques dont la maturation est provisoirement interrompue.

Lorsque les cellules sont activées, la maturation de ces pré-ribosomes reprend. Ils sont alors exportés vers le cytoplasme, ce qui permet une mobilisation rapide de nouveaux ribosomes pour assurer les synthèses protéiques cellulaires.

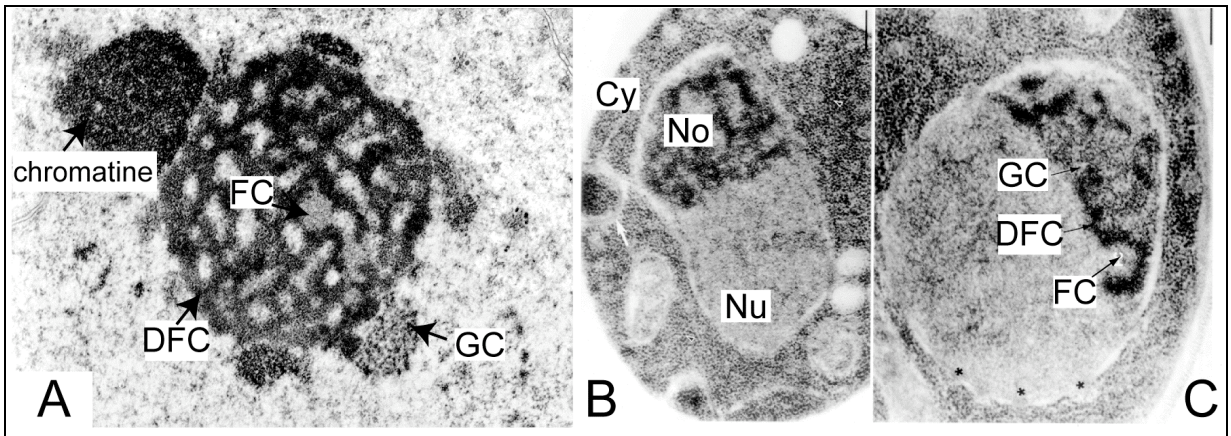


Figure 19 : Ultrastructure de nucléoles observés en microscopie électronique à transmission. FC, centre fibrillaire ; DFC, composant fibrillaire dense ; GC, composant granulaire ; Cy, cytoplasme, Nu, nucléoplasme ; No, Nucléole. (A) Nucléole d'une cellule de Mammifère (d'après Spacek, 2000). (B-C) Nucléoles de levures (d'après Leger-Silvestre et al., 1999). Les astérisques indiquent la position de pores nucléaires.

Ces trois structures s'auto-assemblent autour des NORs. La transcription des ARNr est nécessaire et suffisante pour que les composants des nucléoles s'assemblent ; en présence d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, les nucléoles se désorganisent. Des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) et de FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) ont montré que la plupart des constituants du nucléole se déplace dans l'ensemble du noyau par diffusion (Phair et Misteli, 2000). Le regroupement apparent de ces constituants dans la zone nucléolaire à l'état stationnaire résulte de leur rétention plus longue dans ce compartiment, en raison des interactions spécifiques protéine-protéine ou protéine-ARN qu'ils y établissent. En effet, le temps de résidence moyen de ces

facteurs dans le nucléole, de l'ordre de dix secondes en conditions normales, diminue nettement si la transcription est inhibée (Chen et Huang, 2001). Ainsi, l'ensemble de la structure nucléolaire s'organise autour de la transcription des ARNr et de leurs maturations ultérieures.

Dernièrement, plusieurs travaux de protéomique ont conduit à l'identification quasi-exhaustive des constituants du nucléole humain (Andersen et al., 2002; Coute et al., 2006; Scherl et al., 2002). Plus de 700 protéines différentes ont ainsi été mises en évidence. Parmi elles, un grand nombre sont des protéines ribosomiques, ou des facteurs participant à la biogenèse des ribosomes connus ou nouvellement décrits. Toutefois, certains facteurs contribuent à d'autres rôles du nucléole comme le transport et la modification des ARN, la régulation du cycle cellulaire ou le vieillissement cellulaire.

2.2. La transcription des ARNr et ses régulations

Chez la levure comme chez les Eucaryotes supérieurs, les ARNr sont transcrits à partir de séquences d'ADNr. Ces séquences sont répétées plusieurs centaines de fois en tandem, soit sous forme de répétitions directes, soit sous forme de répétitions inversées. Dans ce paragraphe, nous détaillerons les mécanismes de transcription et de régulations tels qu'ils sont décrits chez *S. cerevisiae*.

Une unité d'ARNr comprend le gène de l'ARN 35S (précurseur qui donnera naissance aux ARNr 18S, 25S et 5,8S) et celui de l'ARN 5S, et couvre une distance totale d'environ 9,1 kb chez la levure. L'organisation de ces gènes est détaillée sur la Figure 20.

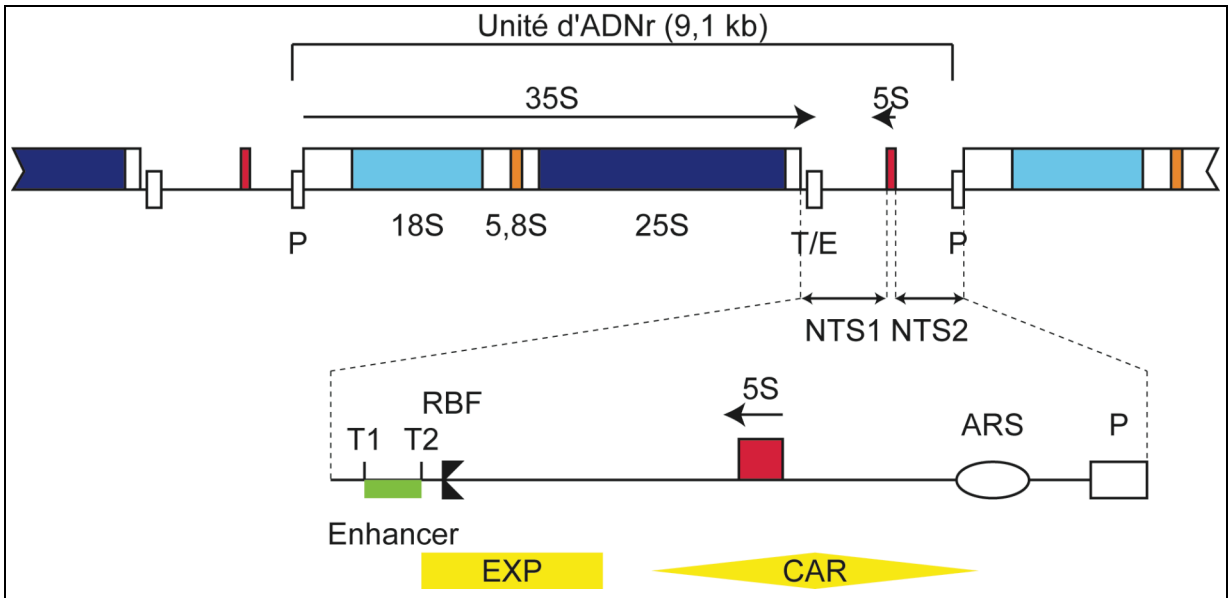


Figure 20 : Organisation des gènes d'ARNr chez *S. cerevisiae*. Une unité d'ADNr comprend les régions codantes pour le précurseur 35S et l'ARNr 5S, orientées « tête-bêche », ainsi que deux régions non transcrites (*Non Transcribed Spacers*) NTS1 et NTS2. NTS2 contient la séquence promotrice pour la transcription du 35S (P), ainsi qu'un site d'initiation de la réplication (ARS). NTS1 contient les sites T1 et T2 de terminaison de la transcription du 35S, une séquence *enhancer* (en vert), ainsi qu'un site de blocage de la fourche de réplication (RBF) représenté par deux triangles noirs. EXP et CAR (en jaune) sont, respectivement, la séquence nécessaire à l'expansion *FOB1*-dépendante des répétitions d'ADNr, et la région associée aux cohésines (*Cohesin Associated Region*), impliquée dans la « mise en silence » de ce locus.

La fréquence de l'initiation de la transcription de ces gènes est bien plus élevée que pour les gènes de protéines (on compte environ une ARN polymérase tous les 100 nucléotides). Cette situation a permis de visualiser très tôt les ARN naissants, attachés à l'ADN par l'ARN polymérase, par microscopie électronique. Les clichés obtenus montrent des structures caractéristiques en « arbre de Noël » (Figure 21). Le tronc correspond à l'ADN, les branches aux ARNr en cours d'élongation. Au bout de certaines branches, on peut distinguer des boules ; ce sont les particules pré-ribosomiques en cours d'assemblage, au sein desquelles l'ARNr est associé aux protéines ribosomiques les plus précoces, aux snoRNPs et aux premiers facteurs pré-ribosomiques. Le sommet de l'arbre correspond au site d'initiation de la transcription.

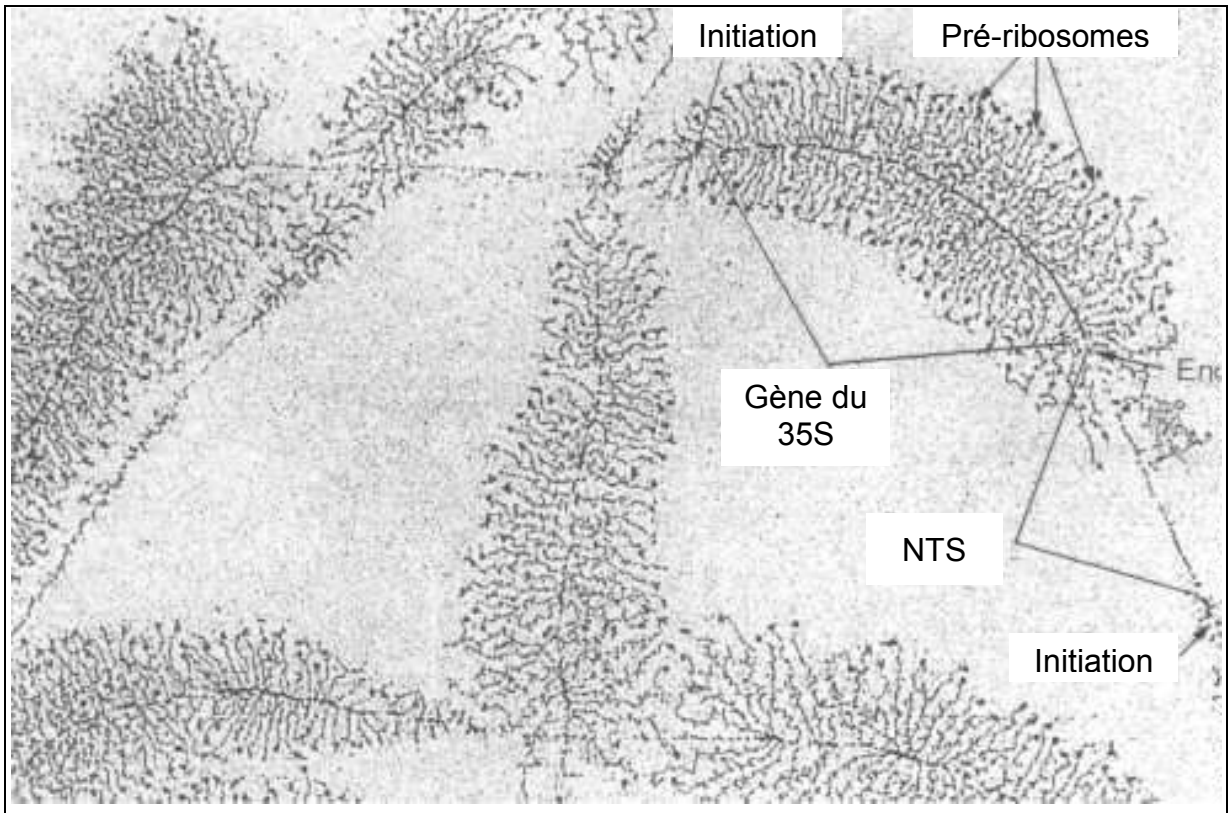


Figure 21 : Cliché de microscopie électronique à transmission d'ADN ribosomique en cours de transcription (d'après Bloom et Fawcett, 1994). On remarquera la forme caractéristique dite en « arbre de Noël », ou en « plume » que prennent ces loci. Le sommet de l'arbre correspond au site d'initiation de la transcription, les branches sont les transcrits primaires d'ARNr, dont la maturation commence.

2.2.1. Mécanismes de transcription des ARNr

Le précurseur d'ARNr 35S et l'ARNr 5S sont transcrits de façon indépendante, par les ARN polymérases I et III respectivement.

2.2.1.1. Transcription du précurseur 35S

Chez *S. cerevisiae*, la seule fonction de l'ARN polymérase I (Pol I) est la transcription du précurseur 35S. La région 5' du gène, représentée Figure 22, comprend une séquence promotrice principale CE (*Core Element*) reconnue par Pol I, en amont de laquelle est situé un élément régulateur appelé UE (*Upstream Element*), reconnu par le complexe d'activation UAF (*Upstream Activating Factor*). En aval de ces séquences, on trouve la séquence transcrite. En 3' du gène, des régions non transcrites contiennent les terminateurs de transcription, ainsi que des séquences *enhancers* activant à distance l'expression du régulon (Figure 20).

Un niveau de base de transcription des gènes du 35S peut être obtenu *in vitro* à partir de matrices d'ADNr contenant uniquement la séquence CE, et pour facteurs protéiques Pol I, un complexe appelé facteur core (CF) et Rrn3. Cependant, la transcription est nettement stimulée par le facteur UAF et TBP (*TATA-box Binding Protein*).

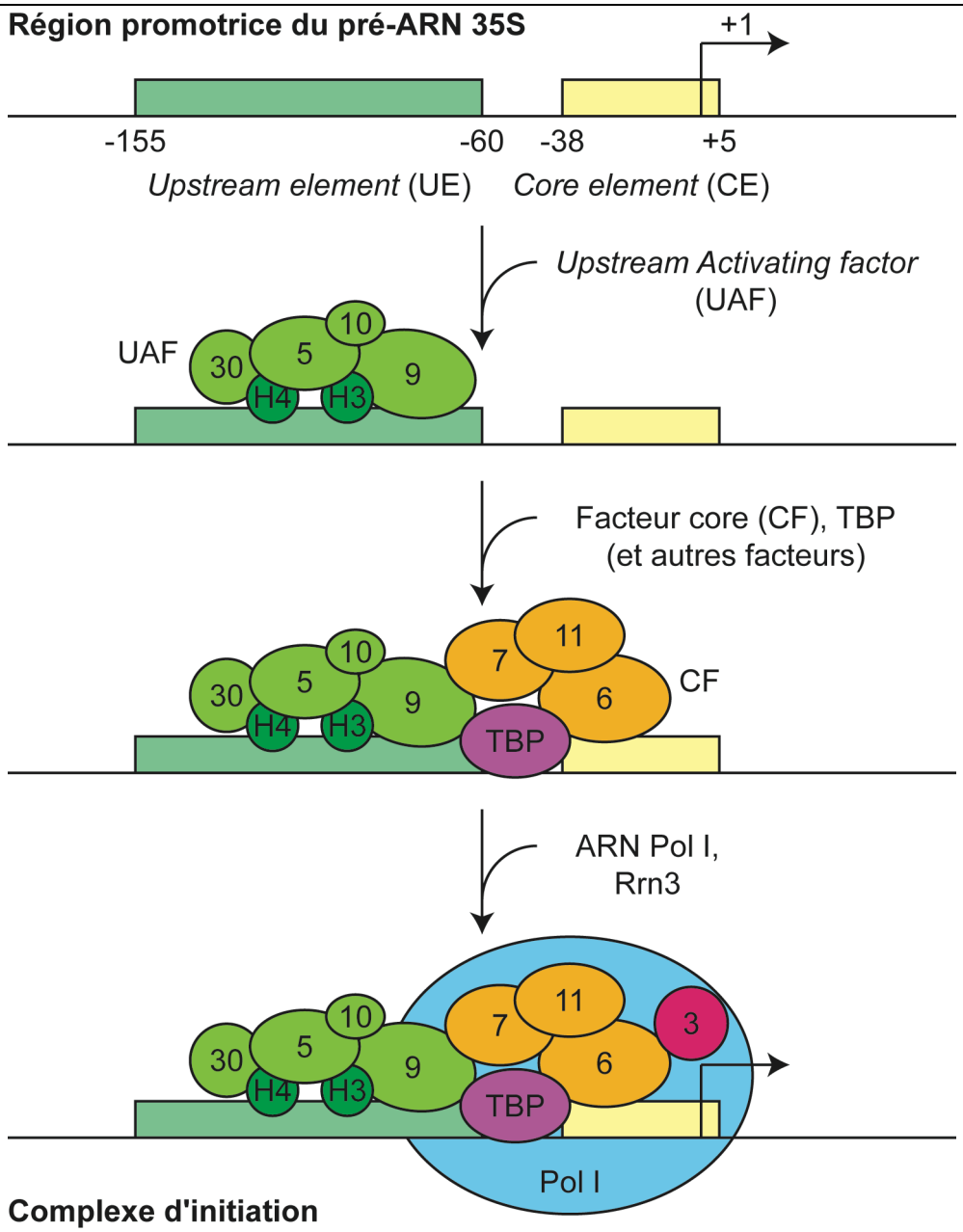


Figure 22 : Structure de la région promotrice du gène de l'ARN 35S et modèle d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase I (d'après Lodish et al., 2004). Les facteurs multimériques UAF (en vert) et CF (en orange) se lient respectivement aux séquences promotrices UE et CF ; ils interagissent entre eux ainsi qu'avec TBP. L'ensemble de ces facteurs permet le recrutement du facteur Rrn3 associé à Pol I, et la formation du complexe d'initiation. Les nombres 3, 5, 6, etc. représentent respectivement les protéines Rrn3, 5, 6, etc. participant à ces complexes ; 30 représente Uaf30 ; H3 et H4 sont des histones.

Le complexe UAF se lie à UE avec une haute affinité, indépendamment de la présence des autres facteurs (Figure 22). Il recrute alors CF sur la séquence CE, ainsi que TBP qui établit un contact entre les deux complexes. Pol I et Rnr3 viennent alors s'associer, pour

former un complexe d'initiation ; la polymérase est placée au site de démarrage de la transcription. La synthèse du 35S se poursuit jusqu'à l'un des deux sites de terminaison situés dans la région NTS1.

Au site de terminaison T1, l'ARN polymérase rencontre une séquence riche en T, suivie d'une séquence où est fixé le facteur de terminaison Reb1. L'ARN polymérase effectue alors une pause, puis elle est libérée, ainsi que le précurseur 35S.

2.2.1.2. Transcription de l'ARN 5S

Contrairement à l'ARN 35S, l'ARN 5S est transcrit par l'ARN polymérase III, dont l'activité est aussi impliquée dans la synthèse des ARNt et d'une panoplie de petits ARN, parmi lesquels le snRNA U6 et l'ARN de la SRP (*Signal Recognition Particle*).

À la différence des gènes dépendant des polymérases I et II, la région promotrice est située dans la séquence codante du gène (Figure 23). Pour l'ARN 5S, il s'agit d'une région de contrôle unique, appelée boîte C, reconnue par le facteur de transcription TFIIIA. Il recrute les facteurs de transcription multimériques TFIIIC et TFIIIB à la région promotrice, ce qui permet le positionnement de la polymérase au site d'initiation de la transcription, et le démarrage de la synthèse.

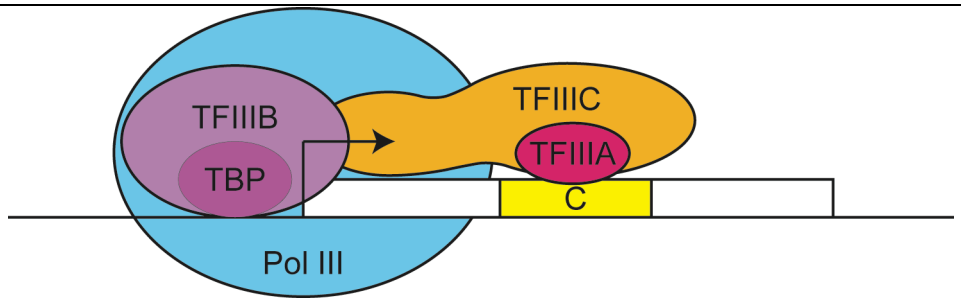


Figure 23 : Mécanismes d'initiation de la transcription de l'ARNr 5S par l'ARN polymérase III (d'après Lodish et al., 2004). Le facteur TFIIIA interagit spécifiquement avec le promoteur interne (boîte C, en jaune). Des interactions protéine-protéine spécifiques entre TFIIIC, TFIIIB et Pol III permettent le positionnement de la polymérase au site d'initiation de la transcription.

On pourra noter que les mécanismes de transcription par les ARN polymérases I et III nécessitent tout deux l'intervention de TBP, bien qu'aucune des régions promotrices ne contienne de boîte TATA. En ce qui concerne la transcription par l'ARN polymérase III, TBP fait partie du facteur TFIIIB, et interagit avec l'ADN de la région promotrice comme avec une boîte TATA.

2.2.2. Facteurs de régulation de la transcription

La quantité de transcrits produits à partir des régions d'ADNr ou des gènes de protéines ribosomiques peut-être régulée de plusieurs manières : (*i*) en modifiant le nombre d'unités d'ADNr, (*ii*) en activant ou réprimant l'ensemble de la région par modification de l'état de la chromatine, (*iii*) en réprimant l'activité de l'ARN polymérase ou (*iv*) en agissant sur l'efficacité de la transcription des gènes pris individuellement.

Le nombre d'unités d'ADNr est, chez la levure, d'environ 150. Il est susceptible de varier par un mécanisme d'expansion/contraction des répétitions, dépendant de la protéine Fob1. Parmi ces unités, toutes ne sont pas transcriptionnellement actives, même en phase de croissance exponentielle ; des expériences de pontage au psoralène ont montré qu'environ 50% des unités sont inactivées par un mécanisme de mise en silence chromatinienne (Dammann et al., 1993). À l'entrée en phase stationnaire, le nombre de copies d'ADNr à l'état actif diminue, voire l'ensemble des copies se trouve éteint. Ce mécanisme est dépendant

de l'histone déacétylase Rdp3 (Sandmeier et al., 2002). La liaison de la déacétylase Sir2 à la région CAR serait également impliquée dans la mise en silence chromatinienne des unités d'ADNr (Smith et Boeke, 1997).

L'activité transcriptionnelle peut également être inhibée par la déphosphorylation de Pol I chez la levure (Fath et al., 2001), ou de Rrn3 (Cavanaugh et al., 2002) chez les Mammifères, ce qui empêche la formation du complexe Pol I-Rrn3. Un certain nombre de signaux cellulaires convergent vers la répression de la polymérase, sans que les détails du mécanisme soient résolus à l'heure actuelle (Nomura, 1999; Reeder, 1999; Warner, 1999).

En ce qui concerne les protéines ribosomiques, le contrôle de la quantité de transcrits s'effectue plutôt par des activateurs ou des répresseurs transcriptionnels, modulant l'efficacité d'initiation par l'ARN polymérase II au niveau des séquences promotrices. Ainsi, les séquences d'activation amont (UAS – *Upstream activating sequence*) des gènes de protéines ribosomiques contiennent des sites de liaison aux activateurs transcriptionnels Rap1 et/ou Abf1. D'autres facteurs sont susceptibles d'intervenir, permettant l'intégration de différentes voies de signalisation cellulaire.

2.2.3. Coordination des régulations affectant la voie biogenèse des ribosomes

La synthèse des constituants ribosomiques (ARNr et protéines ribosomiques) est étroitement régulée en réponse à une variété de signaux extracellulaires (disponibilité en sources de carbone et d'azote, stress thermiques, oxydants et osmotiques, etc.) ou intracellulaires (phase du cycle, activité des voies de sécrétion, etc). Ceci permet d'adapter les quantités de ribosomes produits aux besoins cellulaires en matière de traduction (Warner, 1999). Des modes de contrôle efficace et rapides de cette voie métabolique très coûteuse en énergie sont nécessaires, afin en particulier d'éviter une fabrication inutile de ribosomes quand les conditions de croissance sont défavorables.

Chez les Eucaryotes, les régulations affectent directement les synthèses des ARNr d'une part, et des protéines ribosomiques d'autre part. À l'inverse, chez les Procaryotes, les contrôles s'exercent sur la synthèse de l'ARNr ; la régulation des quantités de protéines ribosomiques s'exerce *a posteriori*, par des mécanismes de rétrocontrôle.

À la différence du système procaryote, les régulations de l'expression des gènes de protéines ribosomiques s'exercent principalement au niveau transcriptionnel. Cependant, des mécanismes de contrôle fin au niveau post-transcriptionnel ont été décrits, comme le mécanisme de dégradation ciblée de l'ARNm de Rps28B (Badis et al., 2004) et de Rpl4 (Presutti et al., 1991), ou encore le contrôle de l'épissage des pré-ARNm de Rps14 et Rpl32 (Dabeva et al., 1986; Fewell et Woolford, 1999). Par ailleurs, les protéines ribosomiques produites en excès (et donc libres) sont instables et rapidement dégradées (pour revue, Nomura, 1999).

Les différentes voies de signalisation permettant la régulation transcriptionnelle des constituants des ribosomes sont encore assez obscures. Les données actuelles d'analyse du transcriptome montrent que tous ces gènes peuvent être classés en quelques régulons, en fonction de leur profil d'expression en réponse à des conditions de stress (Jorgensen et al., 2004). On distingue les gènes d'ARNr, le régulon RP contrôlant la synthèse des protéines ribosomiques, et le régulon Ribi contrôlant la synthèse des facteurs pré-ribosomiques. Une partie de ces données de transcriptome sont représentées Figure 24. À l'intérieur de chacun de ces régulons, plusieurs classes peuvent être distinguées, par exemple les facteurs impliqués plutôt dans la biogenèse de la grande ou de la petite sous-unité ribosomiques ont en général des profils dissemblables.

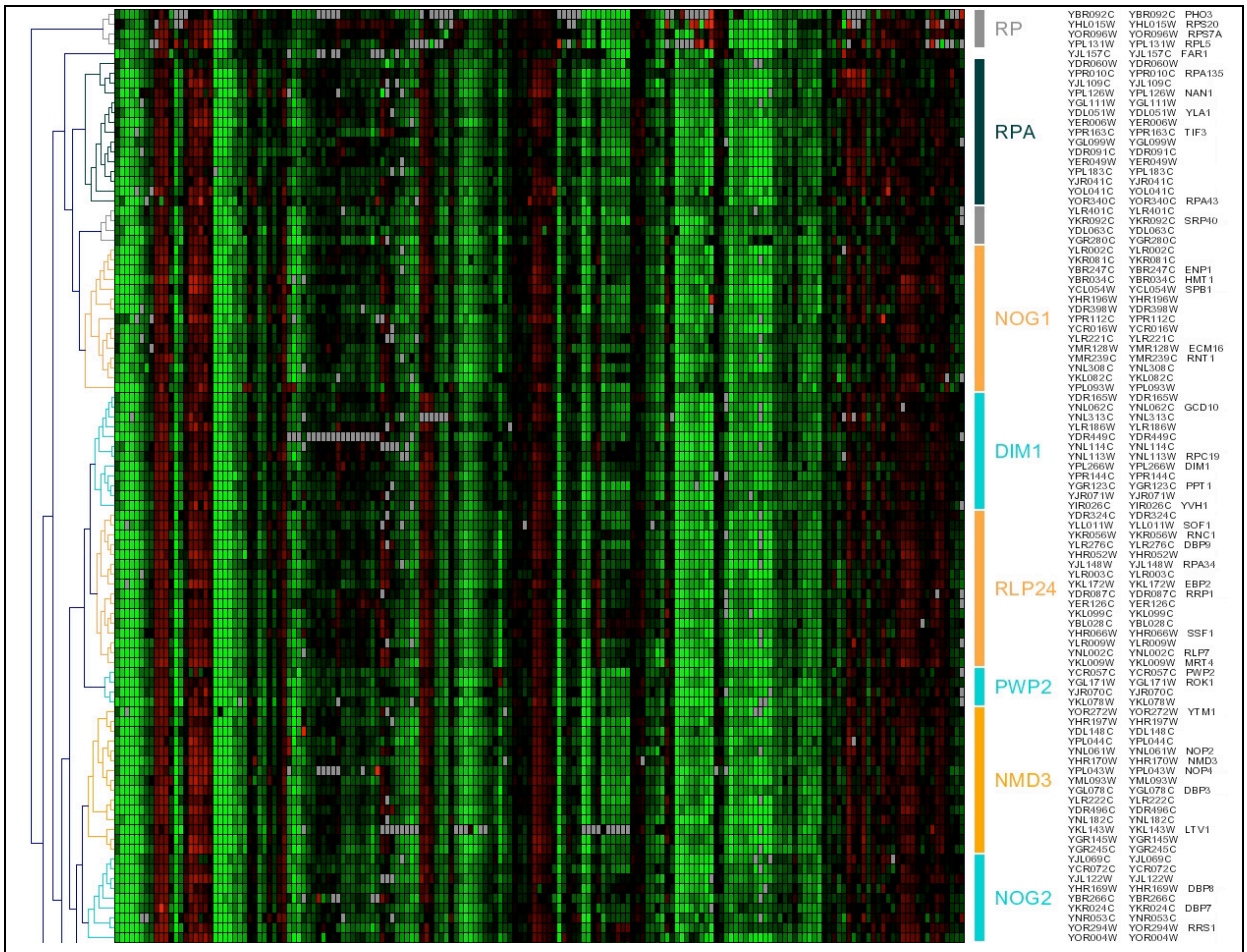


Figure 24 : Profils d'expression de certains gènes de *S. cerevisiae* en réponse aux stress. Les profils ont été regroupés en fonction de leur similarité grâce au logiciel Genesis. Ici, la plupart des facteurs sont impliqués dans la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique ; chaque sous-groupe de gène caractérisé par un type de profil a été nommé d'après un facteur particulier appartenant à ce sous-groupe. En haut, RP regroupe quelques gènes de protéines ribosomiques appartenant à un régulon distinct ; RPA regroupe les gènes codant les sous-unités de Pol I. Les gènes sans lien avec la traduction, non représentés ici, présentent un profil d'expression en réponse aux stress nettement distincts.

Chez *S. cerevisiae*, la voie TOR (*Target Of Rapamycin*) semble exercer un rôle non négligeable dans le contrôle transcriptionnel de la biogenèse des ribosomes (Powers et Walter, 1999). Cette voie implique une cascade de kinases et de phosphatases, parmi lesquelles les kinases TOR1, sensible à la rapamycine, et TOR2. Elle participe, non seulement au contrôle de la biogenèse des ribosomes, mais aussi à la régulation de l'activité de nombreuses voies du métabolisme central de la cellule, en réponse à la disponibilité en acides aminés principalement. Parmi les effets de la voie TOR, on compte la régulation de l'entrée en G_0, de l'initiation de la traduction et du métabolisme azoté (Crespo et Hall, 2002). Le mécanisme proposé pour la régulation de la transcription des gènes d'ARNr et de protéines ribosomiques par TOR est décrit Figure 25A.

D'autres travaux ont montré que la voie de signalisation dépendant de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) avait également un rôle dans le contrôle de ces régulons, et agissait de façon coordonnée avec TOR (Chen et Powers, 2006) ; le modèle actuellement proposé est représenté Figure 25B. Les deux voies convergeraient vers

l'activation de facteurs de transcription (Sch9 ou Sfp1/Fhl1/Ifh1/Rgm1), qui favoriseraient l'initiation de la transcription des gènes cibles (Figure 25C).

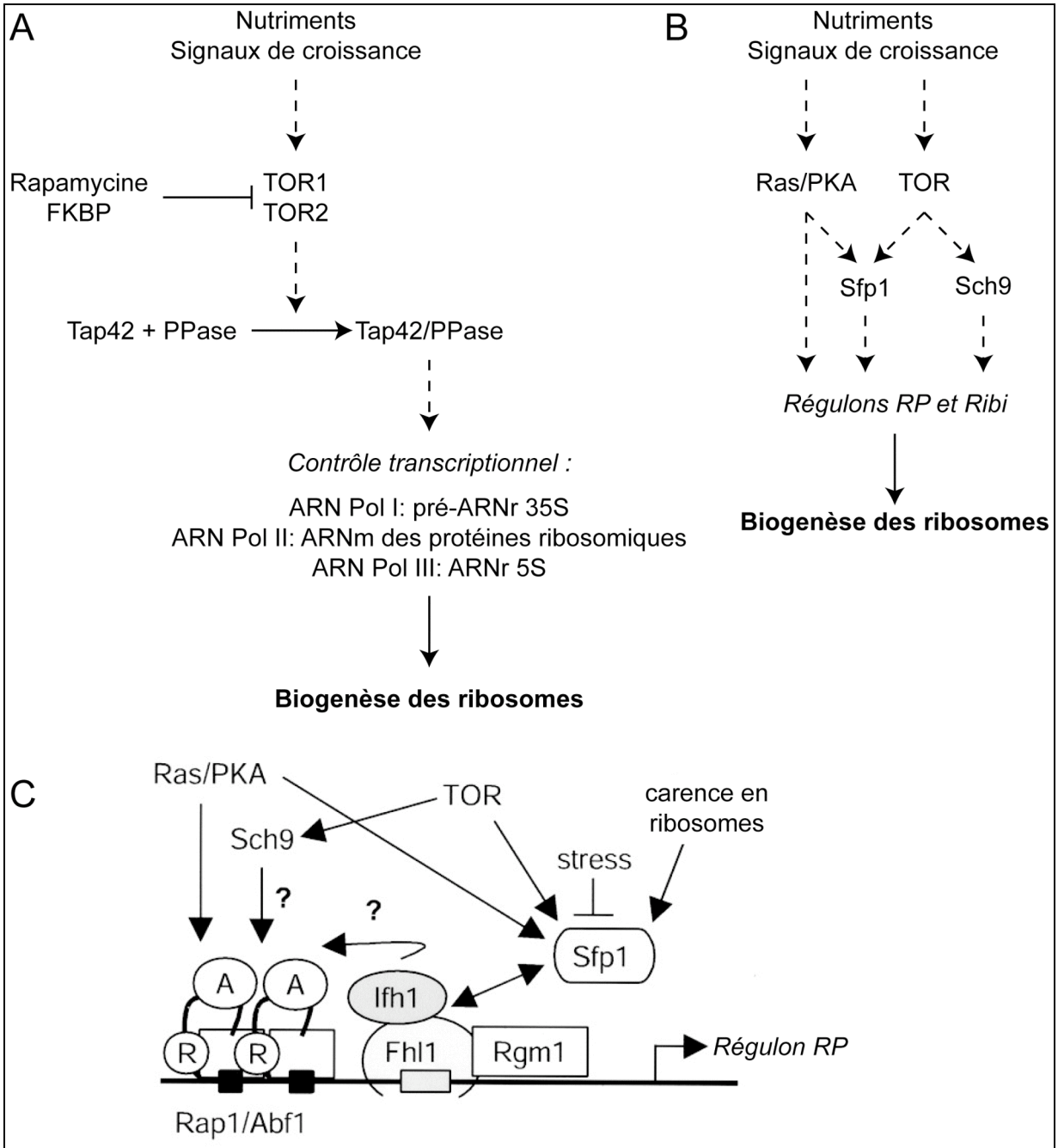


Figure 25 : Modèles pour la régulation de la transcription des gènes de la biogenèse des ribosomes en fonction des conditions de croissance cellulaire. (A) Mécanisme de contrôle transcriptionnel par la voie de signalisation TOR, tel qu'il était décrit en 1999 (d'après Powers et Walter, 1999). Les pointillés indiquent que les mécanismes moléculaires n'ont pas été élucidés. (B) Le mécanisme proposé actuellement repose sur une régulation coordonnée par deux voies : TOR et PKA (d'après Jorgensen et al., 2004). (C) L'ensemble de ces voies de signalisation converge vers un contrôle transcriptionnel impliquant soit Sch9, soit la protéine à doigts de zinc Sfp1, le facteur de transcription Fhl1 et ses régulateurs Crf1 et Ifh1 ; ces facteurs activeraient la transcription des gènes de protéines ribosomiques via Rap1 ou Abf1 (d'après Jorgensen et al., 2004).

Enfin, certaines régulations feraient intervenir la protéine kinase C (PKC). C'est le cas pour l'inhibition de la biogenèse des ribosomes observée lorsque les voies de sécrétion sont bloquées (Mizuta et Warner, 1994).

2.3. Les clivages des ARNr

L'obtention, à partir du précurseur 35S, des ARNr matures 18S, 25S et 5,8S se fait par une succession ordonnée de coupures endo- et exo-nucléolytiques, qui conduisent à l'élimination des séquences séparatrices transcrites externes (*External Transcribed Spacers* 5'ETS et 3'ETS en amont et en aval du 18S et du 25S respectivement) et séparatrices transcrites internes (*Internal Transcribed Spacers* ITS1 et 2, situées de part et d'autre du 5,8S) (Figure 26).

À la fin de la transcription, le précurseur 35S est libéré par l'action de l'endonucléase Rnt1, orthologue de la RNase III bactérienne, au site B_0 (Elela et al., 1996; Kufel et al., 1999).

Dans un premier temps, le précurseur 35S est coupé aux sites A_0 puis A_1, ce qui élimine le 5'ETS et forme le précurseur 32S. Les deux fragments d'ARN éliminés sont dégradés, l'un par l'exosome (Zanchin et Goldfarb, 1999), l'autre par l'exoribonucléase 5'>3' Rat1 (ou éventuellement son équivalent cytoplasmique, Xrn1) (Dichtl et al., 1997). Le clivage A_2 dans l'ITS1 conduit alors à la divergence des voies de maturation de la grande et de la petite sous-unité ribosomique, en séparant le précurseur 20S du précurseur $27SA_2$. L'enzyme (ou les enzymes) responsable(s) de ces clivages est (sont) encore inconnue(s), mais la snoRNP U3 est nécessaire pour que ces trois étapes se produisent (Hughes et Ares, 1991).

2.3.1. Formation de l'ARNr 18S

La suite de la maturation de l'ARN 20S s'effectue dans le cytoplasme, après export de la particule pré-40S au travers du pore nucléaire. La portion de l'ITS1 restante en 3' de l'intermédiaire 20S est éliminée par le clivage endonucléolytique D (Udem et Warner, 1973). Ce fragment est ensuite dégradé par Xrn1 (van Beekvelt et al., 2001). Les sous-unités 40S contiennent alors l'ARN 18S mature.

2.3.2. Formation des ARNr 25S et 5,8S

Le précurseur $27SA_2$ est maturé dans le noyau en ARNr 25S et 5,8S par deux voies distinctes : la voie majeure (85 % des transcrits) conduit à la formation d'ARN $5,8S_S$, la voie mineure (15% des transcrits) à la formation d'ARN $5,8S_L$, allongé de 6 nucléotides dans sa partie 5' par rapport au produit majoritaire. Dans la voie majeure, un complexe ribonucléoprotéique, la RNase MRP, catalyse le clivage A_3 en 5' de l'ARNr 5,8S, conduisant à la formation du $27SA_3$ (Lindahl et al., 1992; Lygerou et al., 1996; Schmitt et Clayton, 1993; Shuai et Warner, 1991). Cette étape est suivie de l'action exonucléolytique de Rat1/Xrn1 des sites A_3 vers B_{1S} (Henry et al., 1994), qui permet de libérer l'extrémité 5' de l'ARN 5 ,$8S_S$ et conduit à la formation du précurseur $27SB_S$. Dans la voie alterne, une activité exonucléolytique agit directement sur le $27SA_2$ pour former le $27SB_L$. Parallèlement, dans les deux voies, Rex1 est nécessaire à la libération de l'extrémité 3' de l'ARNr 25S.

Les intermédiaires 27SB sont clivés au site C_2. L'intermédiaire 7S ainsi produit est maturé en ARNr 5,8S par une succession de clivages exonucléolytiques C_2>E, impliquant l'exosome, Rex1, Rex2 et Ngl2 (Faber et al., 2002; van Hoof et al., 2000). En parallèle, la formation de l'ARNr 25S nécessite les activités exonucléase 5'>3' de Rat1 (ou, à défaut, Xrn1) (Geerlings et al., 2000).

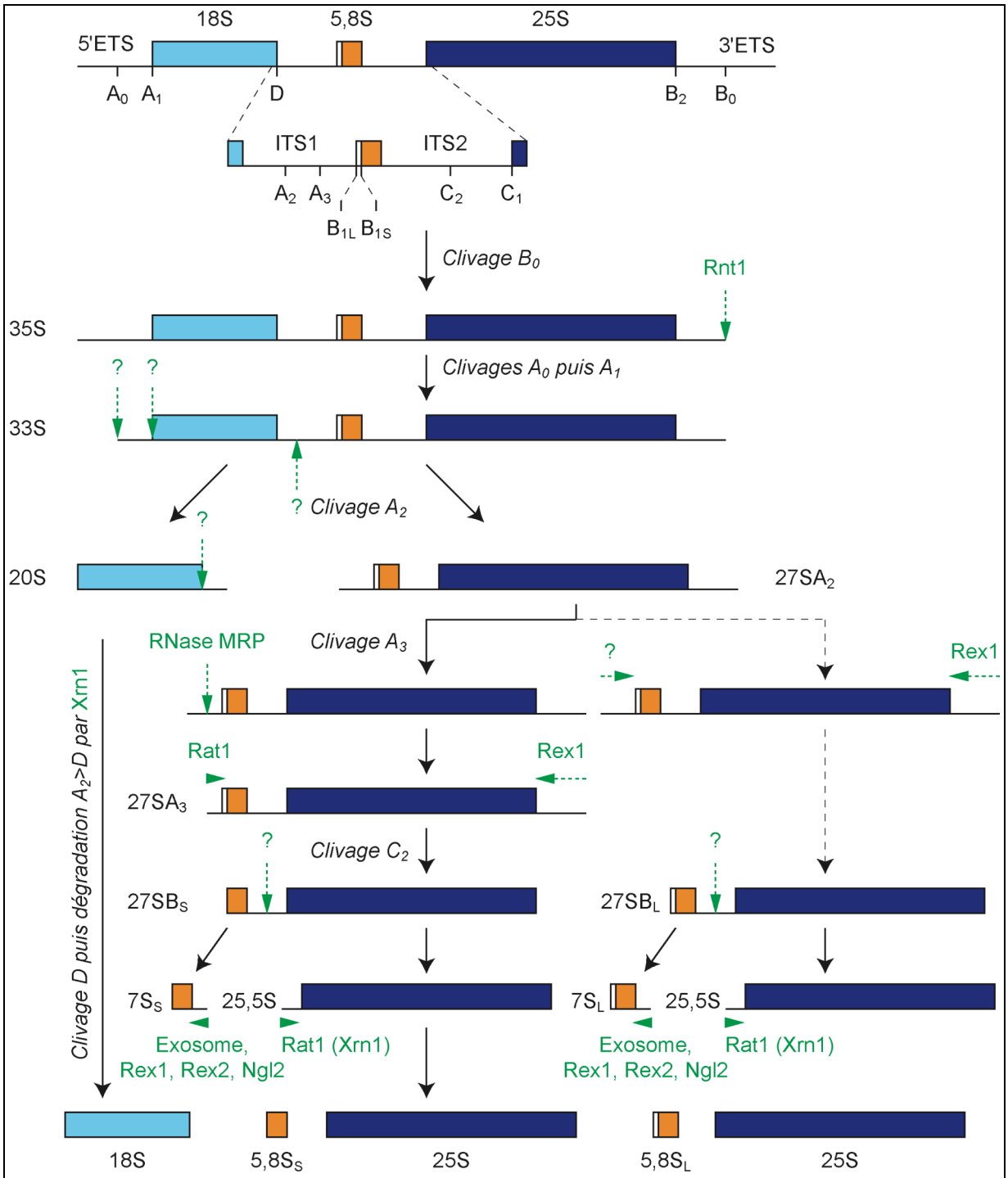


Figure 26 : Voies de clivages du précurseur d'ARNr 35S chez *S. cerevisiae* (d'après Fatica et Tollervey, 2002). Les enzymes impliquées dans les différents clivages sont indiquées en vert. Les sites de clivages endonucléolytiques sont indiqués par des flèches verticales ; les maturations exonucléolytiques sont représentées par des flèches horizontales. Les points d'interrogation indiquent que les acteurs du clivage n'ont pas été identifiés.

2.4. Les modifications des ARNr

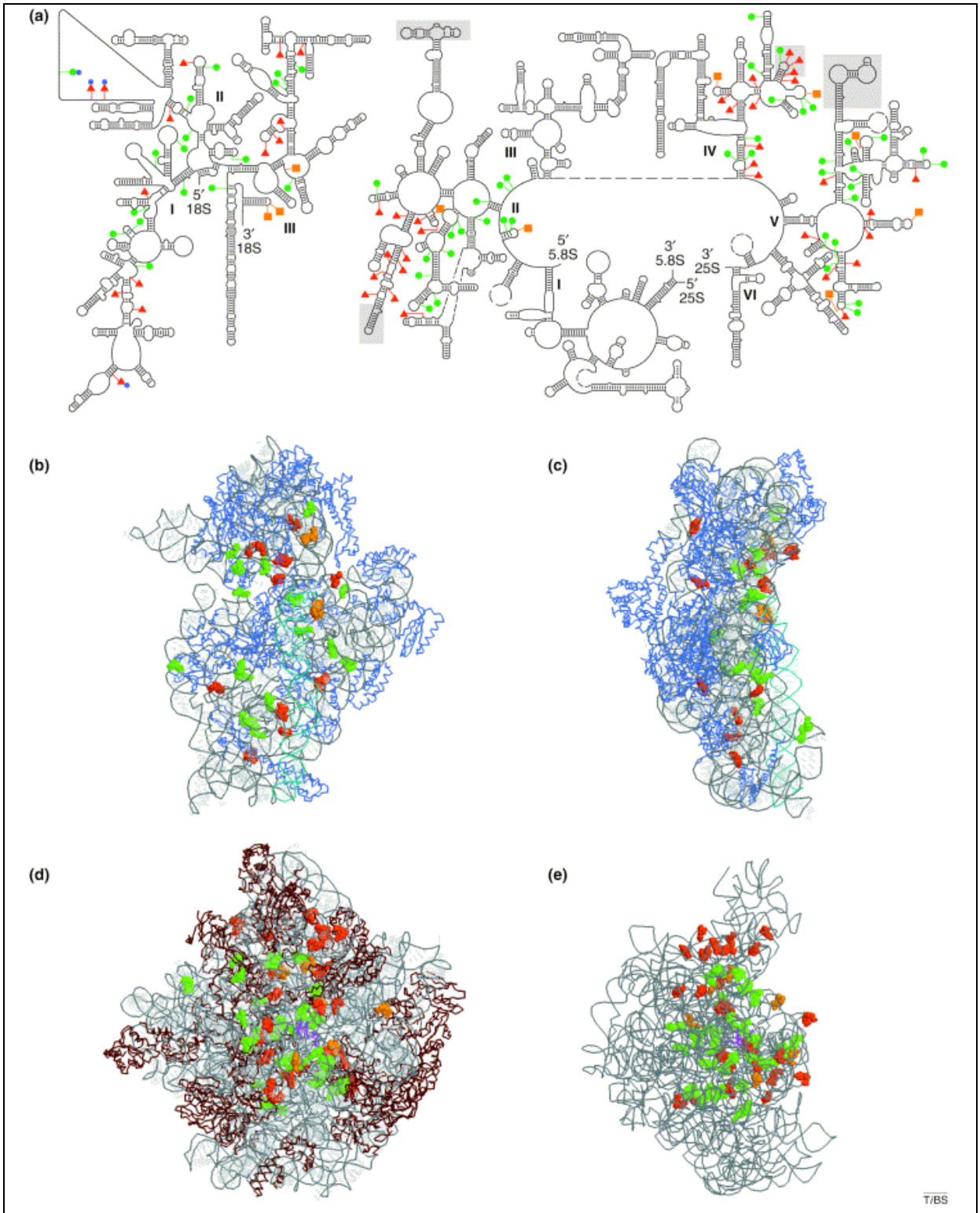


Figure 27 : Distribution des nucléotides modifiés des ARNr de *S. cerevisiae* (Decatur et Fournier, 2002). Les pseudo-uridylations sont indiquées en rouge, les méthylations en orange ou en vert. L'ARNr est représenté en gris, les protéines ribosomiques en bleu (30S) ou en brun (60S) (a) Positions des modifications dans les ARN 18S, 5,8S et 25S. (b-c) Positions des modifications à la surface de la petite sous-unité ribosomique. (d-e) Positions des modifications à la surface de la grande sous-unité ribosomique.

En plus des maturations des ARNr par clivages endo- ou exo-nucléolytiques, un certain nombre de modifications de bases apparaissent entre la séquence du transcrit primaire, et celle des ARNr matures (Figure 27).

Les modifications des ARNr sont catalysées principalement par des snoRNP, mais peuvent aussi l'être par certaines enzymes spécifiques comme Dim1. On distingue deux types de snoRNP : celles contenant un snoARN à boîte H/ACA, impliquées dans des mécanismes de pseudo-uridylation, et celles contenant un snoARN à boîte C/D, impliquées dans des mécanismes de méthylation des 2'-O-ribose. Ces modifications, bien qu'elles ne soient pas essentielles si on les considère une à une, le deviennent si on les étudie dans leur globalité. Certaines d'entre-elles sont extrêmement conservées dans les trois règnes du vivant ; d'autres sont plus spécifiques des Eucaryotes, ou même de certaines espèces. Il semble qu'elles favorisent l'activité optimale des ribosomes au cours de la traduction.

Notons que, si certaines modifications des ARNr sont conservées au cours de l'évolution, les mécanismes divergent ; ainsi, la reconnaissance des sites à modifier et la catalyse sont-ils réalisés par des enzymes chez les bactéries, et principalement par des snRNP chez les Eucaryotes. Pour les deux types de snRNP eucaryotes, le snoARN sert de guide pour le positionnement de la modification dans l'ARN ribosomique, grâce à des appariements de bases entre les boucles du snoARN et la séquence cible. Les protéines participent à la structure du complexe et portent l'activité catalytique.

2.4.1. snRNP à boîte C/D

Les particules ribonucléoprotéiques responsables des méthylations sur les 2'-O-ribose des ARNr contiennent un snoARN à boîte C/D (Figure 28), auquel s'associent les protéines Nop1, Nop56 Nop58 et Snu13 pour former un complexe de 230 kDa environ.

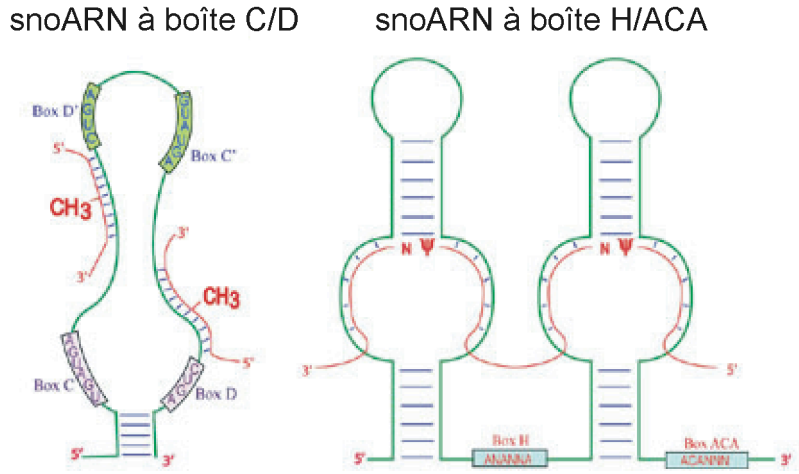


Figure 28 : Comparaison des snoARN à boîte C/D (à gauche) et à boîte H/ACA (à droite). Le snoARN à boîte C/D porte deux séquences guides déterminant les positions des sites à méthyler (indiquées pas –CH3), ainsi que deux couples de boîtes C/D et C'/D' impliquées dans l'interaction avec les protéines de la snoRNP. Le snoARN à boîte H/ACA comprend deux structures en tige-boucle séparées par la boite H (de consensus ANANNA), suivies de la boîte ACA. Les positions à modifier (indiquées par le symbole ψ) sont déterminées par les séquences guides situées dans les boucles, à la base des tiges.

Notons que certaines snRNP à boîte C/D peuvent être impliquées dans d'autres processus que la méthylation ; c'est le cas de la snoRNP U3 mentionnée plus haut, ainsi que de la snoRNP U14, qui participe, en plus de son rôle de méthylase, à la formation de l'ARNr 18S mature par appariement de bases.

2.4.2. *snRNP à boîte H/ACA*

Les snoARN à boîte H/ACA participent aux complexes ribonucléoprotéiques responsables des pseudo-uridylations des ARNr. Ils sont associés aux protéines Nhp2, Nop10, Cbf5 et Gar1 (Figure 29) pour former un complexe de 260 kDa environ.

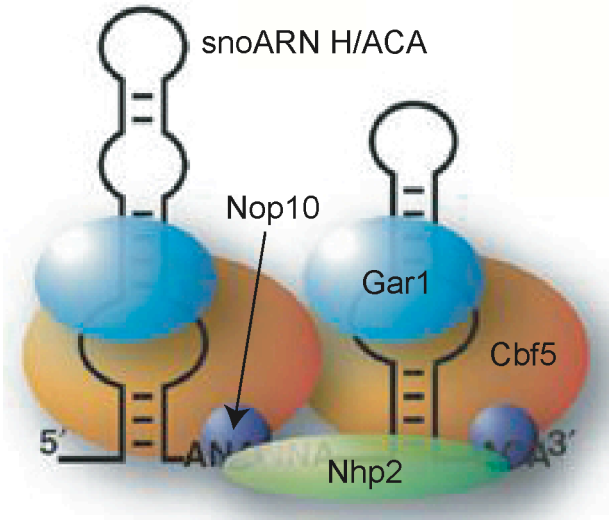


Figure 29 : Structure des snoRNPs à boîte H/ACA (d'après Wang et Meier, 2004). Les protéines Cbf5 (en orange), Nop10 (en bleu foncé), Nhp2 (en vert) et Gar1 (en bleu pâle) s'associent à un snoARN à boîte H/ACA pour former la snoRNP.

De la même manière que pour les snRNP à boîte C/D, certaines snRNP à boîte H/ACA peuvent participer à la maturation des ARNr matures. Ainsi, les snoARN snR10 et snR30 participent-t-ils à la maturation de l'ARNr 18S.

2.4.3. *Méthylations par des enzymes spécifiques*

L'enzyme Dim1 a été caractérisée pour son activité de diméthylase de bases de l'ARN (Lafontaine et al., 1994). Elle catalyse la diméthylation m6(2)A_{1518},m6(2)A_{1519} dans la boucle terminale en 3' de l'ARNr 18S. Contrairement à son orthologue bactérien KsgA, Dim1 est essentielle, et semble requise pour la maturation correcte de la petite sous-unité ribosomique (Lafontaine et al., 1995; Lafontaine et al., 1998). Elle agirait en partenariat avec la protéine à domaines KH Dim2 dans le contrôle des événements de clivage des précurseurs d'ARNr aux sites A1 et A2 (Vanrobays et al., 2004).

Une autre méthyltransférase, Spb1 est nécessaire pour la maturation normale des ARNr (Kressler et al., 1999). Elle peut méthyler la position G_{2922} de l'ARNr 25S, localisée au site accepteur de l'ARNt dans la sous-unité mature, et conservée dans tous les règnes du vivant (Bonnerot et al., 2003). À la différence des snRNPs, Spb1 intervient tardivement au cours de la biogenèse (Lapeyre et Purushothaman, 2004). La position voisine U_{2921} est habituellement méthylée par snR52 ; en son absence, Spb1 pourrait également méthyler ce site.

Enfin, la protéine Nop2, impliquée dans la maturation des précurseurs d'ARNr 27SB, est une m5C-méthyltransférase d'ARN putative (Hong et al., 2001).

2.5. *Une voie, des voies ?*

La complexité de la biogenèse des ribosomes conduit à se demander s'il existe une voie unique de maturation des ARNr dans un ordre précis, par un ensemble d'enzymes spécifiques, ou si plusieurs voies peuvent coexister dans la cellule.

Le décryptage de l'ordre d'intervention des différents clivages laisse supposer que, pour la majeure partie de la biogenèse, le processus est ordonné, et que chaque coupure intervient à un moment bien précis. Lorsqu'une coupure intervient de façon inappropriée, comme c'est le cas dans certains mutants affectant les clivages aux sites A_1-A_2, pour lesquels seuls les clivages A_0 et A_3 ont lieu, un produit aberrant est formé (le 23S), qui ne subit pas la suite de la maturation et est rapidement dégradé par l'exosome.

Cependant, la maturation de la grande sous-unité ribosomique chez la levure montre que, pour certaines étapes de la biogenèse au moins, il existe plusieurs voies. Ainsi, 15% des précurseurs 27SB échappent à l'activité exonucléolytique de la RNase MRP, conduisant directement au $27SB_L$ (Figure 26) ; cette voie alternative permet la production d'une forme allongée de l'ARNr 5,8S : le $5,8S_L$, par opposition au $5,8S_S$ produit à 85%.

Chez les Eucaryotes supérieurs, plusieurs voies distinctes de maturation des ARNr ont été décrites. Des études récentes montrent que l'utilisation de ces voies de maturation peut être modulée en fonction des conditions physiologiques ou de l'état pathologique de la cellule comme le cancer ou l'infection virale (communication personnelle de Jean-Jacques Diaz, résultats non publiés).

L'existence de plusieurs voies de biogenèse, qui conduisent à la formation de sous-unités ribosomiques dont la composition en ARNr diffère sensiblement les unes des autres, laisse penser que plusieurs classes de ribosomes peuvent coexister. On peut se demander si ces variations sur le plan des ARNr s'accompagnent de modifications de la composition protéique, et/ou de la structure finale des ribosomes. Une hypothèse intéressante est que ces classes seraient légèrement distinctes du point de vue fonctionnel ; certaines d'entre elles pourraient ainsi être spécialisées dans la traduction d'ARNm spécifiques, ou du moins montrer plus d'affinité pour certains types de messagers.

Un élément de réponse est apporté par les études menées ches *P. falciparum*. Chez ce parasite, plusieurs loci transcriptionnels distincts assurent la synthèse des ARNr en fonction de la phase du cycle parasitaire. Les divergences entre les séquences d'ARNr se répercutent sur la structure des ribosomes matures, ainsi que sur leurs caractéristiques fonctionnelles (Velichutina et al., 1998). Ces classes distinctes de ribosomes pourraient favoriser la traduction de transcrits spécifiques de certaines phases cellulaires, ou être plus ou moins adaptées aux conditions physiologiques rencontrées selon les phases du cycle (température, apport en acides aminés, etc.). Ainsi, la température et l'apport de glucose contrôlent la transcription des différentes unités d'ADNr, en relation avec le passage de la forme asexuée à la forme sexuée du parasite (Fang et al., 2004). Cependant, chez la plupart des autres organismes eucaryotes, l'existence de classes de ribosomes distincts du point de vue fonctionnel n'a jusqu'ici pas été montrée.

3. Dynamique des protéines au cours de la biogenèse des ribosomes eucaryotes

3.1. Composition des particules pré-ribosomiques

3.1.1. Caractérisation des facteurs pré-ribosomiques

3.1.1.1. Caractérisations fonctionnelles (génétique, biochimique) : Les nucléases

Les premiers facteurs pré-ribosomiques caractérisés furent les enzymes et les complexes enzymatiques impliqués dans les clivages des ARNr. Leur identification a été permise par des travaux de génétique montrant que certains mutants accumulaient des intermédiaires d'ARNr immatures ou aberrants, puis des expériences de biochimie ont confirmé leur fonction. Dans certains cas, l'homologie de ces enzymes avec celles trouvées chez les bactéries a facilité leur mise en évidence.

Ainsi, Rnt1, l'enzyme responsable du clivage au site B_0 permettant la libération du précurseur 35S de l'ARN Pol I, fut dans un premier temps mise en évidence pour son homologie avec la RNase III bactérienne (Elela et al., 1996). Des expériences de clivage *in vitro* montrèrent que la protéine recombinante était capable de cliver l'ARNr dans la séquence 5'ETS au site A_0. Ce résultat fut infirmé par la suite, montrant que l'enzyme était requise pour un clivage dans la séquence 3'ETS (Kufel et al., 1999).

Le rôle de la RNase MRP fut pour sa part mis en évidence grâce au phénotype observés chez les mutants de ces gènes (Lindahl et al., 1992; Shuai et Warner, 1991). Des expériences de complémentation de ces mutants permirent d'identifier certains des composants protéiques et nucléiques de cette RNase (Chu et al., 1994). La RNase MRP était déjà connue chez les Mammifères pour son rôle dans la réplication de l'ADN mitochondrial, et son homologue bactérien, la RNase P, pour son rôle dans la synthèse des ARNt. Des expériences ultérieures de génétique, puis de biochimie montrèrent que la forme nucléaire du complexe eucaryote était impliquée dans le clivage endonucléolytique au site A_3 (Lygerou et al., 1996; Schmitt et Clayton, 1993).

De la même manière, le premier composant de l'exosome, Rrp4, fut identifié par le phénotype observé chez les mutants, et clonés par complémentation (Mitchell et al., 1996). Par la suite, la purification du complexe associé montra qu'il était constitué d'au moins onze exonucléases 3'>5' (ou exonucléases putatives) : Rrp4, Rrp41, Rrp44, Csl4, Mtr3, Rrp40, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 et Rrp6 (Allmang et al., 1999; Mitchell et al., 1997).

3.1.1.2. Description de nouveaux facteurs : approches protéomiques

Plus récemment, des approches protéomiques ont permis de compléter le tableau des facteurs pré-ribosomiques impliqués dans la biogenèse des deux sous-unités. En particulier, les données de purifications par affinité en tandem et d'immunoprécipitation fournissent une liste quasi-exhaustive des protéines retrouvées dans les complexes pré-ribosomiques. Une compilation de ces données est présentée Figure 30 ; les différents appâts utilisés pour les purifications, ainsi que les proies, ont été ordonnés de sorte à ce que les complexes purifiés ayant un profil similaire soient regroupés (Fromont-Racine et al., 2003). Ce diagramme met en valeur des facteurs majoritairement associés aux particules 90S, pré-40S, pré-60S ou pré-$60S_L$ (un sous-complexe pré-60S relativement tardif).

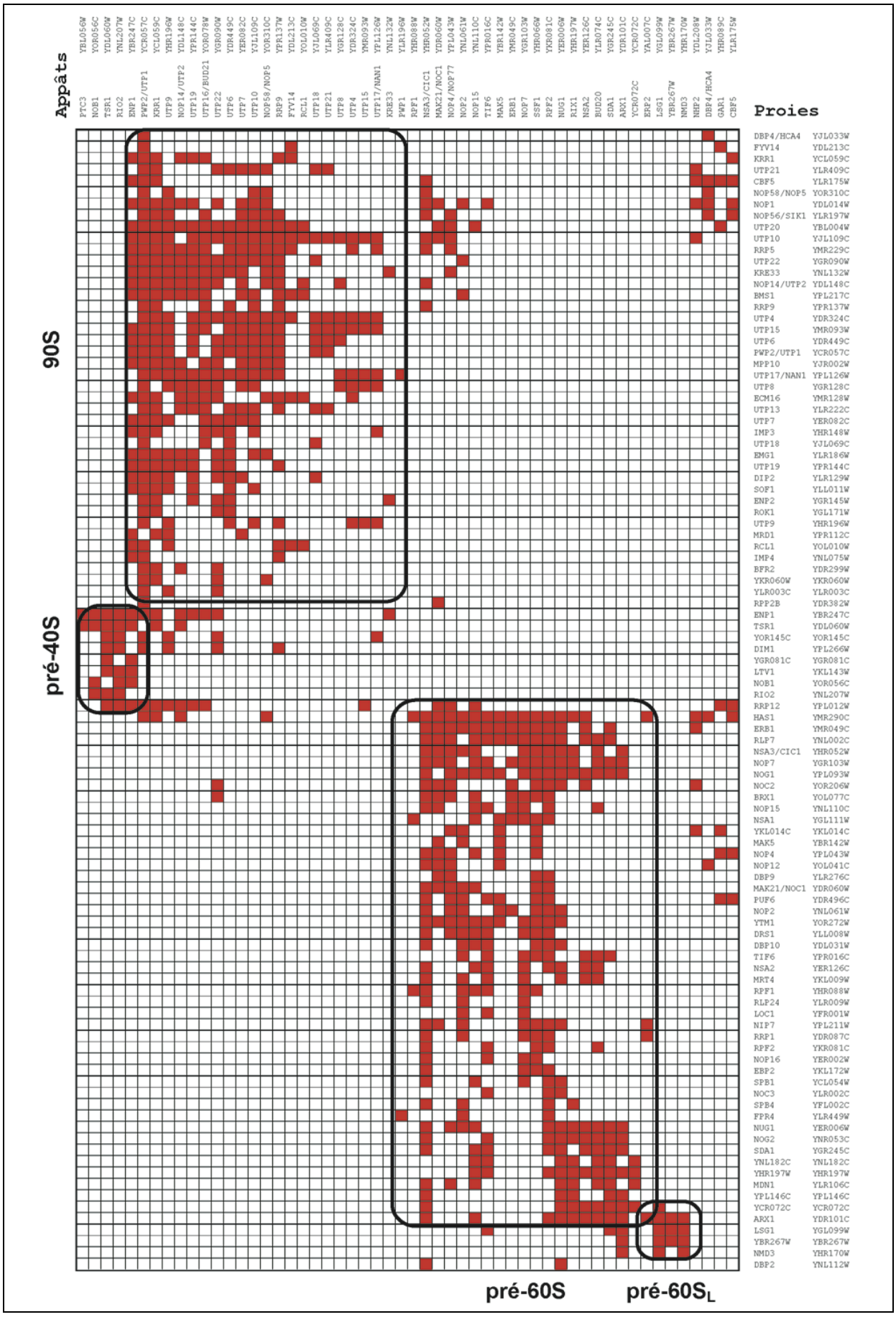

Appâts
YBL056W PTC3
YOR056C NOB1
YDL060W TSR1
YNL207W RIO2
YBR247C ENP1
YCR057C PWP2/UTP1
YCL059C KRR1
YHR196W UTP9
YDL148C NOP14/UTP2
YPR144C UTP19
YOR078W UTP16/BUD21
YGR090W UTP22
YDR449C UTP6
YER082C UTP7
YJL109C UTP10
YOR310C NOP58/NOP5
YPR137W RRP9
YDL213C FYV14
YOL010W RCL1
YJL069C UTP18
YLR409C UTP21
YGR128C UTP8
YDR324C UTP4
YMR093W UTP15
YPL126W UTP17/NAN1
YNL132W KRE33
YLR196W FWP1
YHR088W RPF1
YHR052W NSA3/CIC1
YDR060W MAK21/NOC1
YPL043W NOP4/NOP77
YNL061W NOP2
YNL110C NOP15
YPR016C TIF6
YER142W MAK5
YMR049C ERB1
YGR103W NOP7
YHR066W SSF1
YKR081C RPF2
YER006W NUG1
YHR197W RIX1
YER126C NSA2
YLR074C BUD20
YGR245C SDA1
YDR101C ARX1
YCR072C YCR072C
YAL007C ERP2
YGL099W LSG1
YBR267W YBR267W
YHR170W NMD3
YDL208W NHP2
YJL033W DBP4/HCA4
YHR089C GAR1
YLR175W CBF5
Proies
DBP4/HCA4 YJL033W
FYV14 YDL213C
KRR1 YCL059C
UTP21 YLR409C
CBF5 YLR175W
NOP58/NOP5 YOR310C
NOP1 YDL014W
NOP56/SIK1 YLR197W
UTP20 YBL004W
UTP10 YJL109C
RRP5 YMR229C
UTP22 YGR090W
KRE33 YNL132W
NOP14/UTP2 YDL148C
BMS1 YPL217C
RRP9 YPR137W
UTP4 YDR324C
UTP15 YMR093W
UTP6 YDR449C
PWP2/UTP1 YCR057C
MPP10 YJR002W
UTP17/NAN1 YPL126W
UTP8 YGR128C
ECM16 YMR128W
UTP13 YLR222C
UTP7 YER082C
IMP3 YHR148W
UTP18 YJL069C
EMG1 YLR186W
UTP19 YPR144C
DIP2 YLR129W
SOF1 YLL011W
ENP2 YGR145W
ROK1 YGL171W
UTP9 YHR196W
MRD1 YPR112C
RCL1 YOL010W
IMP4 YNL075W
BFR2 YDR299W
YKR060W YKR060W
YLR003C YLR003C
RPP2B YDR382W
ENP1 YBR247C
TSR1 YDL060W
YOR145C YOR145C
DIM1 YPL266W
YGR081C YGR081C
LTV1 YKL143W
NOB1 YOR056C
RIO2 YNL207W
RRP12 YPL012W
HAS1 YMR290C
ERB1 YMR049C
RLP7 YNL002C
NSA3/CIC1 YHR052W
NOP7 YGR103W
NOG1 YPL093W
NOC2 YOR206W
BRX1 YOL077C
NOP15 YNL110C
NSA1 YGL111W
YKL014C YKL014C
MAK5 YBR142W
NOP4 YPL043W
NOP12 YOL041C
DBP9 YLR276C
MAK21/NOC1 YDR060W
PUF6 YDR496C
NOP2 YNL061W
YTM1 YOR272W
DRS1 YLL008W
DBP10 YDL031W
TIF6 YPR016C
NSA2 YER126C
MRT4 YKL009W
RPF1 YHR088W
RLP24 YLR009W
LOC1 YFR001W
NIP7 YPL211W
RRP1 YDR087C
RPF2 YKR081C
NOP16 YER002W
EBP2 YKL172W
SPB1 YCL054W
NOC3 YLR002C
SPB4 YFL002C
FPR4 YLR449W
NUG1 YER006W
NOG2 YNR053C
SDA1 YGR245C
YNL182C YNL182C
YHR197W YHR197W
MDN1 YLR106C
YPL146C YPL146C
YCR072C YCR072C
ARX1 YDR101C
LSG1 YGL099W
YBR267W YBR267W
NMD3 YHR170W
DBP2 YNL112W
90S
pré-40S
pré-60S
pré-60S$_L$

Figure 30 : Composition protéique des complexes pré-ribosomiques (Fromont-Racine et al., 2003). Ce diagramme regroupe les données de chromatographie d'affinité et d'immunoprécipitation concernant la composition des complexes associés à divers facteurs pré-ribosomiques (Bassler et al., 2001; Dragon et al., 2002; Fatica et Tollervey, 2002; Gavin et al., 2002; Grandi et al., 2002; Nissan et al., 2002) ; seules les protéines non ribosomiques trouvées dans au moins trois complexes distincts ont été prises en compte. Les profils similaires ont été regroupés grâce au logiciel Genesis. Chaque carré rouge indique qu'une proie donnée a été identifié dans le complexe associé à un appât donné.

Par ailleurs, des approches de génomique et de transcriptome permettent peu à peu de mettre en évidence d'autres facteurs impliqués dans biogenèse des ribosomes, mais ayant jusqu'ici échappé aux travaux de protéomique parce qu'ils ne sont associés que de manière très transitoire ou instable aux complexes pré-ribosomiques. Un certain nombre de données concernant ces facteurs sont apportées par la comparaison des profils d'expression des gènes de levure en réponse à différents stress ; d'autres peuvent provenir de cribles mettant en évidence des interactions fonctionnelles entre facteurs, comme des cribles de recherche de suppresseurs multicopies, ou des cribles de létalité synthétique. Enfin, des facteurs passés jusqu'ici inaperçus dans les complexes pré-ribosomiques purifiés peuvent être mis en évidence par des cribles double-hybride.

3.1.1.3. Les différentes classes de facteurs pré-ribosomiques

En plus des enzymes impliquées dans les clivages des ARN ribosomiques, plusieurs classes de protéines participent à la biogenèse de la grande et la petite sous-unité ribosomique. Une partie de ces familles est répertoriée dans la Table 1, pour comparaison avec les familles similaires chez les Procaryotes. La plupart de ces facteurs sont représentés Figure 31, en fonction de leur ordre d'intervention dans la biogenèse des ribosomes (tel qu'il était décrit en 2002). Il s'agit :

- **Des hélicases ATP-dépendantes à boîte DEAD/H**. Ces protéines permettent le dépliement des structures secondaires des ARNr. Le nombre d'hélicases putatives (18 chez la levure) est nettement plus élevé chez les Eucaryotes que chez les bactéries. Une hypothèse émise quant au rôle de ces enzymes est qu'elles participeraient au maintien de structures ouvertes des ARNr, en particulier pour rendre accessibles aux snRNPs les sites de modifications de bases. Elles pourraient aussi participer au maintien de structures d'ARN simple brin, facilitant ainsi l'action de certaines nucléases. À l'exception de Has1, la plupart des hélicases sont impliquées spécifiquement dans la maturation de la petite ou la grande sous-unité ribosomique (Bernstein et al., 2006; Granneman et al., 2006).
- **Des chaperones d'ARN**. Le complexe Lsm2-8 pourrait participer au repliement adéquat des ARNr au sein des particules pré-ribosomiques (Kufel et al., 2003).
- **Des NTPases**. Plusieurs GTPases putatives ont été identifiées pour leur rôle dans des étapes précises de la biogenèse des ribosomes. Elles appartiennent à deux familles de petites protéines G : Nog1, Nug1, Nog2 et Lsg1 sont des membres de la famille Obg, alors que Bms1 et Efl1 sont des homologues des facteurs d'initiation IF2/EF-Tu. Bms1 participe à des étapes précoces de la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique (Gelperin et al., 2001; Karbstein et Doudna, 2005). Les cinq autres protéines participent à la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique, à des étapes nucléolaire comme Nog1 (Saveanu et al., 2003), avant l'export comme Nug1 et Nog2 (Bassler et al., 2001; Saveanu et al., 2001), ou à des étapes cytoplasmiques comme Lsg1 et Efl1 (Hedges et al., 2005; Kallstrom et al., 2003; Senger et al., 2001). La fonction exacte de ces protéines est encore mal définie ; elles pourraient exercer un

rôle de censeur de l'avancement de la biogenèse, en permettant la transition vers des étapes ultérieures sous l'effet de l'hydrolyse du GTP. Un rôle similaire est supposé pour les AAA-ATPases Rix7 et Rea1/Mdn1 (Gadal et al., 2001a; Galani et al., 2004).

En plus de ces classes de protéines communes aux Eucaryotes et aux Procaryotes, interviennent un certain nombre de facteurs spécifiques des Eucaryotes ; la liste ci-dessous tente de classer ces facteurs par familles en fonction de leurs domaines caractéristiques ; cependant, certains facteurs possèdent plusieurs de ces motifs et sont par conséquent difficiles à classer.

- **Les protéines à domaines HEAT**. Ces protéines, qui participent aussi bien à l'assemblage de la grande (Noc1, Noc2, Noc3, Sda1, Rrp12) que de la petite sous-unité ribosomique (Utp10, Utp20, Noc4) ont une structure allongée et incurvée. Elles pourraient participer à des réarrangements de grande ampleur dans la structure des particules pré-ribosomiques au cours de leur maturation, ou à leur transport (Dlakic et Tollervey, 2004).
- **Les protéines à doigts de Zinc**. Un certain nombre de facteurs pré-ribosomiques, comme Rlp24 ou Rei1, possèdent des doigts de zinc. Ces motifs sont susceptibles de participer à des interactions protéine-protéine ou protéine-ARN au sein des complexes ribonucléoprotéiques.
- **Les protéines à répétitions WD**. Un certain nombre de facteurs pré-ribosomiques (Erb1, Mak11, Ytm1, …) possèdent plusieurs répétitions de la séquence Tryptophane-Aspartate (WD), motif connu pour son rôle dans les interactions protéine-protéine.
- **Les protéines à motif Brix**. Cette famille de protéines, qui compte 5 membres chez les Eucaryotes (Ssf1/2, Rpf1/2, Brx1, Imp4 et Ykr081c), et un chez les Archées, semble spécifiquement dédiée à la biogenèse des ribosomes (Eisenhaber et al., 2001). Le motif central Brix serait impliqué dans des interactions avec l'ARNr.
- **Les kinases**. Rio1 et Rio2 sont des membres de la famille des protéines kinases de sérines. Elles participent toutes deux aux étapes cytoplasmiques de maturation de la petite sous-unité ribosomique (pour revue, LaRonde-LeBlanc et Wlodawer, 2005)
- **Les homologues de protéines ribosomiques**. Le facteur pré-ribosomique Rlp7 est homologue à Rpl7, Rlp24 à Rpl24. Une hypothèse formulée est que les facteurs pré-ribosomiques occupent, dans les particules en cours de synthèse, la place qu'occuperont leurs homologues dans les particules matures. Cependant, ceci n'a toujours pas été démontré avec certitude, de même que le fait que la présence de la protéine ribosomique ou de son homologue sur la particule soit exclusive. D'autres facteurs possèdent des motifs caractéristiques de protéines ribosomiques, comme Nsa2, facteur pré-60S dont une partie de la séquence est homologue aux protéines S8e d'Archées ou Rps8 d'Eucaryotes. Ces domaines sont probablement impliqués dans des interactions entre les protéines et les ARNr, et ont été conservés au cours de l'évolution, bien que les fonctions des protéines aient divergé.
- **D'autres facteurs sont impliqués à différentes étapes de la biogenèse des ribosomes**. Entre autres, on trouve des protéines potentiellement impliquées dans les modifications post-traductionnelles d'autres protéines (les peptidyl-prolyl-isomérases Fpr3 et Fpr4 ; la méthionine-aminopeptidase putative Arx1), ou des protéines sans analogies de séquence évidentes avec d'autres protéines connues à ce jour, comme Rai1, Loc1, Rsa1, etc.

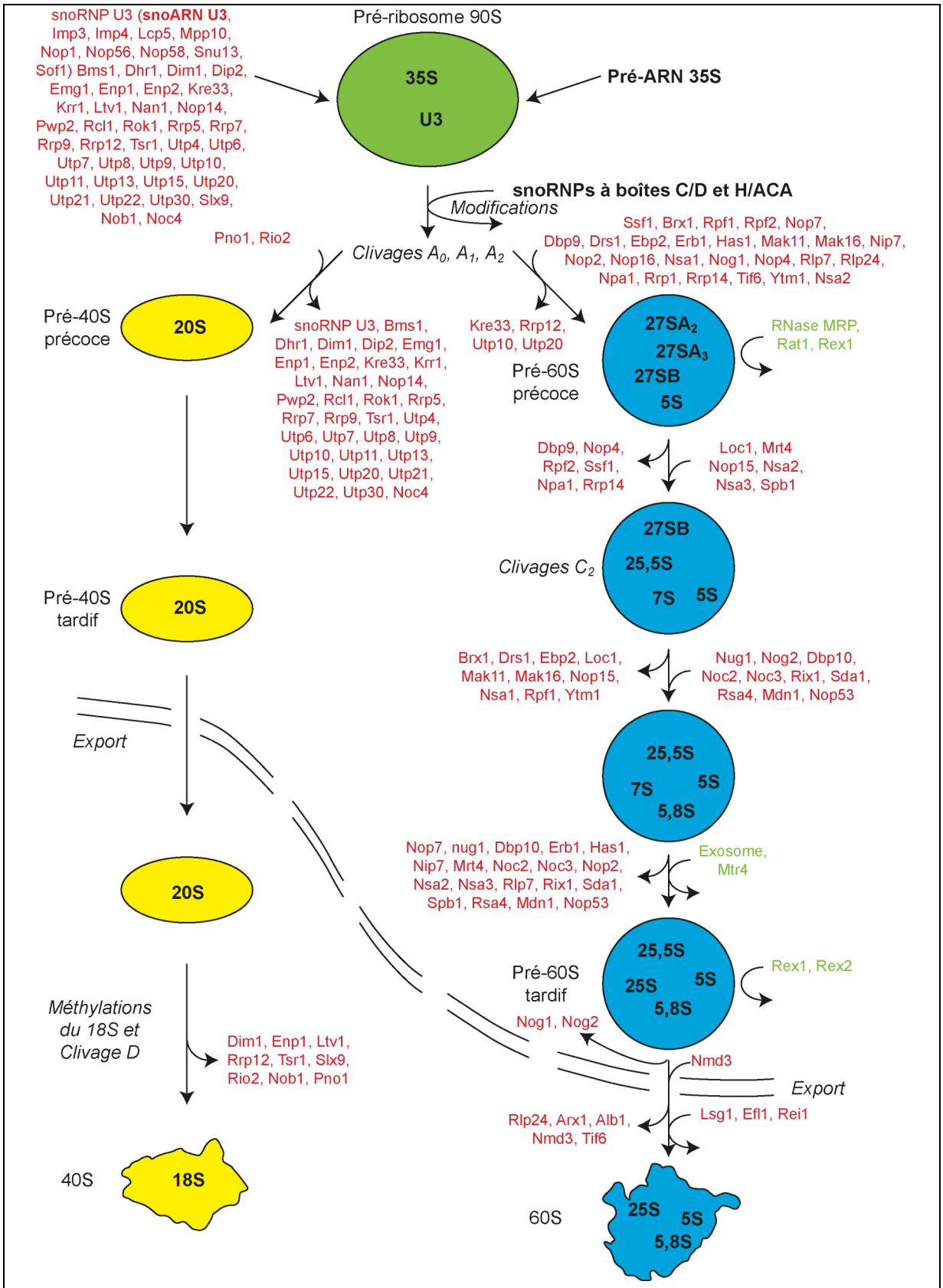


Figure 31 : Ordre d'intervention des facteurs pré-ribosomiques au sein des particules pré-ribosomiques (D'après Fatica et Tollervey, 2002). Les différents facteurs pré-ribosomiques (en rouge) sont replacés par rapport aux principales étapes de maturation des ARNr. Les enzymes responsables de ces clivages sont indiquées en vert, les ARN sont en caractère gras.

3.1.2. *Vers la dynamique des pré-ribosomes*

Contrairement à ce que pourrait laisser penser la Figure 30, la composition des complexes pré-ribosomiques n'est pas figée, mais évolue tout au long de la biogenèse. Chaque particule passe par un continuum d'états distincts au fur et à mesure de l'association et de la dissociation des facteurs pré-ribosomiques qui la composent, et de la maturation des ARNr. Un aperçu de cette dynamique des facteurs pré-ribosomiques au sein des particules pré-ribosomiques est donné Figure 31.

Une grande part des recherches actuelles en matière de biogenèse des ribosomes tente de déterminer l'ordre d'intervention des différentes protéines sur la particule, et de repositionner cette dynamique des facteurs pré-ribosomiques par rapport à la voie de maturation des ARNr d'une part, et au cheminement des particules pré-60S dans la cellule d'autre part. L'ensemble de ces travaux s'avère extrêmement complexe. En effet, chaque facteur s'associe aux particules pré-ribosomiques, y exerce sa fonction, puis quitte la particule. Certains facteurs comme Rlp24 peuvent rester associés à une particule du nucléole jusqu'au cytoplasme ; d'autres ne s'associent que de façon très transitoire. Une manière d'illustrer ceci est représentée Figure 32.

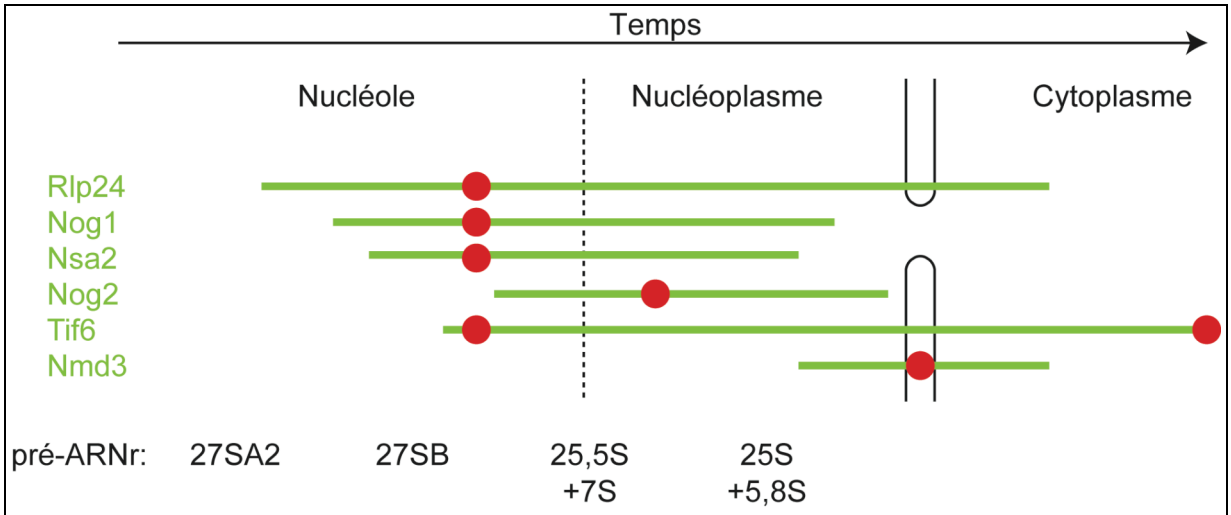


Figure 32 : Ordre d'intervention de quelques facteurs dans la biogenèse de la sous-unité 60S. La durée d'association de chaque facteur aux particules pré-60S est représentée par un segment vert. Son « point d'action » est indiqué par un disque rouge. L'ensemble est resitué temporellement par rapport aux étapes de clivages des précurseurs d'ARNr de la grande sous-unité ribosomique, et spatialement par rapport à la localisation cellulaire. Certaines données sont encore hypothétiques, notamment l'ordre de dissociation des facteurs, et l'existence d'un ou plusieurs « points d'action » pour chaque protéine. Ces « points d'action » sont généralement déterminés en analysant les phénotypes en l'absence de chaque facteur ; ceci n'exclut pas que la protéine étudiée soit nécessaire, non directement pour le point précis de biogenèse qui lui est attribué, mais pour l'association aux particules pré-ribosomiques d'un autre facteur intervenant, lui, à cette étape.

Un moyen de restituer l'ordre d'intervention des facteurs dans la biogenèse des ribosomes est d'utiliser des mutants de facteurs pré-ribosomiques bloquant la biogenèse des ribosomes à une étape donnée. En analysant la composition protéique des complexes pré-ribosomiques dans ces contextes mutants, et en la comparant à la composition des complexes purifiés en conditions sauvage, il est possible de déterminer quels facteurs s'associent aux particules avant ou après le point de blocage de la biogenèse, et ainsi d'ordonner les facteurs pré-ribosomiques sur un axe temporel, ou du moins de délimiter des sous-groupes de facteurs

précoces ou tardifs. Les travaux présentés dans la partie 1 de la section Résultats utilisent ce type d'approche.

Cependant, on ne peut ordonner de cette manière que l'association des facteurs par rapport à un point de blocage donné dépendant du mutant choisi ; cette technique ne permet pas de replacer le point d'action des facteurs dans la biogenèse, qui doit être déterminé par des analyses fonctionnelles de chaque protéine considérée individuellement. Par ailleurs, les données sur l'ordre et les mécanismes de dissociation des facteurs sont encore limitées. À quelques exceptions près, on ne sait pas si les facteurs se dissocient de façon passive après leur action, ou au contraire si d'autres facteurs interviennent activement dans le décrochage.

Dans la section Résultats, les parties 2 et 3 abordent directement ces questions. La première porte sur la caractérisation fonctionnelle du facteur pré-60S Nsa2, très conservé au cours de l'évolution. La seconde récapitule un ensemble de travaux permettant de replacer l'ordre d'intervention d'un certain nombre de protéines dans la voie de biogenèse des ribosomes, par rapport au point d'action de Nsa2. Pour ceci, nous avons mis au point et utilisé une technique couplant la purification par affinité en tandem de complexes pré-ribosomiques et le SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino-acids in Cell culture*), qui permet de comparer les compositions protéiques des complexes purifiés dans des conditions sauvages ou mutantes.

3.2. Transports nucléo-cytoplasmiques au cours de la biogenèse des ribosomes

3.2.1. L'import des constituants des pré-ribosomes vers le noyau

La partie nucléaire de la biogenèse des ribosomes nécessite l'import des acteurs de cette biogenèse sur le site d'assemblage. Les protéines ribosomiques, mais aussi les facteurs pré-ribosomiques, traduits dans le cytoplasme, sont importés vers le noyau.

L'import des protéines ribosomiques de levure est principalement réalisé par une importine de la classe des ß-karyophérines, Kap123 (Rout et al., 1997). Ce transport est Ran-GTP dépendant. Cependant, plusieurs autres karyophérines (Kap119, Kap108 et Kap121) ont une spécificité de cargos redondante avec celle de Kap123. En conséquence, Kap123 n'est pas essentielle chez *S. cerevisiae* (Sydorskyy et al., 2003).

Le mécanisme de transport des protéines ribosomiques vers le noyau par Kap123 nécessite une interaction directe entre les cargos à transporter et l'importine. Cette reconnaissance s'effectue au niveau de NLS contenus dans la séquence en acides aminés des cargos. L'importine liée à son cargo franchit alors le pore nucléaire grâce à des interactions spécifiques avec plusieurs nucléoporines. Une fois dans le noyau, Ran-GTP se lie à l'importine, libérant la protéine ribosomique. Kap123 peut alors participer à de nouveaux cycles de transport nucléo-cytoplasmique.

Les facteurs pré-ribosomiques sont aussi transportés pas des karyophérines plus ou moins spécifiques. Parmi elles, Kap121 a été caractérisée pour son rôle dans le transport de Sof1 et Nop1 (Leslie et al., 2004). Il semble que cette karyophérine essentielle, qui participe au transport de cargos impliqués dans une grande diversité de voies métaboliques (Delahodde et al., 2001; Isoyama et al., 2001; Kaffman et al., 1998; Leslie et al., 2002), puisse agir par plusieurs mécanismes différents : soit par une interaction directe avec son cargo, soit en co-transportant plusieurs protéines associées entre elles. L'interaction avec les protéines ou les complexes à transporter se ferait par reconnaissance d'un type de NLS particulier : les rg-NLS, caractérisés par leur richesse en acides aminés arginine et glycine. Une autre importine, Kap104, présente de l'affinité pour ce type de séquences et pourrait participer à l'import de facteurs pré-ribosomiques.

3.2.2. *L'export des pré-ribosomes*

Comme mentionné plus haut, l'export des particules pré-ribosomiques à un stade précis de leur maturation est un processus impliquant l'exportine Crm1 de la famille des ß-karyophérines, et dépendant de Ran-GTP. Dans le cas de la grande sous-unité ribosomique, Nmd3 sert d'adaptateur entre la particule à transporter et la karyophérine, en fournissant le signal d'export nucléaire (Figure 33).

À ce jour, la nature du contrôle permettant de trier les particules à exporter en fonction de leur stade de maturation est inconnue. Un test fonctionnel par un mécanisme de traduction nucléaire serait une hypothèse intéressante (Johnson et al., 2002), mais probablement à rejeter car (*i*) des expériences menées sur des ovocytes de Xénope ont montré que l'export des particules pré-60S n'était pas affecté en présence d'inhibiteurs de la traduction, (*ii*) les expériences tendant à démontrer l'existence de la traduction nucléaire (Iborra et al., 2001) sont très fortement controversées (pour revue, Dahlberg et Lund, 2004) et (*iii*) la présence, sur les particules pré-60S nucléaires, du facteur d'anti-association Tif6 est à même de bloquer toute interaction entre les précurseurs de la petite et de la grande sous-unité ribosomique.

Les données actuelles laissent supposer que le contrôle s'exercerait au niveau structural : au cours de la maturation, certains réarrangements structuraux conduiraient à l'exposition du site de fixation de Nmd3 à la surface des complexes pré-60S, permettant ainsi leur export. Un certain nombre de données montrent que le positionnement correct de Rpl10, à proximité du site peptidyltransférase sur le ribosome, est crucial pour la fixation de Nmd3 (Gadal et al., 2001b; Hedges et al., 2005). D'autres travaux suggèrent que des GTPases relativement tardives telles que Nog2/Nug2 et Nug1 pourraient exercer un rôle de censeur de l'état de maturation des particules pré-60S avant leur export vers le cytoplasme (Bassler et al., 2001; Saveanu et al., 2001). Enfin, certains travaux laissent penser que les facteurs pré-ribosomiques à domaines HEAT pourraient recouvrir la surface des ribosomes de sorte à neutraliser leurs charges et ainsi à les rendre apte à l'export (Dlakic et Tollervey, 2004; Oeffinger et al., 2004).

Chez les Eucaryotes supérieurs, dans les lymphocytes dormants, des particules pré-ribosomiques immatures sont stockées en périphérie du nucléole dans le composant granulaire, et ne subissent pas l'export (Olson, 2004). Ces pré-ribosomes peuvent être recrutés très rapidement vers le cytoplasme lorsque les cellules sont activées. Il est probable que le contrôle sévère des précurseurs de ribosomes avant leur export permet, en partenariat avec une inhibition de la biogenèse dans ces cellules, de maîtriser la quantité de ribosomes dans le cytoplasme, et ainsi de limiter l'activité traductionnelle dans les phases où l'activité cellulaire est réduite.

3.3. *Transition entre biogenèse et traduction*

À la fin de la biogenèse des ribosomes, les particules pré-40S et pré-60S achèvent leur maturation dans le cytoplasme. À ce stade, elles contiennent encore un certain nombre de facteurs pré-ribosomiques, qui ne se retrouvent pas dans l'architecture finale. Ces protéines quittent donc les ribosomes avant la traduction, et sont recyclées.

3.3.1. *Le recyclage des facteurs pré-ribosomiques*

Le nombre moyen de facteurs pré-ribosomiques présents dans les particules pré-60S diminue considérablement entre le début de la maturation dans le nucléole, et la fin dans le cytoplasme (Nissan et al., 2002). Au fur et à mesure de l'avancement de la maturation, ces facteurs se décrochent, et sont recyclés pour participer à la fabrication d'autres sous-unités.

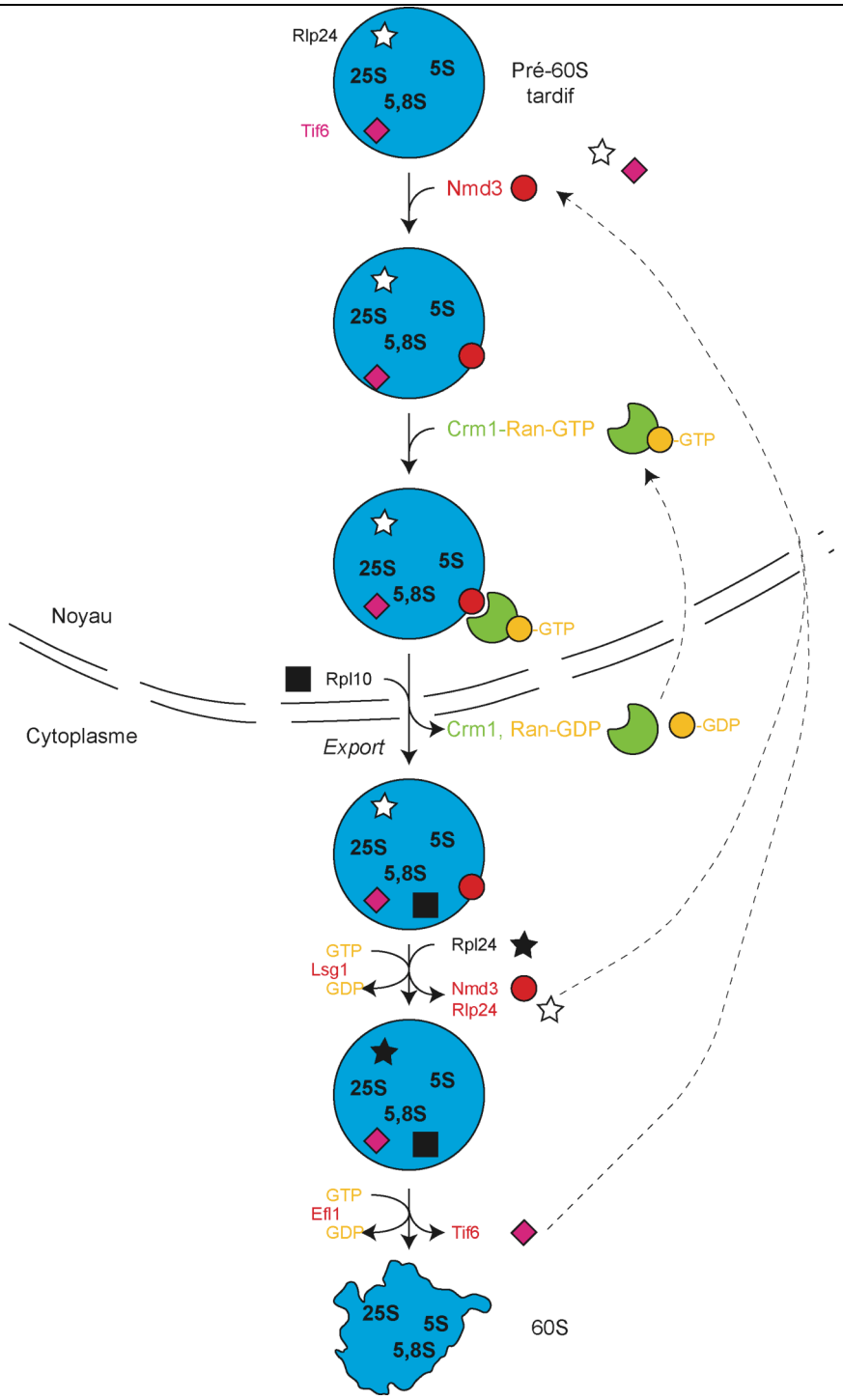


Figure 33 : Mécanisme d'export et fin de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique. L'export des particules pré-60S vers le cytoplasme requiert l'adaptateur Nmd3 (en rouge) qui fournit le NES. Le cargo est alors pris en charge par l'exportine Crm1 (en vert) liée à Ran-GTP (en orange), qui assurent le transport au travers du complexe de pore nucléaire. Une fois dans le cytoplasme, l'activité GTPase de Ran (activée par RanGAP) conduit à la dissociation entre le cargo et l'exportine, qui est alors recyclée. Le décrochage de Nmd3 de la particule (Hedges et al., 2005), ainsi que d'un autre facteur navette, Rlp24 (Fromont-Racine, M., données préliminaires non publiées), nécessiterait l'action de la GTPase Lsg1. La GTPase Efl1 participerait à la dissociation du facteur navette Tif6 (Senger et al., 2001). Enfin, sur ce schéma ont été représentées en noir deux protéines ribosomiques tardives, Rpl10 et Rpl24.

Le recyclage des facteurs exclusivement nucléaires/nucléolaires ne nécessite pas réellement de mécanismes particuliers ; par contre, pour les facteurs navettes, qui subissent l'export vers le cytoplasme avec les particules pré-ribosomiques, chaque participation à un nouveau cycle de biogenèse nécessite l'import vers le noyau par des karyophérines. Le mécanisme est alors relativement similaire à celui mis en jeu pour l'import des protéines après leur traduction. Cependant, quelques détails spécifiques au recyclage de ces facteurs navettes méritent d'être mentionnés :

3.3.1.1. Le décrochage des facteurs navettes

Le décrochage de plusieurs facteurs navettes des particules semble être, non pas un processus passif, une fois leur rôle dans la biogenèse effectué, mais un processus nécessitant l'intervention d'autres facteurs. Deux GTPases cytoplasmiques notamment sont impliquées dans ces événements (Figure 33) : Lsg1 d'une part, qui participe au décrochage de l'adaptateur Nmd3 (Hedges et al., 2005) et probablement aussi de Rlp24 (Fromont-Racine M., résultats non publiés) ; Efl1 d'autre part, qui participe au décrochage de Tif6 (Senger et al., 2001).

3.3.1.2. La nature du signal d'import

Le seul décrochage des facteurs pré-ribosomiques de la particule n'est pas nécessairement suffisant pour leur import. Comme ceci sera décrit dans la section Résultats, partie 4, dans le mutant *rei1Δ*, les facteurs navettes Arx1 et Alb1 se décrochent effectivement mais ne retournent pas au noyau, bien qu'ils soient capables d'interagir avec l'importine Kap121. L'import de ces facteurs vers le noyau nécessite donc probablement un signal supplémentaire qui leur est fourni (via Rei1) à la fin de la biogenèse. La nature de ce co-signal d'import est encore inconnue ; il pourrait s'agir de l'association ou de la dissociation d'une autre protéine, ou bien d'une modification post-traductionnelle réversible, comme une phosphorylation.

3.3.2. Le modèle de l' « opercule fraîcheur »

Les événements moléculaires qui marquent la transition entre les particules pré-ribosomiques immatures et les sous-unités ribosomiques matures pouvant entrer dans la traduction sont encore assez peu décrits. Il est cependant probable qu'un mécanisme agit en tant qu' « opercule fraîcheur », séparant nettement les pré-ribosomes des ribosomes.

Une des manières d'essayer de mieux comprendre cette transition est de caractériser les derniers facteurs pré-ribosomiques présents sur les particules dans le scénario d'assemblage des pré-ribosomes. Le départ du (ou des) dernier(s) facteur(s) pré-ribosomiques pourrait constituer le signal indiquant que la maturation est terminée.

Dans le cas de la grande sous-unité ribosomique, un bon candidat à ce rôle est le facteur pré-60S Tif6. Impliqué dans la voie de maturation des particules pré-60S depuis le nucléole, ce facteur est également caractérisé pour ses propriétés inhibitrices de l'association entre les sous-unités ribosomiques. En fin de biogenèse, la GTPase Efl1 participe à la dissociation de Tif6 des particules pré-60S, ce qui pourrait constituer le signal d'entrée des sous-unités 60S dans la traduction. Cependant, ce modèle est encore hypothétique, et des données supplémentaires concernant l'ordre d'assemblage et de dissociation des derniers facteurs pré-ribosomiques sont nécessaires. Une partie des travaux présentés dans la section Résultats, partie 4, aborde cette question, et montre qu'elle est en réalité directement liée à la question du recyclage des facteurs navettes vers le noyau.

3.4. Dégradation des particules pré-ribosomiques

Au cours de la biogenèse, certains complexes pré-ribosomiques peuvent subir des erreurs de maturation des ARNr ou d'assemblage ; de tels complexes sont particulièrement

abondants dans les mutants de la biogenèse des ribosomes, mais peuvent également, dans des proportions moindres, être rencontrés dans des conditions physiologiques. Il est probable que ces particules pré-ribosomiques mal assemblées soient reconnues par des systèmes spécifiques, et éliminées, afin d'éviter leur accumulation dans les cellules.

Des données récentes montrent que les ARN immatures de ces complexes sont pris en charge dans le noyau par les complexes TRAMP4 et 5 (Trf4-5/Air1-2/Mtr4 Polyadenylation complex), et orientés vers une dégradation par l'exosome dans un foyer nucléolaire, le No-body (Houseley et Tollervey, 2005 et Dez C. et al, en préparation). Le devenir des protéines contenues dans ces complexes reste encore à découvrir. Par ailleurs, aucune donnée n'existe à l'heure actuelle sur le devenir des particules pré-ribosomiques bloquées à des stades cytoplasmiques.

RESULTATS

Poursuivie
la luciole s'abrite
dans un rayon de lune
Ôshima Ryôta

Les travaux présentés ici s'attachent à caractériser fonctionnellement de nouveaux facteurs impliqués dans la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique. En plus des caractérisations « classiques » de ces facteurs, l'originalité de cette étude est de s'intéresser à leur dynamique tout au long de la voie métabolique. Ainsi, les parties 1 et 3 tentent de replacer les facteurs pré-ribosomiques dans le scénario d'assemblage de la sous-unité 60S. La partie 2 concerne la caractérisation d'un facteur pré-60S très conservé sur le plan évolutif, Nsa2 ; nous montrons que la stabilité de ce facteur est corrélée à l'activité de la biogenèse des ribosomes. La partie 3 est dédiée à la description d'une nouvelle approche permettant d'étudier l'ordre d'association des facteurs pré-ribosomiques. Cette technique, fondée sur le couplage entre purifications par affinité en tandem et SILAC, est ici mise en application pour l'étude du couple de facteurs pré-60S Nog1-Nsa2. Enfin, la partie 4 se penche sur les mécanismes de recyclage des derniers facteurs pré-ribosomiques à la fin de la biogenèse, et sur les événements moléculaires marquant la transition avec l'entrée des sous-unités matures dans la traduction.

Les principaux résultats constituant le corps des parties 1, 2 et 4 ont été publiés (Saveanu et al., 2003), ou sont en voie de l'être (Lebreton et al., 2006b; Lebreton et al., 2006a) ; ils figurent ici sous une forme résumée. Les articles correspondants peuvent être consultés dans les annexes à ce volume (Articles 1, 2 et 3). Les données de la partie 3 s'intègrent à une étude menée à plus grande échelle dans le laboratoire, avec plusieurs couples de facteurs différents, et feront l'objet d'une publication ultérieure (Saveanu et al., en préparation). Un certain nombre de travaux connexes, réalisés au cours de ces études, viennent s'ajouter ici pour compléter les données ou apporter des informations nouvelles, et sont décrits plus en détail.

1. Assemblage séquentiel des protéines sur les particules pré-60S

Au début des années 2000, les premières purifications par affinité en tandem réalisées avec des facteurs pré-ribosomiques comme appâts avaient révélé l'existence d'autre facteurs pré-ribosomiques insoupçonnés jusqu'alors. Ainsi, l'unité GIM de l'Institut Pasteur avait pu mettre en évidence les protéines Nog1 et Rlp24 dans les complexes associés à la GTPase Nog2, qui est impliquée dans la maturation des précurseurs d'ARNr 27SB et 7S à des étapes nucléaires (Saveanu et al., 2001). Nog1 est également une petite protéine G nucléaire-nucléolaire, et Rlp24 est un facteur pré-60S à doigts de zinc, homologue de la protéine ribosomique Rpl24.

La conservation des paires de facteurs Rlp24/Rpl24 dans tout le règne Eucaryote nous a conduit à explorer plus profondément le rôle de ce duo dans la biogenèse des ribosomes (Saveanu et al., 2003). En utilisant des mutants de Nog1, qui bloquent la maturation et l'export des particules pré-60S, nous avons montré que Rlp24 faisait la navette entre le noyau et le cytoplasme, alors que Rpl24 apparaissait strictement cytoplasmique. Toutefois, les mutants utilisés bloquent à la fois la maturation et l'export des particules pré-ribosomiques ; ces expériences ne permettent donc pas d'exclure une association de Rpl24 aux particules pré-60S à un stade tardif de maturation dans le noyau, après le point d'action de Nog1.

En réprimant l'expression des gènes *NOG1* et *RLP24*, nous avons observé que ces deux facteurs étaient nécessaires pour la même étape de maturation des ARNr : le clivage du précurseur 27SB dans l'ITS2, pour former les intermédiaires 25,5S et 7S (clivage C_2). Ce blocage de la maturation se traduit par une accumulation nucléolaire des précurseurs d'ARNr, à la différence des effets de la répression de *NOG2*, qui entraînent une accumulation de particules pré-ribosomiques immatures dans le nucléoplasme.

La composition en protéines et en précurseurs d'ARNr des complexes associés à Nog1-TAP et Rlp24-TAP est cohérente avec ces données : du point de vue des ARN, ces complexes sont enrichis en $27SA_2$, $27SA_3$, 27SB et 7S, c'est-à-dire en précurseurs d'ARNr de la grande sous-unité ribosomique. Notamment, les ARNr 27SB et 7S sont respectivement le substrat et le produit du clivage C_2 ; leur enrichissement était donc attendu pour des protéines impliquées à ce stade de maturation. Du point de vue protéique, les complexes contiennent, en plus des protéines ribosomiques, un certain nombre de facteurs pré-60S connus, ainsi que quatre autres protéines jusqu'alors non identifiées dans de tels complexes : l'hélicase pré-60S Dbp7, et les facteurs non caractérisés Vps75, Yil096c et Yor252w.

Au-delà de la caractérisation fonctionnelle de Nog1 et Rlp24 comme facteurs pré-60S, nous avons souhaité replacer ces facteurs dans le scénario d'assemblage de la grande sous-unité ribosomique. Pour ceci, nous avons réalisé une série d'expériences de purifications par affinité en tandem dans des conditions sauvages ou mutantes, afin de déterminer quels étaient les facteurs essentiels pour l'assemblage des autres protéines aux complexes pré-60S. Nous partons pour ceci du postulat que, lorsqu'on réprime un gène dont le produit est nécessaire pour une étape donnée de la biogenèse des ribosomes, les facteurs s'associant aux particules pré-60S en aval de cette étape ne pourront plus le faire. Les résultats de ces travaux montrent que (*i*) Ssf1 quitte la particule avant l'arrivée de Nog2, ou en même temps, (*ii*) Nog2 n'est pas nécessaire à l'association de Nog1 et Rlp24 et (*iii*) Nog1 est nécessaire à l'association de Nog2, mais pas à celles de Mak11, Ssf1 ou Rlp24. Nous avons pu en déduire un schéma de l'ordre d'intervention de ces facteurs dans la biogenèse, resitué par rapport aux événements de maturation des ARNr et à leur localisation au sein du noyau (Figure 36).

Enfin, nous avons montré que Nog1 et Rlp24 étaient des partenaires physiques et fonctionnels directs. En effet, la surexpression de *NOG1* complémente le phénotype de croissance lente d'une souche exprimant *RLP24-TAP*. De plus, Nog1 et Rlp24 interagissent

en double hybride, et les protéines recombinantes GST-Rlp24 et Nog1 peuvent être co-purifiées *in vitro*. L'association de Nog1 aux particules pré-ribosomiques se fait donc probablement par le biais d'une interaction directe avec Rlp24.

L'ensemble de ces travaux a conduit à la caractérisation du rôle de deux nouveaux facteurs pré-60S, Nog1 et Rlp24, dans une étape de maturation de la grande sous-unité ribosomique localisée dans le nucléole, et critique pour l'établissement du clivage C_2. Nous avons montré que Nog1 et Rlp24 interagissaient directement, et enfin, nous avons pu replacer ces facteurs dans le scénario d'assemblage de la sous-unité 60S, par rapport à deux facteurs « précoces » : Ssf1 et Mak11, et à un facteur plus tardif : Nog2.

2. Nsa2, un facteur pré-60S extrêmement conservé, étroitement régulé, nécessaire au clivage de l'ITS2

Suite à la caractérisation de Nog1 comme facteur pré-60S impliqué dans le clivage de l'ITS2, nous avons souhaité approfondir l'étude de cette GTPase en caractérisant ses partenaires fonctionnels au cours de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique (Lebreton et al., 2006a).

Nous avons identifié la protéine Nsa2, étroitement liée à Nog1. Du point de vue physique, Nsa2 et Nog1 interagissent en double hybride (Annexe 2, Figure 1B). Nsa2 est également capable d'interagir avec des mutants de Nog1 bloqués sous forme liée au GTP ou au GDP, ou avec les 160 premiers acides aminés de Nog1, situés avant le site de liaison au GTP de la protéine (Figure 34). Du point de vue fonctionnel, la surexpression de *NSA2* est capable de compenser les phénotypes thermosensibles ou de croissance ralentie de plusieurs mutants de *NOG1* obtenus par mutagenèse aléatoire (Annexe 2, Figure 1A).

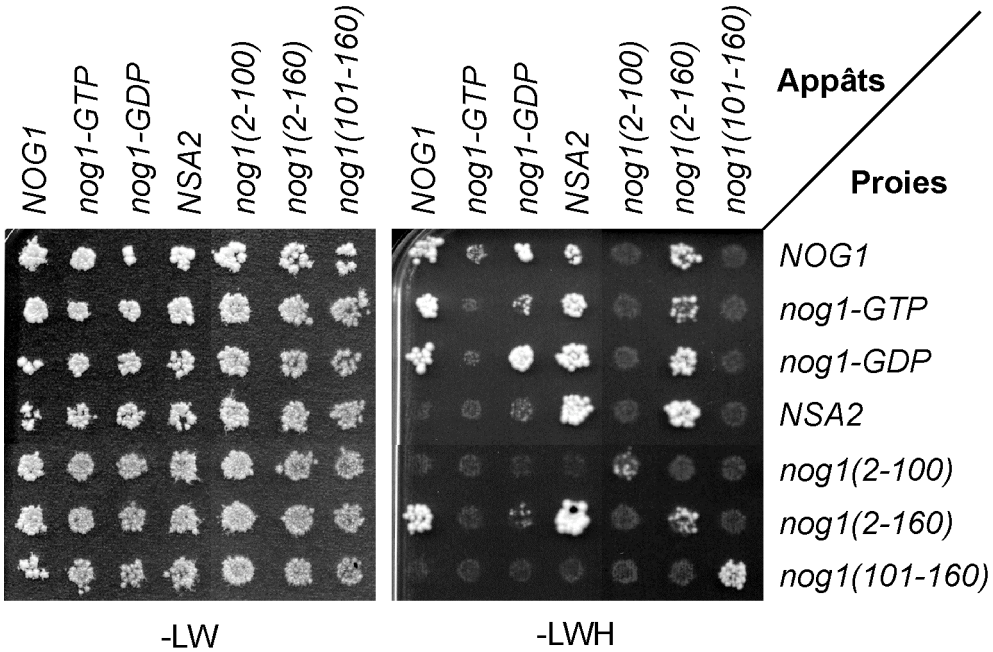


Figure 34 : Nog1 et Nsa2 interagissent en double hybride. *NSA2*, *NOG1* et des mutants de *NOG1* ont été clonés dans les vecteurs de double hybride appât (pAS2ΔΔ) et proie (pAct2st) par la stratégie Gateway®. La souche CG1945 transformée par les vecteurs appâts a été croisée avec la souche Y187 transformée par les vecteurs proies. Les diploïdes ont été sélectionnés sur milieu sans leucine ni tryptophane (-LW). Les couples appât/proie montrant une interaction ont été sélectionnés sur milieu sans leucine, tryptophane ni histidine (-LWH). Pour les versions tronquées de Nog1, les chiffres entre parenthèses indiquent la position acides aminés par rapport à la séquence de la protéine entière. Ainsi, par exemple, l'appât *NSA2* interagit avec les proies *NSA2*, *NOG1*, *nog1-GTP* et *–GDP*, ainsi qu'avec un fragment comprenant les 160 premiers acides aminés de Nog1. Les vecteurs exprimant des fragments de Nog1 au-delà du résidu 160 n'ont pas été inclus, car ils présentaient un phénotype auto-activateur.

Par ailleurs, les défauts de biogenèse des ribosomes observés en l'absence de Nsa2 sont similaires à ceux observés en l'absence de Nog1 (Annexe 2, Figure 3B). Ces deux protéines sont donc requises pour la maturation de l'intermédiaire d'ARNr 27SB en ARNr 25S et 5,8S matures. Le rôle de Nsa2 dans l'étape de clivage C_2 de l'ITS2 est confirmé par le

fort enrichissement des intermédiaires d'ARNr 27SB, 7S et 25,5S dans les complexes co-purifiés avec Nsa2-TAP (Annexe 2, Figure 3C). En effet, ces intermédiaires sont le substrat et les produits du clivage C_2.

Par des expériences de gradients de saccharose permettant de détecter Nog1-TAP ou Nsa2-TAP dans des conditions mutantes pour *NSA2* ou *NOG1* respectivement, nous avons montré que Nsa2 intervenait après Nog1 dans l'assemblage de la grande sous-unité ribosomique (Annexe 2, Figure 4).

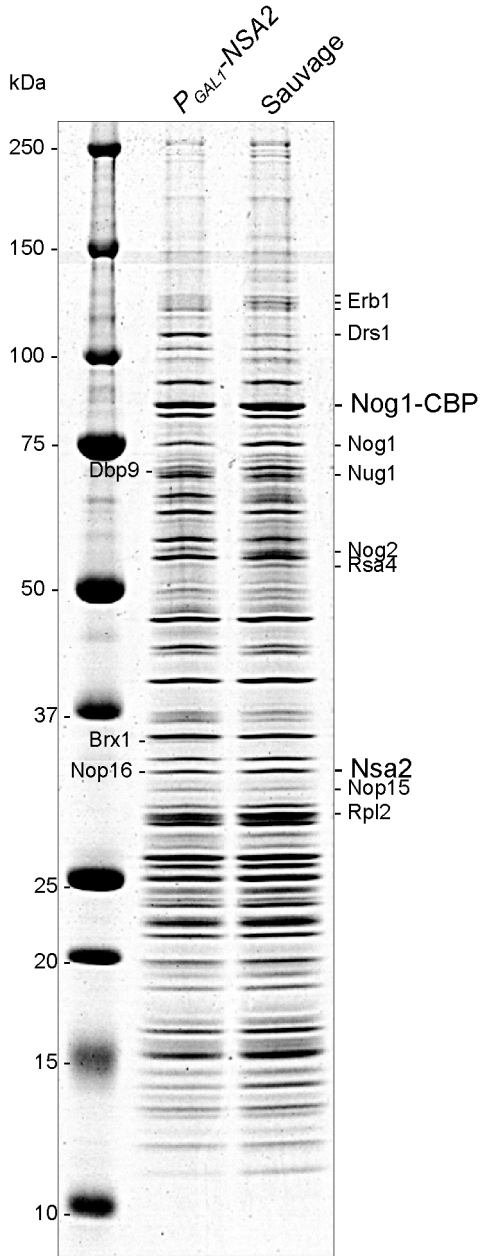


Figure 35 : Purification par affinité en tandem du complexe associé à Nog1-TAP en présence ou en absence de Nsa2. Les complexes associés à Nog1-TAP ont été purifiéspar la technique TAP classique, à partir de cultures de 4 litres de souches sauvage ou P_{GAL1}-*NSA2*, cultivées pendant 16 heures en milieu YPD (*NSA2* est alors réprimé dans le mutant). Après électrophorèse sur gel d'acrylamide (4-20% en gradient) dénaturant, le gel a été coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les protéines contenues dans les bandes d'intérêt ont été identifiées par spectrométrie de masse.

En purifiant des complexes pré-ribosomiques associés à Nog1-TAP dans des conditions où *NSA2* est réprimé (Figure 35 et Annexe 2, Figure 5), nous avons pu replacer le point d'action de Nsa2 par rapport à d'autres facteurs pré-60S : il se situe après l'ancrage de Nog1 et Nop7 (donc également, de Mak11, Rlp24 et Ssf1), et avant l'association de Nog2 aux particules pré-60S (Figure 36).

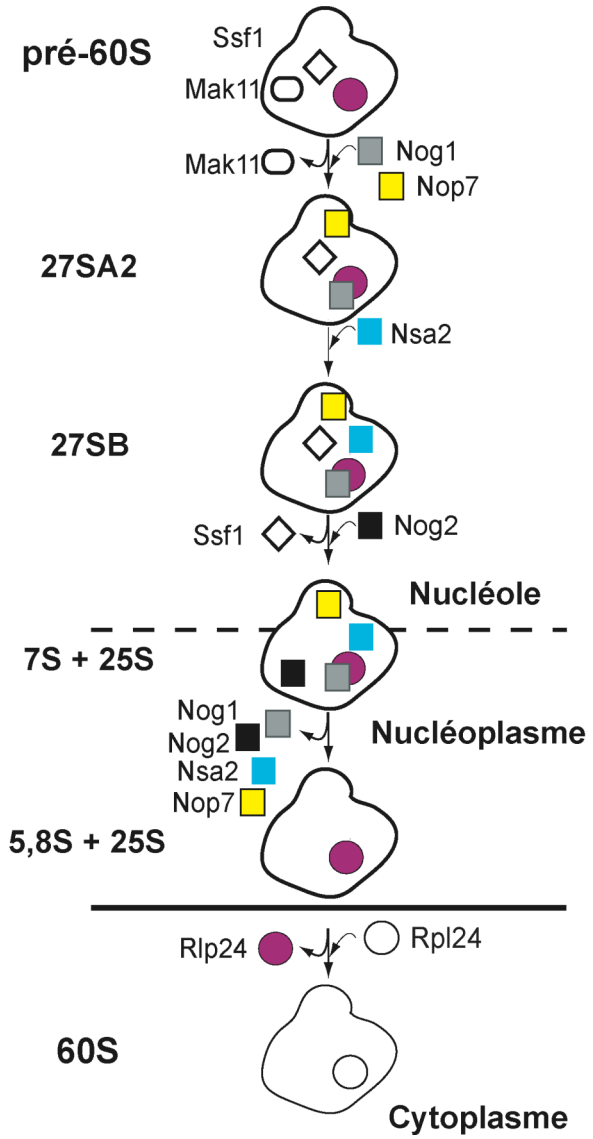


Figure 36 : Scénario d'assemblage de la grande sous-unité ribosomique. L'ordre d'association et de dissociation des facteurs pré-60S considérés ici a été établi pour ce schéma d'après les données des parties 1 et 2 (Lebreton et al., 2006a; Saveanu et al., 2003).

Nous avons également montré que Nsa2 était un facteur pré-ribosomique particulièrement instable. De durée de vie courte dans des conditions physiologiques (Annexe 2, Figure 7), cette protéine disparaît en outre des cellules lorsque la biogenèse des ribosomes est bloquée en amont de son point d'action (Annexe 2, Figures 4 et 6). Cette caractéristique de Nsa2 peut être rapprochée de celles de ses homologues chez les Eucaryotes supérieurs. En particulier, l'homologue humain, TinP1, est produit à partir d'un gène surexprimé en réponse au TGFß (Zhang, J.S. et Smith, D.I., données non publiées), et localisé dans un territoire chromosomique lésé chez un certain nombre de patients atteints de leucémie à tricholeucocytes (Wu et al., 1999). L'ensemble de ces données suggère que les régulations de *TINP1* sont très strictes, et corrélées à la capacité de prolifération cellulaire. De plus,

l'expression de *TINP1* chez la levure est capable de complémenter partiellement l'absence de Nsa2 (Annexe 2, Figure 2B) ; les deux protéines sont par conséquent orthologues. Par analogie avec Nsa2, le rôle de TinP1 dans la prolifération cellulaire pourrait donc être lié à une fonction dans la biogenèse des ribosomes.

Enfin, des données de double hybride suggèrent que Nsa2 pourrait occuper, sur les particules pré-60S, une position correspondant à l'épaule droite de la grande sous-unité ribosomique mature (Figure 37). En effet, les protéines ribosomiques Rpl4, Rpl15 et Rpl18, dont les homologues procaryotes sont localisées à cet endroit, ont été trouvées comme proies de Nsa2 au cours d'un crible double hybride génomique.

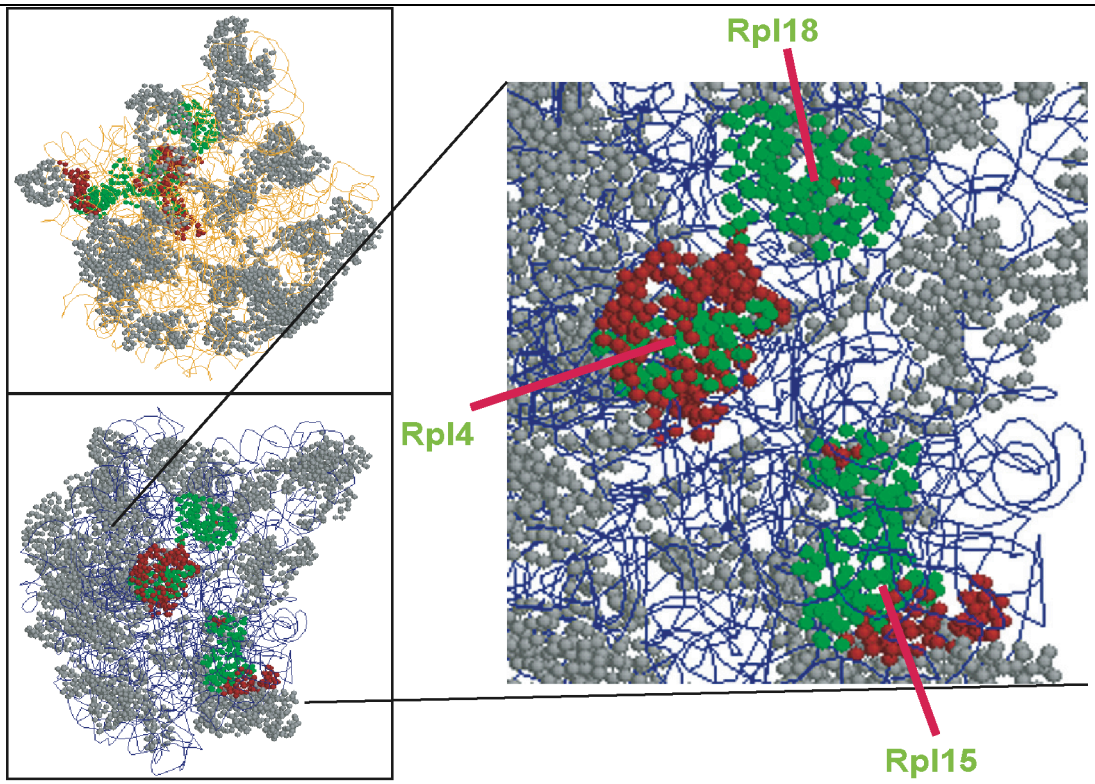


Figure 37 : Position hypothétique de Nsa2 sur les particules pré-60S. Sur la structure de la grande sous-unité ribosomique de *H. marismortui*, les homologues des protéines Rpl4, 15 et 18 de levure ont été colorés en rouge. Les portions de ces protéines correspondant au domaine minimal d'interaction défini à partir des résultats de double hybride sont colorées en vert.

Ces travaux ont conduit à l'identification d'un partenaire physique et fonctionnel de la GTPase Nog1, Nsa2. Ce facteur, essentiel pour la maturation des précurseurs d'ARN 27SB à la sortie du nucléole, est extrêmement conservé au cours de l'évolution. La stabilité de ce facteur est de plus régulée en fonction de l'activité de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique. L'ensemble de ces données font de Nsa2 un facteur clé de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique. Etant donné qu'un grand nombre de mutants de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique se traduisent par des défauts de maturation dans l'ITS2, Nsa2 constitue un bon candidat pour centraliser des signaux de contrôle à cette étape.

3. Ordre d'assemblage des facteurs pré-60S : l'approche SILAC

Les résultats présentés dans les parties 1 et 2 montrent que la purification de complexes dans des conditions sauvages ou mutantes, et la comparaison des compositions protéiques de ces échantillons, permettent de replacer l'ordre d'assemblage de certains facteurs pré-60S dans le scénario de maturation de la grande sous-unité ribosomique. Cependant, ces études se sont rapidement heurtées à des limites techniques, que les complexes soient analysés par spectrométrie de masse ou par western blot.

3.1. Limites techniques de l'analyse de l'ordre d'assemblage des facteurs pré-60S par chromatographie d'affinité en tandem

La comparaison d'échantillons protéiques par spectrométrie de masse devient rapidement limitante en raison de son caractère qualitatif et non quantitatif. Les complexes purifiés dans des conditions sauvages ou mutantes, lorsqu'ils existent, présentent en général des profils très semblables sur gels d'acrylamide dénaturants colorés en bleu de Coomassie après éléctrophorèse monodimensionnelle (voir par exemple la Figure 5 de Lebreton et al., 2006a). L'électrophorèse bi-dimensionnelle, pour sa part, est actuellement peu performante pour séparer les constituants très basiques de ces complexes. La plupart des changements dans la composition des complexes n'est pas détectable à l'œil nu sur les gels en gradient. En effet, la majorité des bandes visibles sur les gels contient plusieurs protéines distinctes ; l'apparition ou la disparition d'une protéine dans une de ces bandes passe donc en général inaperçue. Lors de l'analyse des spectres de masse, une variation des quantités d'une protéine donnée dans les échantillons ne se traduit pas nécessairement par une variation comparable de l'intensité des pics correspondant aux peptides issus de cette protéine ; en effet, les échantillons étant traités séparément, les résultats ne sont pas comparables du point de vue quantitatif, en particulier en raison d'efficacités variables des digestions à la trypsine. Par ailleurs, les identifications ne sont pas exhaustives. Le fait de ne pas retrouver une protéine dans les spectres ne constitue donc pas un argument recevable pour conclure qu'elle est absente de l'échantillon de départ.

L'analyse des échantillons par immunodétection permettrait de résoudre certains de ces problèmes, en visualisant des accumulations ou des pertes spécifiques de certains facteurs. Cependant, nous sommes limités dans cette étude par le nombre d'anticorps dirigés contre des facteurs pré-60S ou des protéines ribosomiques disponibles ; par ailleurs, le temps nécessaire pour détecter l'ensemble de ces facteurs par western blot serait considérable.

3.2. Principe du SILAC

Afin de résoudre ces problèmes techniques, nous avons décidé de coupler nos purifications par affinité en tandem à la technique de SILAC, qui permet d'analyser par spectrométrie de masse deux échantillons protéiques en même temps, et ainsi de les comparer du point de vue quantitatif. Cette technique, mise au point dans le laboratoire de M. Mann (Ong et al., 2002), a été adaptée dans l'unité de Génétique des Interactions Macromoléculaires par C. Saveanu (Lebreton et al., en préparation) afin d'étudier les variations de compositions protéiques de complexes purifiés dans des conditions sauvages ou mutantes. J'ai par la suite utilisé cette technique pour l'étude du couple de facteurs pré-60S Nog1/Nsa2.

Le principe du SILAC (Figure 38) consiste à cultiver les deux souches à comparer dans des milieux différents : l'une d'elle (par exemple, la souche mutante *NOG1-TAP*, P_{GAL1}-*NSA2*) est cultivée pendant 16 heures en milieu synthétique complet contenant de la leucine normale, alors que l'autre (par exemple, la souche sauvage *NOG1-TAP*) est cultivée dans un milieu équivalent, mais contenant de la leucine deutérée. Ainsi, toutes les protéines provenant

de la souche sauvage sont marquées à la leucine deutérée en lieu et place de la leucine normale.

Ces cultures sont utilisées pour des expériences de purification par affinité en tandem selon le protocole habituel (Rigaut et al., 1999). Les deux échantillons purifiés sont mélangés et séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes. Toutes les bandes colorées en bleu de Coomassie sont découpées des gels obtenus ; les protéines en sont extraites, clivées à la trypsine porcine et analysées par spectrométrie de masse.

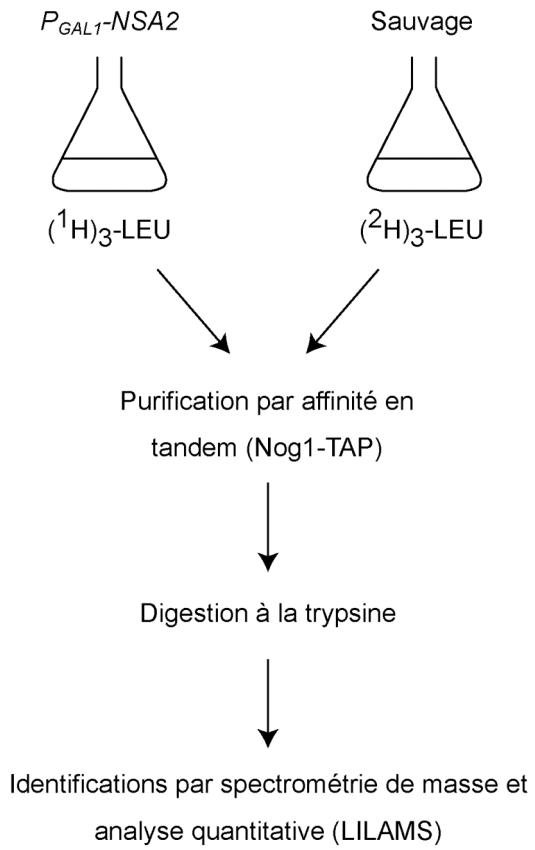


Figure 38 : Principe du SILAC couplé à la chromatographie d'affinité en tandem.

Cette technique permet de comparer directement les quantités des protéines identifiées provenant de chaque échantillon. En effet, un peptide issu de la digestion trypsique contenant une leucine deutérée a une masse de 3 Da supérieure à celle du même peptide contenant une leucine normale ; ainsi, le pic deutéré est déplacé de 3 unités vers la droite du spectre de masse obtenu. La Figure 39 montre quelques exemples de spectres obtenus pour les complexes associés à Nog1-TAP purifiés en contexte sauvage ou en répression de *NSA2*. Ici, la souche sauvage a été cultivée en présence de leucine deutérée ; tous les peptides choisis contenaient deux leucines, entraînant une différence de 6 Da dans les pics entre les échantillons mutant et sauvage. En quantifiant le rapport (intensité en leucine normale)/(intensité en leucine deutérée) pour chaque peptide, nous pouvons déduire le rapport mutant/sauvage pour chaque protéine analysée dans les complexes.

Pour chaque protéine, l'existence de plusieurs peptides contenant une ou plusieurs leucines permet d'obtenir une valeur moyenne des rapports entre le mutant et le sauvage. L'expérience a été reproduite en cultivant cette fois la souche mutante en milieu contenant de la leucine deutérée.

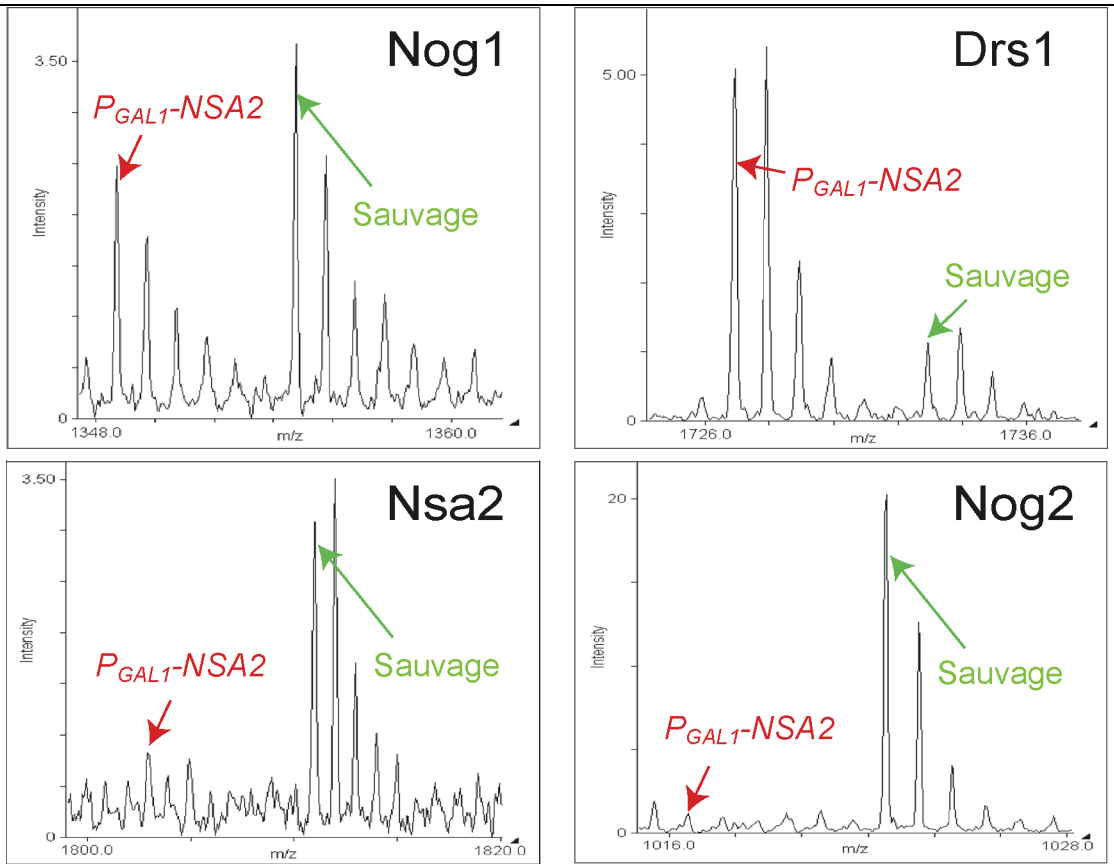


Figure 39 : Quelques exemples de spectres de masse obtenus avec la technique de SILAC. Les quatre spectres présentés correspondent à des peptides issus de la digestion trypsique de Nog1, Drs1, Nsa2 et Nog2, identifiés dans les complexes associés à Nog1-TAP dans des conditions sauvages ou mutantes (répression de *NSA2* par culture d'une souche P_{GAL1}-*NSA2* en milieu contenant du glucose). La souche sauvage a été cultivée en présence de leucine deutérée. Chacun des peptides analysés ici contenait deux leucines ; les pics correspondant à la souche sauvage sont donc décalés de 6 unités vers la droite par rapport aux pics observés pour la souche mutante. Dans le mutant, on observe bien la disparition de Nsa2, ainsi que celle de Nog2. Drs1, au contraire, s'accumule. Nog1-TAP est, en théorie, en quantités comparables dans les deux échantillons ; les différences observées ici entre le sauvage et le mutant impliquent une normalisation ultérieure des données.

3.3. Résultats obtenus pour le couple Nog1-TAP/NSA2

Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport aux valeurs trouvées pour la protéine appât, Nog1-TAP, qui doit en théorie se retrouver en quantités équivalentes dans le sauvage et dans le mutant. Ils sont présentés Figure 40 : pour chaque protéine, les rapports mutant/sauvage obtenus dans deux expériences distinctes ont été reportés en abscisse ou en ordonnée. L'alignement de la plupart des points sur la diagonale suggère que la méthode est relativement reproductible.

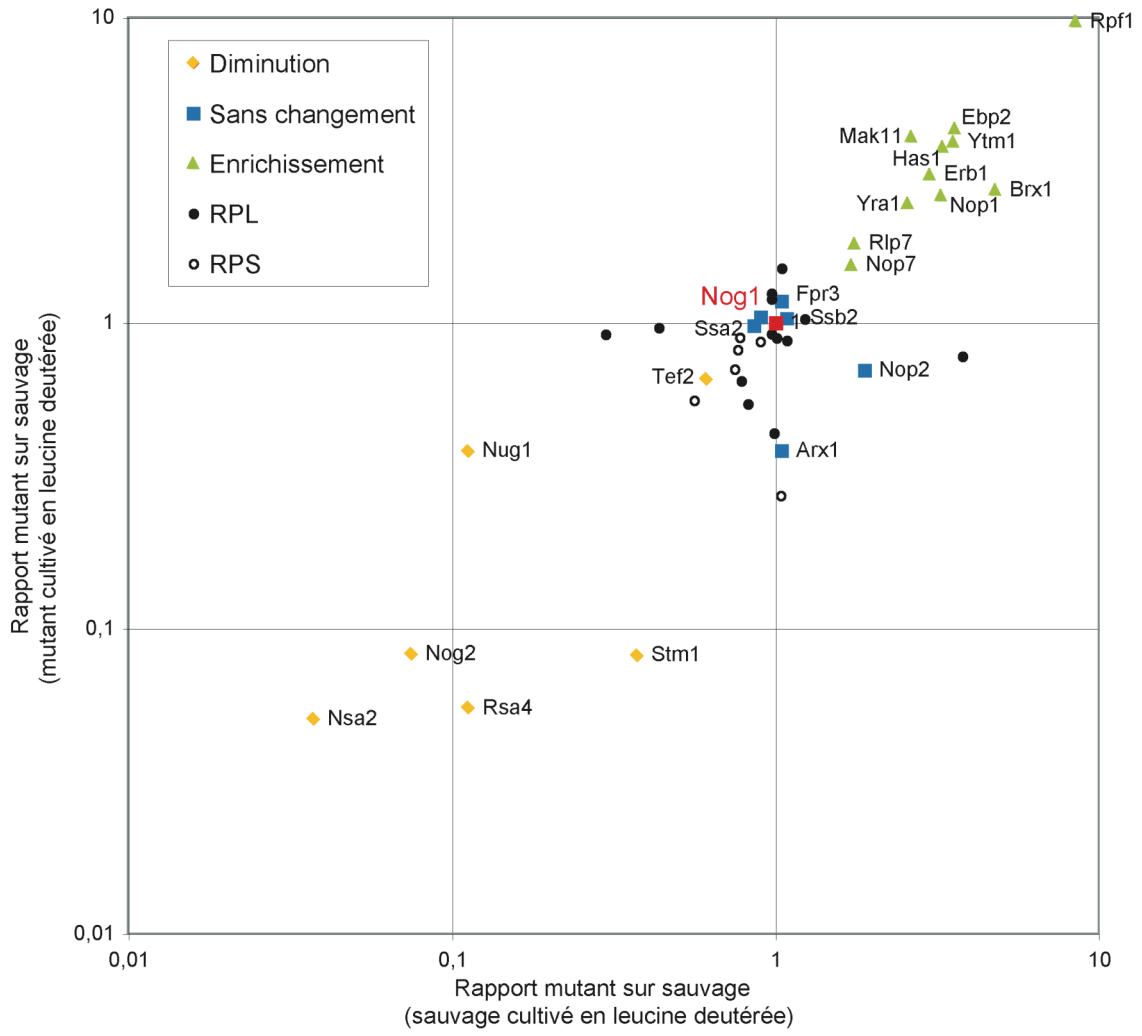


Figure 40 : Identification des facteurs s'associant aux complexes Nog1-TAP de façon précoce ou tardive, par rapport au point d'action de Nsa2. La purification des complexes associés à Nog1-TAP a été réalisée à partir d'une souche sauvage cultivée pendant 16 heures en milieu synthétique complet contenant de la leucine deutérée, ou d'une souche P_{GAL1}-*NSA2* cultivée pendant 16 heures en milieu synthétique complet contenant de la leucine normale (*NSA2* est alors réprimé). Les deux échantillons ont été mélangés, et leurs constituants protéiques séparés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide (4%-20% en gradient), dans des conditions dénaturantes. Les protéines contenues dans chaque bande colorée au bleu de Coomassie ont été identifiées avec un spectromètre de masse Voyager DE-STR MALDI-TOF. Pour chaque peptide analysé, les rapports (intensité pour la souche mutante/intensité pour la souche sauvage) ont été déterminés, grâce au logiciel LILAMS développé par C. Saveanu. Ces résultats ont été normalisés par rapport à ceux obtenus pour l'appât Nog1, pour lequel nous avons fixé le rapport à 1. L'expérience a été reproduite avec de la leucine normale pour la souche sauvage et de la leucine deutérée pour la souche mutante. Le graphe récapitule ces résultats: chaque protéine a pour coordonnées les rapports (sauvage/mutant) obtenus pour chacune des expériences. ■, appât Nog1; ■, protéines en quantités équivalentes dans les deux échantillons; ▲, protéines enrichies lorsque *NSA2* est réprimé; ◆, protéines perdues dans les complexes en l'absence de Nsa2; ●, protéines ribosomiques de la grande sous-unité; ○, protéines ribosomiques de la petite sous-unité.

Ces résultats nous permettent de distinguer plusieurs catégories de protéines :

(*i*) Des protéines présentes en quantités comparables dans les échantillons purifiés en conditions mutante ou sauvage. Ce groupe comprend la plupart des protéines ribosomiques de la grande sous-unité, qui sont probablement déjà présentes sur les complexes pré-60S avant l'arrivée de Nog1, et sont donc stoechiométriques à Nog1 dans tous les complexes associés à ce facteur. Le cas des facteurs Arx1 et Nop2 est plus difficile à traiter, en raison de la faible reproductibilité des données les concernant. Nous pensons que ces facteurs pourraient être associés de manière instable aux complexes pré-60S, ou bien s'associer en même temps que Nsa2, ce qui pourrait biaiser les résultats.

(*ii*) Des protéines présentes en quantités plus faibles dans les complexes purifiés en conditions mutantes que dans ceux purifiés en conditions sauvages. Parmi ces protéines, nous trouvons la protéine Nsa2 dont le gène est réprimé, ainsi que des facteurs supposés se lier aux complexes pré-60S après l'intervention de Nsa2. C'est le cas des GTPases Nog2 (Saveanu et al., 2001; Saveanu et al., 2003) et Nug1 (Bassler et al., 2001), qui sont nécessaires à des étapes nucléoplasmiques de maturation des particules pré-60S, juste avant leur export vers le cytoplasme. Rsa4 est un facteur pré-60S (de la Cruz et al., 2005) présent, d'après la compilation des données de purifications par affinité en tandem, dans des complexes pré-60S relativement tardifs (Fromont-Racine et al., 2003).

Les contaminants usuels des purifications TAP sont retrouvés à l'interface des catégories (*i*) et (*ii*). Il s'agit de protéines que nous identifions dans la quasi-totalité des purifications par affinité en tandem réalisées, quelques soient les appâts utilisés (y compris des appâts appartenant à des voies métaboliques très distinctes). Nous retrouvons systématiquement un certain nombre de protéines très abondantes dans la cellule, et en particulier des protéines impliquées dans la traduction ; ces protéines contaminantes sont particulièrement enrichies si elles possèdent des motifs de liaison à l'ARN. Les protéines ribosomiques de la petite sous-unité, ainsi que les facteurs Ssa1/2, Ssb1/2, Tef1/2 et probablement Stm1 appartiennent à cette catégorie.

(*iii*) Des protéines accumulées dans les complexes mutants par rapport aux complexes sauvages. Ces protéines sont probablement présentes dans des complexes pré-60S contenant Nog1 avant le point d'action de Nsa2. Nous retrouvons des facteurs pré-60S précoces déjà caractérisés (Nop1, Brx1, Rpf1, Ebp2, Erb1, Nop7, Rlp7, Mak11), ainsi que des protéines dont la position dans le scénario d'assemblage de la grande sous-unité ribosomique était jusqu'ici moins claire (Has1, Ytm1). Yra1 n'a actuellement pas de rôle connu dans la biogenèse des ribosomes, mais dans l'export des ARNm ; il pourrait s'agir d'un contaminant.

Cette technique, appliquée ici à l'étude du couple Nog1-TAP/*NSA2*, est mise en œuvre dans le laboratoire pour une série de couples protéine appât/gène réprimé jalonnant la voie de biogenèse de la grande sous-unité ribosomique. Nous avons ainsi pu affiner la connaissance de l'ordre d'association des facteurs pré-ribosomiques aux particules, et souhaitons à terme replacer un maximum d'entre-eux dans le scénario d'assemblage de la grande sous-unité ribosomique.

4. Un réseau fonctionnel impliqué dans le recyclage des facteurs pré-60S nucléo-cytoplasmiques

La fin de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique est marquée par la transition entre des particules pré-60S immatures, et des sous-unités matures, prêtes à entrer dans la traduction. Dans le cytoplasme, les derniers facteurs pré-ribosomiques, dits « navettes », sont décrochés des particules pré-60S, et réutilisés pour un nouveau cycle de biogenèse. Quelques facteurs exclusivement cytoplasmiques sont impliqués dans ce processus. Nous avons mis en évidence l'existence d'un réseau de facteurs impliqués dans ces dernières étapes cytoplasmiques (Lebreton et al., 2006b).

4.1. Étude de l'assemblage de la protéine ribosomique tardive Rpl24 sur la grande sous-unité ribosomique.

À la suite des travaux effectués sur l'assemblage séquentiel des protéines aux particules pré-ribosomiques, l'apparente homologie entre le facteur pré-ribosomique Rlp24 et la protéine ribosomique tardive Rpl24 nous laissait supposer que les deux protéines occupaient successivement la même position dans les particules pré-60S et la grande sous-unité mature, et qu'il existait un mécanisme d'échange entre Rlp24 et Rpl24 dans le cytoplasme.

Nos études pour tenter de confirmer ou d'infirmer ce modèle ont principalement porté sur trois axes : (*i*) Vérifier que Rpl24 était bien une protéine ribosomique tardive, s'associant aux particules pré-60S dans le cytoplasme, (*ii*) déterminer si Rlp24 et Rpl24 étaient mutuellement exclusives sur la particule et (*iii*) rechercher des facteurs impliqués dans la dissociation de Rlp24, l'association de Rpl24 ou l'échange entre les deux protéines.

4.1.1. Rpl24 est une protéine ribosomique tardive

Des expériences de marquage par des acides aminés tritiés suivis de chasse (Kruiswijk et al., 1978) suggéraient que Rpl24 était l'une des protéines ribosomiques s'associant les plus tardivement aux particules pré-60S. Afin de le vérifier, nous souhaitions déterminer si cette protéine était exclusivement cytoplasmique, ou passait au contraire par le noyau. Un premier élément de réponse était apporté par nos travaux de 2003 (Saveanu et al., 2003), mais nous souhaitions confirmer ceci.

Les protéines ribosomiques sont visualisées principalement dans le cytoplasme à l'état stationnaire, mais la plupart d'entre-elles s'assemblent aux particules pré-60S dans le noyau. En utilisant des mutants pour lesquels l'export des particules pré-60S est bloqué, on peut détecter une accumulation nucléaire de ces protéines précoces. En revanche, nous avons montré que ces mutants étaient sans effet sur la localisation de la protéine de fusion Rpl24-GFP, qui reste cytoplasmique (Annexe 3, Figure 2E). Nous en déduisons que Rpl24 est exclusivement cytoplasmique, et par conséquent qu'elle s'associe aux précurseurs de la grande sous-unité ribosomique aux stades les plus tardifs de la biogenèse.

Inversement, Rlp24-GFP, dont la localisation est normalement nucléaire et cytoplasmique, s'accumule dans le noyau dans ces mutants. Ces résultats confirment que Rlp24 est un facteur pré-60S faisant la navette entre le noyau et le cytoplasme.

4.1.2. Rlp24 et Rpl24 sont-elles mutuellement exclusives ?

Pour tenter de savoir si Rlp24 et Rpl24 peuvent coexister sur les mêmes particules pré-ribosomiques, nous avons purifié différents complexes associés à des protéines ribosomiques précoces (Rpl11) ou tardives (Rpl24), et recherché la présence de Rlp24 dans ces complexes par western blot (Figure 41). Contrairement à Arx1, qui est trouvée dans les deux complexes

en quantités comparables, Rlp24 est observée exclusivement dans les complexes associés à Rpl11. Il semble donc que Rpl24 s'associe aux particules pré-60S après le départ de Rlp24.

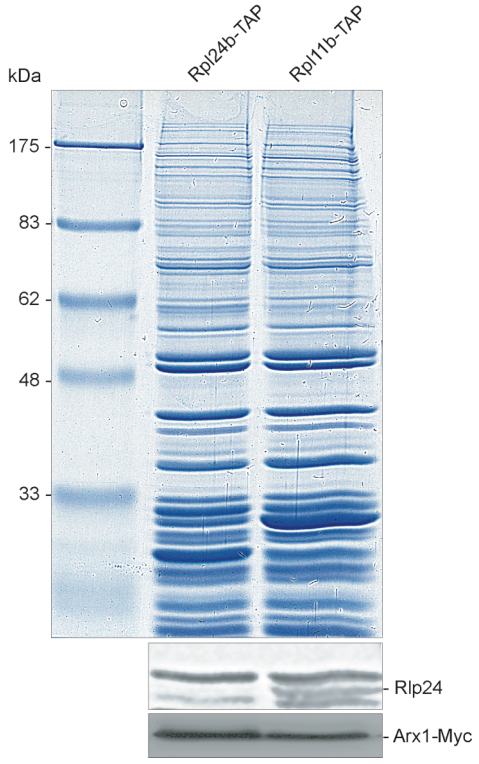


Figure 41 : Rlp24 est absent des complexes associés à Rpl24b-TAP. Les complexes associés à Rpl24b-TAP et Rpl11b-TAP ont été purifiés par chromatographies d'affinité en tandem dans des souches où Arx1 est en fusion avec un épitope Myc. Le profil des protéines co-purifiées a été analysé pas coloration au bleu de Coomassie après électrophorèse en conditions dénaturantes (en haut). Rlp24 et Arx1-Myc ont été détectés par western blot avec des anticorps spécifiques (en bas).

L'expérience inverse a été réalisée, en purifiant des complexes associés à divers facteurs pré-ribosomiques dont Rlp24, et en détectant Rpl24b fusionné à un épitope Myc. Cependant, cette expérience n'est pas concluante. En effet, Rpl24b étant une protéine ribosomique, elle est retrouvée en grande quantité dans tous les extraits de levure, et contamine tous les complexes purifiés, y compris des complexes associés à des facteurs pré-ribosomiques précoces et exclusivement nucléaires comme Ssf1.

Partant du constat que Rlp24 et Rpl24 semblaient mutuellement exclusives, nous nous sommes demandé si le décrochage de Rlp24 était conditionné par l'arrivée de Rpl24 sur les particules. Pour répondre à cette question, nous avons observé par western blot la localisation de Rlp24 dans des extraits cellulaires séparés sur gradient de saccharose, dans une souche sauvage ou dans une souche où les deux gènes *RPL24A* et *RPL24B* sont invalidés (Figure 42). Dans les deux cas, Rlp24 se retrouve principalement dans les fractions correspondant à la sous-unité 60S et aux particules pré-60S, et ne passe donc pas dans les polysomes. Nous en déduisons que Rpl24 n'est pas nécessaire au décrochage de Rlp24 des particules à la fin de la biogenèse des ribosomes.

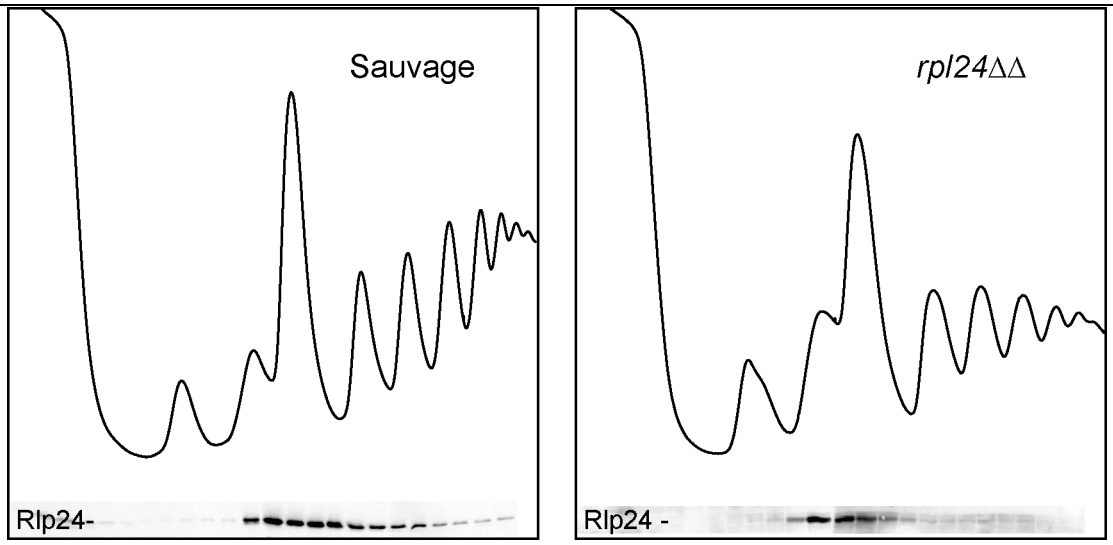


Figure 42 : Rlp24 ne passe pas dans les polysomes en l'absence de Rpl24. Des extraits cellulaires d'une souche sauvage et d'une souche où *RPL24A* et *B* ont été invalidés (*rpl24ΔΔ*) ont été séparés sur gradient de saccharose. Rlp24 a détecté par western blot dans les fractions récupérées de chacun de ces gradients.

```
                    •         20         •         40         •
Rpl24b    1 MKVEVDSFSGAKIYPGRGTLFVRGDSKIFRFQNSKSASLFKQRKNPRRIA 50
            M++    F  +  YPG G +FVR D+K FRF  SK    FKQR+NPR++
Rlp24     1 MRIYQCHFCSSPCYPGHGIMFVRNDAKEFRFCRSKCHKAFKQRRNPRKLK 50
                    •         20         •         40         •
```

Doigts de zinc de Rlp24

```
                   60         •         80         •
Rpl24b   51 WTVLFRKHHKKGITEEVAKKRS-RKTVKAQRPITGASLDLIKERRSLKPE 99
            WT  FRK   K +  +     + R+ V  +     +  L    R  +
Rlp24    51 WTKAFRKAAGKELAVDSTLTFAQRRNVPVRYNRELVATTLKAMARIEEIR 100
                   60         •         80         •        100
```

Zone d'homologie entre RLP24 et RPL24B

```
          100         •        120         •        140
Rpl24b  100 V-RK-ANREEKLKANKEKK--RAEKAARKA-EKAKSAGVQGS-KVSKQQA 143
              R+ A  + +++ NKEK   R +K      E  +   V+ + K++K+Q
Rlp24   101 QKRERAFYKNRMRGNKEKDFLRDKKLVESNPELLRIREVEIARKLAKEQE 150
                   •       120         •       140         •
                 •
Rpl24b  144 KGAFQKVAATSR------------------------------------ 155
            +         S
Rlp24   151 RAESVSEQEESEEEEDMEIDSDEEEEEQLEKQKILLKNRRRNTKKIAF 199
                  160         •       180         •
```

Queue C-terminale étendue de RLP24

Figure 43 : Domaines de Rlp24 et Rpl24 définis d'après les homologies de séquence entre les deux protéines. Chaque protéine a été subdivisée en trois domaines : une partie N-terminale, contenant deux motifs à doigts de zinc pour Rlp24, mais pas pour Rpl24 ; une partie centrale relativement conservée entre les deux protéines ; une queue C-terminale nettement plus longue pour Rlp24 que pour Rpl24. Remarque : pour Rpl24, la version choisie ici est Rpl24b, mais les séquences des deux versions Rpl24a et b sont remarquablement homologues.

Pour tenter de déterminer quels étaient les domaines de Rlp24 et Rpl24 qui orientaient plus ces protéines vers une fonction pré-ribosomique ou ribosomique, nous avons conçu des constructions permettant la production de protéines chimères. Les buts de ces constructions étaient multiples : (*i*) voir si elles pouvaient complémenter l'absence de Rlp24 ou Rpl24, (*ii*) détecter la localisation des chimères afin de mettre en évidence un éventuel NLS caractéristique de Rlp24 et (*iii*) détecter ces protéines dans des gradients de saccharose, afin de voir si les différents domaines permettaient leur association aux particules pré-60S ou aux polysomes.

Les trois domaines définis pour construire ces chimères sont représentés Figure 43. Six constructions chimères ont été réalisées par combinaisons de ces trois domaines. En tenant compte des deux gènes sauvages, nous disposons donc de huit constructions différentes. Ces constructions (décrites plus précisément en annexes) ont été introduites dans un vecteur d'expression par la technique de clonage Gateway®.

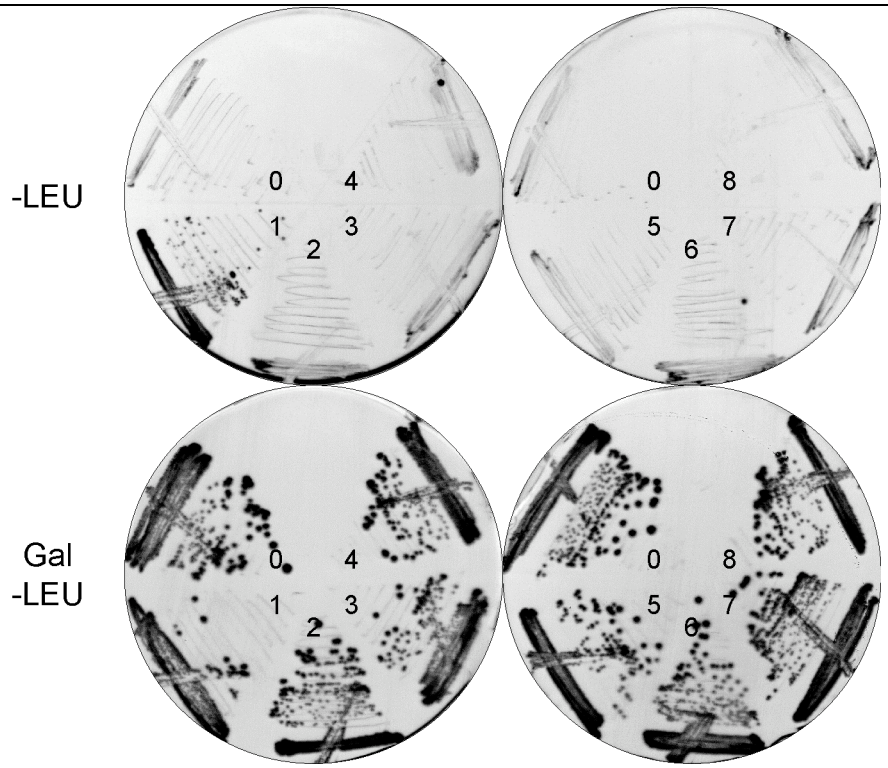


Figure 44 : Phénotypes d'une souche P_{GAL1}-*RLP24* exprimant différentes combinaisons des gènes *RLP24* et *RPL24B*. La souche où *RLP24* est placé sous contrôle d'un promoteur inductible au galactose a été transformée par un plasmide pFL36cII vide (0), ainsi que par des plasmides exprimant *RLP24*, *RPL24B* (1 et 2 respectivement) ou les 6 chimères A à F (3 à 8 respectivement) sous contrôle du promoteur de *RLP24*. Les transformants ont été cultivés à 30°C sur milieu minimum sans leucine contenant du glucose pendant 4 jours (-LEU), ou contenant du galactose pendant 2 jours (Gal –LEU).

Le vecteur d'expression choisi pour les premiers tests est un plasmide simple copie dérivé de pFL36, dans lequel ont été introduites les séquences 5' non transcrites du gène *RLP24* (c'est-à-dire une séquence de 305 nucléotides en amont de la phase ouvrete de lecture), puis la cassette RFC du système Gateway®, permettant une insertion des gènes à exprimer par recombinaison spécifique de site. Le vecteur a été conçu de sorte à ce que les gènes à exprimer se retrouvent sous contrôle du promoteur de *RLP24*. Le codon initiateur est apporté par le vecteur, ainsi qu'une séquence résiduelle nécessaire à la recombinaison spécifique de site, et entraînant l'ajout de quelques acides aminés

(MGPELGTHQTSLYKKAGL) dans la partie N-terminale des protéines recombinantes produites. Ce vecteur, baptisé pFL36-P_{RLP24}-RFC, est décrit plus précisément en annexes.

Seule l'expression de *RLP24* s'est montrée capable de complémenter (bien que faiblement) l'absence de Rlp24 dans une souche où *RLP24* est réprimé (Figure 44). Inversement, l'expression de *RPL24B* ne permet pas de complémenter le phénotype de croissance ralentie d'une souche où les deux gènes RPL24A et *B* sont invalidés (Figure 45). Par ailleurs, l'expression de deux chimères (C et F) est légèrement toxique dans la souche *rpl24ΔΔ*. Ces deux protéines de fusion possèdent en commun la partie N-terminale de Rpl24B dépourvue de doigts de zinc, et la partie centrale de Rlp24 ; elles diffèrent dans la partie C-terminale.

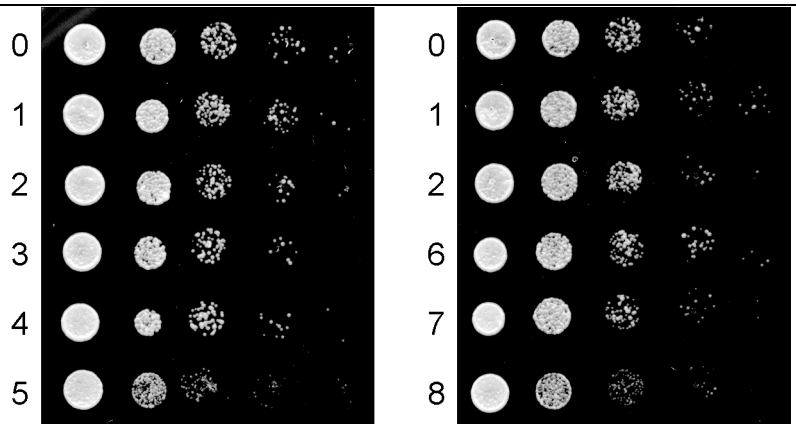


Figure 45 : Phénotype d'une souche *rpl24ΔΔ* exprimant différentes combinaisons des gènes *RLP24* et *RPL24B*. La souche où les gènes *RPL24A* et *B* ont été invalidés a été transformée par un plasmide pFL36cII vide (0), ainsi que par des plasmides exprimant *RLP24*, *RPL24B* (1 et 2 respectivement) ou les 6 chimères A à F (3 à 8 respectivement) sous contrôle du promoteur de *RLP24*. Après dilutions sériées au 1/10ème, les transformants ont été cultivés à 30°C sur milieu minimum sans leucine contenant du glucose pendant 2 jours.

Nous n'avons pour l'instant pas poursuivi cette étude ; cependant, nous pouvons émettre quelques hypothèses pour tenter d'expliquer les phénotypes observés.

Deux hypothèses (non exclusives) pourraient expliquer les faibles niveaux de complémentation obtenus avec *RLP24*, et l'absence de complémentation avec *RPL24B*. La première serait que les séquences en 5' de *RLP24* utilisées comme promoteur ne permettent pas d'obtenir des niveaux d'expression satisfaisants. La seconde serait que les quelques acides aminés ajoutés dans la partie N-terminale de la protéine, et dont nous ne pouvons pas nous affranchir avec ce type de clonage, sont délétères pour la fonction de la protéine.

Pour la complémentation par *RPL24B*, la première hypothèse semble convaincante. En effet, Rpl24 étant une protéine ribosomique, des niveaux élevés d'expression de cette protéine sont réquis ; l'utilisation d'un promoteur de type « pré-ribosomique » pourrait être inadaptée.

En ce qui concerne la mauvaise complémentation par *RLP24*, deux arguments nous font plutôt pencher en faveur de la seconde hypothèse : (*i*) Plusieurs tentatives ont été réalisées dans le laboratoire pour tenter d'insérer des fusions en 5' de *RLP24* sur le chromosome. Ces essais se sont toujours traduits par des échecs, et lorsque l'on obtient la mutation dans des levures diploïdes, elle s'avère létale à la sporulation. Les fusions de Rlp24 avec une autre protéine dans sa partie N-terminale semblent donc compromettre l'activité de la protéine. (*ii*) Toujours par la technique du Gateway®, nous avons cloné *RLP24* dans une série de vecteurs produisant des fusions N-terminales de la protéine sous contrôle de promoteurs hétérologues comme P_{GAR1}. Aucune de ces constructions n'a permis de complémenter à des niveaux satisfaisants la répression de *RLP24*.

Pour poursuivre l'étude, il serait envisageable de répéter ces constructions en utilisant cette fois des fusions transcriptionnelles plaçant les gènes chimères à exprimer directement sous contrôle des promoteurs de *RLP24* et/ou *RPL24B*, sans séquence séparatrice. Les raisons de la toxicité observée lors de l'expression des chimères C et F restent à déterminer.

4.1.3. Rei1, un partenaire privilégié de Rpl24

Dans le but de trouver des facteurs susceptibles de participer à l'assemblage de Rpl24 sur les particules pré-60S, nous avons recherché des partenaires physiques de cette protéine par un crible double hybride, réalisé par Hybrigenics (Annexe 3, Figure 1A). Le meilleur candidat issu de ce crible est la protéine Rei1 (*Required for Isotropic bud growth*). Cette protéine avait auparavant été identifiée pour son rôle dans un réseau fonctionnel associé à la kinase Swe1, et nécessaire pour la croissance isotrope des bourgeons cellulaires (Iwase et Toh-e, 2004). Bien que *REI1* ne soit pas un gène essentiel, il est conservé de la Levure à l'Homme (Figure 46).

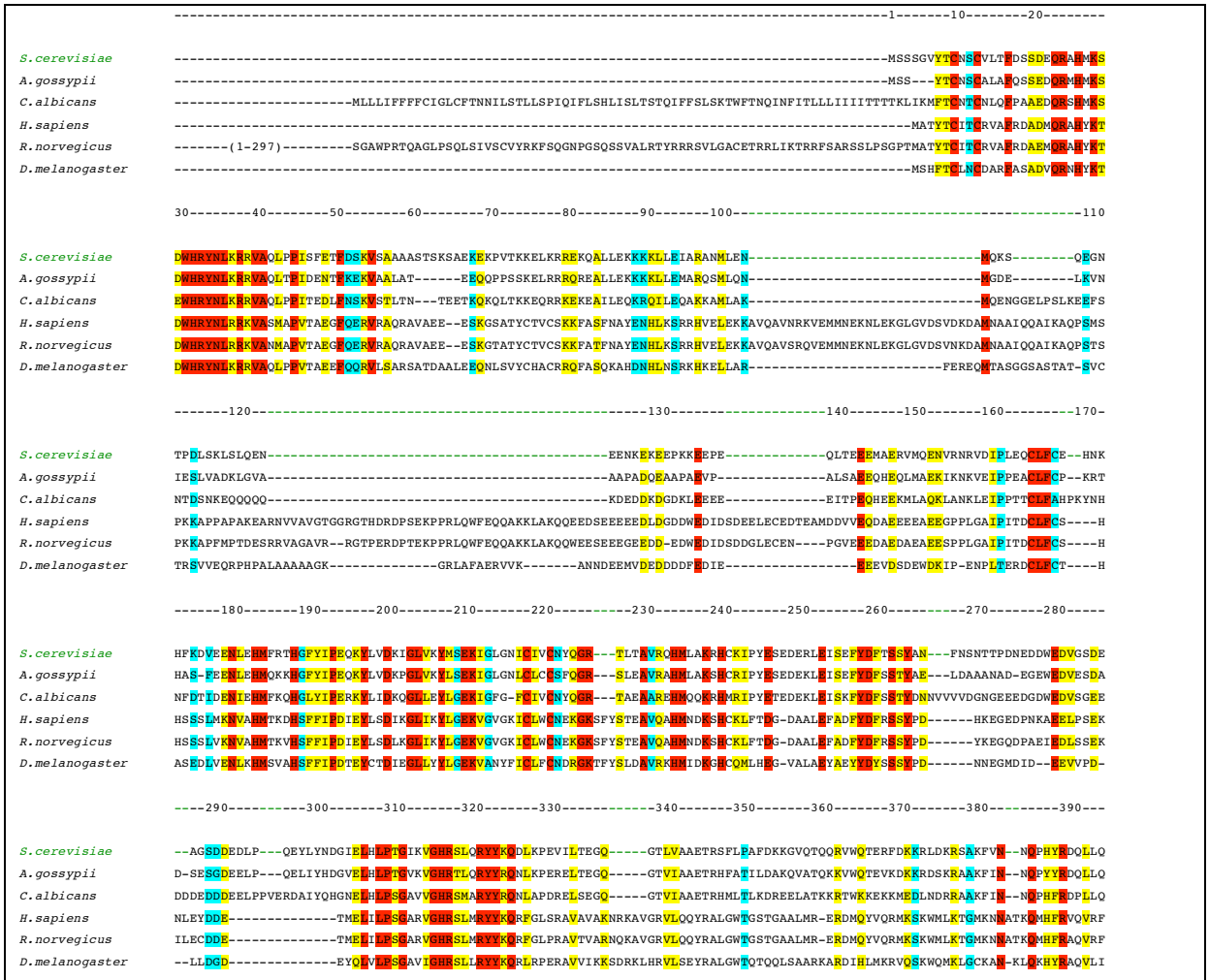


Figure 46 : Alignement des séquences protéiques des homologues de Rei1 dans le règne Eucaryote. Les positions conservées entre les quatre protéines sont colorées en rouge. Les positions conservées entre trois séquences au moins sont colorées en bleu ou jaune, le jaune indiquant une conservation des propriétés chimiques des résidus entre les six séquences.

Par chromatographie d'affinité en tandem, nous avons montré que Rei1 était spécifiquement associée à des complexes contenant Rpl24b-TAP, mais pas à des complexes contenant Rlp24-TAP (Annexe 3, Figure 1B). Par ailleurs, la localisation de la protéine sur des gradients de saccharose montre qu'elle est spécifiquement associée à des particules 60S

(Annexe 3, Figure 1C). Rei1 semble donc associée à des complexes pré-ribosomiques très tardifs, ne contenant plus Rlp24 et contenant Rpl24.

En plus du lien physique, Rei1 et Rpl24 présentent un lien fonctionnel. En effet, la surexpression de *REI1*, qui a peu d'effet dans une souche sauvage, amplifie de manière très nette le phénotype de croissance lente d'une souche où *RPL24A* et *RPL24B* sont invalidés (Figure 47).

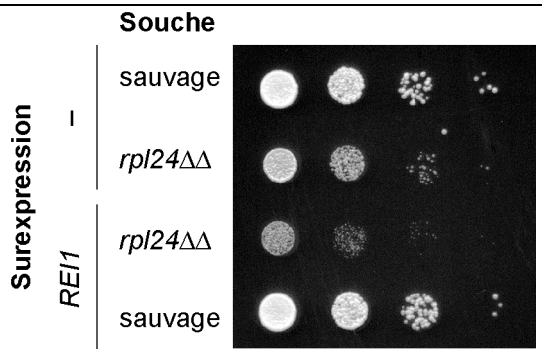


Figure 47 : La surexpression de *REI1* est toxique dans une souche *rpl24ΔΔ*. Les souches sauvage et invalidée pour *RPL24A* et *B* (*rpl24ΔΔ*) ont été transformées par un plasmide multicopie (pFL44L) vide ou surexprimant *REI1*. Des dilutions successives au 1/10e de chaque souche ont été déposées sur milieu minimum sans uracile, et incubées à 30°C pendant 40 h.

Afin de mieux comprendre l'effet de l'absence de Rpl24, nous avons analysé le phénotype conféré par l'absence des deux gènes *RPL24A* et *B* en présence de deux antibiotiques, la paromomycine et la cycloheximide (Figure 48). Nous observons une sensibilité accrue à la paromomycine pour la souche *rpl24aΔ* ; cette sensibilité est nettement amplifiée en l'absence des deux gènes. Ces résultats laissent supposer que la protéine ribosomique Rpl24, bien que non essentielle, participerait au contrôle de la fidélité de la traduction.

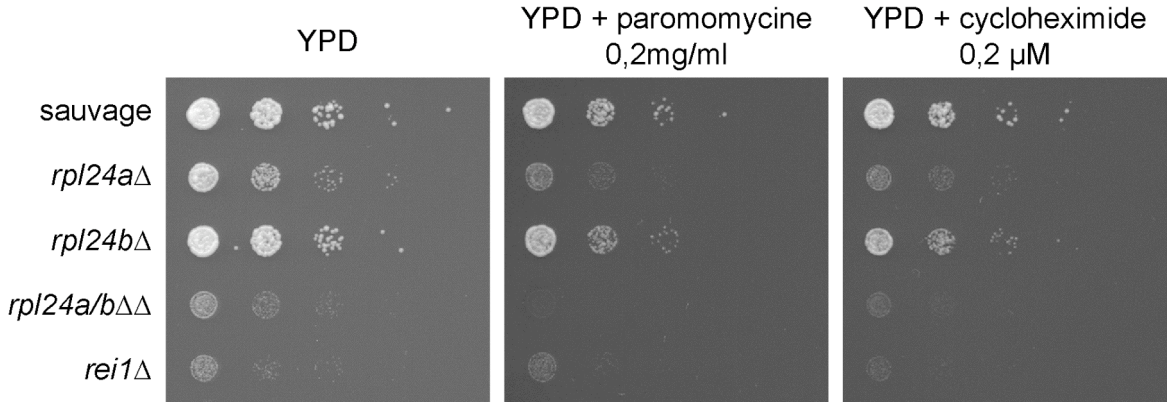


Figure 48 : L'absence de Rpl24 déclenche une hypersensibilité à la paromomycine. Le phénotype des souches invalidées pour les gènes *RPL24* ou *REI1* a été analysé par étude de leur croissance sur milieu riche (YPD), ou en présence de deux antibiotiques, la paromomycine ou la cycloheximide. Des dilutions successives au 1/10e de chaque souche ont été déposées, et incubées à 30°C pendant 40 h.

Les mêmes antibiotiques ont été testés sur la souche *rei1Δ* ; ils ne semblent pas avoir d'effet notable sur la croissance de cette souche, déjà très fortement affectée sur milieu YPD (Figure 48). Par ailleurs, la croissance du triple mutant *rpl24a/bΔΔ, rei1Δ* est légèrement plus affectée que celle du simple mutant *rei1Δ*, mais le phénotype ne semble pas synthétique

(données non fournies). Par conséquent, bien que Rpl24 et Rei1 soient liées fonctionnellement, Rei1 ne semble pas être directement impliquée dans le contrôle de la fidélité de la traduction. L'effet toxique observé lors de la surexpression de Rei1 en l'absence de Rpl24 pourrait refléter une participation des deux protéines au le contrôle des dernières étapes de la biogenèse des ribosomes.

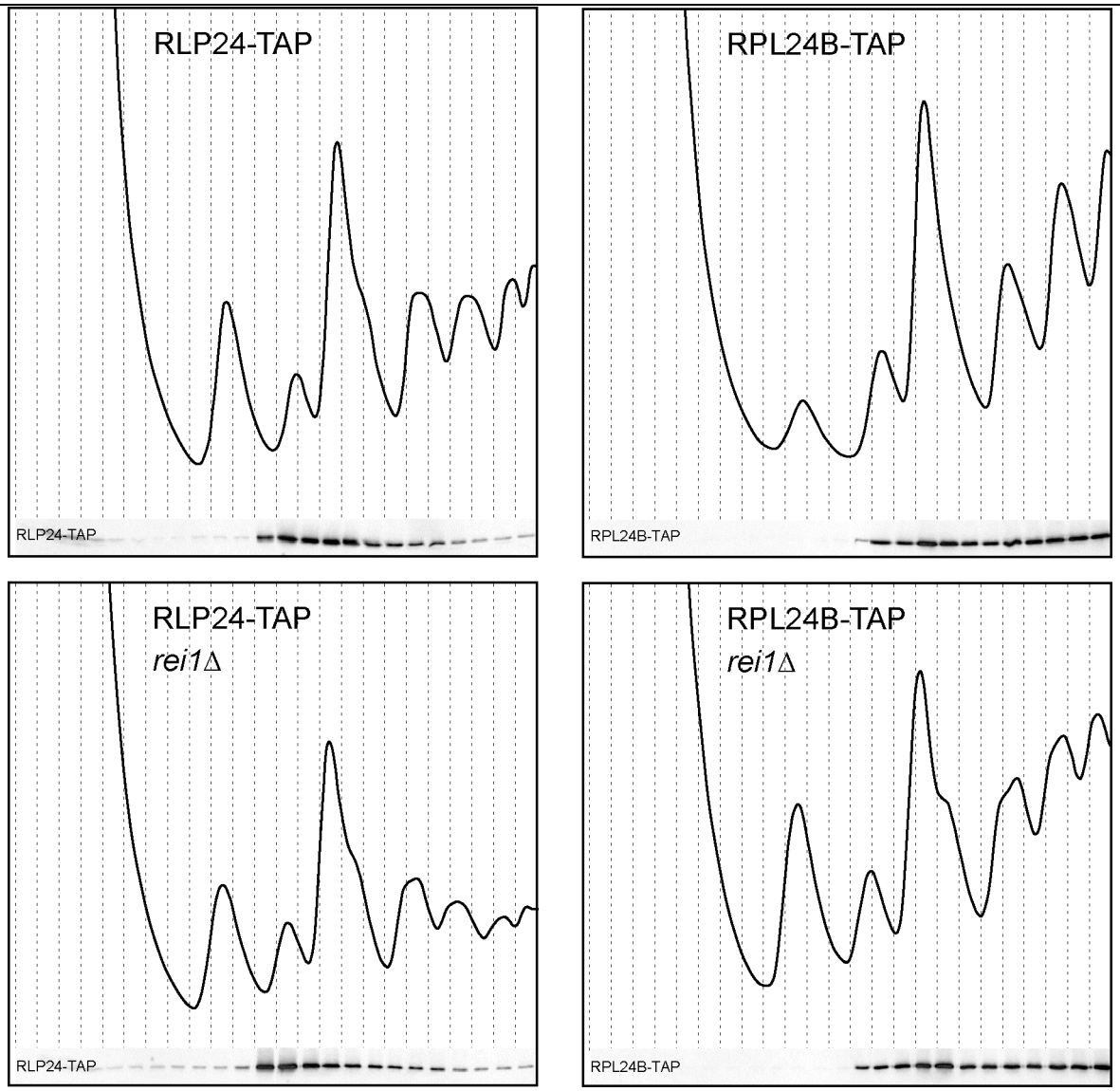


Figure 49 : Rei1 n'est pas nécessaire à la dissociation de Rlp24, ni à l'association de Rpl24. Des extraits cellulaires de souches sauvages ou *rei1Δ*, exprimant *RLP24-TAP* ou *RPL24-TAP* ont été séparés sur gradient de saccharose. Les protéines portant l'étiquette –TAP contenues dans les fractions collectées des gradients ont été détectées par western blot avec le complexe peroxydase-anti-peroxydase (PAP).

Pour déterminer si Rei1 participe à l'échange entre Rlp24 et Rpl24, nous avons observé la localisation de Rlp24-TAP et Rpl24b-TAP dans des extraits cellulaires de souches sauvages ou invalidées pour *REI1*, séparés sur gradient de saccharose (Figure 49). Dans les deux cas, nous observons Rlp24-TAP principalement dans les fractions correspondant aux particules 60S, et Rpl24b-TAP dans les fractions correspondant aux sous-unités 60S, aux monosomes et aux polysomes. Par conséquent, Rei1 n'est nécessaire ni au décrochage de Rlp24 avant l'initiation de la traduction, ni à l'association de Rpl24 aux particules. Si cette

protéine a une fonction à la fin de la biogenèse des ribosomes, elle ne semble donc pas être liée directement à l'échange entre Rlp24 et Rpl24.

Inversement, nous avons observé la localisation de Rei1 dans des gradients de saccharose en présence ou en absence de Rpl24, afin de déterminer si Rpl24 était nécessaire à l'ancrage de Rei1 aux complexes pré-ribosomiques (données non fournies). Dans les deux cas, Rei1 était associée aux particules pré-60S. Aucune des deux protéines n'est donc essentielle pour l'accrochage de l'autre aux particules ; nous ne pouvons donc pas déterminer l'ordre d'association de ces deux protéines sur les particules pré-60S par cette méthode.

4.2. Rei1, un nouveau facteur pré-60S

À la suite de ces travaux, nous avons souhaité mieux caractériser le rôle de Rei1 dans la biogenèse des ribosomes. Nous avons montré que Rei1 était un facteur pré-60S exclusivement cytoplasmique, et qu'il était nécessaire pour des étapes nucléaires de maturation des ARNr 25S et 5,8S (Annexe 3, Figure 2).

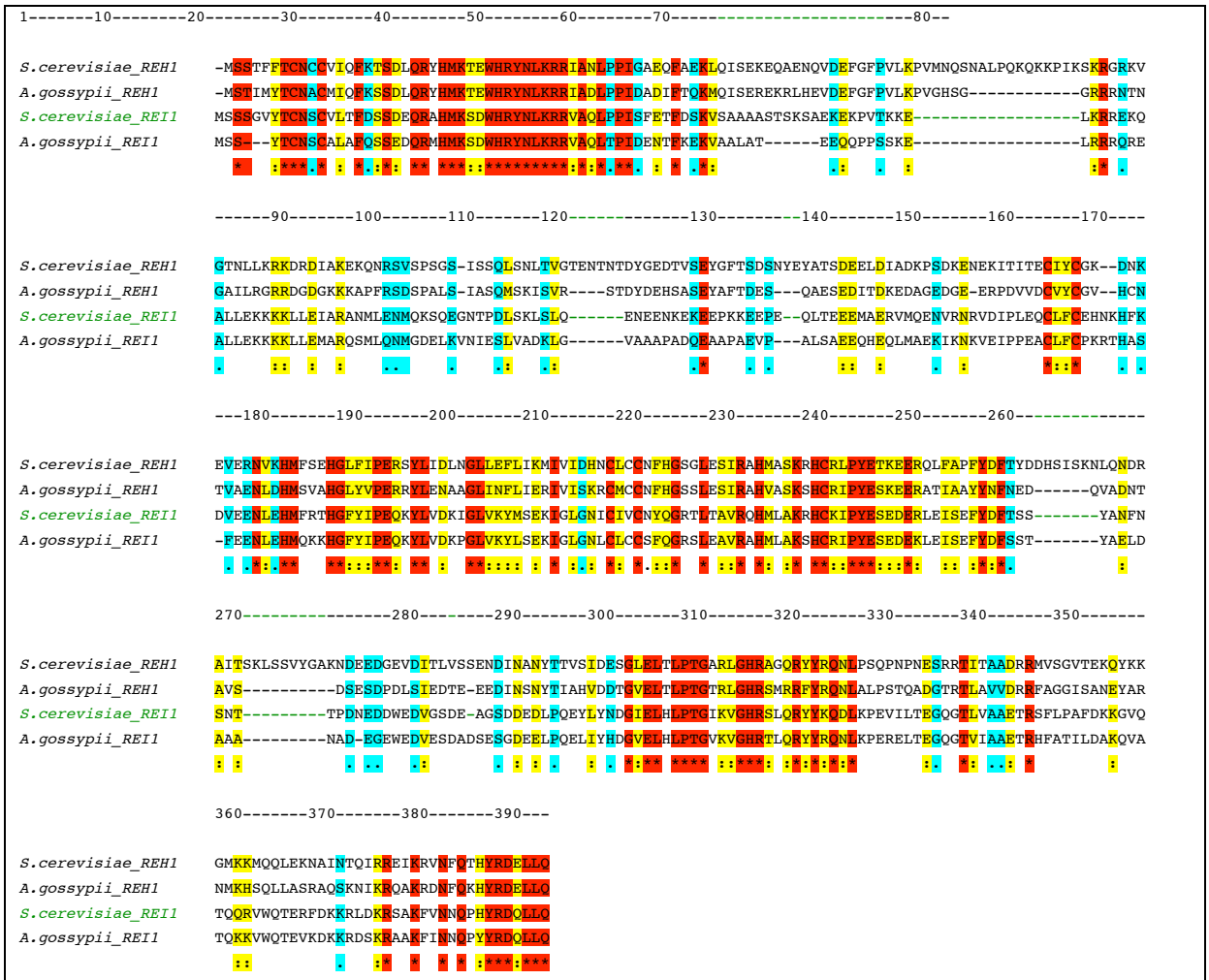


Figure 50 : Alignement des séquences protéiques de Rei1 et Reh1 chez *S. cerevisiae*, et de leurs homologues respectifs chez *A. gossypii*. Les positions conservées entre les quatre protéines sont colorées en rouge. Les positions conservées entre deux séquences au moins sont colorées en bleu ou jaune, le jaune indiquant une conservation des propriétés chimiques des résidus entre les quatre séquences. La numérotation des résidus correspond à la séquence de Rei1 de levure.

Par ailleurs, Rei1 possédant un homologue chez la levure, Reh1 (*Rei1 homologue*), nous avons mené un certain nombre d'études phénotypiques afin de déterminer si Reh1 avait aussi un rôle dans la biogenèse des ribosomes. Un alignement des deux protéines, chez *S. cerevisiae* ou *A. gossypii*, est représenté Figure 50.

L'absence de Rei1 se traduit, sur le plan phénotypique, par une croissance ralentie, et un phénotype cryosensible prononcé (Figure 51). Ce défaut est nettement accru dans une souche *rei1Δ, reh1Δ* (données non fournies), ou quand *REH1* est réprimé dans une souche *rei1Δ* (Figure 51). La souche *reh1Δ*, en revanche, présente un phénotype quasi-sauvage. La surexpression de *REH1* dans une souche *rei1Δ*, par exemple en plaçant ce gène sous contrôle du promoteur P_{GAL1} inductible au galactose, et en observant la croissance sur milieu riche contenant du galactose comme source de carbone (Figure 51), complémente l'absence de Rei1. Rei1 et Reh1 présentent donc une redondance fonctionnelle dans les cellules de levure.

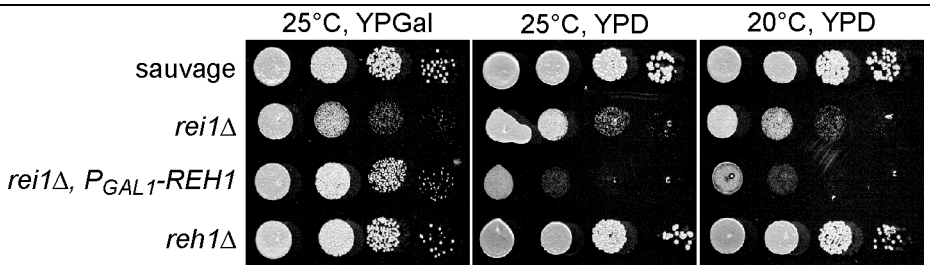


Figure 51 : Rei1 et Reh1 sont liées fonctionnellement. Les phénotypes d'une souche sauvage, d'une souche *rei1Δ*, d'une souche *reh1Δ* ou d'une souche *rei1Δ* pour laquelle *REH1* est placé sous contrôle du promoteur P_{GAL1} (*rei1Δ*, P_{GAL1}-*REH1*) ont été analysés à 20°C ou 25°C, sur milieu riche contenant du glucose (P_{GAL1} est alors éteint) ou du galactose (P_{GAL1} est alors actif).

Rei1 étant impliqué dans la biogenèse des ribosomes, nous nous sommes demandé si cette redondance fonctionnelle traduisait une implication de Reh1 dans la biogenèse des ribosomes. Nous avons donc analysé les phénotypes en gradients de saccharose ou la maturation des ARNr dans des mutants de *REH1* (Figure 52).

Le mutant *reh1Δ* présente un phénotype sauvage pour les gradients de saccharose (Figure 52) comme pour les ARNr (données non fournies). Lorsque l'on réprime *REH1* dans le mutant *rei1Δ*, le phénotype observé en gradients de saccharose est très légèrement plus accentué que pour le mutant *rei1Δ* seul. Les deux profils montrent une diminution des quantités de particules 60S libres, et l'apparition d'épaulements dans les pics de polysomes, correspondant à la formation de complexes de pré-initiation abortifs sur lesquels aucune sous-unité 60S ne se fixe. En ce qui concerne la maturation des ARNr, les deux profils sont très similaires. Tous deux montrent un enrichissement en intermédiaire d'ARNr 27SB rapporté au produit du clivage C_2, l'intermédiaire 7S. La redondance fonctionnellle entre Rei1 et Reh1 ne semble donc pas se situer au niveau de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique.

Enfin, bien que Rei1 soit impliqué dans une étape nucléaire de maturation des ARNr, son absence n'entraîne pas de défaut notable d'export des particules pré-60S, comme ceci a pu être vérifié en détectant la protéine de fusion Rpl25-GFP dans des souches sauvage, *rei1Δ*, ou *rei1Δ*, P_{GAL1}-*REH1* (Figure 53). Dans toutes ces souches, Rpl25-GFP présente sa localisation cytoplasmique naturelle.

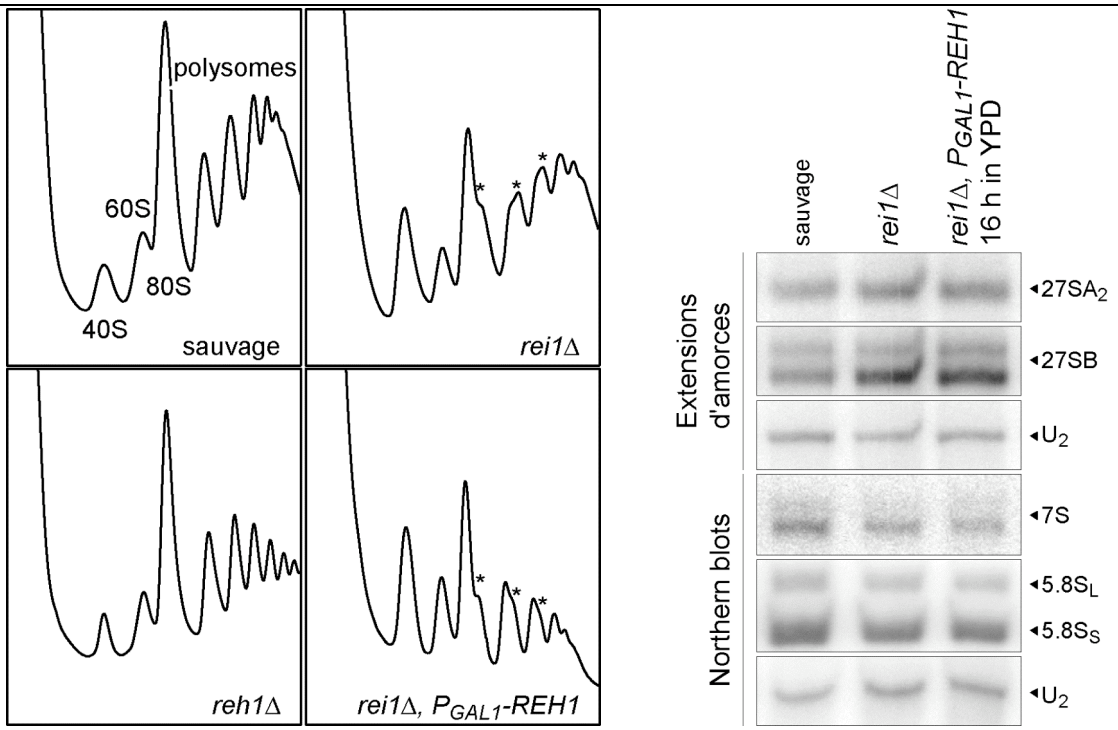


Figure 52 : L'absence de Reh1 n'accentue pas les défaults de biogenèse des ribosomes observés en l'absence de Rei1. Des souches sauvage, *rei1Δ*, *reh1Δ* ou *rei1Δ, P_{GAL1}-REH1* ont été cultivées pendant 16 heures à 23°C. Les extraits cellulaires de ces souches ont été séparés sur gradient de saccharose (à droite). À gauche, les intermédiaires d'ARNr extraits de souches sauvage, *rei1Δ* ou *rei1Δ, P_{GAL1}-REH1* cultivées à 23°C pendant 16 heures ont été analysés par extension d'amorces (oligonucléotides marqués au ^{32}P : CS10 pour le 27SB et le $27SA_2$; MFR457 pour l'ARN contrôle U2) ou northern blot (sondes marquées au ^{32}P : CS3 pour le 7S, CS5 pour le 5,8S et MFR457 pour U2).

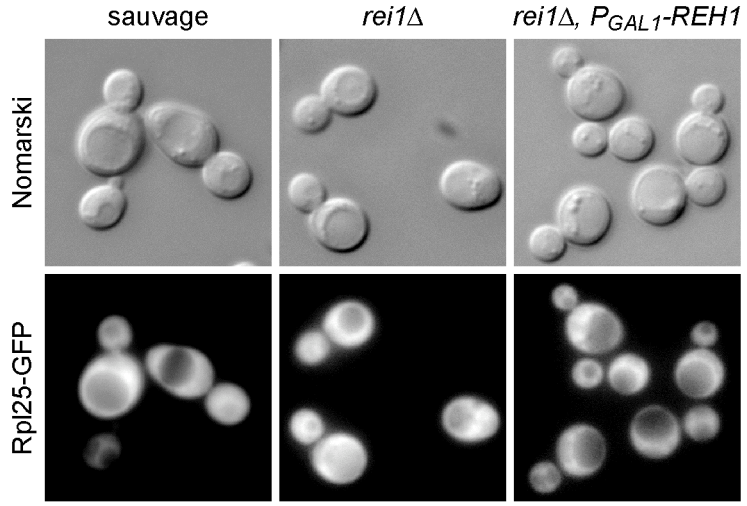


Figure 53 : Rei1 et Reh1 ne sont pas nécessaires pour l'export des particules pré-60S. Un plasmide exprimant la fusion traductionnelle *RPL25-GFP* a été transformé dans des souches sauvage, *rei1Δ*, ou *rei1Δ, P_{GAL1}-REH1*. Après croissance en milieu minimum sans leucine pendant 16 heures à 23°C, la localisation de Rpl25-GFP a été observée en microscopie par fluorescence.

4.3. Rei1 est nécessaire au recyclage de facteurs pré-60S navettes

En raison des effets nucléaires sur la biogenèse des ribosomes observés en l'absence de Rei1, nous avons pensé que ce facteur strictement cytoplasmique pourrait être impliqué dans le recyclage de facteurs pré-60S navettes du cytoplasme vers le noyau à la fin de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique.

Nous avons montré que Rei1 était en effet nécessaire pour que s'effectue le retour normal au noyau des protéines Arx1 et Tif6 (Annexe 3, Figure 3A), ainsi que d'un nouveau facteur navette jusqu'alors inconnu : Alb1 (*Arx1 little brother*) (Annexe 3, Figure 5A). Par ailleurs, les défauts de maturation des ARNr observés en l'absence de Rei1 sont très semblables à ceux d'une répression partielle de *TIF6* (Annexe 3, Figure 2). Nous supposons que les phénotypes observés en l'absence de Rei1 sont donc la conséquence d'un mauvais recyclage de facteurs navettes, et en particulier de Tif6.

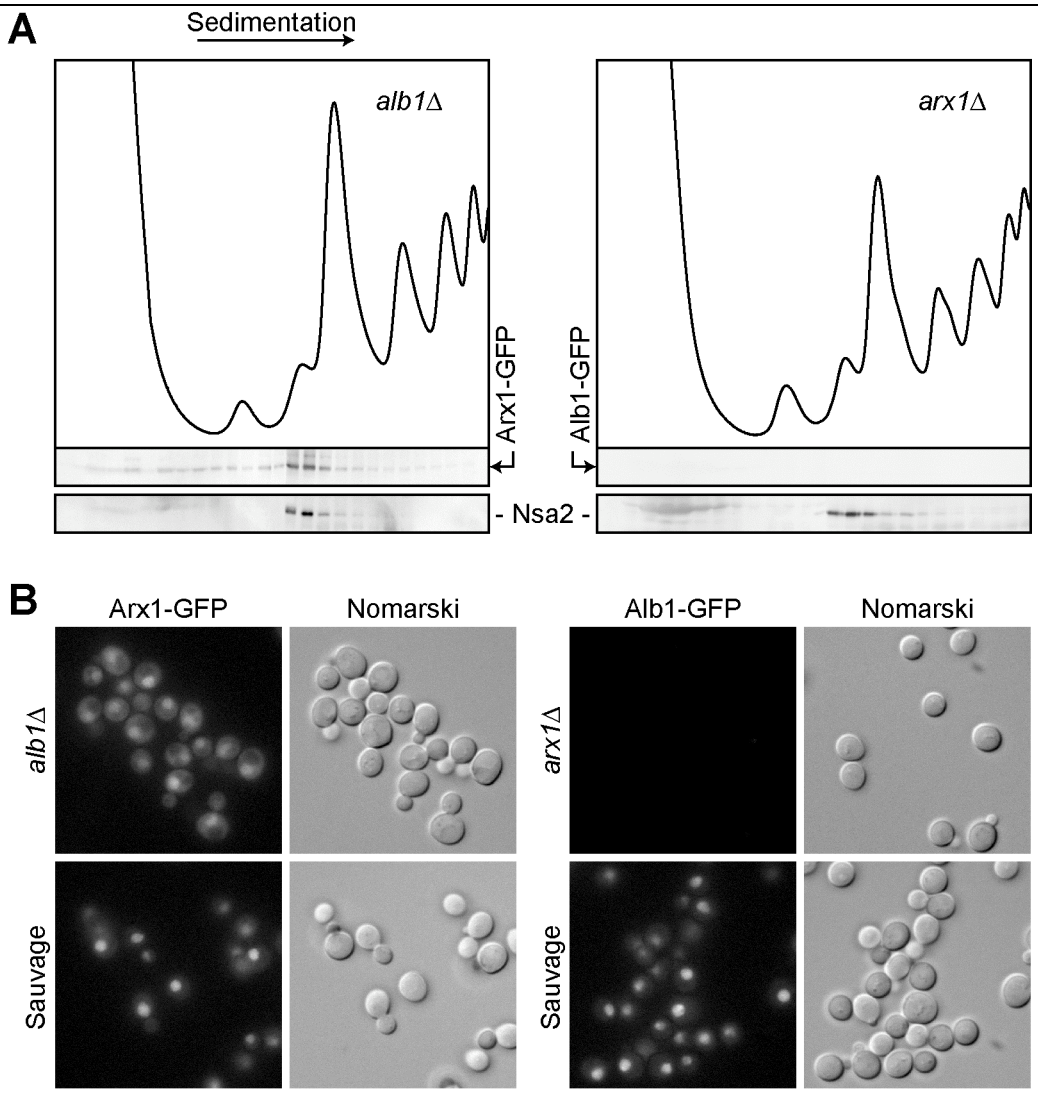


Figure 54 : Alb1 est déstabilisée en l'absence de Arx1. (A) Des extraits cellulaires de souches *alb1Δ, ARX1-GFP* ou *arx1Δ, ALB1-GFP* ont été séparés sur gradients de saccharose. Arx1-GFP, Alb1-GFP ou Nsa2 ont été détectées dans les fractions de ces gradients par western blot. (B) Des souches sauvages, *alb1Δ* ou *arx1Δ* exprimant *ARX1-GFP* ou *ALB1-GFP* ont été observées en microscopie par fluorescence, après une culture de 7 heures en milieu minimum.

Ces travaux ont conduit à l'identification d'un nouveau facteur pré-60S, Alb1. Cette petite protéine de 175 acides aminés interagit en double hybride avec Arx1, et est trouvée associée à Arx1 et Rei1 dans des complexes purifiés par chromatographie d'affinité en tandem (Annexe 3, Figure 4). En gradients de saccharose, Arx1 et Alb1 sédimentent toutes deux dans les fractions correspondant aux particules pré-60S. Des expériences d'interaction *in vitro* montrent que Arx1 et Alb1 peuvent former un hétérodimère. En conditions physiologiques, les deux protéines sont trouvées dans le cytoplasme et dans le noyau, avec une localisation préférentiellement nucléaire (Figure 54B).

Alb1 n'est pas nécessaire à l'association de Arx1 aux particules pré-60S (Figure 54A). En revanche, Arx1 est nécessaire à l'ancrage de Alb1. En son absence, non seulement Alb1-GFP est absent des fractions correspondant aux particules 60S, mais la protéine n'est plus détectée, ni par western blot, ni en microscopie par fluorescence (Figure 54). Nous n'avons pas vérifié si cette déstabilisation affectait la protéine, ou était une conséquence d'effets transcriptionnels ou post-transcriptionnels. La première solution semble néanmoins plus probable.

En l'absence de Rei1, Arx1 et Alb1 se décrochent des particules pré-60S, mais leur transport vers le noyau est compromis. Elles appartiennent alors à un petit complexe cytoplasmique dépourvu de protéines ribosomiques (Annexe 3, Figures 3B et 5B). Ce petit complexe contient, entre autres, la karyophérine Kap121 (Annexe 3, Figure 4D). Tif6, en revanche, reste associée aux particules pré-60S.

4.4. Le recyclage des facteurs navettes est Kap121-dépendant

Un crible de recherche de suppresseurs multicopie nous a permis de mettre en évidence une relation fonctionnelle entre Rei1 et la ß-karyophérine Kap121. Le phénotype cryosensible de *rei1Δ* est compensé par la surexpression de *REI1*, de son homologue *REH1*, ou encore de *KAP121* (Annexe 3, Figure 6A).

Nous avons montré que cette complémentation du phénotype de croissance se traduisait par une restauration de l'import de Arx1, Alb1 et Tif6 vers le noyau (Annexe 3, Figure 6B). Cependant, cette surexpression ne compense pas totalement les défauts observés dans les profils de polysomes (Figure 55).

De surcroît, lorsque *KAP121* est surexprimé, Arx1-GFP retourne bien au noyau, mais reste sous la forme d'un petit complexe (Figure 55). La présence de Rei1 semble donc doublement nécessaire : d'une part, pour déclencher le retour de Arx1 vers le noyau ; d'autre part, une fois que Arx1 est dans le noyau, pour permettre sa participation à un nouveau cycle de biogenèse des ribosomes. Ces deux signaux semblent pouvoir être découplés l'un de l'autre, puisque le retour au noyau peut être compensé par la surexpression de Kap121, mais pas l'association aux complexes pré-60S.

En l'absence de Kap121, l'import nucléaire de Arx1 et Alb1 est bloqué (Annexe 3, Figure 6D). Par ailleurs, Kap121 est trouvé dans les complexes associés à Arx1-TAP et Alb1-TAP (Annexe 3, Figure 6C), et interagit en double hybride avec Alb1 (Annexe 3, Figure S4). L'ensemble de ces données suggèrent que Kap121 pourrait être l'importine spécifique de Arx1 et Alb1 ; tout au moins, le retour au noyau de ces deux protéines est-il Kap121-dépendant.

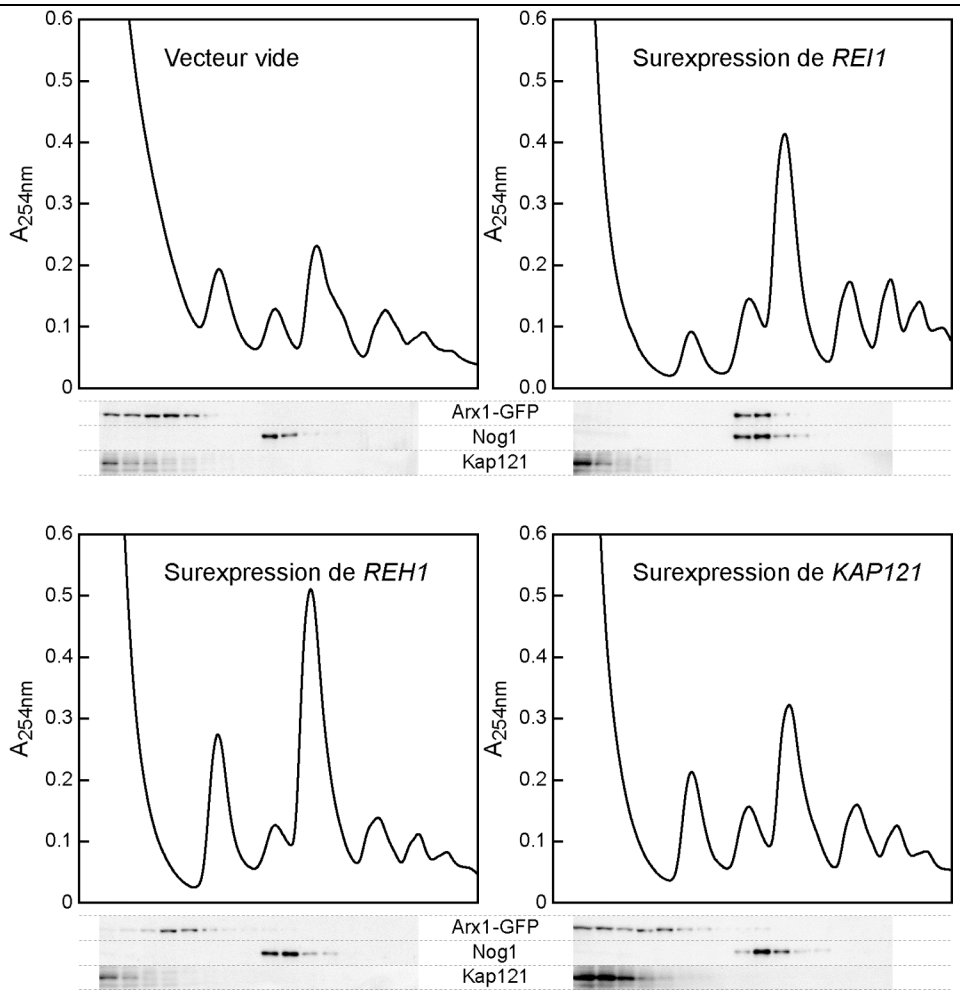


Figure 55 : L'import de Arx1 vers le noyau peut être découplé de son association aux particules pré-60S. Des extraits cellulaires ont été réalisés à partir de souches *rei1Δ, ARX1-GFP* transformées par des plasmides multicopies (pFL44L) vide, ou surexprimant *REI1*, *REH1* ou *KAP121*, et cultivées pendant 7 heures à 23°C. Ces extraits ont été séparés sur gradients de saccharose ; les protéines contenues dans les fractions de ces gradients ont été détectées par western blot contre Arx1-GFP, Nog1 ou Kap121.

4.5. Rôle du dimère Arx1-Alb1 dans le recyclage de Tif6

Le défaut de recyclage de Tif6 observé en l'absence de Rei1 peut être compensé par l'invalidation des gènes *ARX1* ou *ALB1* (Annexe 3, Figure 7). Ces invalidations compensent également le phénotype de croissance cryosensible. Ces données nous ont conduit à établir un modèle, dans lequel Rei1 est nécessaire au recyclage Kap121-dépendant des facteurs navettes Arx1 et Alb1 (Annexe 3, Figure 8).

En l'absence de Rei1, Arx1 et Alb1 se décrochent des particules pré-60S, et restent dans le cytoplasme sous la forme d'un petit complexe, inhibant le décrochage de Tif6 et son retour au noyau. Ces problèmes peuvent être contournés en forçant le retour de Arx1/Alb1 vers le noyau par surexpression de *KAP121*, ou bien lorsque l'un des gènes *ARX1* ou *ALB1* est invalidé, ce qui empêche la formation du petit complexe. Notons que, Alb1 étant absent des extrait cellulaires en l'absence de Arx1 (Figure 54), une simple invalidation de *ARX1* équivaut de fait à une invalidation des deux gènes.

Jusqu'ici, nous ne connaissons pas les mécanismes impliqués dans l'inhibition du recyclage de Tif6 par le petit complexe contenant Arx1 et Alb1. Ce mécanisme ne semble

toutefois pas impliquer la GTPase Efl1 (Annexe 3, Figure S2), facteur connu pour son rôle dans la dissociation de Tif6 des particules pré-60S.

Ces travaux ont permis la mise en évidence d'un réseau d'interactions fonctionnelles entre la fin de la biogenèse des ribosomes et l'import nucléaire. Ce réseau permet la coordination des derniers événements moléculaires de maturation des particules pré-60S et du recyclage des derniers facteurs pré-ribosomiques vers le noyau, pour qu'ils participent à un nouveau cycle de biogenèse. En particulier, ce réseau contrôle le décrochage et le recyclage du facteur Tif6, qui est présumé être un facteur d'anti-association entre la grande et la petite sous-unité ribosomique. Ces événements cytoplasmiques pourraient donc être impliqués dans le contrôle des sous-unités 60S à la fin de leur fabrication, et avant leur entrée dans la traduction.

DISCUSSION

1. Le clivage de l'ITS2, un point de contrôle de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique ?

Au cours de cette étude, nous avons pu constater qu'un certain nombre des facteurs pré-60S étudiés (Nog1, Rlp24, Rei1, Tif6) étaient impliqués, directement ou indirectement, dans les événements de maturation du précurseur d'ARNr 27SB, conduisant à l'élimination de l'ITS2 suite au clivage C_2 et à la dégradation C_2>C_1. Les données de la littérature montrent que plusieurs autres mutants de facteurs impliqués dans la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique entraînent des défauts à cette étape (Fromont-Racine et al., 2003). Cependant, les enzymes responsables de ces clivages n'ont pas encore été identifiées.

La multiplicité des mutants affectant cette étape de maturation laisse penser qu'il s'agit d'un point de convergence de diverses régulations de la voie de biogenèse des ribosomes. On peut imaginer que certains des effets observés sont très indirects ; c'est par exemple le cas de l'absence de Rei1 ; nous avons montré en effet que le défaut nucléaire de maturation des ARNr était probablement lié à un défaut de recyclage du facteur navette Tif6. On pourrait aussi penser que certains de ces facteurs sont impliqués, non pas dans le clivage de l'ITS2, mais dans des événements de maturation plus tardifs ; l'effet observé sur la maturation du précurseur 27SB serait alors lié à des mécanismes de rétrocontrôle. Ceci est probablement le cas pour des facteurs pré-60S relativement tardifs comme Nog2, Nug1 ou Nmd3 (Bassler et al., 2001; Ho et Johnson, 1999; Saveanu et al., 2001).

Plusieurs protéines sont supposées exercer un rôle de censeur à cette étape, comme la GTPase Nog1, l'AAA-ATPase Rea1, ou un peu plus tardivement, les GTPases Nog2 et Nug1. Ces protéines participeraient au contrôle de l'avancement correct de la biogenèse ; leur activité d'hydrolyse de nucléotides triphosphate pourrait permettre des changements de conformation des particules pré-ribosomiques, et ainsi libérer l'accès à l'ITS2 pour les enzymes réalisant les clivages.

Le facteur pré-60S Nsa2 pourrait également jouer un rôle à cette étape clé. Nous avons montré que cette protéine était un partenaire physique et fonctionnel de Nog1. Elle pourrait donc assister cette GTPase dans le contrôle de l'avancement de la biogenèse. L'instabilité de Nsa2, qui semble corrélée à l'état d'activité de la biogenèse des ribosomes, en fait un bon candidat pour centraliser divers signaux de régulation conduisant au blocage des clivages de l'ITS2. L'étude des mécanismes responsables de cette instabilité permettrait sans doute de mieux comprendre la manière dont peuvent s'exercer ces régulations.

Un autre champ d'études potentiel est celui de l'homologue humain de Nsa2, TinP1. Ce facteur semble être effectivement l'orthologue de Nsa2, et lui-même est étroitement régulé, mais cette fois au niveau transcriptionnel. Il pourrait être intéressant de déterminer si la protéine TinP1 est également instable. Par ailleurs, il serait judicieux de vérifier que le rôle de TinP1 dans la prolifération cellulaire passe par un rôle dans le contrôle de l'avancement de la biogenèse des ribosomes.

Enfin notons que, si Nsa2 est très conservé chez les Eucaryotes, son partenaire Nog1 l'est nettement moins, avec 46% d'identité et 66% d'homologie entre les séquences humaine et de levure (Figure 56). On remarque que les parties les plus conservées sont les domaines caractéristiques d'une GTPase de la famille OBG ainsi que les 160 acides aminés situés dans la partie N-terminale, et dont nous avons montré qu'ils étaient nécessaires à l'établissement de l'interaction double hybride avec Nsa2. Ceci laisse penser qu'une pression de sélection s'exerce sur la conservation d'une interaction entre les deux protéines au cours de l'évolution ; la co-évolution nécessaire des deux séquences ralentirait ainsi la dérive génétique. Afin de confirmer cette hypothèse, on pourrait tester si l'absence de Nog1, Nsa2 ou des deux protéines peut être complémentée par la co-expression des deux homologues

humains. En effet, la complémentation de l'absence de Nsa2 par l'expression de *TINP1* est très partielle ; la co-expression du partenaire humain pourrait compenser ce défaut.

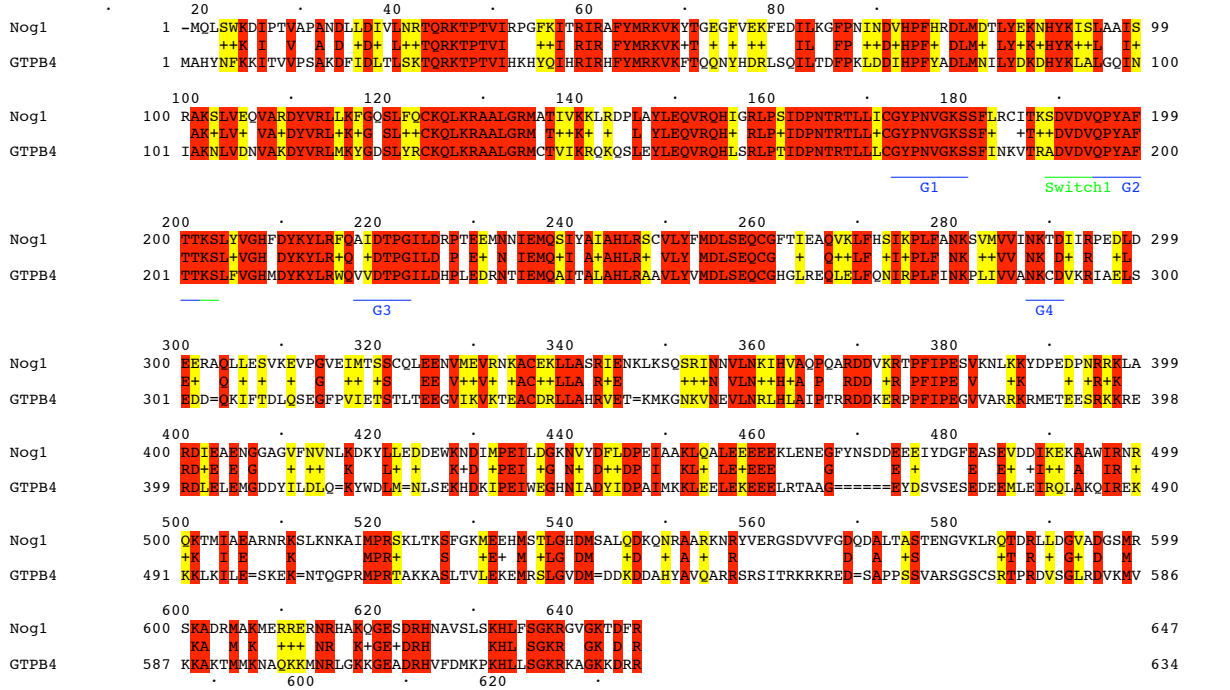


Figure 56 : Nog1 est homologue à la protéine humaine GTPB4. Les positions conservées entre les deux séquences sont colorées en rouge (soit 46% d'identité). Les résidus pour lesquels les propriétés chimiques sont conservées sont colorés en jaune. La position des motifs G1 à G4 de Nog1, ainsi que du domaine switch1, ont été indiquées, en bleu et vert respectivement.

2. Le couplage TAP + SILAC : perspectives et points d'ombre

Dans le but de déterminer l'ordre d'assemblage des facteurs pré-60S au cours de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique, nous avons adapté la technique de SILAC aux chromatographies d'affinité en tandem. Nous pouvons ainsi comparer la composition de complexes protéiques purifiés dans des conditions sauvages ou mutantes.

Les premiers essais de la technique, réalisés sur les couples appât/gène réprimé Rlp24-TAP/*NOG1* et Nog1-TAP/*NSA2*, sont prometteurs. En effet, une partie des résultats obtenus confirme des données déjà connues sur l'ordre d'intervention de certains facteurs dans la voie de biogenèse. D'autres résultats apportent des informations nouvelles pour des facteurs caractérisés comme pré-60S, mais dont la position dans la voie métabolique était peu claire. Les expériences menées sur ces deux couples semblent comporter peu de bruit de fond autre que les contaminants classiques des purifications par affinité en tandem ; en outre, elles ne semblent pas comporter de données aberrantes (par exemple, un facteur connu comme étant tardif qui serait retrouvé comme précoce dans nos expériences, ou encore, des résultats incohérents entre les deux couples appât/gène réprimé.

D'autres couples de facteurs ont été testés, ce qui nous permet actuellement de regrouper les facteurs pré-60S en plusieurs sous-groupes, (précoces, intermédiaires ou tardifs). Cependant, plusieurs remarques sur l'utilisation couplée de ces deux techniques doivent être prises en compte, afin d'exploiter au mieux les résultats attendus, mais aussi de les nuancer :

(*i*) Les mutants que nous utilisons bloquent à un stade très précis de la biogenèse, qui ne correspond pas nécessairement au stade où intervient le produit du gène réprimé, mais peut être une conséquence indirecte de la répression. Par exemple, l'absence de certains facteurs conduit à un blocage de la biogenèse au niveau de la maturation de l'ITS2, et donc à une accumulation de particules pré-60S à ce stade. Cependant, ces facteurs peuvent avoir un rôle plus en aval dans la biogenèse (Rei1, par exemple), ou, pourquoi pas, plus en amont. Le blocage au niveau du clivage C_2 serait alors une conséquence de défauts de maturation mineurs conduisant à une particule pré-60S anormale, sur laquelle la maturation du 27SB ne peut s'effectuer. Les données que nous obtenons correspondent donc à la composition d'un petit nombre d'intermédiaires de biogenèse très particuliers ; multiplier le nombre de mutants étudiés ne permettra pas nécessairement d'isoler la totalité des sous-complexes successifs qui jalonnent la voie de biogenèse.

(*ii*) Certains des mutants utilisés pourraient conduire à l'accumulation, non pas d'intermédiaires existant naturellement dans la voie de biogenèse, mais de complexes aberrants ; les résultats obtenus ne correspondraient alors à aucune réalité physiologique. Ce ne semble toutefois pas être le cas pour les couples Rlp24-TAP/*NOG1* et Nog1-TAP/*NSA2*. En effet, les constituants protéiques retrouvés dans ces complexes en conditions mutantes correspondent à des facteurs pré-60S déjà caractérisés. On ne trouve, par exemple, pas de facteurs indiquant que les particules seraient orientées vers une voie de dégradation, comme les constituants de TRAMP. Du point de vue des ARN, ces complexes contiennent des intermédiaires d'ARNr physiologiques, et non des produits aberrants. Les données obtenues semblent donc relativement fiables, du moins en ce qui concerne ces deux couples.

(*iii*) La plupart des facteurs pré-ribosomiques étant essentiels, les mutants utilisés jusqu'ici sont des mutants de répression, obtenus en plaçant le gène à réprimer sous contrôle du promoteur P_{GAL1}. L'utilisation de ces mutants nécessite une longue phase de culture en milieu glucosé (en général, environ 16 heures), afin de s'affranchir de toute trace résiduelle du produit du gène réprimé. Cette cinétique de répression est relativement longue, et se traduit par des conséquences néfastes pour la physiologie cellulaire. Il serait judicieux de s'affranchir

de ces effets secondaires, en utilisant des mutants conditionnels dont les effets sont plus rapides, par exemple des mutants thermosensibles.

(*iv*) Certains facteurs pré-60S sont accrochés de façon instable aux complexes, et échappent par conséquent aux purifications par affinité en tandem. Lorsqu'ils sont trouvés dans les complexes, les données sont en général peu reproductibles. Pour ces facteurs, la détermination du point d'arrivée sur la particule sera probablement impossible, du moins en utilisant cette méthode.

La mise en œuvre du SILAC permet donc d'apporter des informations très utiles sur l'ordre d'intervention des facteurs pré-ribosomiques dans la biogenèse, mais l'analyse des données se doit d'être réalisée avec une certaine circonspection, afin d'éviter une interprétation trop hâtive des résultats obtenus. De plus, elle n'exclut pas l'utilisation d'autres techniques, permettant de compléter ces données, de déterminer l'ordre de dissociation des facteurs, et d'obtenir des informations plus fonctionnelles sur le rôle de chacun des facteurs pré-60S.

3. Arx1 en question

À la fin de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique, les particules pré-60S sont exportées vers le cytoplasme avec plusieurs facteurs pré-ribosomiques navettes, parmi lesquels Rlp24, Tif6, Nmd3, Arx1 et Alb1. Nous avons montré que le recyclage ultérieur d'Arx1 et Alb1 vers le noyau nécessitait l'intervention du facteur pré-60S cytoplasmique Rei1 (Lebreton et al., 2006b).

Selon nos résultats, en l'absence de Rei1, Arx1 et Alb1 sont dissociés des particules pré-60S, et demeurent dans le cytoplasme sous la forme d'un petit complexe qui inhibe le recyclage de Tif6 (Annexe 3, Figure 8). Il me semble toutefois nécessaire de préciser que ces données sont controversées. En effet, un autre groupe montre que Rei1 est nécessaire au retour d'Arx1 vers le noyau, mais leurs résultats suggèrent qu'Arx1 reste associé aux particules pré-60S cytoplasmiques en l'absence de Rei1 (Hung et Johnson, 2006). Il ressort de cette étude un modèle très différent du notre, dans lequel n'interviennent ni Alb1, ni Tif6.

De plus, ce groupe montre que Rei1 est nécessaire pour la dissociation d'Arx1 des particules pré-60S, mais non pour son retour de noyau ; en effet, dans un mutant pour lequel l'interaction entre Arx1 et les particules pré-60S est destabilisée, le recyclage d'Arx1 est restauré. Ce nouvel élément est également en contradiction avec nos résultats, puisque nous parvenons, en l'absence de Rei1, à compenser le défaut d'import nucléaire d'Arx1 par surexpression de Kap121, mais pas son défaut d'association aux particules pré-60S (Figure 55). Nos données suggèrent donc, au contraire, que Rei1 est nécessaire pour fournir deux signaux distincts à Arx1, qui peuvent être découplés l'un de l'autre : l'un permet le retour d'Arx1 vers le noyau, et peut-être complémenté par la surexpression d'une importine ; l'autre permet l'association d'Arx1 aux particules pré-60S nucléaires néosynthétisées et sa participation à un nouveau cycle de biogenèse des ribosomes, et n'est pas compensé par la surexpression de Kap121.

À l'heure actuelle, nous ne pouvons que formuler quelques hypothèses pour tenter d'expliquer les différences d'observations entre nos deux groupes. L'une d'entre-elles est le fond génétique utilisé (W303 pour le groupe d'A.W. Johnson ; S288C pour notre groupe). Une autre concerne les conditions de culture (nature du milieu de culture ; température d'incubation), qui varient entre nos travaux, et qui pourraient influer sur les résultats, de la même manière qu'elles influent sur la régulation de la biogenèse des ribosomes. Une dernière concerne les conditions de salinité utilisées pour les gradients de saccharose (100mM NaCl dans nos expériences ; variables pour le groupe d'A.W. Johnson), et qui pourraient affecter l'association d'Arx1 aux particules pré-60S ; ce paramètre prend d'autant plus d'importance que l'association d'Arx1 aux particules pré-60S est probablement plus labile que pour d'autres facteurs pré-60S (ceci est suggéré, entre autres, par les résultats de SILAC pour cette protéine, page 75).

Par ailleurs, la détection de Arx1 dans les gradients de saccharose a été effectuée à l'aide d'une protéine de fusion Arx1-HA chez A.W. Johnson ; de notre côté, nous avons détecté soit la protéine endogène à l'aide d'anticorps spécifiques, soit une protéine de fusion Arx1-GFP. Nous obtenons dans les deux cas des résultats similaires. En revanche, nous avons pu constater que la fusion Arx1-TAP donnait un profil de sédimentation différent (la protéine est retrouvée presque tout au long du gradient). Nous en avons déduit que les propriétés de liaison de la fusion -TAP étaient altérées ; il pourrait en être de même pour la fusion –HA.

En somme, il est possible que l'état associé/dissocié d'Arx1 résulte d'un équilibre très instable dans lequel interviennent différents paramètres tels que la présence de Rei1 et de Kap121, les quantités d'Arx1 dans le cytoplasme, la température, la salinité, la nature du milieu, ou encore la phase de croissance des levures. Des expériences complémentaires, où

chacun de ces paramètres devra être strictement contrôlé, seront nécessaires afin de trancher entre ces deux modèles contradictoires. Ces travaux pourraient conduire à l'élaboration d'un nouveau modèle, nécessairement plus complexe, qui tiendrait compte de l'équilibre instable entre les différents états d'Arx1.

En dehors de ces résultats contradictoires, une donnée marquante se dégage de l'article de Hung et Johnson : la localisation de Arx1 sur la particule pré-60S. Ces auteurs ont remarqué que les fusions des protéines ribosomiques Rpl25 et Rpl39 à la GFP gênaient l'association de Arx1 aux particules pré-60S. Ils en ont déduit que le site de fixation de Arx1 aux complexes pré-60S était localisé à proximité du canal de sortie des peptides naissants, par analogie avec la structure de la grande sous-unité ribosomique mature.

Ces données sont particulièrement intéressantes si l'on tient compte du fait que Arx1 possède une forte homologie avec les protéines de la famille des méthionine-aminopeptidases cytoplasmiques (Map1 et Map2 chez *S. cerevisiae*). Ces métallopeptidases, essentielles aussi bien chez les Procaryotes que chez les Eucaryotes, clivent les méthionines amino-terminales des peptides en cours de synthèse (Chang et al., 1990; Li et Chang, 1995). Grâce à des domaines en doigts de zinc situés dans leur partie N-terminale, elles se fixent aux ribosomes au cours de la traduction (Vetro et Chang, 2002), probablement à proximité de leur substrat, et donc du canal de sortie des peptides néosynthétisés.

L'homologie de Arx1 avec ces méthionine-aminopeptidases est principalement localisée dans la partie N-terminale de la protéine. D'après Hungh et Johnson, les motifs caractéristiques d'une protéine de cette famille sont particulièrement bien conservés chez Arx1, mais pas les acides-aminés clefs du site catalytique. Ces données suggèrent que Arx1 mime structuralement les méthionine-aminopeptidases cytoplasmiques, et occupe en conséquence leur position sur la particule pré-60S en cours de maturation, mais qu'elle n'exerce pas nécessairement une fonction enzymatique de peptidase. D'après ces auteurs, l'analogie structurale permettrait de bloquer l'interaction des particules immatures avec différents facteurs (par exemple, Map1 et Map2). Alternativement, la structure d'aminopeptidase pourrait permettre à Arx1 de s'ancrer aux pré-ribosomes à un site privilégié, et d'y exercer sa fonction pré-ribosomique.

4. La fabrication des ribosomes est coordonnée à d'autres voies métaboliques

La fabrication des ribosomes est centrale pour le métabolisme cellulaire. Ceci se traduit pas une coordination entre cette voie et d'autres voies métaboliques. Les travaux menés au cours de cette étude apportent un certain nombre d'éléments mettant en lumière la nécessité d'une telle coordination.

4.1. Liens avec la traduction

La fabrication des ribosomes est, bien entendu, concertée avec la traduction, puisqu'elle conditionne la quantité de ribosomes disponibles dans les cellules. Ceci ressort très nettement de la co-régulation des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes avec ceux impliqués dans la traduction, en particulier lors de réponses à divers stress cellulaires (Jorgensen et al., 2004).

Nos travaux semblent indiquer ici qu'il existerait, de plus, un contrôle-qualité des sous-unités ribosomiques dans le cytoplasme, à la fin de la biogenèse et avant l'entrée dans la traduction. Ce contrôle nécessiterait le départ du facteur d'anti-association Tif6, qui serait lui-même conditionné par un certain nombre d'événements moléculaires impliquant les facteurs cytoplasmiques Rei1 (Lebreton et al., 2006b) et Efl1 (Senger et al., 2001).

Une hypothèse émise par le laboratoire était que l'échange entre le facteur pré-60S Rlp24 et son homologue ribosomique Rpl24 pourrait marquer la transition entre les particules immatures et les sous-unités matures. Rlp24 et Rpl24 semblent mutuellement exclusives sur les particules, mais nous n'avons pas pu déterminer si elles occupent successivement le même site, ni si un tel échange a lieu. En définitive, que cet échange ait lieu ou non, il ne semble pas déterminant pour marquer la fin de la biogenèse des ribosomes, car l'absence de Rpl24 ne se traduit ni par un défaut de décrochage de Rlp24 des particules, ni par un défaut d'utilisation de ces particules pour la traduction.

4.2. Liens avec le transport nucléo-cytoplasmique

En raison de la compartimentation cellulaire, la biogenèse des ribosomes est nécessairement liée à des phénomènes de transport nucléo-cytoplasmiques : la plupart des protéines ribosomiques et des facteurs pré-ribosomiques doivent être importés vers le nucléole pour participer aux étapes nucléaires de fabrication des ribosomes. Les précurseurs des sous-unités ribosomiques doivent ensuite être exportés vers le cytoplasme, pour y achever leur maturation et entrer dans la traduction.

Cette étude a souligné l'importance du recyclage des facteurs pré-60S navettes pour l'efficacité de la biogenèse des ribosomes. Des travaux précédents avaient déjà suggéré le rôle central de ce recyclage, en décrivant un lien entre la karyophérine Kap123 et le facteur pré-60S Rai1 (Sydorskyy et al., 2003). Ici, nous avons montré que le recyclage des facteurs navettes Arx1 et Alb1 était dépendant de la karyophérine Kap121 ; des défauts de l'import nucléaire de ces facteurs entraînent un défaut de recyclage de Tif6, ce qui se traduit, du point de vue nucléaire, par des défauts de biogenèse de la sous-unité 60S et probablement, du point de vue cytoplasmique, par une inhibition de l'association entre les sous-unités 60S et 40S. Dans des conditions physiologiques, ces mécanismes de recyclage des facteurs navettes doivent donc être strictement régulés.

L'étude génétique de ce réseau de recyclage des facteurs navettes offre des perspectives intéressantes. Le mutant *arx1Δ* présente des phénotypes de létalité synthétique avec plusieurs nucléoporines (Nup2, Nup42, Nup59) ou composants du pore nucléaire

(Pom34, Pom152). Ceci suggère que le rôle de Arx1 pourrait être directement lié au transport nucléo-cytoplasmique, soit par un lien avec l'import des facteurs vers le noyau, soit au contraire par un lien avec l'export des pré-ribosomes.

4.3. Liens avec la croissance et le cycle cellulaire

Comme chez les bactéries, l'activité de la biogenèse des ribosomes eucaryotes est corrélée à la croissance cellulaire. D'une part, la biogenèse doit être particulièrement active quand les cellules se divisent activement, afin de permettre le renouvellement du stock de ribosomes d'une génération à la suivante et d'assurer la synthèse des constituants cellulaires ; d'autre part, la biogenèse doit être réprimée efficacement dans les cellules quiescentes, afin d'éviter des déperditions énergétiques trop conséquentes (Warner, 1999).

Ces régulations fines semblent perdues dans les cellules cancéreuses, où l'on observe à la fois une prolifération cellulaire et une activité très importante des voies de biogenèse des ribosomes, sans rétrocontrôle négatif. L'observation que l'homologue humain de *NSA2*, *TINP1*, est surexprimé en réponse au TGFß, et probablement dérégulé chez les patients atteints de leucémie à tricholeucocytes, conduit à s'interroger sur la nature des causes premières du déclenchement des cancers. En d'autres termes, est-ce parce que les cellules deviennent cancéreuses que les besoins de biogenèse des ribosomes sont accrus, et que certains facteurs comme TinP1 se trouvent dérégulés, ou au contraire, la surexpression de facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes pourrait-elle aboutir, seule, à une prolifération cellulaire incontrôlée ? L'occurrence fréquente de cancers chez les patients pour lesquels le locus du gène *TINP1* est compromis semble plaider en faveur de la seconde hypothèse. Cependant, la plupart des cancers étant des pathologies multifactorielles, il est difficile de trancher sans ambiguïté ; il est fort possible que, parmi les événements participant au processus oncogène, les dérégulations de la biogenèse des ribosomes soient essentielles, mais qu'elles ne soient pas suffisantes, seules, pour déclencher la pathologie.

Chez la levure, le facteur Rei1 (*Required for isotropic bud growth*) pourrait constituer l'un des liens entre la biogenèse des ribosomes et la croissance cellulaire. En effet, ce facteur semble impliqué dans un réseau de régulations centré sur la kinase Swe1, par l'intermédiaire de Nis1 (Iwase et Toh-e, 2004). La kinase Swe1 est le carrefour d'un certain nombre d'événements moléculaires aboutissant à l'inhibition de kinases dépendantes des cyclines, qui contrôlent la transition entre les phases de croissance polaire et isotrope des bourgeons de levures.

À l'image de Rei1, d'autres facteurs semblent impliqués dans ces deux voies. Par exemple, Sda1 participerait également au réseau de transduction des signaux mitotiques par l'intermédiaire de Swe1 (Saracino et al., 2004). Il a été proposé que Sda1 contrôlerait le passage de stades quiescent à des stades proliératifs, en relation avec l'activité de la synthèse protéique. De façon intéressante, Nap1, qui appartient à ce réseau mitotique, établit des interactions avec les deux facteurs pré-ribosomiques Sda1 (Gavin et al., 2002; Krogan et al., 2004) et Rei1 (Krogan et al., 2004).

Afin d'étudier le lien entre Rei1 et la croissance des bourgeons, une piste d'étude semple être le domaine E-MAP-115 de cette protéine. Ce domaine a été mis en évidence dans l'ensconsine, une protéine d'Eucaryotes supérieurs de 115kDa associée aux microtubules dans les cellules épithéliales (Masson et Kreis, 1993). Cette protéine pourrait participer à la polarisation des épithelia et à la différentiation cellulaire (Fabre-Jonca et al., 1998). Si Rei1 interagit également avec les microtubules, nour pouvons imaginer qu'elle oriente les sous-unités ribosomiques néo-synthétisées vers les sites de bourgeonnement. À ces sites en effet, la croissance du bourgeon requiert une activité de synthèse protéique importante, et de nouveaux ribosomes sont nécessaires pour constituer une dot de machinerie traductionnelle à la cellule

fille. Une hypothèse non moins séduisante serait que Rei1 ne déclenche la dissociation de Tif6 des particules pré-60S qu'une fois qu'elles ont atteint les sites de traduction.

5. Quelques remarques finalistes

En observant la structure du ribosome, on peut s'interroger sur les raisons évolutives conduisant à la sélection, pour ce processus central dans la vie cellulaire, d'un assemblage macromoléculaire aussi complexe, et dont la fabrication est aussi coûteuse en énergie.

Si l'on raisonne en termes de taille de la particule, un ribosome est à peu près aussi grand que la plus grande protéine eucaryote connue, la titine (26926 acides aminés, soit environ 3 MDa). Un premier élément de réponse ressort immédiatement de cette comparaison : la synthèse de la titine par un ribosome à partir de son ARNm requiert plusieurs heures aux cellules qui la produisent, soit une durée supérieure au temps de génération d'une levure. L'existence de ribosomes sous forme d'une unique chaîne protéique est par conséquent impossible dans les cellules se divisant activement, car la quantité de ribosomes serait alors insuffisante pour la duplication du stock nécessaire pour engendrer une cellule fille. Par ailleurs, un tel ribosome nécessiterait la synthèse d'ARNm monocistroniques d'environ 100 000 nucléotides ; compte tenu de la faible fidélité des ARN polymérases, la probabilité d'occurrence d'erreurs dans la synthèse de ces messagers serait élevée (environ 2 à 10 erreurs par transcrit), ce qui conduirait à la formation de protéines non fonctionnelles. Enfin, d'un point de vue structural, le repliement d'une chaîne protéique de cette taille sous forme globulaire poserait de nombreux problèmes de gêne stérique, nécessiterait l'activité de nombreuses chaperones pendant une durée non négligeable, et conduirait sans doute souvent à une protéine mal repliée. On remarquera en ce sens que la titine est une protéine fibreuse composée de plusieurs centaines de domaines fibronectine de type III et immunoglobuline (Labeit et Kolmerer, 1995).

À l'inverse, les constituants du ribosome étant synthétisés séparément (mais de façon concertée) par une multitude d'unités transcriptionnelles et traductionnelles, la durée de production de chaque constituant pris indépendamment, et *in fine* de ribosomes matures, se retrouve nettement réduite. En particulier, une grande part du ribosome est constituée d'ARN, dont la synthèse est bien plus rapide que celle des protéines : La vitesse d'élongation des ARNr par l'ARN polymérase I en cellules de Mammifères est de 95 nucléotides par seconde (Dundr et al., 2002), soit environ 5000 nucléotides ou 1 500 kDa par minute ; en revanche, la vitesse de synthèse protéique est de l'ordre de 200 acides aminés ou 20 kDa par minute (Lodish et al., 2004). Ainsi, pour un même équipement transcriptionnel et traductionnel, la cellule est à même de produire un plus grand nombre de ribosomes par unité de temps, sans pour autant saturer la voie de fabrication. De plus, en cas d'occurrence d'erreurs dans la synthèse, les conséquences sont de moindre ampleur, car elles n'affectent qu'une pièce du ribosome, et non l'ensemble. Enfin, l'acquisition de la structure globulaire est favorisée par l'organisation en petites unités susceptibles de se replier, du moins en partie, indépendamment de la structure finale.

Pour mieux comprendre cette comparaison entre la titine et les ribosomes, il pourrait être intéressant de modéliser, sur plusieurs générations, les flux cellulaires ainsi que les encombrements des machineries transcriptionnelle, traductionnelle et de maturation nécessaires pour obtenir l'un ou l'autre produit en quantités comparables.

On remarquera que la plupart des protéines ribosomiques sont de petite taille, en comparaison aux autres protéines cellulaires. Le cas est légèrement différent pour les facteurs pré-ribosomiques, dont la taille peut atteindre plusieurs centaines de Da. Toutefois, la pression de sélection en faveur d'une synthèse rapide de ces facteurs est probablement moindre, si l'on considère que chacun d'entre eux peut en théorie participer à la fabrication de plusieurs ribosomes, puis être recyclé.

Un deuxième axe peut nous éclairer dans la tentative de compréhension d'un tel assemblage : celui de la perspective évolutive. En effet, si un ribosome est constitué d'une multitude d'unités protéiques et nucléotidiques distinctes, dont un certain nombre ne sont pas essentielles, chacune est susceptible de suivre un chemin évolutif indépendant des autres. Cette organisation est plutôt favorable à l'apparition aléatoire de mutations sans conséquences à court terme, mais pouvant éventuellement conduire à l'apparition de nouvelles fonctions, ou de raffinements de l'activité ribosomique. Les arguments en faveur de cette piste théorique sont doubles. D'une part, les ribosomes eucaryotes, plus processifs, sont plus riches en protéines que les ribosomes procaryotes. Ceci suggère que la pression sélective s'est exercée en faveur de la capacité de diversification apportée par les protéines. D'autre part, un certain nombre de gènes de protéines ribosomiques sont dupliqués chez les Eucaryotes. Au-delà du rôle purement quantitatif de ces duplications, elles constituent un réservoir de gènes non négligeable, au sein duquel de nouvelles fonctions sont susceptibles d'apparaître.

6. Conclusion

Ces travaux ont permis d'apporter quelques précisions sur la dynamique des facteurs pré-ribosomiques au cours de la biogenèse de la grande sous-unité-ribosomique. D'une part, ils offrent de nouvelles informations sur l'ordre d'association et de dissociation des facteurs pré-ribosomiques au cours de la biogenèse ; d'autre part, ils mettent en lumière la nécessité d'une coordination précise des événements impliqués dans la biogenèse pour assurer la fabrication de sous-unités matures. Ainsi, nous avons vu que la maturation correcte des intermédiaires d'ARN 27SB nécessitait l'intervention de plusieurs facteurs pré-60S essentiels ; parmi eux, Nsa2 apparaît comme un facteur instable, très régulé, et pourrait centraliser un certain nombre de signaux de contrôle de l'avancement de la biogenèse. Par ailleurs, nous avons montré que la fin de la biogenèse des ribosomes nécessitait une concertation étroite entre les derniers événements de maturation des particules pré-ribosomiques, la dissociation et le recyclage des derniers facteurs pré-ribosomiques.

Un grand nombre de questions concernant les mécanismes de la biogenèse des ribosomes restent ouvertes. En particulier, la fonction précise de la plupart des facteurs impliqués au cours de cette voie métabolique est encore inconnue. Inversement, certaines des activités enzymatiques responsables d'étapes de maturation des ARNr, comme par exemple le clivage de l'ITS2, n'ont pas été attribuées. À la suite de cette étude, plusieurs pistes s'ouvrent pour des recherches ultérieures dans le domaine, parmi lesquelles : (*i*) L'analyse exhaustive de l'ordre d'association des facteurs pré-ribosomiques, en utilisant des techniques comme le SILAC, et d'autres approches complémentaires. (*ii*) L'étude des mécanismes de transport-nucléo-cytoplasmiques en relation avec la biogenèse des ribosomes ; une approche possible du problème serait l'investigation des liens mis en évidence entre Kap121, Arx1 et les protéines du pore nucléaire. (*iii*) L'étude des relations entre la biogenèse des ribosomes et la prolifération cellulaire ; ce dernier sujet pourrait prendre deux orientations : l'une porterait sur les relations entre Rei1 et le site de bourgeonnement, l'autre serait une approche en cellules humaines, afin de déterminer si les dérégulations pathologiques de l'homologue de *NSA2*, *TINP1*, affectent la biogenèse des ribosomes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Allmang, C., E. Petfalski, A. Podtelejnikov, M. Mann, D. Tollervey, et P. Mitchell. 1999. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' --> 5' exonucleases. *Genes Dev*. 13:2148-58.
2. Andersen, J.S., C.E. Lyon, A.H. Fox, A.K. Leung, Y.W. Lam, H. Steen, M. Mann, et A.I. Lamond. 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*. 12:1-11.
3. Badis, G., C. Saveanu, M. Fromont-Racine, et A. Jacquier. 2004. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol Cell*. 15:5-15.
4. Bakin, A., B.G. Lane, et J. Ofengand. 1994. Clustering of pseudouridine residues around the peptidyltransferase center of yeast cytoplasmic and mitochondrial ribosomes. *Biochemistry*. 33:13475-83.
5. Bassler, J., P. Grandi, O. Gadal, T. Lessmann, E. Petfalski, D. Tollervey, J. Lechner, et E. Hurt. 2001. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell*. 8:517-29.
6. Baudin-Baillieu, A., E. Guillemet, C. Cullin, et F. Lacroute. 1997. Construction of a yeast strain deleted for the TRP1 promoter and coding region that enhances the efficiency of the polymerase chain reaction-disruption method. *Yeast*. 13:353-6.
7. Bernstein, K.A., S. Granneman, A.V. Lee, S. Manickam, et S.J. Baserga. 2006. Comprehensive Mutational Analysis of Yeast DEXD/H Box RNA Helicases Involved in Large Ribosomal Subunit Biogenesis. *Mol Cell Biol*. 26:1195-208.
8. Bloom, et Fawcett. 1994. A Textbook of Histology.
9. Bonnerot, C., L. Pintard, et G. Lutfalla. 2003. Functional redundancy of Spb1p and a snR52-dependent mechanism for the 2'-O-ribose methylation of a conserved rRNA position in yeast. *Mol Cell*. 12:1309-15.
10. Brachmann, C.B., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, et J.D. Boeke. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 14:115-32.
11. Brenner, S., F. Jacob, et M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*. 190:576-581.
12. Brosius, J., T.J. Dull, D.D. Sleeter, et H.F. Noller. 1980. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*. 148:107-127.
13. Bylund, G.O., L.C. Wipemo, L.A. Lundberg, et P.M. Wikstrom. 1998. RimM and RbfA are essential for efficient processing of 16S rRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 180:73-82.
14. Cavanaugh, A.H., I. Hirschler-Laszkiewicz, Q. Hu, M. Dundr, T. Smink, T. Misteli, et L.I. Rothblum. 2002. Rrn3 phosphorylation is a regulatory checkpoint for ribosome biogenesis. *J Biol Chem*. 277:27423-32.
15. Chang, Y.H., U. Teichert, and J.A. Smith. 1990. Purification and characterization of a methionine aminopeptidase from Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*. 265:19892-7.
16. Charollais, J., M. Dreyfus, et I. Iost. 2004. CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res*. 32:2751-9.

17. Charollais, J., D. Pflieger, J. Vinh, M. Dreyfus, et I. Iost. 2003. The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 48:1253-65.

18. Chen, D., et S. Huang. 2001. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol*. 153:169-76.

19. Chen, J.C., et T. Powers. 2006. Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Curr Genet*:1-13.

20. Chu, S., R.H. Archer, J.M. Zengel, et L. Lindahl. 1994. The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:659-63.

21. Coute, Y., J.A. Burgess, J.J. Diaz, C. Chichester, F. Lisacek, A. Greco, et J.C. Sanchez. 2006. Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom Rev*. 25:215-34.

22. Crespo, J.L., et M.N. Hall. 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66:579-91, table of contents.

23. Culver, G.M. 2003. Assembly of the 30S ribosomal subunit. *Biopolymers*. 68:234-49.

24. Dabeva, M.D., M.A. Post-Beittenmiller, et J.R. Warner. 1986. Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:5854-7.

25. Dahlberg, J.E., et E. Lund. 2004. Does protein synthesis occur in the nucleus? *Curr Opin Cell Biol*. 16:335-8.

26. Dammann, R., R. Lucchini, T. Koller, et J.M. Sogo. 1993. Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 21:2331-8.

27. de la Cruz, J., E. Sanz-Martinez, et M. Remacha. 2005. The essential WD-repeat protein Rsa4p is required for rRNA processing and intra-nuclear transport of 60S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Res*. 33:5728-39.

28. Decatur, W.A., et M.J. Fournier. 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci*. 27:344-51.

29. Delahodde, A., R. Pandjaitan, M. Corral-Debrinski, et C. Jacq. 2001. Pse1/Kap121-dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1. *Mol Microbiol*. 39:304-12.

30. Dichtl, B., A. Stevens, et D. Tollervey. 1997. Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. *Embo J*. 16:7184-95.

31. Dlakic, M., et D. Tollervey. 2004. The Noc proteins involved in ribosome synthesis and export contain divergent HEAT repeats. *Rna*. 10:351-4.

32. Dragon, F., J.E. Gallagher, P.A. Compagnone-Post, B.M. Mitchell, K.A. Porwancher, K.A. Wehner, S. Wormsley, R.E. Settlage, J. Shabanowitz, Y. Osheim, A.L. Beyer, D.F. Hunt, S.J. Baserga, M. Mann, C.W. Hogue, D. Figeys, et M. Tyers. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*. 417:967-70.

33. Druzina, Z., et B.S. Cooperman. 2004. Photolabile anticodon stem-loop analogs of tRNAPhe as probes of ribosomal structure and structural fluctuation at the decoding center. *Rna*. 10:1550-62.

34. Dudzinska-Bajorek, B., K. Bakowska, et T. Twardowski. 2006. Conformational changes of L-rRNA during elongation of polypeptide. *J Plant Physiol*. 163:463-74.

35. Dundr, M., U. Hoffmann-Rohrer, Q. Hu, I. Grummt, L.I. Rothblum, R.D. Phair, et T. Misteli. 2002. A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science*. 298:1623-6.

36. Eisenhaber, F., C. Wechselberger, et G. Kreil. 2001. The Brix domain protein family -- a key to the ribosomal biogenesis pathway? *Trends Biochem Sci*. 26:345-7.

37. El Hage, A., M. Sbai, et J.H. Alix. 2001. The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. 264:796-808.

38. El Hage, A., et D. Tollervey. 2004. Why is ribosome Assembly so Much More Complicated in eukaryotes than Bacteria? *RNA Biology*. 1:10-15.

39. Elela, S.A., H. Igel, et M. Ares, Jr. 1996. RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell*. 85:115-24.

40. Faber, A.W., M. Van Dijk, H.A. Raue, et J.C. Vos. 2002. Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. *Rna*. 8:1095-101.

41. Fabre-Jonca, N., J.M. Allaman, G. Radlgruber, P. Meda, J.Z. Kiss, L.E. French, et D. Masson. 1998. The distribution of murine 115-kDa epithelial microtubule-associated protein (E-MAP-115) during embryogenesis and in adult organs suggests a role in epithelial polarization and differentiation. *Differentiation*. 63:169-80.

42. Fang, J., M. Sullivan, et T.F. McCutchan. 2004. The effects of glucose concentration on the reciprocal regulation of rRNA promoters in Plasmodium falciparum. *J Biol Chem*. 279:720-5.

43. Fath, S., P. Milkereit, G. Peyroche, M. Riva, C. Carles, et H. Tschochner. 2001. Differential roles of phosphorylation in the formation of transcriptional active RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14334-9.

44. Fatica, A., et D. Tollervey. 2002. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 14:313-8.

45. Fewell, S.W., et J.L. Woolford, Jr. 1999. Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to RPS14B pre-mRNA and to 18S rRNA. *Mol Cell Biol*. 19:826-34.

46. Fontana, F. 1781. Traité sur le venin de la vipère, sur les poisons américains, sur le laurier cerise et sur quelques autres poisons végétaux, Florence.

47. Freud, S. 1881. Überden Bauder Nevenfasern und Nevenzellen beim Flußkrebs, Austrian Academy of Sciences.

48. Fromont-Racine, M., B. Senger, C. Saveanu, et F. Fasiolo. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*. 313:17-42.

49. Gaal, T., M.S. Bartlett, W. Ross, C.L. Turnbough, Jr., et R.L. Gourse. 1997. Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science*. 278:2092-7.

50. Gaal, T., et R.L. Gourse. 1990. Guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate is not required for growth rate-dependent control of rRNA synthesis in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:5533-7.

51. Gadal, O., D. Strauss, J. Braspenning, D. Hoepfner, E. Petfalski, P. Philippsen, D. Tollervey, et E. Hurt. 2001a. A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *Embo J*. 20:3695-704.

52. Gadal, O., D. Strauss, J. Kessl, B. Trumpower, D. Tollervey, et E. Hurt. 2001b. Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol*. 21:3405-15.

53. Galani, K., T.A. Nissan, E. Petfalski, D. Tollervey, et E. Hurt. 2004. Rea1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits. *J Biol Chem*. 279:55411-8.

54. Gavin, A.C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J.M. Rick, A.M. Michon, C.M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M.A. Heurtier, R.R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, et G. Superti-Furga. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 415:141-7.

55. Geerlings, T.H., J.C. Vos, et H.A. Raue. 2000. The final step in the formation of 25S rRNA in Saccharomyces cerevisiae is performed by 5'-->3' exonucleases. *Rna*. 6:1698-703.

56. Gelperin, D., L. Horton, J. Beckman, J. Hensold, et S.K. Lemmon. 2001. Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *Rna*. 7:1268-1283.

57. Ghaemmaghami, S., W.K. Huh, K. Bower, R.W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E.K. O'Shea, et J.S. Weissman. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 425:737-41.

58. Gourse, R.L., H.A. de Boer, et M. Nomura. 1986. DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell*. 44:197-205.

59. Grandi, P., V. Rybin, J. Bassler, E. Petfalski, D. Strauss, M. Marzioch, T. Schafer, B. Kuster, H. Tschochner, D. Tollervey, A.C. Gavin, et E. Hurt. 2002. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell*. 10:105-15.

60. Granneman, S., K.A. Bernstein, F. Bleichert, et S.J. Baserga. 2006. Comprehensive Mutational Analysis of Yeast DEXD/H Box RNA Helicases Required for Small Ribosomal Subunit Synthesis. *Mol Cell Biol*. 26:1183-94.

61. Gros, F., H. Hiatt, et W. Gilbert. 1961. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of *Eschericha coli*. *Nature*. 190:581-585.

62. Harnpicharnchai, P., J. Jakovljevic, E. Horsey, T. Miles, J. Roman, M. Rout, D. Meagher, B. Imai, Y. Guo, C.J. Brame, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, et J.L. Woolford, Jr. 2001. Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell*. 8:505-15.

63. Hedges, J., M. West, et A.W. Johnson. 2005. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *Embo J*. 24:567-79. Epub 2005 Jan 20.

64. Held, W.A., M. Nomura, et J.W. Hershey. 1974. Ribosomal protein S21 is required for full activity in the initiation of protein synthesis. *Mol Gen Genet*. 128:11-22.

65. Henry, Y., H. Wood, J.P. Morrissey, E. Petfalski, S. Kearsey, et D. Tollervey. 1994. The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *Embo J*. 13:2452-63.

66. Ho, J.H., et A.W. Johnson. 1999. NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*. 19:2389-99.

67. Ho, J.H., G. Kallstrom, et A.W. Johnson. 2000. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol*. 151:1057-66.

68. Holben, W.E., et E.A. Morgan. 1984. Antitermination of transcription from an *Escherichia coli* ribosomal RNA promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:6789-93.

69. Hong, B., K. Wu, J.S. Brockenbrough, P. Wu, et J.P. Aris. 2001. Temperature sensitive nop2 alleles defective in synthesis of 25S rRNA and large ribosomal subunits in Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res*. 29:2927-37.

70. Houseley, J., et D. Tollervey. 2005. Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase. *EMBO Rep*.

71. Hughes, J.M., et M. Ares, Jr. 1991. Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *Embo J*. 10:4231-9.

72. Hung, N.J., et A.W. Johnson. 2006. Nuclear Recycling of the Pre-60S Ribosomal Subunit-Associated Factor Arx1 Depends on Rei1 in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*. 26:3718-27.

73. Iborra, F.J., D.A. Jackson, et P.R. Cook. 2001. Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*. 293:1139-42.

74. Isoyama, T., A. Murayama, A. Nomoto, et S. Kuge. 2001. Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *J Biol Chem*. 276:21863-9. Epub 2001 Mar 23.

75. Inoue, K., J. Alsina, J. Chen, et M. Inouye. 2003. Suppression of defective ribosome assembly in a rbfA deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in Escherichia coli. *Mol Microbiol*. 48:1005-16.

76. Iwase, M., et A. Toh-e. 2004. Ybr267w is a new cytoplasmic protein belonging to the mitotic signaling network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Struct Funct*. 29:1-15.

77. Jacob, F., et J. Monod. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*. 3:318-56.

78. Johnson, A.W., E. Lund, et J. Dahlberg. 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci*. 27:580-585.

79. Jorgensen, P., I. Rupes, J.R. Sharom, L. Schneper, J.R. Broach, et M. Tyers. 2004. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev*. 18:2491-505.

80. Kaffman, A., N.M. Rank, et E.K. O'Shea. 1998. Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev*. 12:2673-83.

81. Kallstrom, G., J. Hedges, et A. Johnson. 2003. The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol Cell Biol*. 23:4344-55.

82. Karbstein, K., et J.A. Doudna. 2005. GTP-dependent Formation of a Ribonucleoprotein Subcomplex Required for Ribosome Biogenesis. *J Mol Biol*.

83. Konings, D.A., et R.R. Gutell. 1995. A comparison of thermodynamic foldings with comparatively derived structures of 16S and 16S-like rRNAs. *Rna*. 1:559-74.

84. Kozak, M. 1978. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*. 15:1109-23.

85. Kozak, M. 1980. Evaluation of the "scanning model" for initiation of protein synthesis in eucaryotes. *Cell*. 22:7-8.

86. Kressler, D., M. Rojo, P. Linder, et J. Cruz. 1999. Spb1p is a putative methyltransferase required for 60S ribosomal subunit biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res*. 27:4598-608.

87. Krogan, N.J., W.T. Peng, G. Cagney, M.D. Robinson, R. Haw, G. Zhong, X. Guo, X. Zhang, V. Canadien, D.P. Richards, B.K. Beattie, A. Lalev, W. Zhang, A.P. Davierwala, S. Mnaimneh, A. Starostine, A.P. Tikuisis, J. Grigull, N. Datta, J.E. Bray, T.R. Hughes, A. Emili, et J.F. Greenblatt. 2004. High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell*. 13:225-39.

88. Kruiswijk, T., R.J. Planta, et J.M. Krop. 1978. The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast. *Biochim Biophys Acta*. 517:378-89.

89. Kufel, J., C. Allmang, E. Petfalski, J. Beggs, et D. Tollervey. 2003. Lsm Proteins are required for normal processing and stability of ribosomal RNAs. *J Biol Chem*. 278:2147-56.

90. Kufel, J., B. Dichtl, et D. Tollervey. 1999. Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *Rna*. 5:909-17.

91. Labeit, S., et B. Kolmerer. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*. 270:293-6.

92. Lafontaine, D., J. Delcour, A.L. Glasser, J. Desgres, et J. Vandenhaute. 1994. The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. *J Mol Biol*. 241:492-7.

93. Lafontaine, D., J. Vandenhaute, et D. Tollervey. 1995. The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev*. 9:2470-81.

94. Lafontaine, D.L., T. Preiss, et D. Tollervey. 1998. Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Mol Cell Biol*. 18:2360-70.

95. Lafontaine, D.L., et D. Tollervey. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:514-20.

96. Lapeyre, B., et S.K. Purushothaman. 2004. Spb1p-directed formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Mol Cell*. 16:663-9.

97. LaRonde-LeBlanc, N., et A. Wlodawer. 2005. A family portrait of the RIO kinases. *J Biol Chem*. 280:37297-300.

98. Lebreton, A., C. Saveanu, L. Decourty, A. Jacquier, et M. Fromont-Racine. 2006a. Nsa2, an unstable, conserved factor required for the maturation of 27SB pre-rRNAs. *J Biol Chem*. 281:27099-108.

99. Lebreton, A., C. Saveanu, L. Decourty, J.C. Rain, A. Jacquier, et M. Fromont-Racine. 2006b. A functional network involved in the recycling of nucleo-cytoplasmic pre-60S factors. *J Cell Biol*. 173:349-360.

100. Leger-Silvestre, I., S. Trumtel, J. Noaillac-Depeyre, et N. Gas. 1999. Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma*. 108:103-13.

101. Leslie, D.M., B. Grill, M.P. Rout, R.W. Wozniak, et J.D. Aitchison. 2002. Kap121p-mediated nuclear import is required for mating and cellular differentiation in yeast. *Mol Cell Biol*. 22:2544-55.

102. Leslie, D.M., W. Zhang, B.L. Timney, B.T. Chait, M.P. Rout, R.W. Wozniak, et J.D. Aitchison. 2004. Characterization of karyopherin cargoes reveals unique mechanisms of Kap121p-mediated nuclear import. *Mol Cell Biol*. 24:8487-503.

103. Li, S.C., C.L. Squires, et C. Squires. 1984. Antitermination of *E. coli* rRNA transcription is caused by a control region segment containing *lambda* nut-like sequences. *Cell*. 38:851-60.

104. Li, X., et Y.H. Chang. 1995. Amino-terminal protein processing in Saccharomyces cerevisiae is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:12357-61.

105. Lindahl, L., R.H. Archer, et J.M. Zengel. 1992. A new rRNA processing mutant of Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res*. 20:295-301.

106. Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, S.L. Zipurky, et J. Darnell. 2004. Molecular Cell Biology. Freeman.

107. Lygerou, Z., C. Allmang, D. Tollervey, et B. Seraphin. 1996. Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science*. 272:268-70.

108. Marks, P.A., E.R. Burka, et D. Schlessinger. 1962. Protein synthesis in erythroïd cells. I. reticulocyte ribosomes active in stimulating amino acid incorporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 48:2163-2171.

109. Masson, D., et T.E. Kreis. 1993. Identification and molecular characterization of E-MAP-115, a novel microtubule-associated protein predominantly expressed in epithelial cells. *J Cell Biol*. 123:357-71.

110. Matsuo, Y., T. Morimoto, M. Kuwano, P.C. Loh, T. Oshima, et N. Ogasawara. 2006. The GTP-binding protein, YlqF, participates in the late step of 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*.

111. McClintock, B. 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea Mays. *Z Zellf*. 21:294-328.

112. Mitchell, P., E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann, et D. Tollervey. 1997. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell*. 91:457-66.

113. Mitchell, P., E. Petfalski, et D. Tollervey. 1996. The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes Dev*. 10:502-13.

114. Mizuta, K., et J.R. Warner. 1994. Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis. *Mol Cell Biol*. 14:2493-502.

115. Montgomery, T.H. 1898. Comparative cytological studies, with especial regards to the morphology of the nucleolus. *J. Morphol*. 15:265-582.

116. Morimoto, T., P.C. Loh, T. Hirai, K. Asai, K. Kobayashi, S. Moriya, et N. Ogasawara. 2002. Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in Bacillus subtilis. *Microbiology*. 148:3539-52.

117. Nierhaus, K.H. 1991. The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie*. 73:739-55.

118. Nilsson, L., A. Vanet, E. Vijgenboom, et L. Bosch. 1990. The role of FIS in trans activation of stable RNA operons of *E. coli*. *Embo J*. 9:727-34.

119. Nirenberg, M.W., et J.H. Matthaei. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 47:1588-602.

120. Nissan, T.A., J. Bassler, E. Petfalski, D. Tollervey, et E. Hurt. 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *Embo J*. 21:5539-5547.

121. Noller, H.F. 1984. Structure of ribosomal RNA. *Annu Rev Biochem*. 53:119-62.

122. Nomura, M. 1999. Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and common principles. *J Bacteriol*. 181:6857-64.

123. Oeffinger, M., M. Dlakic, et D. Tollervey. 2004. A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev*. 18:196-209.

124. Olson, M.O.J. 2004. The Nucleolus. Kluwer Academic / Plenum. 347 pp.

125. Ong, S.E., B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, et M. Mann. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 1:376-86.

126. Palade, G.E. 1955. A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol*. 1:59-68.

127. Peske, F., A. Savelsbergh, V.I. Katunin, M.V. Rodnina, et W. Wintermeyer. 2004. Conformational changes of the small ribosomal subunit during elongation factor G-dependent tRNA-mRNA translocation. *J Mol Biol*. 343:1183-94.

128. Phair, R.D., et T. Misteli. 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*. 404:604-9.

129. Powers, T., et P. Walter. 1999. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 10:987-1000.

130. Presutti, C., S.A. Ciafre, et I. Bozzoni. 1991. The ribosomal protein L2 in *S. cerevisiae* controls the level of accumulation of its own mRNA. *Embo J*. 10:2215-21.

131. Reeder, R.H. 1999. Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 62:293-327.

132. Retel, J., et R.J. Planta. 1967. Ribosomal precursor RNA in Saccharomyces carlsbergensis. *Eur J Biochem*. 3:248-58.

133. Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, et B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. 17:1030-2.

134. Rodnina, M.V., T. Daviter, K. Gromadski, et W. Wintermeyer. 2002. Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie*. 84:745-54.

135. Ross, W., K.K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov, et R.L. Gourse. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science*. 262:1407-13.

136. Ross, W., J.F. Thompson, J.T. Newlands, et R.L. Gourse. 1990. *E.coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. *Embo J*. 9:3733-42.

137. Rout, M.P., G. Blobel, et J.D. Aitchison. 1997. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell*. 89:715-25.

138. Sandmeier, J.J., S. French, Y. Osheim, W.L. Cheung, C.M. Gallo, A.L. Beyer, et J.S. Smith. 2002. RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *Embo J*. 21:4959-68.

139. Saracino, F., J. Bassler, D. Muzzini, E. Hurt, et M.L. Agostoni Carbone. 2004. The yeast kinase Swe1 is required for proper entry into cell cycle after arrest due to ribosome biogenesis et protein synthesis defects. *Cell Cycle*. 3:648-54. Epub 2004 May 15.

140. Sato, A., G. Kobayashi, H. Hayashi, H. Yoshida, A. Wada, M. Maeda, S. Hiraga, K. Takeyasu, et C. Wada. 2005. The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells*. 10:393-408.

141. Saveanu, C., D. Bienvenu, A. Namane, P.E. Gleizes, N. Gas, A. Jacquier, et M. Fromont-Racine. 2001. Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *Embo J*. 20:6475-84.

142. Saveanu, C., A. Namane, P.E. Gleizes, A. Lebreton, J.C. Rousselle, J. Noaillac-Depeyre, N. Gas, A. Jacquier, et M. Fromont-Racine. 2003. Sequential Protein Association with Nascent 60S Ribosomal Particles. *Mol Cell Biol*. 23:4449-60.

143. Scherl, A., Y. Coute, C. Deon, A. Calle, K. Kindbeiter, J.C. Sanchez, A. Greco, D. Hochstrasser, et J.J. Diaz. 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell*. 13:4100-9.

144. Schmitt, M.E., et D.A. Clayton. 1993. Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*. 13:7935-41.

145. Senger, B., D.L. Lafontaine, J.S. Graindorge, O. Gadal, A. Camasses, A. Sanni, J.M. Garnier, M. Breitenbach, E. Hurt, et F. Fasiolo. 2001. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol Cell*. 8:1363-73.

146. Sharma, M.R., C. Barat, D.N. Wilson, T.M. Booth, M. Kawazoe, C. Hori-Takemoto, M. Shirouzu, S. Yokoyama, P. Fucini, et R.K. Agrawal. 2005. Interaction of Era with the 30S ribosomal subunit implications for 30S subunit assembly. *Mol Cell*. 18:319-29.

147. Shuai, K., et J.R. Warner. 1991. A temperature sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae defective in pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Res*. 19:5059-64.

148. Siekevitz, P., et P.C. Zamecnik. 1951. *In vitro* incorporation of l-C14-DL-alanine into proteins of rat liver granular fractions. *Fed. Proc*. 10:246-247.

149. Smith, J.E., B.S. Cooperman, et P. Mitchell. 1992. Methylation sites in *Escherichia coli* ribosomal RNA: localization and identification of four new sites of methylation in 23S rRNA. *Biochemistry*. 31:10825-34.

150. Smith, J.S., et J.D. Boeke. 1997. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev*. 11:241-54.

151. Spacek, J. 2000. Atlas of ultrastructural neurocytology.

152. Spahn, C.M., R. Beckmann, N. Eswar, P.A. Penczek, A. Sali, G. Blobel, et J. Frank. 2001. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* — tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*. 107:373-86.

153. Sydorskyy, Y., D.J. Dilworth, E.C. Yi, D.R. Goodlett, R.W. Wozniak, et J.D. Aitchison. 2003. Intersection of the Kap123p-mediated nuclear import and ribosome export pathways. *Mol Cell Biol*. 23:2042-54.

154. Talkington, M.W., G. Siuzdak, et J.R. Williamson. 2005. An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 438:628-32.

155. Tissieres, A., et J.W. Hopkins. 1961. Factors affecting amino acid incorporation into proteins by Escherichia coli ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 47:2015-23.

156. Tissieres, A., et J.D. Watson. 1958. Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. *Nature*. 182:778-80.

157. Traub, P., et M. Nomura. 1969. Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes. VI. Mechanism of assembly of 30 S ribosomes studied *in vitro*. *J Mol Biol*. 40:391-413.

158. Udem, S.A., et J.R. Warner. 1973. The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J Biol Chem*. 248:1412-6.

159. Uicker, W.C., L. Schaefer, et R.A. Britton. 2006. The essential GTPase RbgA (YlqF) is required for 50S ribosome assembly in Bacillus subtilis. *Mol Microbiol*. 59:528-40.

160. Valentin, G. 1839. Repertorium für Anatomie und Physiologie. Verlag von Veit und Comp. 275 pp.

161. van Beekvelt, C.A., R.E. Jeeninga, J. van't Riet, J. Venema, et H.A. Raue. 2001. Identification of cis-acting elements involved in 3'-end formation of Saccharomyces cerevisiae 18S rRNA. *Rna*. 7:896-903.

162. van Hoof, A., P. Lennertz, et R. Parker. 2000. Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *Embo J*. 19:1357-65.

163. Vanrobays, E., J.P. Gelugne, M. Caizergues-Ferrer, et D.L. Lafontaine. 2004. Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis. *Rna*. 10:645-56.

164. Velichutina, I.V., M.J. Rogers, T.F. McCutchan, et S.W. Liebman. 1998. Chimeric rRNAs containing the GTPase centers of the developmentally regulated ribosomal rRNAs of Plasmodium falciparum are functionally distinct. *Rna*. 4:594-602.

165. Vetro, J.A., et Y.H. Chang. 2002. Yeast methionine aminopeptidase type 1 is ribosome-associated and requires its N-terminal zinc finger domain for normal function in vivo. *J Cell Biochem*. 85:678-88.

166. Walther, T.C., H.S. Pickersgill, V.C. Cordes, M.W. Goldberg, T.D. Allen, I.W. Mattaj, et M. Fornerod. 2002. The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import. *J Cell Biol*. 158:63-77.

167. Wang, C., et U.T. Meier. 2004. Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. *Embo J*. 23:1857-67.

168. Warner, J.R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*. 24:437-40.

169. Warner, J.R., P.M. Knopf, et A. Rich. 1963. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 49:122-9.

170. Warner, J.R., et R. Soeiro. 1967. Nascent ribosomes from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 58:1984-90.

171. Weitzmann, C., S.J. Tumminia, M. Boublik, et J. Ofengand. 1991. A paradigm for local conformational control of function in the ribosome: binding of ribosomal protein S19 to Escherichia coli 16S rRNA in the presence of S7 is required for methylation of m2G966 and blocks methylation of m5C967 by their respective methyltransferases. *Nucleic Acids Res*. 19:7089-95.

172. Wells, S.E., P.E. Hillner, R.D. Vale, et A.B. Sachs. 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*. 2:135-40.

173. Wu, X., G. Ivanova, M. Merup, M. Jansson, B. Stellan, D. Grander, E. Zabarovsky, G. Gahrton, et S. Einhorn. 1999. Molecular analysis of the human chromosome 5q13.3 region in patients with hairy cell leukemia and identification of tumor suppressor gene candidates. *Genomics*. 60:161-71.

174. Yusupov, M.M., G.Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T.N. Earnest, J.H. Cate, et H.F. Noller. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution. *Science*. 292:883-96.

175. Zanchin, N.I., et D.S. Goldfarb. 1999. The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. *Nucleic Acids Res*. 27:1283-8.

176. Zimmermann, R.A., et A.E. Dahlberg. 1996. Ribosomal RNA - Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Synthesis. CRC.

ANNEXES

1. Assemblage séquenciel des protéines aux précurseurs des sous-unités 60S — *Sequential Protein Association with Nascent 60S Ribosomal particles*

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, July 2003, p. 4449–4460 Vol. 23, No. 13
0270-7306/03/$08.00+0 DOI: 10.1128/MCB.23.13.4449–4460.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Sequential Protein Association with Nascent 60S Ribosomal Particles

Cosmin Saveanu,[1] Abdelkader Namane,[2] Pierre-Emmanuel Gleizes,[3] Alice Lebreton,[1] Jean-Claude Rousselle,[2] Jacqueline Noaillac-Depeyre,[3] Nicole Gas,[3] Alain Jacquier,[1] and Micheline Fromont-Racine[1]*

Génétique des Interactions Macromoléculaires, CNRS-URA2171,[1] and PT Protéomique,[2] Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, and Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote (CNRS), 31062 Toulouse Cedex,[3] France

Received 22 January 2003/Returned for modification 28 February 2003/Accepted 4 April 2003

Ribosome biogenesis in eukaryotes depends on the coordinated action of ribosomal and nonribosomal proteins that guide the assembly of preribosomal particles. These intermediate particles follow a maturation pathway in which important changes in their protein composition occur. The mechanisms involved in the coordinated assembly of the ribosomal particles are poorly understood. We show here that the association of preribosomal factors with pre-60S complexes depends on the presence of earlier factors, a phenomenon essential for ribosome biogenesis. The analysis of the composition of purified preribosomal complexes blocked in maturation at specific steps allowed us to propose a model of sequential protein association with, and dissociation from, early pre-60S complexes for several preribosomal factors such as Mak11, Ssf1, Rlp24, Nog1, and Nog2. The presence of either Ssf1 or Nog2 in complexes that contain the 27SB pre-rRNA defines novel, distinct pre-60S particles that contain the same pre-rRNA intermediates and that differ only by the presence or absence of specific proteins. Physical and functional interactions between Rlp24 and Nog1 revealed that the assembly steps are, at least in part, mediated by direct protein-protein interactions.

The synthesis of ribosomes is one of the major metabolic pathways of a cell. In *Saccharomyces cerevisiae*, ribosome assembly begins in the nucleolus after the transcription of two rRNA precursors, the 35S RNA (precursor of the 18S, 5.8S, and 25S rRNAs) and the pre-5S RNA, by RNA polymerases I and III, respectively. The synthesized pre-rRNAs are modified extensively at multiple positions specified by small nucleolar ribonucleoparticles (snoRNPs) or specific enzymes (1, 22, 33). During rRNA maturation, the 5′ and 3′ external transcribed sequences (ETS) and internal transcribed sequence 1 (ITS1) and ITS2 are removed from the 35S precursor RNA by well-ordered cleavages and trimming events, which require the enzymatic activities of helicases and endo- and exonucleases (19, 37).

Cotranscriptional assembly of ribosomal and nonribosomal proteins in the nucleolus gives rise to a large ribonucleoprotein particle corresponding to the 90S preribosomal complexes described more than 20 years ago (35) and recently characterized biochemically (8, 14). These early preribosomal complexes are further converted to smaller pre-40S (43S) and pre-60S (66S) particles, precursors of the mature small and large ribosomal subunits. The pre-40S complexes, each containing a precursor of the 18S rRNA, are exported into the cytoplasm, where they give rise to the mature 40S ribosomal particles (36). Most of the large ribosomal subunit proteins are absent from the 90S preribosomes (8, 14) and associate in the nucleolus with the pre-rRNA, probably concomitantly with the formation of the pre-60S particles. During pre-60S particle maturation, 27S pre-rRNA intermediates are converted into 25S and 5.8S mature rRNAs by successive and well-ordered steps. Several pre-60S particles, which differ in their RNA and protein compositions, are generated successively in the nucleolus and nucleoplasm and then exported to the cytoplasm (for reviews see references 11, 19, and 37).

The existence of ribosome precursors in the form of discrete particles during eukaryotic ribosome biogenesis was described many years ago in experiments using HeLa and yeast cells (for a review on these early results see reference 38). However, a detailed characterization of the preribosomal complexes emerged only recently due to the development of affinity purification methods and large-scale protein identification by mass spectrometry (3, 8, 10, 14, 15, 24, 31). In addition to these results, the high-throughput identification of protein complexes in yeast (13, 17) generated a large amount of data and offered a global view of the factors physically associated with preribosomal particles. To date, more than 120 nonribosomal proteins are predicted to be physically associated in large ribonucleoprotein complexes along the maturation pathway from the nucleolus to the cytoplasm. The physical association with the preribosomes is, for many of these conserved factors, the only hint as to their function.

Previous studies on preribosomal particle composition showed that different tagged proteins were associated with different sets of preribosomal factors in multiple preribosomal complexes (24; for a review, see reference 11). However, especially for early pre-60S particles of highly complex composition, little is known about the identities of the different particles and the association or dissociation of specific factors. A major limitation in the study of ribosome assembly comes from the difficulties in isolating homogenous preribosomal intermediates. By blocking ribosome biogenesis at specific steps and by analyzing the changes in the composition of early pre-60S intermediates, we were able to show that specific protein association and dissociation steps are required for the maturation of 27S-containing pre-60S particles during ribosome bio-

* Corresponding author. Mailing address: Génétique des Interactions Macromoléculaires, Institut Pasteur (CNRS-URA2171), 25-28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Phone: 33 0 1 40 61 32 05. Fax: 33 0 1 45 68 87 90. E-mail: mfromont@pasteur.fr.

TABLE 1. Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Reference or source
MGD353-13D	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3, 112 Arg4*(*RV*$^-$)	29
BMA64	*MAT***a**/*alpha ura3-1*/*ura3-1* Δ*trp1*/Δ*trp1 ade2-1*/*ade2-1 leu2-3,112*/*leu2-3, 112 his3-11,15*/*his3-11,15*	4
LMA148	*MAT***a** *ura3-1* Δ*trp1 ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 GAL1*::*NOG2*/*KanMX6*	31
LMA158	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *Nog1-TAP*/*TRP1*	31
LMA160	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *Rlp24-TAP*/*TRP1*	31
LMA174	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112, Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*NOG1*/*KanMX6*	This study
LMA176	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*NOG2*/*KanMX6 Nog1-TAP*/*TRP1*	This study
LMA177	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112, Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*NOG2*/*KanMX6 Rlp24-TAP*/*TRP*	This study
LMA178	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*RLP24*/*KanMX6*	This study
LMA181	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*RLP24*/*KanMX6 Nog1-TAP*/*TRP1*	This study
LMA182	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*NOG1*/*KanMX6 Rlp24-TAP*/*TRP1*	This study
LMA205	*MAT***a**/α *ura3-1*/*ura3-1* Δ*trp1*/Δ*trp1 ade2-1*/*ade2-1 leu2-3,112*/*leu2-3,112 his3-11,15*/*his3-11,15 GAL1*::*GFP-Rlp24*/*TRP1*	This study
LMA226	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*NOG1*/*KanMX6 Rpl24B-GFP*/*TRP1*	This study
SC1101	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *Ssf1-TAP*/*URA3*	13
LMA233	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*RLP24*/*KanMX6 Ssf1-TAP*/*URA3*	This study
LMA234	*MAT***a** *trp1-289 ura3-52 ade2 leu2-3,112 Arg4*(*RV*$^-$) *GAL1*::*NOG1*/*KanMX6 Ssf1-TAP*/*URA3*	This study

genesis. This novel approach should be able to elucidate the order of the assembly of preribosomal factors on, and their disassembly from, the particles and the mechanisms governing this coordinated process. We show here that direct protein-protein interactions are likely to be needed for the assembly of multiple complexes during ribosome assembly.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, plasmids, and oligonucleotides. The strains used in this study are listed in Table 1. They were generated by homologous recombination using PCR products to transform either the BMA64 or the MGD353-13D strains (4). PCR fragments used to generate conditional mutants or TAP-tagged proteins were synthesized from pFA6a-kanMX6-PGal1-3HA or pBS1479, respectively, by using oligonucleotides designed previously (23, 29). For recombinant-protein expression, PCR fragments containing the whole *NOG1*, *RPL24*, *RPL24B*, and *RPL5* open reading frames (ORFs) were introduced into a vector derived from pGEX4-T (Amersham Biosciences) at *Nco*I/*Sal*I sites. The genes were subcloned into pET16 (Novagen) at *Nco*I/*Xho*I sites. The sequences of oligonucleotides used for Northern hybridization and primer extension analysis were as follows: CS14, CAT GGC TTA ATC TTT GAG AC; MFR422, CTA CTC GGT CAG GCT C (5S); MFR457, GCT TAA AAA GTC TCT TCC CGT CC (snRNA-U2); MFR221, CCA AGT TGG ATT CAG TGG CTC (snRNA-U3). The sequences of the other oligonucleotides were previously described (31).

Similarity searches for Rlp24 homologues. The amino acid sequence encoded by yeast ORF YLR009W (RLP24) was used for Blast searches of nonredundant databases. Similar sequences were retrieved and compared with the Rpl24-related sequences, and multiple alignments were obtained with ClustalX (34). For the *Guillardia theta* nucleomorph genome, the partial sequence of an Rpl24-like protein whose gene had no initiator ATG was also used in the final alignment.

High-copy-number suppressor genetic screen. The LMA160 (Rlp24-TAP) strain was transformed with a yeast genomic high-copy-number vector library constructed in pFL46S (a gift from F. Lacroute, Gif-sur-Yvette, France). The transformants were grown on solid synthetic minimal medium lacking leucine at 25°C. Colonies having a growth rate superior to that of LMA160 transformed with an empty vector were selected.

RNA extraction, Northern blotting, and primer extension. Cells were broken with glass beads, and total RNAs were subjected to phenol-chloroform extraction and finally resolved on 1% agarose–6% formaldehyde gels or 5% acrylamide–urea gels. RNAs were transferred to Hybond-N+ (Amersham Biosciences) membranes probed with various ^{32}P-labeled oligonucleotides complementary of specific regions of the intermediate and mature rRNAs.

Sucrose gradients and protein analysis. Total-protein extracts were prepared from exponentially growing yeast cells and separated on 10 to 50% sucrose gradients. Fractions of the gradient were collected, total proteins were precipitated, and specific proteins were detected by immunoblotting. Rabbit polyclonal Rlp24- and Nog2-specific antibodies were generated by using recombinant glutathione *S*-transferase (GST)-Rlp24 and GST-Nog2 purified from *Escherichia coli*. Nog1-specific antibodies were obtained in a similar manner but with native Nog1 expressed in bacteria and purified as inclusion bodies.

In vitro binding assay. The proteins were expressed in native form or in fusions with the GST in the BL21 CodonPlus RP (Stratagene) strain. Expression was induced by 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) for 1 h at 37°C in exponentially growing cells. Protein extracts were obtained in a French press by using 10 volumes of a buffer containing 50 mM MOPS (morpholinepropanesulfonic acid), pH 7, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, complete protease inhibitors (Roche), and 1 mM dithiothreitol (DTT). The extracts, clarified by centrifugation at 20,000 × *g* for 45 min, were stored frozen at −70°C. After 45 min of preincubation a mixture of equal (0.5-ml) volumes of extracts from strains expressing GST-tagged and untagged proteins was bound to 50 μl of glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences). Following 1 h of incubation and eight washes with 0.7 ml of buffer (20 mM MOPS [pH 7], 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1% (Sigma Igepal CA-630) the bound proteins were eluted by boiling the beads in 40 μl of denaturing buffer for electrophoresis.

Complex purification. Strains expressing Rlp24 and Nog1 with C-terminally fused TAP tags were used for complex purification by a slight modification of the original tandem affinity purification protocol (29) starting from 4 liters of yeast culture. For the analysis of RNAs associated with Nog1 and Rlp24 the first step of the tandem affinity purification protocol was performed with a lysis buffer containing 20 mM vanadyl ribonucleoside complex (New England Biolabs) and a TEV protease digestion buffer that contained 0.1 U of recombinant RNasin/μl (Promega). The RNAs contained in the TEV eluate were extracted twice with phenol-chloroform and precipitated.

Mass spectrometry identification of proteins. Proteins were identified by peptide mass fingerprinting with a Voyager DE-STR matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Systematic and band-specific analyses of gels were performed. The Investigator Progest system (Genomic Solutions) was used for digestion with modified porcine trypsin (Promega), peptide purification, and preparation of MALDI plates. A minimum of four matching peptides (at 30-ppm error) were considered necessary for positive protein identifications.

Immunofluorescence methods and electron microscopy. The proteins in fusion with the TAP tag were detected by immunofluorescence according to methods described previously (28). Hoechst 33258 at 2 μg/ml was used to stain DNA. Pre-25S rRNAs were localized with a Cy3-conjugated oligomeric probe complementary to the 5′ part of ITS2 as described previously (5). Electron microscopy was performed as previously described (31) using riboprobes complementary to the ITS2 sequence. To evaluate the distribution of pre-rRNAs in the nuclei of mutant cells after in situ hybridization for electron microscopy, 18 to 20 sections of nuclei displaying both the nucleolus and the nucleoplasm were randomly photographed per strain. On each picture, the labeling densities of the nucleolus and of the nucleoplasm were calculated on the basis of the ratio of the number of gold particles to the surface area.

RESULTS

Rlp24 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. We recently isolated pre-60S particles containing three novel proteins, Nog1, Nog2, and Rlp24 (31). Sequence similarity searches showed that Rlp24 is highly conserved in *Archaea* and

Eukarya and belongs to the family of eukaryotic Rpl24e proteins (Fig. 1A). All the eukaryotic genomes completely sequenced so far encode at least one pair of Rpl24-like and Rlp24-like proteins. These observations prompted us to study the cellular role of Rlp24 in ribosome biogenesis.

Many of the proteins involved in the maturation of the preribosomes are located in the nucleolus and nucleoplasm. Surprisingly, the localization of Rlp24, detected as a C-terminal fusion with the TAP tag (29), was not limited to the nucleus. A significant amount of Rlp24-TAP fusion protein was also observed in the cytoplasm (Fig. 1B, top). In some of the cells, Rlp24-TAP, although visible in the nucleoplasm and the cytoplasm, showed a preferential nucleolar staining. When we analyzed the localization of Rpl24, the ribosomal homologue of Rlp24, under similar experimental conditions, we observed a specific cytoplasmic localization with no nuclear staining, as expected for a ribosomal protein (Fig. 1B, bottom). Since the C-terminal TAP tag had a slight negative effect on the growth rate of the Rlp24-tagged strain, we verified that the observed localization, unusual for a preribosomal factor, was not the result of the tag. A similar localization was observed for an N-terminal GFP fusion when overexpressed in a diploid strain (data not shown).

We wondered whether the cytoplasmic fraction of Rlp24 is in a free form, associated with active ribosomes, or associated with late pre-60S particles. Total-protein extracts from a strain expressing C-terminally TAP-tagged Rpl24B were fractionated by ultracentrifugation, and the positions of both tagged Rpl24 and native Rlp24 were assessed by immunoblotting (Fig. 1C). Rpl24-TAP was found to sediment at positions corresponding to polysomes and free 60S ribosomal particles, whereas endogenous Rlp24 sedimented only in the 60S fractions. Like the native form of Rlp24, Rlp24-TAP was exclusively found in the 60S fractions and not in the upper part of the gradient, showing that all the Rlp24-TAP protein, including its cytoplasmic fraction, is associated with a large complex.

To analyze the origin of the cytoplasmic fraction of Rlp24, we tested the effects of blocking pre-60S export on Rlp24 intracellular distribution. A ribosomal protein (Rpl25) fused with the green fluorescent protein (GFP) has been previously used to detect pre-60S export defects. The corresponding signal shows nuclear or nucleolar accumulation if the export or maturation of the ribosomes is impaired (18). We used a strain depleted of Nog1 in which preribosomes are blocked in the nucleus, as demonstrated by the retention of the Rpl25-GFP marker (Fig. 1D). Under these conditions, Rlp24-TAP was entirely relocated to the nucleus, with some of the signal more concentrated in the nucleolus (Fig. 1E). Similar results were obtained with a strain depleted of Nog2 (data not shown). In contrast, when we looked at the localization of the ribosomal Rpl24 in fusion with GFP, we observed a decrease in only the cytoplasmic staining, with no nuclear accumulation when the export of the ribosomes was blocked (Fig. 1F). These results indicate that, unlike ribosomal Rpl24, Rlp24 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. It further suggests that the cytoplasmic localization of Rlp24 is dependent on active ribosome biogenesis and export. In contrast to most of the other factors involved in 60S maturation, which are confined to the nucleus, Rlp24 seems to remain associated with pre-60S particles even after export to the cytoplasm.

Rlp24 and Nog1 are present in similar preribosomal complexes. We have previously shown that Rlp24 and Nog1 are associated with pre-60S particles with similar protein profiles (31). Nog1 is a nuclear protein found in association with the nuclear pore complexes (27, 30) and identified in many preribosomal complexes (see reference 11 and references therein). We decided to characterize in detail the protein and RNA compositions of both Nog1- and Rlp24-associated particles. Complexes associated with each of these proteins were isolated by tandem affinity purification (29) using strains expressing the C-terminally TAP-tagged fusion proteins. The proteins present in these purified complexes were separated by electrophoresis (Fig. 2A) and identified by MALDI-TOF mass spectrometry. The results of these identifications and the corresponding positions of proteins on a typical gel are listed in Table 2. In addition to ribosomal proteins of the large subunit and common contaminants (see supplemental data at http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Gim/index.html), 45 nonribosomal proteins were identified. Most of them could be found in both Nog1- and Rlp24-associated complexes, consistent with the similar electrophoretic profiles. An obvious exception was Mak11 (protein band 21); this protein, previously found to be essential for 60S formation (25), was present in larger amounts in the Rlp24-associated complex than in the Nog1-associated complex, as determined by the intensity of protein staining (Fig. 2A). We also identified Mak11 as a component of Ssf1-associated particles (not shown), and it was recently reported to be a component of Nsa3/Cic1-associated complexes (24). With the exception of four novel proteins, all the identified proteins have been previously found associated with preribosomal particles (3, 10, 13, 15, 17, 24). Of the four new proteins, Dbp7 was previously characterized as a *trans*-acting factor involved in 60S biogenesis (7). Vps75, identified in a genetic screen for factors affecting carboxypeptidase Y secretion (6), was not previously identified in association with multiprotein complexes and might be a new component of preribosomes. Finally, the functions of Yil096c and Yor252w are unknown. In a large-scale protein localization study, Yil096c was found to be nuclear (21). The expression profiles of both YIL096C and YOR252W under stress conditions (12) are similar to the expression profiles of known preribosomal genes, strongly suggesting the involvement of these new factors in ribosome biogenesis.

Among the identified preribosomal proteins, Rpf1 and Ssf1 have been previously shown to associate early with pre-60S particles (10, 39) while Nog2 and Arx1 are late-associating pre-60S factors (24, 31). Since Rlp24 and Nog1 seemed to be present both in early and late pre-60S complexes, we tested the RNA composition of the isolated particles. As expected, a strong enrichment of 27SA2, 27SA3, 27SB, and 7S rRNA intermediates, but not 35S pre-rRNA, in the purified complexes was observed. We also noted an enrichment of the 5S, 5.8S, and 25S rRNA in both complexes (Fig. 2B and C). In conclusion, the protein and RNA compositions of the Nog1- and Rlp24-associated complexes revealed that these proteins are present in both early and late pre-60S particles.

Rlp24 and Nog1 are involved in the biogenesis of the 60S ribosomal subunit. The presence of Nog1 and Rlp24 in preribosomal complexes in association with 27S and 7S rRNA intermediates did not indicate at which step of rRNA maturation

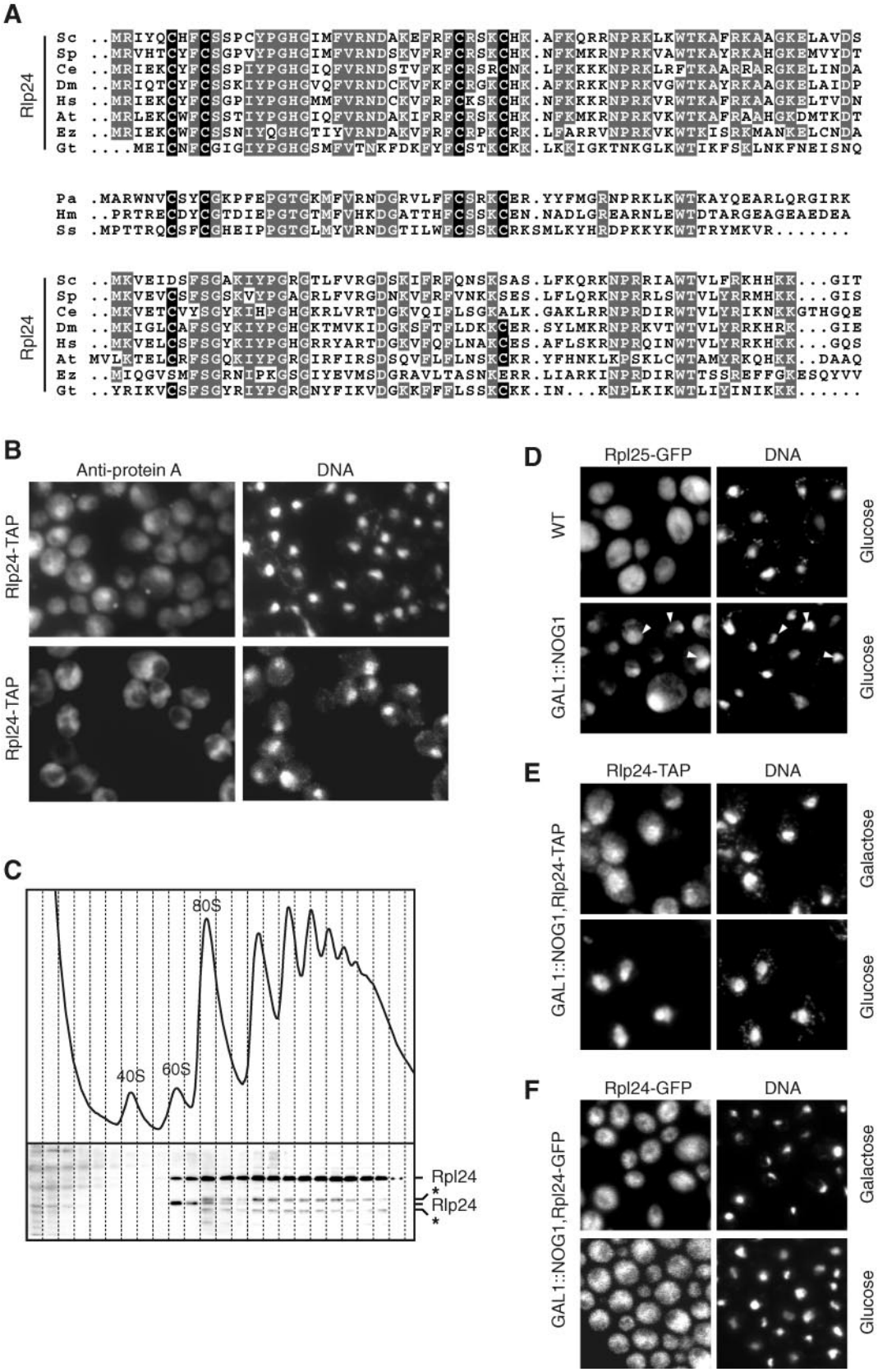


FIG. 1. Rlp24 and Rpl24 are homologous proteins of different cellular localizations. (A) N-terminal sequences of Rlp24-like and Rpl24-like proteins encoded by genes present in eukaryotes or *Archaea* were aligned with ClustalX. Gray, amino acid residues identical in several sequences; black, conserved cysteines of the putative zinc finger present in Rlp24 sequences. Accession numbers (TrEMBL, SwissProt, or Genpept) for the

TABLE 2. Nonribosomal proteins identified in association with Rlp24-TAP and Nog1-TAP

Spot(s)	Protein	Rlp24	Nog1	ORF
1, 2, 3	Erb1	+	+	YMR049C
	Dbp7		+	YKR024C
	Sda1	+	+	YGR245C
5	Mak5	+	+	YBR142W
6	Noc2	+	+	YOR206W
7	Nop2	+	+	YNL061W
	Rix1		+	YHR197W
9	Nop7	+	+	YGR103W
8	Puf6	+	+	YDR496C
10	Nog1	+	+	YPL093W
11, 12	Dbp9	+		YLR276C
12	Spb4	+	+	YFL002C
	Nug1	+	+	YER006W
13	Arx1	+	+	YDR101C
14	Fpr3	+	+	YML074C
15	Ssf1	+		YHR066W
15	Dbp2		+	YNL112W
15	Nop12		+	YOL041C
16	Has1	+	+	YMR290C
18	Nsa1	+	+	YGL111W
16	Fpr4		+	YLR449W
17	Yp1146c		+	YPL146C
19	Nog2	+	+	YNR053C
19, 20	Ycr072c	+	+	YCR072C
20	Ytm1	+	+	YOR272W
20	Nop58		+	YOR310C
21	Mak11	+		YKL021C
22	Cic1/Nsa3	+	+	YHR052W
23	Rlp7	+	+	YNL002C
23	Mak16	+		YAL025C
24	Rpf2	+	+	YKR081C
25	Nop1	+	+	YDL014W
25	Rrp1	+	+	YDR087C
26	Vps75	+		YNL246W
27	Yil096c	+		YIL096C
27	Rpf1		+	YHR088W
28	Brx1	+	+	YOL077C
29	Nop16	+	+	YER002W
29	Nsa2	+	+	YER126C
	Rlp24	+	+	YLR009W
31	Mrt4	+	+	YKL009W
33	Tif6	+	+	YPR016C
30	Nop15	+		YNL110C
32	Loc1	+		YFR001W
	Yor252w	+	+	YOR252W

these proteins are essential during the 60S ribosomal particle biogenesis. We thus investigated the effects of depleting each of these proteins on pre-rRNA steady-state levels. We used yeast strains in which the expression of *NOG1* or *RLP24* was under the control of the galactose-inducible GAL1 promoter. The growth rate became significantly reduced after about 8 h of culture on glucose, and this reduction was accompanied by a marked increase in the level of free 40S subunits, a concomitant decrease in the level of free 60S subunit, and the appearance of "halfmer" polysomes (data not shown) (see reference 15 for similar results on Rlp24 depletion). The 35S and 27SB intermediates in the rRNA maturation pathway were enriched in cells depleted of either Rlp24 or Nog1 (Fig. 3A and B). In these cells, we observed the accumulation of aberrant 23S intermediates that are generated by A3 cleavages directly from 35S precursors if the processing at sites A0, A1, and A2 is delayed. The 35S processing defects could explain the observed decrease in the levels of 27SA2 and 20S intermediates, which are formed downstream the processing pathway (Fig. 3A and B; Fig. 2D shows the order of processing steps). Since Rlp24 and Nog1 are not associated with 35S rRNA intermediates, the 35S accumulation is most likely indirect. This effect was previously observed in studies of a large number of mutant genes involved in 60S ribosome biogenesis (37). The 27SB rRNA species, present in the complexes associated with both Nog1 and Rlp24, accumulated compared with the preceding 27SA2 intermediate (Fig. 3B), indicating a block in 27SB processing when either Nog1 or Rlp24 was depleted. This block could explain the observed decrease of the 7S rRNA intermediate (Fig. 3C). We concluded that the absence of Rlp24 or Nog1 from the 27S-containing particles impedes 27SB processing.

Dynamics of preribosomes in Nog1-depleted cells. In contrast to the depletion of Nog1 or Rlp24, which leads to the accumulation of only 27SB intermediates, Nog2 depletion leads to an accumulation of 27SB and 7S intermediates (Fig. 3C shows a comparison of the effects on 7S). We have previously shown that Nog2 depletion leads to nucleoplasmic accumulation of late pre-60S particles and suggested that these late steps, by which the maturation of 7S intermediates is accomplished, could occur in the nucleoplasm (31). Any difference in the intranuclear accumulation of pre-60S particles between Rlp24- or Nog1-depleted cells and Nog2-depleted cells would support this hypothesis. Because Rlp24 depletion appeared to

Rlp24-like sequences are as follows: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), Q07915; *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), Q10353; *Caenorhabditis elegans* (Ce), Q17606; *Drosophila melanogaster* (Dm), Q9VGN9; *Homo sapiens* (Hs), Q9UHA3; *Arabidopsis thaliana* (At), O22165; *Encephalitozoon cuniculi* (Ez), gi-19074000; *G. theta* nucleomorph (Gt), gi-13812425; *Pyrococcus abyssi* (Pa), Q9V0W3; *H. marismortui* (Hm), P14116; *Sulfolobus sulfataricus* (Ss), Q980Q6. Accession numbers for the Rpl24-like sequences are as follows: *S. cerevisiae*, P04449; *S. pombe*, O74884; *C. elegans*, O01868; *D. melanogaster*, Q9VJY6; *H. sapiens*, P38663; *A. thaliana*, Q9LF73; *E. cuniculi*, gi-19074515 (starting residue 14). For the *G. theta* nucleomorph pseudo-Rpl24, see Materials and Methods. (B) Unusual localization of Rlp24 from the nucleolus to the cytoplasm. Cells expressing Rlp24-TAP and Rpl24-TAP under the control of their own promoters were fixed with formaldehyde, washed, and incubated with anti-protein A antibodies (Sigma) followed by Cy3-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch). (C) Rlp24 is neither free nor associated with polysomes. The sedimentation behavior of Rpl24-TAP was assessed by sucrose gradient ultracentrifugation. Twenty-four fractions were collected, and tagged proteins were detected by immunoblotting using peroxidase-antiperoxidase conjugates (Sigma) and Rlp24-specific antibodies. Asterisks, cross-reactive bands. The same profile of sedimentation was obtained with an Rlp24-TAP strain. (D) Cytoplasmic Rlp24 localization depends on active ribosome biogenesis. Preribosomes are blocked in the nucleus in absence of Nog1. Wild-type (WT) and *GAL1*::*NOG1* cells expressing Rpl25-GFP were grown for 16 h in glucose-containing medium. The fluorescence signals of GFP and Hoechst 33342-stained DNA were observed by microscopy. Arrowheads, position of the nucleoplasm. The localizations of Rlp24-TAP (E) and Rpl24-GFP (F) expressed under the control of their own promoters were observed in *GAL1*::*NOG1* cells either grown exclusively on galactose or shifted to glucose-containing medium for 16 h. Rlp24-TAP was detected as described for panel B. Similar results (data not shown) were obtained when we blocked pre-60S export by overexpressing the Nmd3Δ100 dominant-negative allele (16).

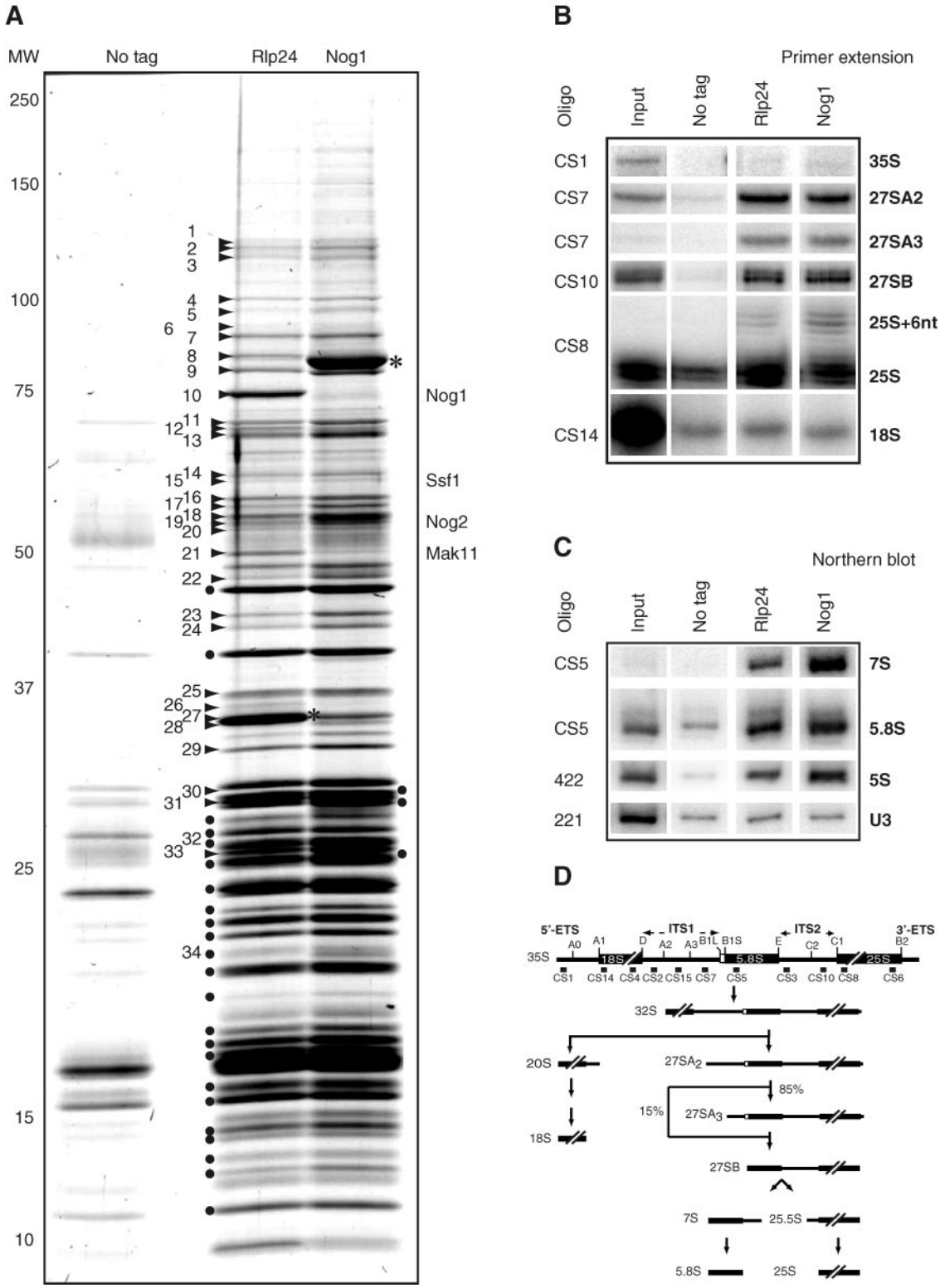


FIG. 2. Similar compositions of Rlp24- and Nog1-associated preribosomal complexes. Tandem affinity purification of Nog1- and Rlp24-associated complexes was followed by separation of proteins by denaturing electrophoresis on a 5 to 20% polyacrylamide gel and colloidal Coomassie blue staining. Asterisks, positions of the tagged proteins used as baits. Numbers correspond to excised gel bands in which the preribosomal factors listed in Table 2 were identified, with the exception of the band marked 34, identified as ribosomal protein Rpl24A/B. Dots correspond to bands in which ribosomal proteins of the large subunit were identified. The result for an identically treated extract from wild-type cells is shown in the left lane. (B and C) Rlp24 and Nog1 are associated with pre-60S RNAs. RNAs were isolated by one-step purification of extracts of Nog1-TAP, Rlp24-TAP, or wild-type cells and detected by primer extension (B) (35S, 27SA2, 27SA3, 27SB, 25S, and 18S) or Northern blotting (C) (7S, 5.8S, 5S, U3 and U2 snRNA) with radiolabeled oligonucleotides. (D) Schematic representation of the steps involved in pre-rRNA processing in *S. cerevisiae*. The largest 35S intermediate pre-rRNA undergoes extensive modifications and processing to generate the mature 18S, 5.8S, 25S rRNAs (19). The relative positions of the oligonucleotides used in this study are indicated.

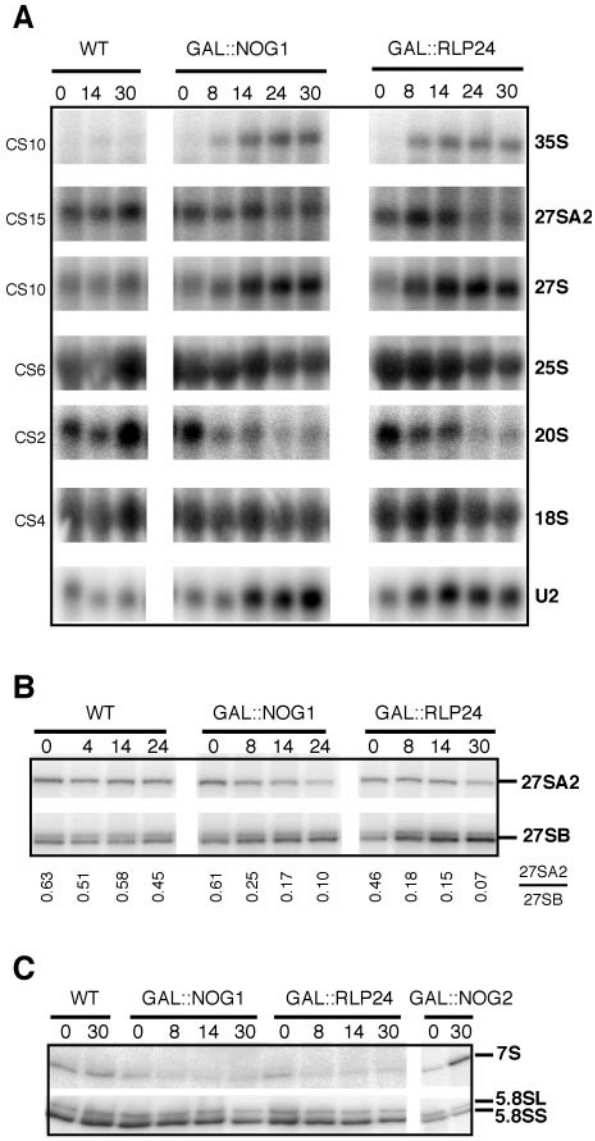


FIG. 3. Rlp24 and Nog1 are involved in 27SB pre-rRNA processing. (A) Steady-state levels of mature and precursor rRNA in strains depleted of Rlp24 or Nog1. Cells grown on galactose-containing medium were shifted to glucose for the indicated number of hours, and total RNAs were analyzed by Northern blotting after denaturing 1.2% formaldehyde agarose electrophoresis. The positions of the probes are indicated in the Fig. 2D. WT, wild type. (B) Accumulation of 27SB over 27SA2 intermediates. Following primer extension with oligonucleotide CS10 (specific for the ITS2 sequence), the changes in the ratio of 27SA2 to 27SB in cells depleted of Rlp24 and Nog1 were quantified with a PhosphorImager and the ImageQuant software (Molecular Dynamics) and are shown below the gel image. (C) Small RNAs separated on denaturing urea–5% polyacrylamide gels were analyzed by Northern blotting using a probe specific for 7S and 5.8S intermediates (CS5).

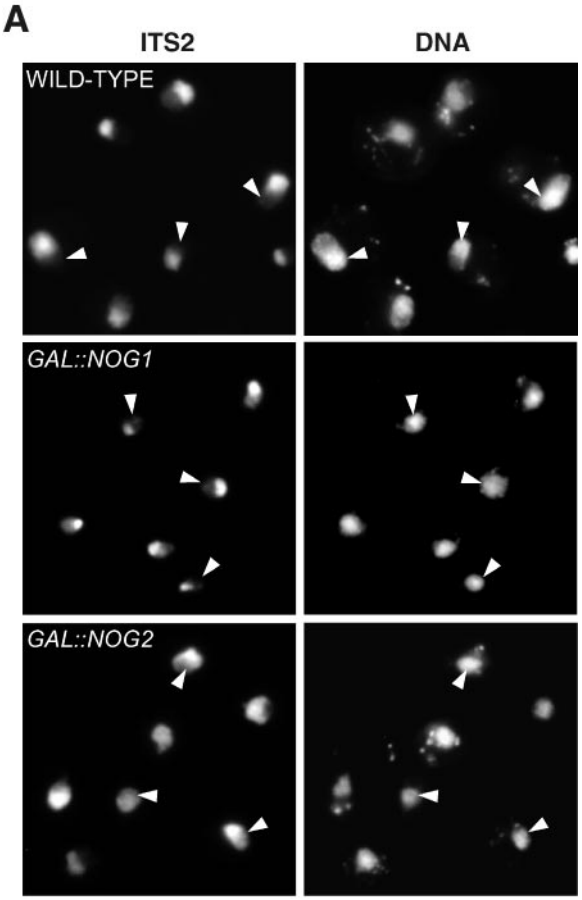
lead to unstable complexes (see Discussion), we chose to compare Nog1-depleted cells to Nog2-depleted cells.

We determined the intranuclear distribution of the accumulated pre-rRNA intermediates by fluorescence in situ hybridization (FISH) and electron microscopy with probes specific to ITS2. These probes are able to detect the intermediates in the 60S processing pathway from the primary transcript to the 7S pre-rRNA. In wild-type cells, the FISH signal mostly localized to the nucleolus, with a faint labeling of the nucleoplasm (Fig. 4A). In cells depleted of Nog1 the labeling was strongly nucleolar. Consistent with what we had previously observed, the nucleoplasmic labeling was more intense in cells depleted of Nog2, in which it was sometimes impossible to distinguish the nucleolus from the rest of the nucleus. As a control, a probe complementary to the 5′ end of ETS1, which hybridizes upstream of the A0 cleavage position and which detects the 35S precursor rRNA, labeled only the nucleolus in all the strains (data not shown). Electron microscopy quantitation of pre-rRNA confirmed that, while Nog1 depletion leads to accumulation of pre-rRNA intermediates mainly in the nucleolus, Nog2 depletion leads to accumulation of these precursors in the nucleolus and nucleoplasm (Fig. 4B). Added to the observed accumulation of 7S intermediates only after Nog2 depletion, these results strongly suggest that the final steps of 7S pre-rRNA processing into 5.8S rRNA occur in the nucleoplasm. Moreover, these results also suggest that Nog1 and Rlp24 precede Nog2 function in 60S biogenesis.

Ordered assembly of Rlp24, Nog1, and Nog2 on pre-60S ribosomal particles. The existence of distinct, successive pre-60S complexes was suggested by the characterization of several preribosomal particles of different protein compositions (11, 24). However the factors that are essential for the coordinated association of the preribosomal proteins with nascent 60S particles are not yet known. To address this question, we took advantage of the presence of Rlp24 all along the 60S maturation pathway from the nucleolus to the cytoplasm. We used Rlp24 as a probe to measure the changes in the protein compositions of the pre-60S complexes that accumulated in cells with different mutations. We performed a series of purifications of complexes using Rlp24 or Nog1 as the bait when Rlp24, Nog1, or Nog2 was depleted. The particles purified with Rlp24 as the bait when Nog1 or Nog2 was absent showed an increase in the abundance of some preribosomal factors compared with the same complexes in wild-type cells (Fig. 5A and data not shown). In contrast, we observed a decrease in the intensities of the bands that correspond to ribosomal proteins. This decrease probably results from the depletion of the cytoplasmic fraction of the Rlp24-associated complexes (Fig. 1E).

Particularly interesting was the strong increase in the intensities of the bands containing Ssf1 and Mak11 when Nog1 was depleted (Fig. 5A). Since the absence of Nog1 blocks 27SB processing and since Ssf1 leaves the pre-60S particles before the generation of the 7S pre-rRNA (10), we concluded that in these mutant cells the Rlp24-associated complex mirrors the composition of early 27S-containing particles. Moreover, Nog2 is absent from these particles (Fig. 5A and B), suggesting that Nog1 function is required for Nog2 assembly and that Ssf1 leaves the pre-60S particles before Nog2 association (see below). We tested the presence of Nog2 and Rlp24 in Ssf1-associated complexes with specific antibodies (Fig. 5C). Nog2 is absent from these complexes, in contrast to Rlp24, which was enriched when Nog1 was depleted.

Altogether these results allowed us to conclude that (i) Ssf1 leaves pre-60S particles before or concomitantly with Nog2 association, (ii) Nog2 is not required for stable association of Nog1 or Rlp24 with pre-60S particles, and (iii) the presence of



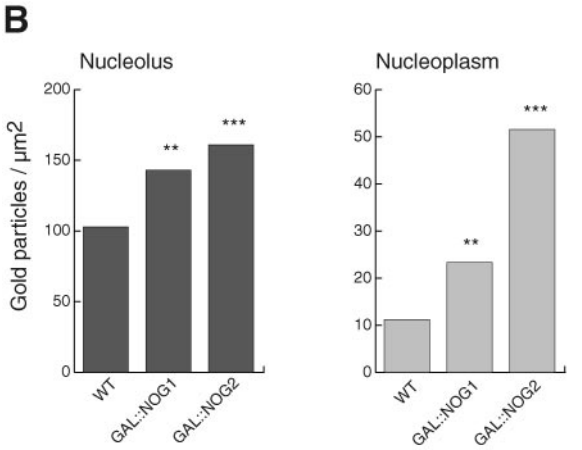


FIG. 4. In the absence of Nog1, pre-rRNAs accumulate in the nucleolus. (A) Intranuclear distribution of the preribosomal particles in Nog1- or Nog2-depleted cells was determined by FISH with a probe specific for the ITS2 sequence. DNA was stained with the DAPI (4′,6′-diamidino-2-phenylindole) fluorescent dye. Arrowheads, position of the nucleoplasm. (B) ITS2 containing pre-RNAs were detected by electron microscopy in situ hybridization in cells depleted of Nog1 or Nog2 by growth on glucose for 14 h, and the labeling densities of the nucleolus and the nucleoplasm were determined. One-to-one comparisons with the wild-type (WT) strain showed significant differences (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). The nucleoplasmic labeling in Nog2-depleted cells is also significantly higher ($P < 0.001$) than that in cells lacking Nog1.

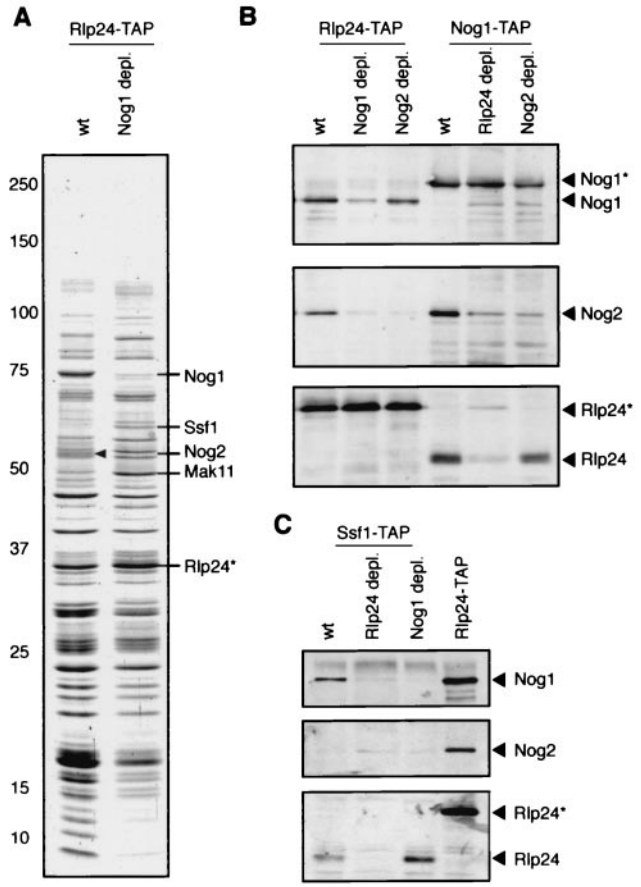


FIG. 5. Nog1 association with pre-60S complexes depends on Rlp24 and is a prerequisite for Nog2 assembly. (A) Early pre-60S complexes accumulate in the absence of Nog1. Rlp24-associated complexes were purified from wild-type (wt) or Nog1-depleted cells (*GAL1*::*NOG1* cells shifted to glucose for 14 h), and the proteins were separated on a 5 to 20% polyacrylamide gel and stained with colloidal Coomassie blue. Asterisks (A to C), positions of the tagged proteins used as baits. The proteins are the same as those in Fig. 2A for comparison. Arrowhead, the Nog2 band identified by mass spectrometry. (B) The role of Nog1 and Rlp24 in Nog2 assembly on pre-60S particles was confirmed by immunoblots with tandem affinity-purified complexes and specific antibodies. Cells were shifted to glucose for 14 h to deplete Nog1 or Rlp24 and for 18 h to deplete Nog2. (C) The requirement of Nog1 for Rlp24 assembly on pre-60S particles was tested by using Ssf1-TAP purified complexes and immunoblots in wild-type cells or after Nog1 or Rlp24 depletion for 14 h.

Nog1 is an absolute requirement for the later addition of Nog2 to 27SB-containing pre-60S particles but Nog1 is not required for the addition of many other preribosomal proteins such as Ssf1, Mak11, and Rlp24.

The study of the composition of the pre-60S complexes in different mutant cells could provide information only on global physical associations of proteins inside the preribosomal particles. Since we were interested in understanding the mechanisms responsible for the ordered assembly of proteins on preribosomes, we searched for functional partners of Rlp24. Taking advantage of the slow-growth phenotype of the strain expressing C-terminally TAP-tagged Rlp24, we performed a high-copy-number suppressor screen which identified genes that rescued the slow-growth phenotype of this strain when

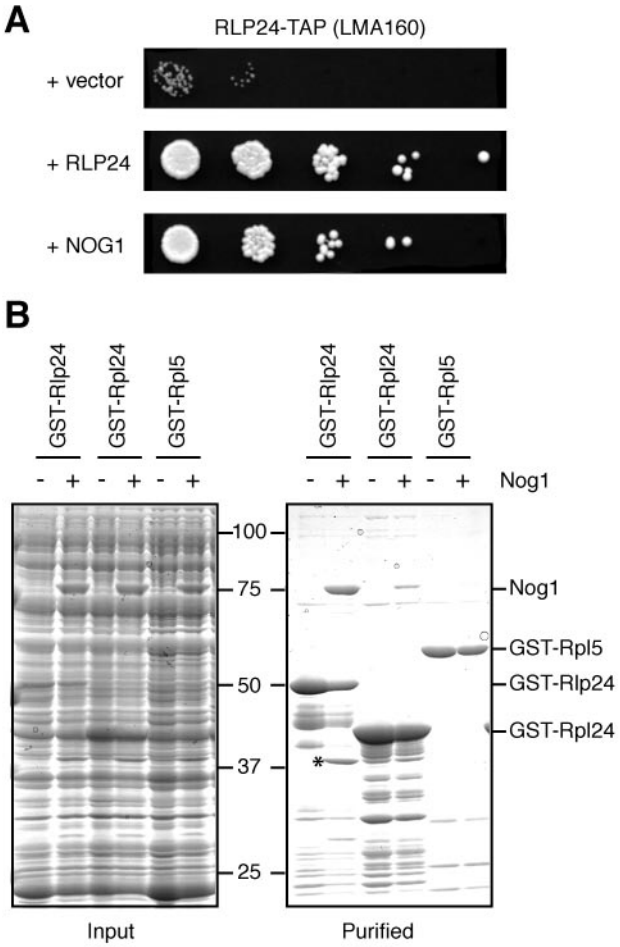


FIG. 6. Rlp24 and Nog1 genetically and physically interact. (A) The Rlp24-TAP strain was transformed with a high-copy-number *LEU2* vector (pFL46S) carrying no insert or inserts corresponding to Nog1 or Rlp24. The rescue of the slow-growth phenotype was tested by spotting transformants on minimal-medium plates in 10^{-1}-dilution steps. The plates were incubated at 25°C for 4 days. (B) Total protein extracts from bacteria expressing GST-Rlp24, GST-Rpl24B, and GST-Rpl5 were incubated with extracts containing Nog1 and then with glutathione-Sepharose beads (Pharmacia). After extensive washing, the bound proteins were eluted under denaturing conditions and separated by electrophoresis. The Coomassie blue-stained gels representing the input mixture of bacterial protein extracts (left) and the purified proteins (right) are shown side by side for comparison. A band of about 38 kDa that copurifies with GST-Rlp24 only in the presence of Nog1 (*) is a C-terminal Nog1 fragment (matching peptides between amino acids 361 and 599 as determined by MALDI-TOF mass spectrometry and assignment of peptide masses to the Nog1 sequence).

overexpressed. In addition to clones expressing Rlp24, two independent plasmids carrying the sequence corresponding to the complete NOG1 gene were selected (the smallest insert encompassed the region from 212 bp upstream of the initiation codon to 250 bp downstream of the stop codon) (Fig. 6A). This interaction between the *NOG1* and *RLP24* genes suggested that the two proteins might directly interact. Strong indications for a direct physical interaction also came from a two-hybrid genomic screen using Nog1 as bait that specifically selected Rlp24 as a prey (M. Fromont-Racine, J. C. Rain, and P. Legrain, unpublished data). To confirm these results in vitro, we tested whether recombinant Nog1 and Rlp24 produced in *E. coli* interact. In pull-down experiments, Nog1 copurified with a GST-Rlp24 fusion when expressed in *E. coli*. A smaller amount of Nog1 was purified when the related GST-Rpl24 protein was used, but no Nog1 could be detected in similar experiments when GST-Rpl5 (Fig. 6B) or GST alone (not shown) was used. In addition, the Rlp24-Nog1 interaction was resistant to an RNase A treatment (not shown). We conclude that Nog1 directly and specifically interacts with Rlp24.

Altogether these results show that Rlp24 plays an early role in pre-60S particle assembly and guides the association of Nog1 with these complexes and that later assembly of Nog2 is dependent on the preassembly of both Nog1 and Rlp24.

DISCUSSION

Ordered assembly of proteins during 60S ribosomal subunit biogenesis. Ribosome biogenesis in eukaryotes involves coordinated assembly of a large number of protein factors on, and their dissociation from, dynamic ribonucleoprotein complexes that contain precursors of the rRNAs. More than 120 preribosomal factors, many of them of previously unknown function, were identified by their presence in intermediate complexes purified by affinity methods (3, 8, 10, 13–15, 17, 24, 31). At least 60 proteins are physically associated with pre-60S complexes in their maturation from the nucleolus to the cytoplasm. Multiple changes in the protein compositions of these complexes are likely to occur in correlation with the rRNA processing steps. However, knowledge of the global protein composition of the preribosomal complexes is not sufficient to define either the order of assembly and dissociation of these factors or their roles in the progression from one preribosomal particle to another. Indirect information about these assembly events comes from localization studies and the analysis of pre-rRNA associated with different preribosomal factors. For example, late nucleoplasmic pre-60S complexes associated with Sda1 consist of apparently mature rRNA, ribosomal proteins, and a subset of preribosomal factors (24). In contrast, early nucleolar pre-60S particles with which most of the known preribosomal factors associate cannot be investigated on the basis of protein localization.

A valuable tool for the study of the early maturation events is the identification of rRNA precursors associated with different pre-60S proteins (3, 10, 15, 24, 31, 39). For example, Ssf1 is a protein involved in early steps of pre-rRNA processing since it is present in 27SA2- and 27SB-containing particles (10, 39). In contrast, other proteins, such as Nog2, associate with 27SB and 7S rRNA intermediates (31). Preribosomal factors are thus commonly associated with multiple preribosomal complexes that contain successive rRNA intermediates.

The approaches described above cannot distinguish different preribosomal complexes that are found in the same cellular compartment and that contain similar rRNA precursors. We investigated the changes in protein composition that define novel preribosomal intermediates by the isolation and characterization of complexes blocked at a particular maturation stage. This approach, combined with phenotypic analysis of novel preribosomal factors Rlp24 and Nog1, allowed us to define a model for pre-60S assembly in the nucleolus. In this model, presented in Fig. 7, an order of association and disso-

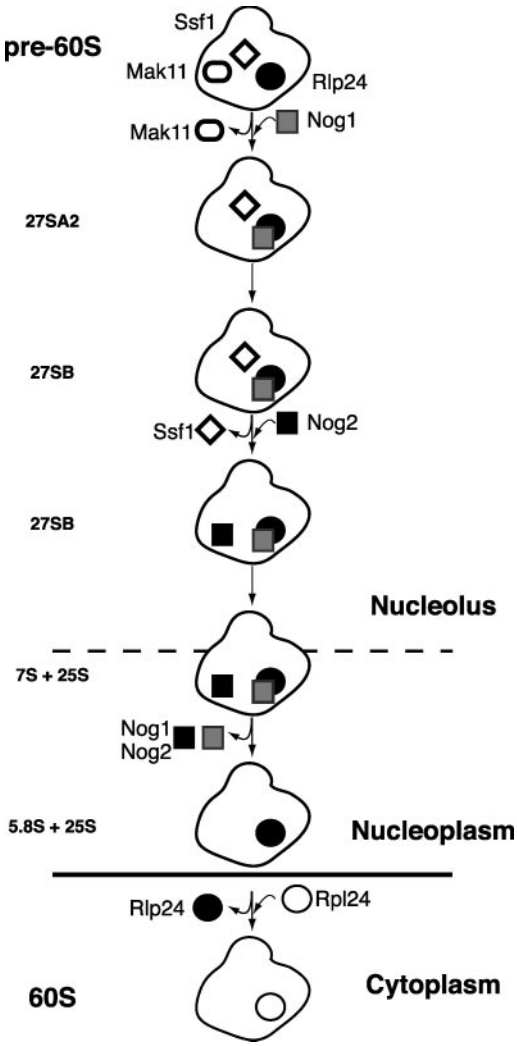


FIG. 7. A model for sequential protein assembly and intracellular trafficking of pre-60S particles. Early pre-60S particles formed in the nucleolus contain Mak11, Ssf1, and Rlp24. The arrival of Nog1 is probably concomitant with Mak11 dissociation. After 27SA2-to-27SB processing, Nog2 associates with pre-60S concomitantly or after Ssf1 has left the particles. Late complexes containing Nog1, Nog2, and Rlp24 are transported to the nucleoplasm, where Nog1 and Nog2 dissociate, apparently before export to the cytoplasm. Finally, Rlp24 dissociates from cytoplasmic pre-60S particles and is likely to be exchanged for its ribosomal homologue, Rpl24.

ciation for Ssf1, Mak11, Rlp24, Nog1, and Nog2 on preribosomal particles is presented. The results that support the key elements of this model are summarized below.

Rlp24 ensures the docking of Nog1 to pre-60S particles. We show here that Rlp24, a protein similar to the ribosomal protein L24e, is associated with pre-60S complexes all along the 60S biogenesis pathway from its assembly in the nucleolus to late cytoplasmic maturation steps. Rlp24 is located not only in the nucleus, like the majority of the known preribosomal proteins, but also in the cytoplasm (Fig. 1B, bottom). Rlp24 is neither free nor present in the polysomal fractions but is exclusively associated with large ribonucleoprotein complexes (Fig. 1C and data not shown). The cytoplasmic fraction of Rlp24 was lost when ribosome maturation and export were impaired (Fig. 1D to F), suggesting that Rlp24 is transported from the nucleus to the cytoplasm in association with the nascent ribosomes and that the cytoplasmic fraction of Rlp24 is associated with pre-60S particles. In Rlp24 complexes isolated by to tandem affinity purification we found both early preribosomal factors such as Ssf1 (10) and late preribosomal factors such as Arx1 (24) (Fig. 2A and Table 1). Moreover, the rRNA precursors 27SA2, 27SA3, 27SB, and 7S, as well as the mature rRNAs of the 60S ribosomal subunits, are enriched in complexes purified in association with Rlp24 (Fig. 2B to D). In conclusion, Rlp24 is a "core" preribosomal protein associated with most, if not all, of the intermediates that are generated during 60S ribosomal subunit biogenesis and follows the pre-60S precursors from their formation in the nucleolus until after export to the cytoplasm.

Several lines of evidence point to essential roles for Rlp24 in pre-60S stability and assembly. Rlp24 may be required for early pre-60S assembly because we observed a reduction in the abundance of complexes associated with Ssf1 or Nog1 when Rlp24 was depleted (not shown). Rlp24, already present in early, 27SA2-containing complexes, may ensure the specific docking of Nog1 to these pre-60S particles. In support to this view, we demonstrate here that Nog1 and Rlp24 not only interact directly (Fig. 6B) but also interact genetically (Fig. 6A). This interaction may explain the similar effects of Rlp24 and Nog1 depletion in blocking pre-rRNA processing at the level of the 27SB intermediate (Fig. 3). Direct protein-protein interactions in ribosome biogenesis by the isolation of multiprotein subcomplexes in wild-type cells (14) or after destabilization of pre-rRNAs (15) have been recently reported although the role of these interactions remains poorly understood.

Nog1 is essential for Nog2 association with the preribosomes. Our data on the Nog1 depletion phenotype and the analysis of Nog1 localization and the associated pre-60S complexes showed that, while being very similar to Rlp24, Nog1 follows the pre-60S particle maturation on a shorter time frame. It dissociates from pre-60S particles in the nucleus or shortly after export to the cytoplasm, as demonstrated by its apparently exclusive nuclear localization (27, 30) (data not shown). Nog1 depletion does not affect the assembly and the stability of early pre-60S complexes, as demonstrated by the purification of Rlp24- and Ssf1-associated pre-60S particles from Nog1-depleted cells (Fig. 5A and C and data not shown). However in the absence of Nog1, later assembly of Nog2 is impaired (Fig. 5B), providing the first direct evidence that the association of late preribosomal factors is dependent on the presence of earlier factors on the particles (Fig. 7).

The same pre-rRNA-containing complexes differ according to their protein compositions. Until now, the existence of several pre-60S complexes was predicted on the basis of the knowledge of the well-ordered steps of rRNA maturation. Careful examination of the compositions of the complexes isolated in association with Ssf1, Rlp24, and Nog1 in wild-type versus mutant cells revealed that the presence of a few preribosomal proteins in these particles is mutually exclusive. Mak11, a protein that is essential for 60S ribosomal subunit formation (25), is present in both Rlp24 (Fig. 2A) and Ssf1 (not shown) complexes. Moreover, this protein is clearly en-

riched in both Rlp24 and Ssf1 complexes after Nog1 depletion (Fig. 5A and data not shown). We conclude that Mak11 is transiently present on early pre-60S particles and leaves these complexes before, or shortly after, Nog1 association (Fig. 7). In contrast, Ssf1 was found on intermediate particles together with Nog1 in complexes containing 27SA2 and 27SB precursors (10) (Fig. 5C).

Ssf1 has been described as an early-acting pre-60S factor on the basis of its nucleolar localization, the pre-rRNA composition of its associated complex, and its depletion phenotype (10). We show here that the presence of Nog2 and Ssf1 in pre-60S complexes seems to be mutually exclusive (Fig. 7) even if both these proteins are associated with 27SB pre-rRNAs (10, 31; C. Saveanu and M. Fromont-Racine, unpublished results). Nog2 was not identified as a component of Ssf1 complexes (10, 13), and we could not detect Nog2 in Ssf1 complexes when using specific antibodies (Fig. 5C). Ssf1 is an early-acting pre-60S factor (10) that is clearly enriched in the Rlp24-associated complexes blocked at the level of 27SB processing (Fig. 5A and 3, which shows the effects of Nog1 depletion on the steady-state levels of rRNA intermediates). Nog2, which we previously reported as a late-acting preribosomal protein (31), was absent from the blocked complexes when Nog1 was depleted (Fig. 5B). We conclude that Ssf1 participates in the assembly of 27SA2 particles and dissociates from 27SB particles independently of Nog1. It is only after Ssf1 dissociation and in the presence of Nog1 that Nog2 becomes associated with 27SB particles. This is the first direct evidence for the existence of distinct pre-60S complexes which differ only by their protein compositions and not by the presence of different pre-rRNAs. At least two 27SB-containing pre-60S particles exist, an early one containing Ssf1 and a later one containing Nog2.

A function for Rlp24 in the cytoplasm? Rlp24 has a sequence very similar to that of the cytoplasmic Rpl24 ribosomal protein, and Rlp24-like sequences are present in all eukaryotes. In *Archaea*, there is only one Rpl24e protein that is more similar to the preribosomal Rlp24 than to the ribosomal protein Rpl24 (Fig. 1). The N-terminal region of Rlp24 is highly conserved and contains a putative zinc finger motif of the form C-X_2-C-X_{21}-C-X_2-C. The four cysteines of this motif are conserved in all Rlp24-like sequences, including those of *Archaea*, whereas the second and the third cysteines are not conserved in Rpl24-like sequences. The C-terminal part of Rlp24 is more divergent and is not present in the *Archaea* sequences. These observations suggest that a gene for an ancient Rpl24/Rlp24 ribosomal protein duplicated early during eukaryotic evolution.

The structure of the large 50S subunit from the halophilic archaean *Haloarcula marismortui* reveals that Rpl24e is located at the interface with the small ribosomal subunit (2). Since only one Rpl24e is present per ribosome, we speculate that, in eukaryotes, Rlp24 and Rpl24 successively occupy the same position on the ribosome and interact directly with the rRNA. In support to this model we show here that, when ribosome assembly and export are impaired, Rpl24 remains cytoplasmic, in contrast to ribosomal proteins such as Rpl25, which accumulates in the nucleus under the same conditions (Fig. 1D and F). Moreover, Rpl24 was shown to assemble late in the cytoplasm with the nascent ribosomes (20). Since Rlp24 dissociates from pre-60S particles in the cytoplasm (Fig. 1B), the exchange with Rpl24 might take place in late cytoplasmic pre-60S particles. The factor that triggers Rlp24 dissociation from pre-60S particles does not seem to be the cytoplasmic Rpl24 itself since Rlp24 localization and its sedimentation profile on sucrose gradients are not affected by the double deletion of RPL24A and RPL24B (Saveanu and Fromont-Racine, unpublished results). Candidates for Rlp24 recycling factors are cytoplasmic pre-60S-associated factors such as Lsg1 (24) and cytoplasmic GTPases such as Efl1, a protein that was shown to be involved in Tif6 recycling (32).

We show here that, unlike Rpl24, Rlp24 is involved in a direct, specific interaction with Nog1 (Fig. 6). This interaction is likely to be essential for the assembly of functional pre-60S particles. Strikingly, the equivalent of ribosomal protein L24 from plants specifically interacts with TAV, a viral translational regulator (26). It is thus likely that Rpl24e proteins developed specific protein interactions with factors that are specialized in ribosome biogenesis or translation. While the role of Rlp24 in the maturation of the ribosomes is essential (Fig. 3), Rpl24 is not essential in yeast and has a role in translation (9).

In conclusion, this study reveals the existence of several preribosomal complexes of different protein compositions associated with identical pre-rRNA intermediates. Our analysis shed light on the assembly and dissociation of some pre-60S factors and allowed us to show that specific protein-protein interactions could mediate the assembly events. Applied systematically, this approach should allow the complete characterization of distinct successive complexes that define the ribosome biogenesis pathway in eukaryotes, as well as the roles of preribosomal proteins in guiding the assembly and dissociation of other factors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Decourty for performing the Rlp24 high-copy-number suppressor screen and J.-C. Rain (Hybrigenics, Paris, France) for providing the results of a Nog1 two-hybrid screen. We thank P. Lenormand for his assistance in mass spectrometry experiments and D. Montean for the generation of polyclonal antibodies. We are grateful to P. Legrain (Hybrigenics) for critical reading of the manuscript. We thank B. Seraphin (CGM-CNRS, Gif-sur-Yvette, France) for providing the plasmid pBS1479, A. Johnson for sharing data prior to publication and for providing the Nmd3 plasmids, and E. Hurt (Biochemie-Zentrum, Heidelberg, Germany) for the plasmid expressing the Rpl25-eGFP reporter gene. The SC1101 strain was obtained from EUROSCARF and has been constructed by CellZome AG (Heidelberg, Germany).

This work was supported by a grant of the European Union, the RNOMICS network (QLG2-CT-2001-01554). C.S. received financial support from Groupe d'Intérêt Publique-Aventis.

REFERENCES

1. **Bachellerie, J. P., B. Michot, M. Nicoloso, A. Balakin, J. Ni, and M. J. Fournier.** 1995. Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA. Trends Biochem. Sci. **20:**261–264.
2. **Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz.** 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. Science **289:**905–920.
3. **Bassler, J., P. Grandi, O. Gadal, T. Lessmann, E. Petfalski, D. Tollervey, J. Lechner, and E. Hurt.** 2001. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. Mol. Cell **8:**517–529.
4. **Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute, and C. Cullin.** 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. **21:**3329–3330.
5. **Bertrand, E., F. Houser-Scott, A. Kendall, R. H. Singer, and D. R. Engelke.** 1998. Nucleolar localization of early tRNA processing. Genes Dev. **12:**2463–2468.
6. **Bonangelino, C. J., E. M. Chavez, and J. S. Bonifacino.** 2002. Genomic

screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell **13:**2486–2501.

7. **Daugeron, M. C., and P. Linder.** 1998. Dbp7p, a putative ATP-dependent RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for 60S ribosomal subunit assembly. RNA **4:**566–581.
8. **Dragon, F., J. E. Gallagher, P. A. Compagnone-Post, B. M. Mitchell, K. A. Porwancher, K. A. Wehner, S. Wormsley, R. E. Settlage, J. Shabanowitz, Y. Osheim, A. L. Beyer, D. F. Hunt, and S. J. Baserga.** 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. Nature **417:**967–970.
9. **Dresios, J., I. L. Derkatch, S. W. Liebman, and D. Synetos.** 2000. Yeast ribosomal protein L24 affects the kinetics of protein synthesis and ribosomal protein L39 improves translational accuracy, while mutants lacking both remain viable. Biochemistry **39:**7236–7244.
10. **Fatica, A., A. D. Cronshaw, M. Dlakic, and D. Tollervey.** 2002. Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. Mol. Cell **9:**341–351.
11. **Fatica, A., and D. Tollervey.** 2002. Making ribosomes. Curr. Opin. Cell Biol. **14:**313–318.
12. **Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P. O. Brown.** 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol. Biol. Cell **11:** 4241–4257.
13. **Gavin, A. C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A. M. Michon, C. M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M. A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, and G. Superti-Furga.** 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature **415:**141–147.
14. **Grandi, P., V. Rybin, J. Bassler, E. Petfalski, D. Strauss, M. Marzioch, T. Schafer, B. Kuster, H. Tschochner, D. Tollervey, A. C. Gavin, and E. Hurt.** 2002. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. Mol. Cell **10:**105–115.
15. **Harnpicharnchai, P., J. Jakovljevic, E. Horsey, T. Miles, J. Roman, M. Rout, D. Meagher, B. Imai, Y. Guo, C. J. Brame, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and J. L. Woolford, Jr.** 2001. Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. Mol. Cell **8:**505–515.
16. **Ho, J. H., G. Kallstrom, and A. W. Johnson.** 2000. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. J. Cell Biol. **151:**1057–1066.
17. **Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S. L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreault, B. Muskat, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willems, H. Sassi, P. A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sorensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. Hogue, D. Figeys, M. Tyers, J. S. Andersen, C. E. Lyon, A. H. Fox, A. K. Leung, Y. W. Lam, H. Steen, and A. I. Lamond.** 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. Nature **415:**180–183.
18. **Hurt, E., S. Hannus, B. Schmelzl, D. Lau, D. Tollervey, and G. Simos.** 1999. A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. J. Cell Biol. **144:**389–401.
19. **Kressler, D., P. Linder, and J. de La Cruz.** 1999. Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **19:**7897–7912.
20. **Kruiswijk, T., R. J. Planta, and J. M. Krop.** 1978. The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast. Biochim. Biophys. Acta **517:**378–389.
21. **Kumar, A., S. Agarwal, J. A. Heyman, S. Matson, M. Heidtman, S. Piccirillo, L. Umansky, A. Drawid, R. Jansen, Y. Liu, K. H. Cheung, P. Miller, M. Gerstein, G. S. Roeder, and M. Snyder.** 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. Genes Dev. **16:**707–719.
22. **Lafontaine, D. L., and D. Tollervey.** 1998. Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs. Trends Biochemical Sci. **23:**383–388.
23. **Longtine, M. S., A. McKenzie III, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J. R. Pringle.** 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **14:**953–961.
24. **Nissan, T. A., J. Bassler, E. Petfalski, D. Tollervey, and E. Hurt.** 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. EMBO J. **21:**5539–5547.
25. **Ohtake, Y., and R. B. Wickner.** 1995. Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. Mol. Cell. Biol. **15:** 2772–2781.
26. **Park, H. S., A. Himmelbach, K. S. Browning, T. Hohn, and L. A. Ryabova.** 2001. A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. Cell **106:**723–733.
27. **Park, J. H., B. C. Jensen, C. T. Kifer, and M. Parsons.** 2001. A novel nucleolar G-protein conserved in eukaryotes. J. Cell Sci. **114:**173–185.
28. **Pringle, J. R., A. E. Adams, D. G. Drubin, and B. K. Haarer.** 1991. Immunofluorescence methods for yeast. Methods Enzymol. **194:**565–602.
29. **Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin.** 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat. Biotechnol. **17:**1030–1032.
30. **Rout, M. P., J. D. Aitchison, A. Suprapto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B. T. Chait.** 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. J. Cell Biol. **148:**635–651.
31. **Saveanu, C., D. Bienvenu, A. Namane, P. E. Gleizes, N. Gas, A. Jacquier, and M. Fromont-Racine.** 2001. Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. EMBO J. **20:**6475–6484.
32. **Senger, B., D. L. Lafontaine, J. S. Graindorge, O. Gadal, A. Camasses, A. Sanni, J. M. Garnier, M. Breitenbach, E. Hurt, and F. Fasiolo.** 2001. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. Mol. Cell **8:**1363–1373.
33. **Smith, C. M., and J. A. Steitz.** 1997. Sno storm in the nucleolus: new roles for myriad small RNPs. Cell **89:**669–672.
34. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. **25:**4876–4882.
35. **Trapman, J., J. Retel, and R. J. Planta.** 1975. Ribosomal precursor particles from yeast. Exp. Cell Res. **90:**95–104.
36. **Udem, S. A., and J. R. Warner.** 1973. The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. J. Biol. Chem. **248:**1412–1416.
37. **Venema, J., and D. Tollervey.** 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Annu. Rev. Genet. **33:**261–311.
38. **Warner, J. R.** 1974. The assembly of ribosomes in eukaryotes, p. 461–488. *In* M. Nomura, A. Tissieres, and P. Lengyel (ed.), Ribosomes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
39. **Wehner, K. A., and S. J. Baserga.** 2002. The sigma(70)-like motif: a eukaryotic RNA binding domain unique to a superfamily of proteins required for ribosome biogenesis. Mol. Cell **9:**329–339.

2. Nsa2, facteur instable et conservé, est nécessaire à la maturation des précurseurs d'ARN 27SB — *Nsa2, an unstable, conserved factor required for the maturation of 27SB pre-rRNAs*

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 281, NO. 37, pp. 27099–27108, September 15, 2006
© 2006 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

Nsa2 Is an Unstable, Conserved Factor Required for the Maturation of 27 SB Pre-rRNAs*

Received for publication, March 8, 2006, and in revised form, July 7, 2006 Published, JBC Papers in Press, July 21, 2006, DOI 10.1074/jbc.M602199200

Alice Lebreton[1], **Cosmin Saveanu, Laurence Decourty, Alain Jacquier, and Micheline Fromont-Racine**[2]
From the Unité de Génétique des Interactions Macromoléculaires, CNRS-URA2171, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France

In *Saccharomyces cerevisiae*, a large variety of pre-ribosomal factors have been identified recently, a number of which are still of unknown function. The essential pre-ribosomal 30-kDa protein, Nsa2, was characterized as one of the most conserved proteins from yeast to human. We show here that the expression of the human orthologue *TINP1* complements the repression of *NSA2* in yeast. Nsa2 was co-purified in several pre-ribosomal complexes and found to be essential for the large ribosomal subunit biogenesis. Like several other factors of the pre-60 S particles, the absence of Nsa2 correlated with a decrease in the 25 S and 5.8 S ribosomal RNA levels, and with an accumulation of 27 SB pre-ribosomal RNA intermediates. We show that Nsa2 is a functional partner of the putative GTPase Nog1. In the absence of Nsa2, Nog1 was still able to associate with pre-ribosomal complexes blocked in maturation. In contrast, in the absence of Nog1, Nsa2 disappeared from pre-60 S complexes. Indeed, when ribosome biogenesis was blocked upstream of Nsa2, this short half-lived protein was largely depleted, suggesting that its cellular levels are tightly regulated.

Ribosome biogenesis is a highly conserved process among eukaryotes and results in the synthesis of functional small and large ribosomal subunits, necessary for the translation of mRNAs into proteins in the cytoplasm. This essential process is tightly regulated; indeed, in exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, it accounts for about 60% of the metabolic effort (1), whereas it is almost completely turned off during the stationary phase.

The pathway begins with the transcription by RNA polymerase I of a 35 S ribosomal RNA (rRNA) precursor and of the 5 S rRNA by RNA polymerase III. This transcription, together with the nuclear import of ribosomal proteins, pre-ribosomal factors, and small nucleolar RNAs, is responsible for the self-assembly of the nucleolus (reviewed in Ref. 2), a region of the nucleus specialized in the production of ribosomes. Association of ribosomal proteins and pre-ribosomal factors with nascent pre-rRNAs gives birth to a 90 S pre-ribosomal complex, which undergoes various steps of maturation, first in the nucleolus, then in the nucleoplasm, and finally in the cytoplasm after export through the pores of the nuclear envelope (for a review of the whole pathway, see Refs. 3–5). Along this maturation, the 90 S complex separates into a pre-60 S complex, which will generate the large ribosomal subunit containing mature 25 S, 5.8 S, and 5 S rRNAs, and a pre-40 S complex, which will generate the small ribosomal subunit containing 18 S rRNA. A large number of factors are necessary for the correct modification, cleavage, and processing of pre-rRNAs, the positioning of ribosomal proteins, and the export of the pre-60 S and pre-40 S particles toward the cytoplasm.

More than 100 factors associated with pre-60 S complexes (pre-60 S factors) have been identified to date, a number of which remain to be characterized (4, 6–9). Some of them display obvious enzymatic functions (RNases, helicases, methylases, etc.). Others are annotated as putative enzymes based on sequence similarities, but their exact role in the biogenesis is still unclear. Among these factors, a set of putative GTPases is required at various steps of the maturation of the large subunit, namely nuclear-nucleolar Nog1, Nog2, Nug1, and cytoplasmic Lsg1 (10–12). As putative GTPases, these proteins are believed to participate in the control of biogenesis; they may play a part as proofreaders of the correct maturation of pre-ribosomal particles at a precise step. In a previous work, we demonstrated that the physical and functional partners Nog1 and Rlp24 are required for adequate processing of the internal transcribed spacer 2 (ITS2)[3] in 27 S pre-rRNAs, located between the 5.8 S and 25 S mature rRNAs (13).

Here, we have focused on a partner of Nog1, the essential pre-60 S factor, Nsa2 (for Nop seven-associated 2), which was found associated with pre-60 S complexes in tandem affinity purifications (6, 7, 13, 14). It contains an S8 domain, named after the Rps8 archaeal and eukaryotic ribosomal proteins, which could be involved in protein-RNA interactions. This factor appears to be one of the most conserved proteins in the eukaryotic kingdom (15). Sequence conservation correlates with function conservation, as we show here that the human orthologue *TINP1* is able to complement the repression of *NSA2* in yeast.

* This work was supported by grants from the European Union, the RNomics network (QLG2-CT-2001-01554), and the Ministère délégué à l'Enseignement Supérieur et à la Recherche (ACI-BCM0089-2003). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] Recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

[2] To whom correspondence should be addressed: Unité de Génétique des Interactions Macromoléculaires, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris cedex 15, France. Tel.: 33-1-40-61-34-32; Fax: 33-1-45-68-87-90; E-mail: mfromont@pasteur.fr.

[3] The abbreviations used are: ITS2, internal transcribed spacer 2; 3-AT, 3-aminotriazol; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; ORF, open reading frame; TAP, tandem affinity purification; TEV, nuclear inclusion A protein of tobacco etch virus; YPD, yeast extract-peptone-D-glucose; snRNA, small nuclear RNA.

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

TABLE 1
Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Ref./source
MGD353-13D	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4*	19
BY4742	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0*	17
BMA64	*MATa/α, ura3-1/ura3-1, trp1Δ1/trp1Δ1, ade2-1/ade2-1, his3-11,-15/his3-11,-15, leu2-3,-112/leu2-3,-112*	23
SC0935	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, NSA2-TAP:URA*	6
LMA158	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, NOG1-TAP:TRP1*	11
LMA240	*MATa, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, Ypl093wΔ::KanMX6* [pFL36-*NOG1*]	This work
LMA241	*MATα, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, Ypl093wΔ::KanMX6* [pFL36-*nog1-2*]	This work
LMA242	*MATα, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, Ypl093wΔ::KanMX6* [pFL36-*nog1-3*]	This work
LMA244	*MATa, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, Ypl093wΔ::KanMX6* [pFL36-*nog1-4*]	This work
LMA245	*MATα, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, Ypl093wΔ::KanMX6* [pFL36-*nog1-5*]	This work
LMA271	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:*P_{GAL1}*-NSA2*	This work
LMA272	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:*P_{GAL1}*-NSA2, NOG1-TAP:TRP1*	This work
LMA275	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:*P_{GAL1}*-NOG1, NSA2-TAPI:TRP1*	This work
LMA276	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:*P_{GAL1}*-RLP24, NSA2-TAP:TRP1*	This work
LMA277	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:*P_{GAL1}*-SSF1, SSF2Δ::NAT, NSA2-TAP:TRP1*	This work
LMA344	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:*P_{GAL1}*-NOG2, NSA2-TAP:URA3*	This work
LMA392	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, NSA2-TAP:His3MX6*	This work
LMA393	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, NOG1-TAP:His3MX6*	This work
LMA402	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:*P_{GAL1}*-NOG1, NSA2-TAP:His3MX6*	This work
LMA403	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:*P_{GAL1}*-NOG1-TAP:His3MX6*	This work
LMA404	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:*P_{GAL1}*-NSA2-TAP:His3MX6*	This work
LMA405	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:*P_{GAL1}*-NSA2, NOG1-TAP:His3MX6*	This work

The absence of Nsa2 results in impaired 60 S levels in yeast cells (14). We show in this work that this protein is required for the progression of the pre-60 S complexes through the ITS2 cleavage and processing steps. Additionally, the protein levels of Nsa2 appear to be tightly regulated and depend on proper 60 S biogenesis upstream in the metabolic pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains, Plasmids, and Oligonucleotides—The yeast strains used in the present study are listed in Table 1. Chromosomal deletions or gene fusions were generated by homologous recombination using PCR products to transform MGD353-13D, BMA64, or BY4742 strains (16). Details concerning these constructs may be provided upon request. Disrupted strains in the BY4742 background, with the KanMX4 marker, came from the Euroscarf collection of deletion strains (17). Plasmids for two-hybrid assays were obtained by Gateway cloning in pAS2ΔΔ and pACTIIst destination vectors. Thermosensitive alleles of *NOG1* (*nog1ts*) were generated by mutagenic PCR (18). They were expressed in the centromeric vector pFL36cII under control of the natural *NOG1* promoter and terminator sequences. The plasmid pFL46sII-P_{NSA2}-*TINP1* was obtained by cloning the complete *TINP1* open reading frame (ORF) from the *TINP1* cDNA in the multicopy plasmid pFL46sII, under control of the natural *NSA2* promoter and terminator sequences. The sequence of oligonucleotides used for Northern hybridization and primer extension analyses were as described previously (13).

High-copy-number Suppressor Genetic Screen—The LMA241, -242, -244, and -245 (*nog1ts*) strains were transformed with a yeast genomic high-copy-number vector library constructed in pFL44L. The transformants were grown on solid synthetic minimal medium lacking uracil at 37 °C. Colonies that had lost their thermosensitive phenotype when compared with the same strains transformed with an empty vector were selected. Plasmidic DNA was recovered and DNA inserts were sequenced. The suppressor plasmids were checked by retransformation of the *nog1ts* and the corresponding wild type LMA240 strains. Their growth phenotypes were compared by spotting transformants in 10^{-1} dilution steps on minimal medium without uracil at 25, 30, and 37 °C.

Matrix Two-hybrid Test—The strain CG1945, transformed with pAS2ΔΔ-*NOG1*, *NSA2*, or *RLP24* baits, was mated with the strain Y187 transformed with the same genes cloned in pACTIIst. Diploids were spotted on minimal medium without leucine and tryptophan (−LW) and then replicated on minimal medium without leucine, tryptophan, and histidine (−LWH) for the selection of positive clones. The strength of the interactions was estimated by replicating on −LWH medium containing 1, 5, 10, or 25 mM 3-aminotriazol (3-AT).

RNA Extraction, Northern Blotting, and Primer Extension—Cells were broken with glass beads, and total RNAs were subjected to phenol-chloroform extraction. RNAs were resolved on 6% polyacrylamide-urea gels or on 1% agarose gels and then transferred to Hybond-N+ membranes and probed with various ^{32}P-labeled oligonucleotides or with random PCR probes complementary to specific mRNAs. Primer extensions were performed with ^{32}P-labeled oligonucleotides, and the products were then resolved on 5% polyacrylamide-urea gels. Quantifications were performed with ImageQuant software.

Sucrose Gradient and Protein Analysis—Total protein extracts were prepared from exponentially growing yeast cells as described previously (11) and separated on 10–50% sucrose gradients by centrifugation for 3 h at 190,000 × *g* in a SW41 rotor (Beckman). In each fraction of the gradient, the proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid, separated on 10% polyacrylamide-SDS gels, and transferred to nitrocellulose membranes. Tandem affinity purification (TAP)-tagged proteins were detected with a 1:10,000 dilution of the peroxidase-anti-peroxidase-soluble complex (Sigma). Native proteins were detected by indirect immunoblotting, using as primary antibodies specific polyclonal rabbit antibodies at 1:2,000 to 1:10,000 dilutions. Anti-Nog1, anti-Rlp24, and anti-Nog2 antibodies were as described by Saveanu *et al.* (13). Anti-Nsa2 antibodies were produced by immunization of rabbits with

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

recombinant GST-Nsa2 fusion protein produced in *Escherichia coli* BL21. Anti-Arx1 and anti-Alb1 antibodies were produced by immunization of rabbits with specific immunogenic peptides and were affinity-purified (Covalab). Antibodies against Nop7, Rpl1, and Tif6 were obtained from J. L. Woolford (Dept. of Biological Sciences, Carnegie Mellon University, Pittsburgh), F. Lacroute (Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, France), and F. Fasiolo (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, Strasbourg, France), respectively. Rabbit anti-glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PDH) antibody was from Sigma.

Secondary antibodies (goat anti-rabbit-horseradish peroxidase conjugate from Bio-Rad) were used at a 1:10,000 dilution. Visualization of the peroxidase activity was performed with the ECL+ chemiluminescence kit (Amersham Biosciences).

Tandem Affinity Purification of Complexes—Protein complexes associated with Nog1-TAP were purified according to the standard TAP protocol (19), starting from 4 liters of yeast culture. The purified protein samples were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot as described above. For the analysis of Nsa2-associated RNAs, only the first step of the TAP protocol was performed, with a lysis buffer containing 20 mM vanadyl ribonucleoside complex (New England Biolabs) and a TEV protease digestion buffer containing 0.1 unit/μl recombinant RNasin (Promega). The RNAs contained in the TEV eluates were extracted twice with phenol-chloroform, precipitated, and then analyzed by primer extension or Northern blot as described above.

Glucose Repression of Specific Genes—Strains expressing various pre-60 S genes under the control of a galactose-inducible promoter were shifted from galactose- to glucose-containing rich medium. The absorbance at 600 nm was measured for each mutant strain and the corresponding wild type strain over a 24-h time course. Measurements were standardized to $A_{600\ nm}$ at time 0. Total proteins or RNAs were extracted from these strains along the time course and consequently analyzed by Western blot or Northern blot as described above.

RESULTS

Nog1 and Nsa2 Are Functionally and Physically Linked—Nog1 is a putative GTPase involved in the biogenesis of the 60 S ribosomal subunit. In a previous work (13), we showed that Nog1 is required, together with Rlp24, for adequate cleavage of ITS2 in the rRNA maturation pathway, suggesting that it might be a regulator of the progression through this step.

To get more insights into the function of Nog1 in this process, we searched for functional partners of this factor. Several mutants of *NOG1* were obtained by random PCR mutagenesis on the whole ORF. Conditional alleles were selected in a *nog1*Δ strain, expressing the mutant alleles on a centromeric plasmid. *nog1-2* to *nog1-5* alleles conferred a thermosensitive phenotype as well as impaired 27 SB processing when strains were grown at 37 °C (data not shown). The most severe phenotype was obtained for *nog1-5*-containing strains, which were also strongly affected for growth at 25 and 30 °C. *nog1-3*-containing strains were less affected but displayed pre-60 S export defects when grown for 2 h at 37 °C (data not shown).

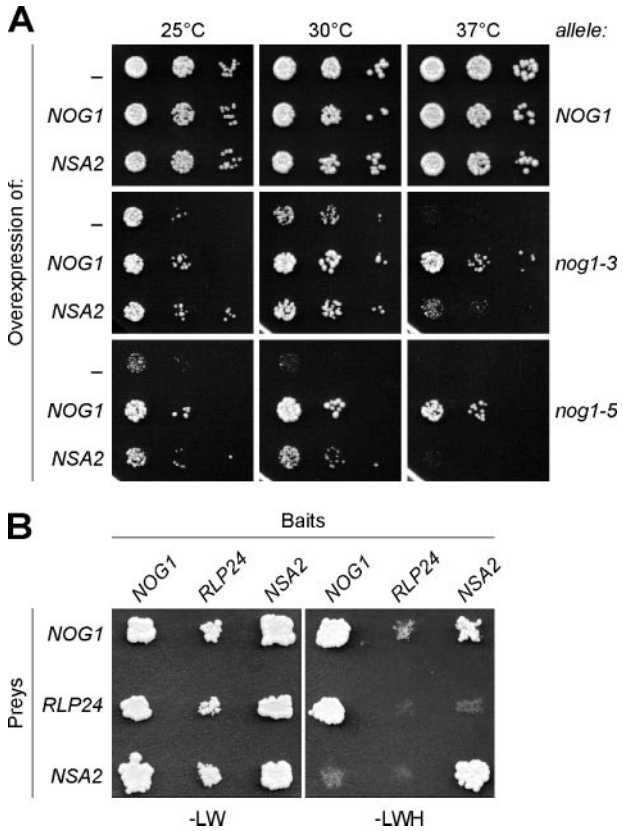


FIGURE 1. **Nog1 and Nsa2 interact genetically and physically.** *A*, *NSA2* is a high-copy-number suppressor of *nog1ts*. Wild type, *nog1-3*, or *nog1-5* mutant strains were transformed with high-copy-number plasmids (pFL44sII) carrying distinct DNA inserts (*NOG1*, *NSA2*, or no insert (−)) and plated in 10^{-1} dilution series on synthetic medium without uracil at 25, 30, or 37 °C for 2 days. *B*, Nsa2 is a two-hybrid partner of Nog1. *NOG1*, *RLP24*, and *NSA2* were cloned as complete ORFs in the two-hybrid pAS2ΔΔ and pActIIst vectors. Bait ORFs cloned in pAS2ΔΔ were transformed into the CG1945 strain; prey ORFs cloned in pActIIst were transformed into the Y187 strain. Both strains were mated, and diploids were selected on minimal medium without leucine and tryptophan (−*LW*). Then bait-prey pairs that displayed a two-hybrid interaction were selected on minimal medium without leucine, tryptophan, and histidine (−*LWH*).

We performed a high-copy-number suppressor screen with these *nog1ts* strains grown at 37 °C. In addition to *NOG1* itself, the *YER126C/NSA2* ORF was selected in eight distinct DNA inserts, seven of which also contained the adjacent ORF, *LCP5*. The smallest insert was constituted by a DNA fragment extending from 1,040 base pairs upstream of the *NSA2* initiation codon to 1,385 base pairs downstream of its stop codon. *NSA2* and *LCP5* were subcloned, along with their promoter and terminator regions, in 2 μ plasmids. *LCP5* alone had no effect on the growth of the mutant strains (data not shown). Fig. 1*A* shows the suppression of the phenotypes for *nog1-3* at 30 and 37 °C and *nog1-5* at 25 and 30 °C when either *NOG1* or *NSA2* was overexpressed. In contrast to *NOG1*, *NSA2* did not complement *nog1*Δ strains (data not shown). Hence, the genetic link between *NSA2* and *NOG1* is not due to a functional redundancy of the gene products.

Apart from this genetic link between both genes, we could identify, through a two-hybrid matrix analysis, a physical interaction between Nog1 as a prey and Nsa2 as a bait (Fig. 1*B*). This interaction supported growth of the diploid cells on minimal medium without leucine, tryptophan, or histidine containing

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

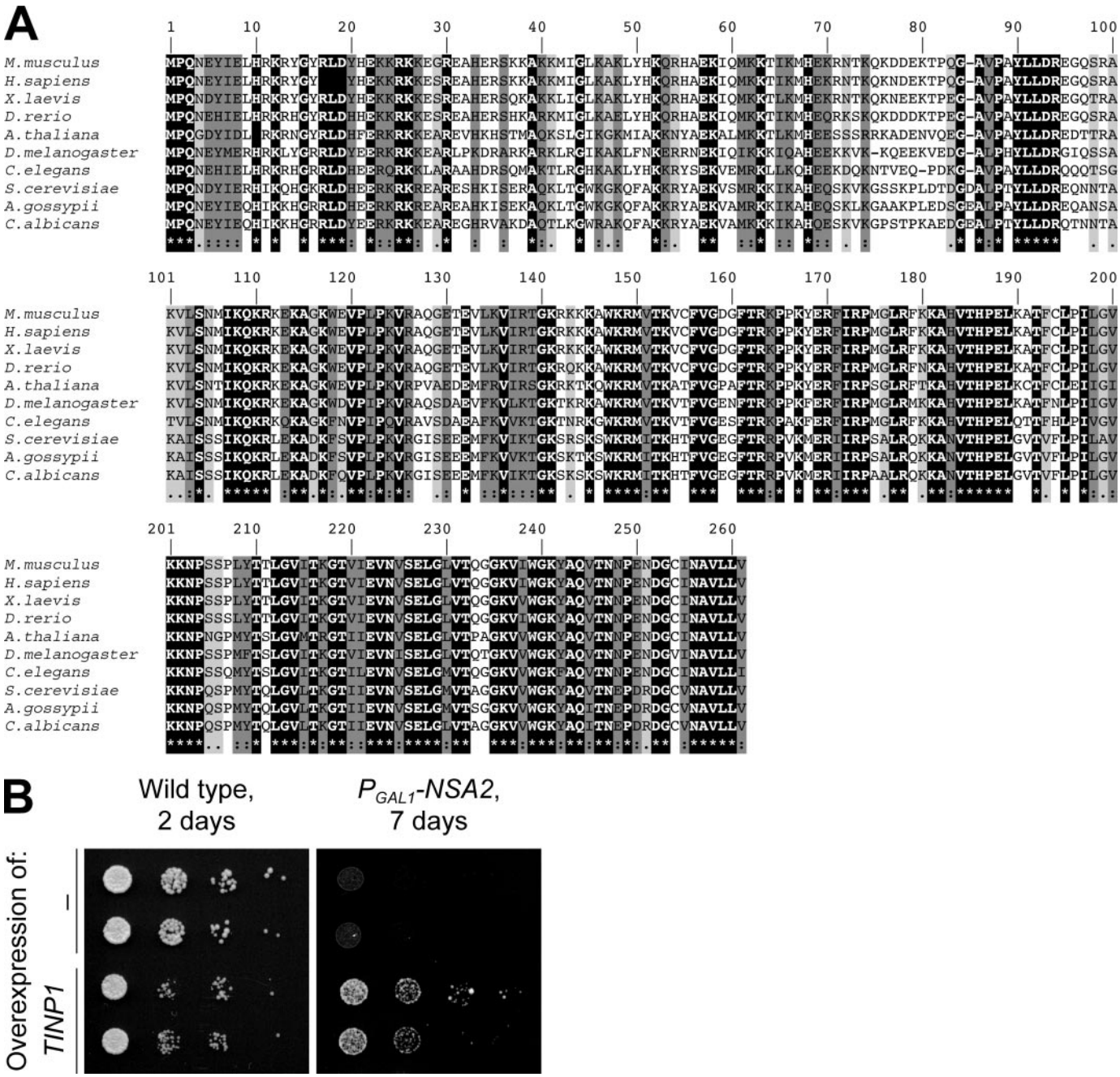


FIGURE 2. ***TINP1* is the human orthologue of *NSA2*.** *A*, Nsa2 is much conserved among eukaryotes. Sequences of Nsa2 homologues in 10 model organisms were aligned with ClustalX. The conserved residues between all species are *shaded* in *black*. The residues that are conserved between at least five species are *shaded* in *gray*. *Dark gray* indicates residues for which the chemical properties are conserved. *B*, overexpression of *TINP1* complements the absence of Nsa2. A strain expressing *NSA2* under the control of the P_{GAL1} promoter and the corresponding wild type strain were transformed with pFL46sII expressing *TINP1* under control of the *NSA2* promoter and terminator sequences or with the corresponding empty vector (−). Transformants were plated in 10^{-1} dilution steps on glucose-containing minimal medium without leucine and then incubated for 2–7 days at 30 °C.

up to 5 mM 3-AT (data not shown). Moreover, both Nog1 and Nsa2 also interacted strongly with themselves in the two-hybrid test (Fig. 1*B*); for Nog1-Nog1 or Nsa2-Nsa2 interactions, diploid cells resisted 3-AT concentrations of 25 mM (data not shown). As a negative control, no interaction was observed between the Rlp24 bait and the Nsa2 prey, whereas this bait could interact with its partner Nog1 (Fig. 1*B*); this interaction resisted 25 mM 3-AT (data not shown). A two-hybrid interaction was also observed between Nsa2 and mutants of Nog1 blocked either in a GTP- or in a GDP-bound state, as well as with a N-terminal fragment of Nog1 reduced to its first 160 amino acids, a conserved domain located upstream of the hypothetical GTP binding site of the protein (data not shown).

TinP1 Is the Orthologue of Nsa2 in Human Cells—Nsa2 (Nop-seven-associated protein 2) is a 261-amino acid-long protein, which was previously identified in pre-60 S complexes isolated by tandem affinity purification (14). This protein is highly conserved among eukaryotes; its human homologue, TinP1 (TGFβ-inducible nuclear protein 1), displays 62.1% identity and 77.4% similarity with Nsa2, which makes it one of the most conserved proteins in

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

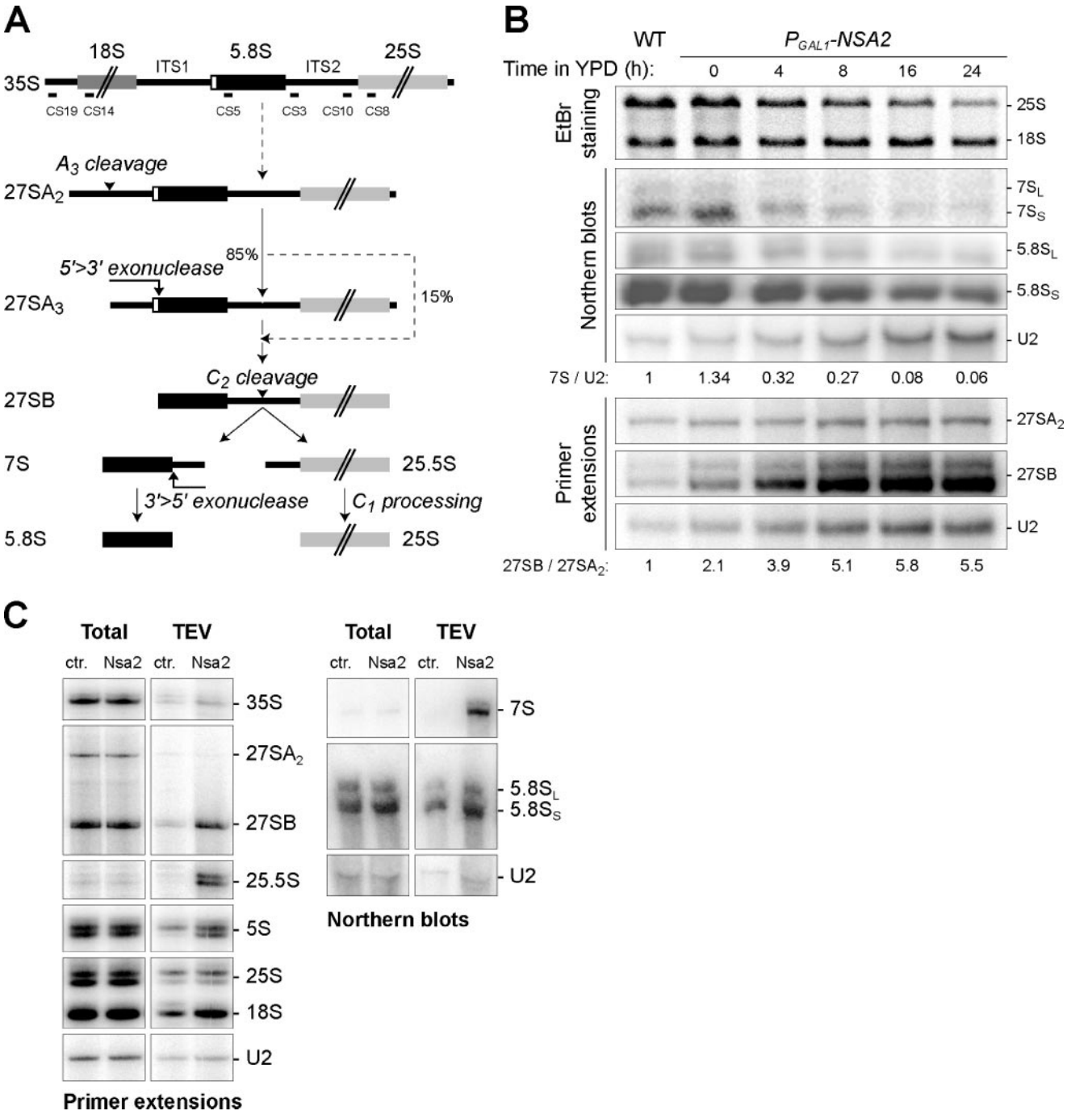


FIGURE 3. **Nsa2 is involved in the processing of ITS2.** *A*, schematic representation of the pre-rRNA processing steps involved in the formation of mature 5.8 S and 25 S rRNA in *S. cerevisiae*. The relative positions of the oligonucleotides used in this study are indicated. *B*, Nsa2 is required for adequate processing of 27 SB pre-rRNAs. Total RNAs were extracted from the wild type BY4742 strain (*WT*) grown in YPD medium, as well as of the LMA392 strain in which *NSA2* was under control of a P_{GAL1} promoter, at several time points after a shift to YPD medium. Mature rRNAs were analyzed by agarose gel electrophoresis and EtBr staining. 27 SB and 27 SA_2 intermediates were detected by primer extension with oligonucleotide CS10. 7 S and 5.8 S were analyzed by Northern blot, using the CS3 and CS5 probes, respectively. Detection of snRNA U2 was used as a loading control. The 27 SB/27 SA_2 ratio in the P_{GAL1}-*NSA2* strain was normalized to the wild type ratio, set arbitrarily as 1. *C*, Nsa2-TAP co-purifies with the substrate and products of the ITS2 cleavage. Extracts from a non-tagged or *NSA2-TAP* strains were affinity-purified on IgG-Sepharose. RNAs contained in the crude extract or in the TEV-eluted fraction were extracted and analyzed by primer extension (*left panel*) and Northern blot (*right panel*). The 35 S pre-rRNA was detected with oligonucleotide CS19 and 25 S, 18 S, and 5 S pre-rRNA with oligonucleotides CS8, CS14, and MFR422, respectively. *ctr.*, control.

the yeast proteome (15). The alignment of Nsa2 homologues in model organisms (Fig. 2*A*) illustrates this strong conservation.

We tested whether TinP1 was the orthologue of Nsa2 by complementation experiments. A 2 μ plasmid expressing *TINP1* under the control of the P_{NSA2} promoter was able to complement a strain in which *NSA2* was repressed (*i.e.* a P_{GAL1}-*NSA2* strain grown in glucose-containing medium) compared with the same strain transformed with the corresponding empty vector (Fig. 2*B*). In contrast, in a wild type strain, the overexpression of *TINP1* was slightly toxic. Our

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

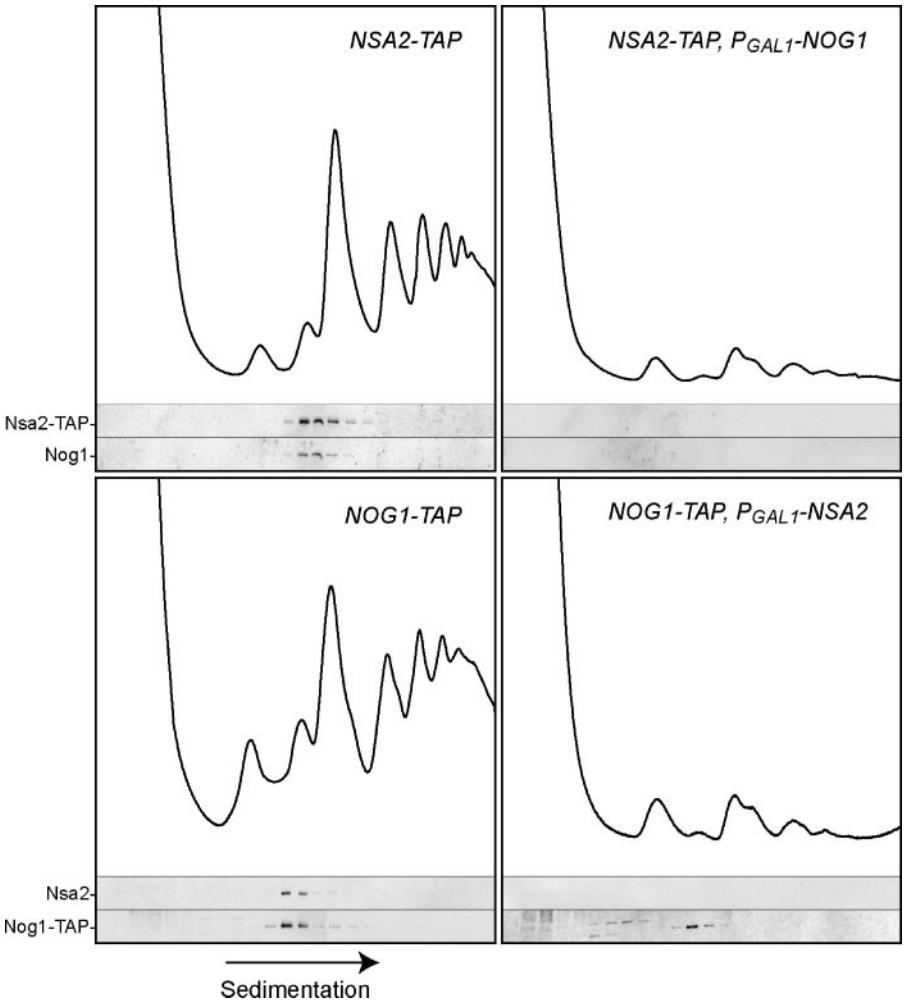


FIGURE 4. **Nog1 precedes Nsa2 in the pre-60 S assembly scenario.** Whole cell extracts were prepared from LMA392, LMA393, LMA402, and LMA405 producing Nsa2-TAP or Nog1-TAP in wild type, P_{GAL1}-*NOG1*, or P_{GAL1}-*NSA2* contexts and were grown for 16 h in YPD. Complexes were separated on sucrose gradients by ultracentrifugation. Absorbance at 254 nm was measured, and 0.5-ml fractions of the gradient were collected. Peaks corresponding to the 40 S, 60 S, 80 S particles or to the polysomes are indicated. The proteins of each fraction were precipitated with trichloroacetic acid and analyzed by Western blot, with peroxidase-anti-peroxidase complex for the detection of the TAP fusion proteins or with antibodies directed against non-tagged Nsa2 or Nog1.

data strongly suggest that Human *TINP1* is thus the orthologue of *NSA2*.

27 SB rRNA Intermediates Accumulate in the Absence of Nsa2—The functional links between Nog1 and Nsa2 suggested that both factors might be involved in the same cellular pathway. Additionally, previous work (14) had shown that Nsa2 is required for maintenance of adequate cellular 60 S ribosomal subunit amounts. Altogether, these data suggested that Nsa2 might be required for the completion of the large ribosomal subunit biogenesis. To identify this step, a strain in which NSA2 was under control of a P_{GAL1} promoter was shifted to glucose from 0 to 24 h. Mature rRNAs and pre-rRNA species were analyzed and quantified along this repression time course (Fig. 3*B*). This experiment revealed a decrease in the levels of mature 5.8 S and 25 S rRNA species in the mutant compared with the wild type strain grown in glucose-containing medium. Within the same period of time, 18 S rRNA levels were not affected.

As far as rRNA intermediates are concerned, we detected a drop in the 7 S levels (standardized to U2 snRNA), which correlated with an increase in the 27 SB/27 SA_2 ratio. We concluded that Nsa2 is required for appropriate C_1/C_2 cleavage and processing steps of ITS2 during the maturation of the large ribosomal subunit (Fig. 3*A*).

27 SB and 7 S rRNA Intermediates Accumulate in Nsa2-TAP Complexes—To confirm the involvement of Nsa2 in the processing of ITS2, we isolated rRNA intermediates contained in Nsa2-TAP-associated complexes. After affinity purification on IgG-Sepharose of either a strain expressing NSA2-TAP or a wild type, non-tagged strain as a negative control, primer extension and Northern blot analysis were performed on the TEV eluates (Fig. 3*C*). 27 SB, 25.5 S, and 7 S rRNA intermediates were strongly enriched in the Nsa2-TAP-associated complexes when compared with the non-tagged strain. Hence, both the substrate and the products of the C_2 cleavage step can be found in Nsa2-TAP-containing complexes (Fig. 3*A*). We could also detect a slight enrichment of 5 S rRNA in the complexes, consistent with this RNA polymerase III transcript being already associated with pre-60 S particles when cleavage of ITS2 occurs. In contrast, no major difference between TEV eluates was detected in the levels of the other pre-rRNAs (27 SA2, 35 S) or mature RNA polymerase I transcripts (25 S, 5.8 S, or 18 S). The observed signals, as well as the observed U2 snRNA levels, thus probably correspond to background contamination. These data indicate that Nsa2 is present in pre-60 S complexes during the ITS2 cleavage.

Nog1 Is Involved in Pre-60 S Assembly before Nsa2—To better define the biological processes in which Nog1 and Nsa2 are involved, we attempted to place them in the assembly sketch of the pre-ribosome.

We first checked that both proteins were present in macromolecular particles in sucrose gradient experiments followed by Western blot analysis (Fig. 4). Both Nsa2-TAP and Nog1-TAP could be detected in fractions corresponding to the 60 S particles. As a control, the ribosomal protein Rpl1 was found to sediment in the 60 S peak, the 80 S peak, and polysomes (data not shown).

To go further with the investigation of the assembly order, we tried to define whether one of these factors was essential for the loading of the other one on the particle. Analysis of Nsa2-TAP-associated complexes was performed in a P_{GAL1}-*NOG1* strain

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

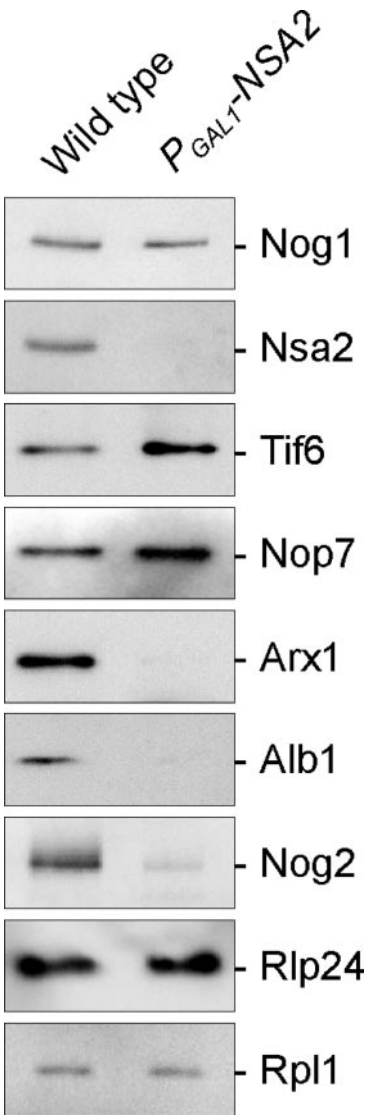


FIGURE 5. **Nog1-associated complexes in the absence of Nsa2.** Nog1-TAP-associated complexes were purified using the TAP method, either under wild type conditions or in a P_{GAL1}-*NSA2* strain shifted to glucose-containing medium for 16 h. The eluates were separated by SDS-PAGE and then analyzed by Western blot with specific antibodies.

shifted to YPD medium for 16 h in order to repress *NOG1*. Under these conditions, Nsa2 was no longer observed in the 60 S fractions and was undetectable in sucrose gradients (Fig. 4). This correlated with a complete disappearance of the Nsa2-TAP-purified complex (data not shown). Meanwhile, the ribosomal protein Rpl1 was still detected in the 60 S peak, 80 S peak, and polysomes on sucrose gradients (data not shown). Hence we conclude that Nog1 is essential for the presence of Nsa2 in pre-60 S particles.

In contrast, Nog1-TAP still sedimented with 60 S particles when *NSA2* was repressed for 16 h (Fig. 4). Hence, the absence of Nsa2 did not impair the loading of Nog1 to pre-60 S complexes. However, biogenesis of the large ribosomal subunit was blocked, because rRNA maturation was impaired (Fig. 2*B*) and a strong decrease in the 60 S levels was observed on sucrose gradients. Together, these data suggest that Nog1 is involved upstream of Nsa2 in the process of ribosome biogenesis. Because the 60 S biogenesis was blocked, we inferred that the purification of Nog1-TAP-associated complexes in absence of Nsa2 could provide a snapshot of the large ribosomal subunit at a precise step in the assembly.

Composition of the Pre-60 S Particles before the Action of Nsa2—Because Nsa2 seemed to be involved in pre-ribosomal complexes later than Nog1, we thought that we might block the biogenesis downstream of Nog1 by repressing *NSA2* and in this way enrich yeast cells in pre-ribosomal complexes characteristic of the ITS2-processing step. Nog1-TAP-associated particles were purified by the TAP method from a strain wild type for Nsa2 or a strain in which *NSA2* was repressed. Differences in composition between both complexes were assessed by immunoblotting for distinct known pre-60 S factors or proteins of the large ribosomal subunit (Fig. 5). When *NSA2* was repressed, we detected in the Nog1-TAP-co-purified complexes a slight increase in the amounts of Tif6 and Nop7 and a disappearance of Arx1, Alb1, and Nog2. Rlp24 levels appeared unchanged between the wild type and the mutant complexes. As loading controls, the Nog1 bait and the large ribosomal protein Rpl1 were found in similar amounts in both complexes. Together, these data suggest that Nsa2 effects on the large ribosomal subunit biogenesis occur after the loading of Nog1, Tif6, and Nop7 to pre-60 S particles and before the loading of Nog2, Arx1, and Alb1. Unchanged levels for Rlp24 might indicate that this factor, like Rpl1, is present in stoichiometric amounts in all Nog1-associated complexes from the beginning to the end. This is consistent with previous results showing that Rlp24 precedes Nog1 and dissociates from pre-60 S particles at late cytoplasmic steps of biogenesis (13).

Presence of Nsa2 in Yeast Cells Is Dependent upon the Presence of Pre-60 S Complexes—As noted previously, when *NOG1* was repressed, not only was Nsa2-TAP absent from the 60 S fraction of sucrose gradient, but it also could not be detected anywhere else in the gradient (Fig. 4), whereas Rpl1 remained bound to 60 S complexes. This disappearance of Nsa2-TAP in Nog1-depleted cells was also observed by immunofluorescence (data not shown). We repeated the experiment on whole cell extracts depleted for pre-ribosomal factors Nog1, Ssf1, Rlp24, and Nog2, with G6PDH used as a loading control (Fig. 6*A*).

In the absence of factors involved in the early steps of the 60 S subunit maturation (*e.g.* Ssf1, Rlp24, Nog1), Nsa2-TAP vanished from the yeast cell extracts. Conversely, in the absence of the later acting factor, Nog2, Nsa2 was still present and even tended to accumulate.

This experiment was reproduced, detecting the wild type form of Nsa2 in strains in which various known pre-60 S factors were repressed. Nsa2 levels decreased when upstream factors such as Ebp2, Mak11, Rlp24, Pop3, or Nog1 were depleted but not when downstream factors such as Nog2 or Lsg1 were depleted (data not shown).

To exclude possible effects of the long-term glucose shift, we also looked for Nsa2 in the *nog1-3* and *nog1-5* strains, grown for 2 h at 25 or 37 °C (Fig. 6*B*). Nsa2 levels were lower in extracts from the *nog1-3* thermosensitive strain at restrictive temperature than at permissive temperature. In the *nog1-5* slow growing strain, Nsa2 levels were affected at both temperatures. As a control, no change was observed in Nsa2 levels in the wild type

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

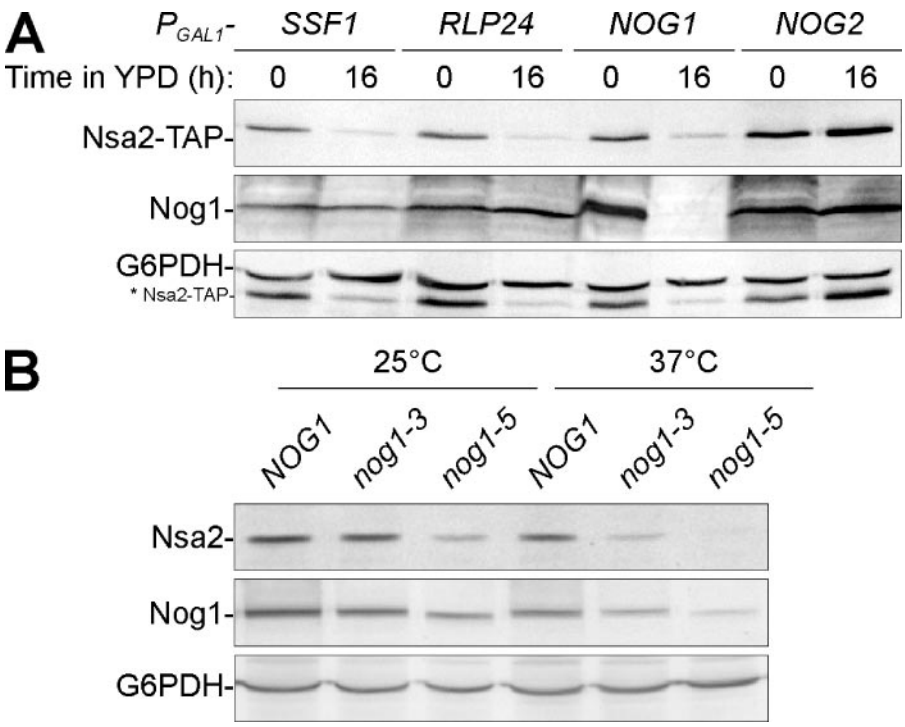


FIGURE 6. **Nsa2 is destabilized when ribosome biogenesis is blocked.** *A*, Nsa2 level decreases in cells depleted of upstream factors in the biogenesis of the large ribosomal subunit. The presence of Nsa2-TAP was assessed by Western blot on total extracts from strains expressing *SSF1*, *RLP24*, *NOG1*, or *NOG2* under the control of the P_{GAL1} promoter grown for 16 h in YPGal (yeast extract-peptone-galactose) or YPD liquid medium. As loading controls, Nog1 and G6PDH were detected with specific antibodies. The signal from Nsa2-TAP was still detectable on this blot, as indicated by an *asterisk*. *B*, Nsa2 is destabilized in *nog1ts* strains. The presence of Nsa2 or Nog1 was assessed by Western blot in wild type, *nog1-3*, or *nog1-5* strains grown for 2 h at 25 or 37 °C in YPD liquid medium. As a loading control, G6PDH were detected with specific antibodies.

strain, whatever the temperature. Hence, the above results are independent of the nature of the mutants used. Note that Nog1 was also hardly detectible with specific antibodies in the mutants, indicating that the selected mutations probably destabilize the protein at elevated temperature.

We wondered whether the observed loss of Nsa2 was because of effects at the protein or mRNA levels. In a Northern blot analysis of the strains tested above, we observed no change in the levels of *NSA2* mRNA when ribosome biogenesis was blocked (data not shown). This suggested that the Nsa2 protein itself, and not its mRNA, was destabilized.

Altogether, these results indicate that not only Nog1 is necessary for the presence of Nsa2 in pre-60 S particles, but also, when ribosome biogenesis is blocked upstream of Nsa2, this factor is no longer present in yeast cells. An efficient ribosome biogenesis upstream of the ITS2 cleavage thus seems necessary for adequate recruitment of Nsa2 to the particle, and whenever this pathway is impaired, Nsa2 is degraded. This phenomenon specifically affects Nsa2, because when either *SSF1* or *RLP24* are repressed, Nog1 can no longer anchor to pre-60 S particles (Ref. 13 and data not shown), but it is still present in equivalent amounts in the cells (Fig. 6*A*).

Nsa2 Is a Short-lived Factor—The disappearance of Nsa2 when ribosome biogenesis was blocked led us to study the stability of this protein independently of ribosomal biogenesis defects. Hence, we compared the clearance of Nsa2 after a transcriptional shut-off compared with that of other pre-60 S factors.

First, we compared the growth in liquid, glucose-containing medium for various strains in which a pre-60 S gene was under control of the P_{GAL1} promoter (Fig. 7*A*). After a shift to glucose, the P_{GAL1}-*NSA2* strain stopped growing earlier than strains depleted from other pre-60 S factors (*i.e.* Nog1, Nog2, or the very stable factor, Npa1). This is consistent with Nsa2 being a short half-lived, essential factor compared with other pre-60 S factors.

The clearance of Nsa2-TAP was followed for 16 h in a P_{GAL1}-*NSA2-TAP* strain shifted to YPD medium and compared with that of Nog1-TAP in a P_{GAL1}-*NOG1-TAP* strain. We observed a rapid clearance of Nsa2-TAP compared with that of Nog1-TAP (Fig. 7*B*). This was not due to a difference in the stability at the mRNA level, because both *NSA2-TAP* and *NOG1-TAP* mRNAs disappeared within minutes when the strains were shifted to glucose (Fig. 7*C*), whereas the proteins could still be detected for hours. The experiment was reproduced in P_{GAL1}-*NOG1* or P_{GAL1}-*NSA2* strains by detecting both proteins with specific antibodies (data not shown). The clearance profiles looked very similar under these conditions, which suggests that the observed difference between Nog1 and Nsa2 was not due to the presence of the TAP tag. We conclude that Nsa2 is naturally less stable than Nog1. A rapid degradation process could regulate levels of this factor in yeast, in correlation with the activity of ribosome biogenesis.

DISCUSSION

Nsa2 Is an Unstable Pre-60 S Factor—In this work, we describe Nsa2 as a pre-ribosomal factor required for adequate processing of the ITS2, which separates 25 S and 5.8 S rRNA. A number of pre-60 S factors, such as Nog1 or Rlp24, are necessary for this step of maturation. The key feature concerning Nsa2 is that its presence in cells appears to depend on the efficiency of ribosome biogenesis. Indeed, in mutants where the biogenesis of the large ribosomal subunit was blocked upstream of Nsa2, this protein was not detected in whole cell extracts (Fig. 6), whereas mRNA expression was not affected. This effect is not due to a destabilization of pre-60 S complexes, because they can still be purified in such mutants. Nsa2 is thus a good candidate for the coordination of regulation events affecting 60 S biogenesis at a rate-limiting step of the ITS2 processing.

Our data suggest that Nsa2 might play a part in the quality control of pre-60 S particles. Under normal, rapid growth conditions, high levels of Nsa2 would allow the progression of pre-60 S particles through the ITS2 processing; these particles would then give birth to wild type amounts of large ribosomal

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

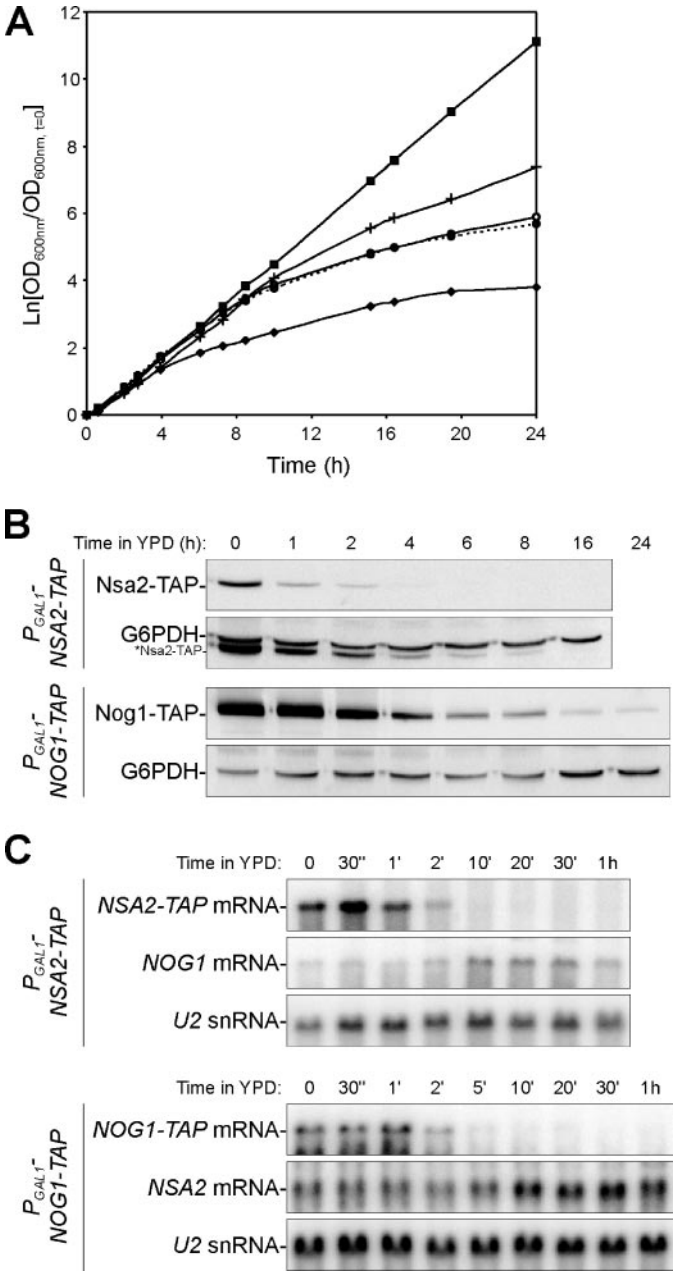


FIGURE 7. **Nsa2 is a short-lived pre-ribosomal factor.** *A*, strains in which *NSA2* was repressed stop growing within a few hours. Various strains in which a pre-60 S gene was under control of a P_{GAL1} promoter, as well as a wild type strain, were grown in glucose-containing medium for 24 h. The absorbance (optical density) at 600 nm ($OD_{600\ nm}$) was measured, normalized to the value at time 0, and drawn as the logarithmic coordinates relative to time. Strains: ■, wild type; +, P_{GAL1}-*NPA1*; ○, P_{GAL1}-*NOG1*; ●, P_{GAL1}-*NOG2*; ♦, P_{GAL1}-*NSA2*. *B*, the clearance of Nsa2-TAP is shorter than that of Nog1-TAP. The presence of Nsa2-TAP or Nog1-TAP in total extracts from P_{GAL1}-*NSA2-TAP* or P_{GAL1}-*NOG1-TAP* strains was assessed over a 16–24-h repression time course by Western blot. As a loading control, G6PDH was detected with specific antibodies. Nsa2-TAP corresponds to the detection of protein A from the TAP tag upon hybridization with G6PDH. The apparent increase of the signal in later fractions is an artifact of the successive hybridization with peroxidase-anti-peroxidase complex and G6PDH, which we consistently found to increase weaker signals relative to stronger ones and thus to equalize the observed levels. *C*, the difference observed between the clearances of Nsa2-TAP and Nog1-TAP is not due to the stability of the mRNAs. The presence of *NSA2-TAP* and *NOG1-TAP* mRNAs in total extracts from P_{GAL1}-*NSA2-TAP* and P_{GAL1}-*NOG1-TAP* strains was assessed over a 1-h repression time course by Northern blot. As loading controls, *NOG1* and *NSA2* mRNAs were detected.

subunits in the cytoplasm. When pre-60 S maturation is impaired upstream of Nsa2, a direct or indirect signal could account for a drop of Nsa2 levels. One interesting hypothesis would be that the absence of Nsa2 could block the ITS2 cleavage step, consequently preventing abnormal pre-60 S particles from being exported toward the cytoplasm. This hypothesis could explain why the absence of many pre-60 S factors results in defects in the ITS2 processing; some of these phenotypes might be an indirect consequence of the absence of upstream pre-60 S factors on Nsa2 cellular levels. It is also possible that Nsa2, as its human homologue, is involved in more physiological regulations in response to extracellular signals.

The low stability of Nsa2 in mutant conditions correlates with a short half-life of this protein in wild type cells (Fig. 7) compared with other pre-60 S factors. To date, we do not know whether this rapid turnover is inherent to the protein or involves specific degradation mechanisms. One interesting hint for this question is that the homologue of Nsa2 in *Caenorhabditis elegans* (Q9XTD3) interacts in two-hybrid with the Rpn10 subunit of the proteasome (20). Hence, when pre-60 S biogenesis is impaired, Nsa2 might be targeted to the proteasome degradation pathway.

Nsa2 Is Highly Conserved in the Eukaryotic Kingdom—Nsa2 is one of the most conserved proteins between *S. cerevisiae* and humans (15). Additionally, homologues of this protein can be found in all eukaryotic organisms sequenced thus far (Fig. 2*A*), with a high degree of similarity. We showed that expression of the human orthologue of the gene *TINP1* was able to restore growth in a strain in which Nsa2 was depleted (Fig. 2*B*). This indicates that not only the sequence but also the function of the protein was conserved during its evolution.

In higher eukaryotes, Nsa2 homologues seem to be tightly regulated. Indeed, *TINP1* stands for TGFβ-inducible Nuclear Protein 1 as its mRNA production was induced in response to stimulation with transforming growth factor β.[4] These features designate TinP1, like Nsa2 in yeast, as a good target for regulation, possibly as a limiting factor for ribosome biogenesis.

In addition to these expression features, *TINP1* is located in the human genome in the 5q13.3 region, which is compromised in patients with hairy cell leukemia (21). These authors suggest that *TINP1*, together with two other noncharacterized genes found in this region, constitute a candidate tumor suppressor gene (21). Moreover, recent evidence suggests that high levels of transforming growth factor-β are secreted by hairy cells and favor the progression of the pathology (22). An appealing hypothesis would therefore be that deregulation of *TINP1* expression could participate in the progression of the disease either because of chromosomal abnormalities or because of stimulation by transforming growth factor-β. The data provided here indicate that expression of *NSA2*, and possibly *TINP1*, is required for production of ribosomes and, consequently, for cell proliferation. A pathological overexpression of this normally tightly regulated gene might favor tumor progression.

Location of Nsa2 on Pre-60 S Particles—In the present work, we have shown that Nog1 binds to pre-60 S particles prior to Nsa2. Although we could not detect any *in vitro* interaction between the

[4] J. S. Zhang and D. I. Smith, as annotated in the NCBI data base.

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

two recombinant proteins expressed in *E. coli*, two-hybrid data suggest that Nog1 and Nsa2 interact. Even if this interaction was indirect, it would still indicate that the two proteins are positioned relatively close to each other on complexes (Fig. 1*B*). The first 160 amino acids of Nog1, which interact strongly with Nsa2 in two-hybrid assays, are more conserved between yeast and higher eukaryotes than the C-terminal part of the protein. It suggests that the N-terminal domain has undergone a higher selective pressure, possibly for the conservation of the interaction with Nsa2. Thus far, we could not determine whether the observed physical interaction was direct or needed the whole structure of pre-60 S particles to occur. If it occurred physiologically, a direct interaction between Nog1 and Nsa2 might require a specific conformation, which could be achieved within pre-60 S complexes but not when the proteins are free in solution.

An additional hint for the possible position of Nsa2 on pre-60 S complexes was provided by two-hybrid experiments. In a genomic two-hybrid screen performed with Nsa2 as bait, we found three distinct ribosomal proteins as preys: Rpl4, Rpl15, and Rpl18.[5] Interestingly, when looking at the position of the prokaryotic homologues in the structure of the mature large ribosomal subunit, all three proteins are grouped on the right shoulder, on the external side of the subunit. These data suggest that Nsa2 might anchor to the precursors of the large subunit in the vicinity of this site.

Conclusion—We have characterized Nsa2 as a pre-60 S factor required for the processing of the 27 SB pre-rRNAs. This physical and functional partner of Nog1 turns out to be an unstable factor, regulated in coordination with the activity of ribosome biogenesis. Together with its strong conservation during its evolution, these features make Nsa2 and its homologues interesting candidates for the understanding of how cell proliferation is coordinated to the biosynthesis of cellular components.

Acknowledgments—We thank Dr. J. L. Woolford, Dr. F. Fasiolo, and Prof. F. Lacroute for providing antibodies against Nop7, Tif6, and Rpl1, respectively, and C. Vanderbergh for help with production of antibodies against Nsa2. We are grateful to Prof. F. Lacroute, Dr. B. Seraphin, and Dr. Edouard Bertrand, who gave us the genomic bank in pFL44L for high-copy-number suppressor screens, the pBS1479 vector, and the two-hybrid Gateway plasmids, respectively. We thank Dr. J.-C. Rain (Hybrigenics) for performing the yeast two-hybrid screen with Nsa2 as a bait. The SC0935 strain was obtained from Euroscarf and was constructed by CellZome AG.

REFERENCES

1. Warner, J. R. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24,** 437–440
2. Dundr, M., and Misteli, T. (2001) *Biochem. J.* **356,** 297–310
3. Venema, J., and Tollervey, D. (1999) *Annu. Rev. Genet.* **33,** 261–311
4. Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003) *Gene* **313,** 17–42
5. Tschochner, H., and Hurt, E. (2003) *Trends Cell Biol.* **13,** 255–263
6. Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G. (2002) *Nature* **415,** 141–147
7. Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002) *EMBO J.* **21,** 5539–5547
8. Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeys, D., and Tyers, M. (2002) *Nature* **415,** 180–183
9. Krogan, N. J., Peng, W. T., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Lalev, A., Zhang, W., Davierwala, A. P., Mnaimneh, S., Starostine, A., Tikuisis, A. P., Grigull, J., Datta, N., Bray, J. E., Hughes, T. R., Emili, A., and Greenblatt, J. F. (2004) *Mol. Cell* **13,** 225–239
10. Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001) *Mol. Cell* **8,** 517–529
11. Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P. E., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2001) *EMBO J.* **20,** 6475–6484
12. Kallstrom, G., Hedges, J., and Johnson, A. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23,** 4344–4355
13. Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P. E., Lebreton, A., Rousselle, J. C., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23,** 4449–4460
14. Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Woolford, J. L., Jr. (2001) *Mol. Cell* **8,** 505–515
15. Stanchi, F., Bertocco, E., Toppo, S., Dioguardi, R., Simionati, B., Cannata, N., Zimbello, R., Lanfranchi, G., and Valle, G. (2001) *Yeast* **18,** 69–80
16. Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21,** 3329–3330
17. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) *Yeast* **14,** 115–132
18. Muhlrad, D., Hunter, R., and Parker, R. (1992) *Yeast* **8,** 79–82
19. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999) *Nat. Biotechnol.* **17,** 1030–1032
20. Davy, A., Bello, P., Thierry-Mieg, N., Vaglio, P., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Thierry-Mieg, D., Reboul, J., Boulton, S., Walhout, A. J., Coux, O., and Vidal, M. (2001) *EMBO Rep.* **2,** 821–828
21. Wu, X., Ivanova, G., Merup, M., Jansson, M., Stellan, B., Grander, D., Zabarovsky, E., Gahrton, G., and Einhorn, S. (1999) *Genomics* **60,** 161–171
22. Shehata, M., Schwarzmeier, J. D., Hilgarth, M., Hubmann, R., Duechler, M., and Gisslinger, H. (2004) *J. Clin. Invest.* **113,** 676–685
23. Baudin-Baillieu, A., Guillemet, E., Cullin, C., and Lacroute, F. (1997) *Yeast* **13,** 353–356

[5] J. C. Rain and M. Fromont-Racine, unpublished results.

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on September 15, 2006

3. Un réseau fonctionnel impliqué dans le recyclage des facteurs pré-60S nucléo-cytoplasmiques — *A functional network involved in the recycling of nucleo-cytoplasmic pre-60S factors*

THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY

A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors

Alice Lebreton,[1] Cosmin Saveanu,[1] Laurence Decourty,[1] Jean-Christophe Rain,[2] Alain Jacquier,[1] and Micheline Fromont-Racine[1]

[1]Génétique des Interactions Macromoléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique URA2171, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France
[2]Hybrigenics, 75014 Paris, France

Eukaryotic pre-ribosomes go through cytoplasmic maturation steps before entering translation. The nucleocytoplasmic proteins participating in these late stages of maturation are reimported to the nucleus. In this study, we describe a functional network focused on Rei1/Ybr267w, a strictly cytoplasmic pre-60S factor indirectly involved in nuclear 27S pre-ribosomal RNA processing. In the absence of Rei1, the nuclear import of at least three other pre-60S factors is impaired. The accumulation in the cytoplasm of a small complex formed by the association of Arx1 with a novel factor, Alb1/Yjl122w, inhibits the release of the putative anti-association factor Tif6 from the premature large ribosomal subunits and its recycling to the nucleus. We propose a model in which Rei1 is a key factor for the coordinated dissociation and recycling of the last pre-60S factors before newly synthesized large ribosomal subunits enter translation.

Introduction

Ribosome biogenesis is a very conserved process in the eukaryotic kingdom. In *Saccharomyces cerevisiae*, the pathway begins with transcription of the 35S and 5S ribosomal RNA (rRNA) precursors by RNA polymerases I and III, respectively. The association of ribosomal proteins and pre-ribosomal factors with nascent pre-rRNAs gives birth to a 90S pre-ribosomal complex that undergoes various steps of maturation. The 90S complex separates into a pre-60S complex, which will generate the large ribosomal subunit containing mature 25S, 5.8S, and 5S rRNAs, and a pre-40S complex, which will generate the small ribosomal subunit containing 18S rRNA. The maturation of both particles follows two distinct pathways, first in the nucleolus and then in the nucleoplasm, and finally in the cytoplasm after Crm1-dependent export through the nuclear pores (Hurt et al., 1999; Moy and Silver, 1999; for review see Johnson et al., 2002). Several factors are necessary for correct modification, cleavage, and processing of pre-rRNAs, positioning of ribosomal proteins, and export of the pre-60S and pre-40S particles (for review see Fatica and Tollervey, 2002; Fromont-Racine et al., 2003; Tschochner and Hurt, 2003).

Correspondence to Micheline Fromont-Racine: mfromont@pasteur.fr

Abbreviations used in this paper: PAP, peroxidase–antiperoxidase complex; rRNA, ribosomal RNA; TAP, tandem affinity purification; YPD, yeast extract–peptone–D-glucose.

The online version of this article contains supplemental material.

For the large ribosomal subunit, apart from the 46 ribosomal proteins that are found in the mature particle, ~100 pre-ribosomal factors have been identified to date. Except for a few factors with known enzymatic activity, the function of most of the pre-ribosomal factors biochemically associated with pre-60S complexes remains to be defined.

Throughout the pathway of biogenesis, the composition of the pre-60S particles changes. At the beginning of the pathway, they contain many pre-60S factors; these proteins gradually dissociate from the complexes in the nucleolus, the nucleoplasm, or the cytoplasm. Even if other pre-60S factors load later on the complexes, the average number of pre-60S factors is significantly lower at the end of biogenesis than at the beginning (Nissan et al., 2002). The whole process is highly dynamic; as they dissociate from the precursors of the large ribosomal subunits, pre-60S factors can be recycled and participate in new rounds of biogenesis.

In the late cytoplasmic events of 60S biogenesis, only a few pre-ribosomal factors are present on the pre-60S particles (for review see Fromont-Racine et al., 2003; Dez and Tollervey, 2004). Some of these factors are shuttling proteins such as Tif6 (Senger et al., 2001), Rlp24 (Saveanu et al., 2003), Nmd3 (Ho et al., 2000a; Gadal et al., 2001), and Arx1 (Nissan et al., 2002), which are loaded on the pre-60S complexes in the nucleus and undergo export toward the cytoplasm together with the particle. Other factors seem exclusively cytoplasmic, such as the GTPases Lsg1 (Kallstrom et al., 2003) and Efl1 (Senger et al., 2001).

© The Rockefeller University Press $8.00
The Journal of Cell Biology, Vol. 173, No. 3, May 8, 2006 349–360
http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200510080

Existing data reveal that recycling shuttling factors and triggering the end of biogenesis are tightly intertwined events. Indeed, since the beginning of the 1980s, the pre-60S factor Tif6 is thought to act as an antiassociation factor between the small and large subunits (Valenzuela et al., 1982); the GTPase Efl1 triggers the recycling of Tif6 (Senger et al., 2001). Recycling of the Nmd3 shuttling protein also requires the GTPase Lsg1 and the late-associating ribosomal protein Rpl10 (Gadal et al., 2001; Hedges et al., 2005).

The shuttling of pre-60S factors between the cytoplasm and the nucleus involves the general import machinery. Recycling of Nmd3 is mediated by the β-karyopherin Kap123 (Sydorskyy et al., 2003), which also accounts for the import of various ribosomal proteins to the nucleus through the nuclear pore complexes (Rout et al., 1997). At least three β-karyopherins participate in the import of ribosomal proteins and pre-ribosomal factors— Kap123, Kap121/Pse1, and Kap104 (Leslie et al., 2004)—with a significant overlap as far as their specificity for cargoes is concerned.

In this study, we investigate late events in the maturation of the large ribosomal subunit in which a newly described, exclusively cytoplasmic pre-60S factor, Rei1/Ybr267w, plays a central role. Our results indicate that coordinated dissociation and return to the nucleus of shuttling pre-60S factors are essential for correct maturation of the large ribosomal subunits and participate in their activation for subsequent entry into translation.

Results

Rei1 is physically linked to Rpl24

Most ribosomal proteins of the large subunit are loaded on 60S pre-ribosomal particles in the early nuclear steps of 60S biogenesis. However, a few proteins, such as Rpl10 and Rpl24, appear to associate later to the pre-60S particles (Kruiswijk et al., 1978). Rpl24 is a late-associating ribosomal protein that shares significant homology with the essential pre-ribosomal factor Rlp24 (Saveanu et al., 2003). Rlp24 is present on pre-60S particles from the nucleolus to the cytoplasm, where it is believed to dissociate when Rpl24 associates with the particle.

To identify potential partners required for the loading of Rpl24 to the particles, a two-hybrid screen using Rpl24b as bait was performed. The most frequent prey selected in the screen was *REI1/YBR267W*, which is found as seven distinct inserts. All of the inserts containing the *REI1* ORF shared a minimal interacting domain from amino acids 270 to 342 (Fig. 1 A).

Rei1 is a 393–amino acid–long protein that contains three conserved C_2H_2 Zn finger motifs extending from amino acids 7 to 31, 162 to 187, and 215 to 239. The domain extending from amino acids 57 to 202 displays similarity with the PFAM E-MAP-115 domain characteristic of ensconsin, a microtubule-associated protein expressed in higher eukaryotes (Masson and Kreis, 1993). The minimal two-hybrid interaction domain between Rei1 and Rpl24b is located in the COOH-terminal part of the protein apart from all of these motifs. This region is quite conserved in Rei1 homologues among eukaryotes, mainly in the portion extending from amino acids 300 to 330 (unpublished data).

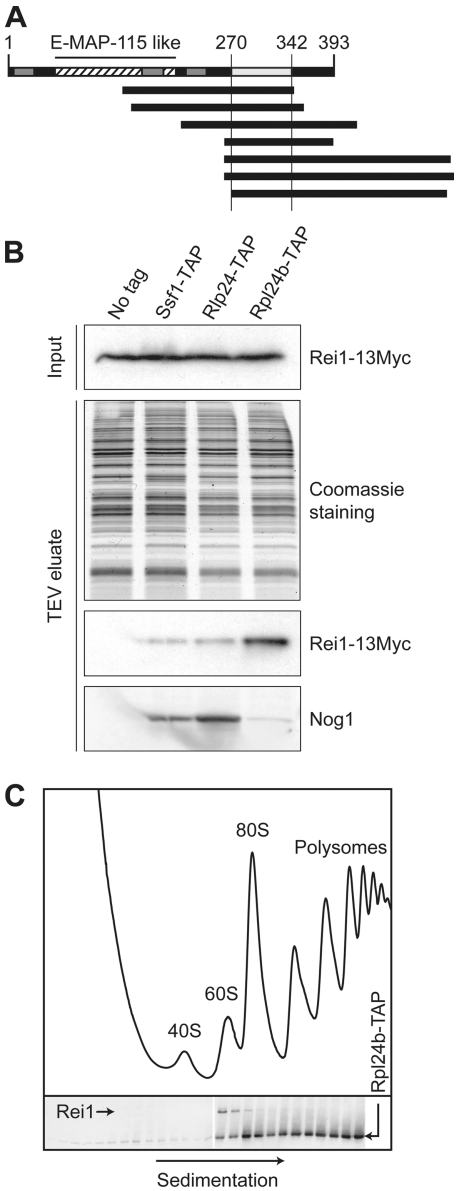


Figure 1. **Rei1 is physically associated with nontranslating, Rpl24-containing complexes.** (A) Rei1 is a two-hybrid prey of Rpl24b. *YBR267W* (*REI1*) was found as prey ORF in a genomic two-hybrid screen performed with *RPL24B* as bait. We represented the 393–amino acid–long protein and pointed out its putative motifs: three conserved C_2H_2 Zn fingers (dark gray) and the PFAM E-MAP-115 motif (stripes). Underneath, displayed as black rectangles, are the seven distinct DNA portions of *REI1* that were found as preys. The minimal interacting domain is indicated in light gray. (B) Rei1-myc copurifies specifically with Rpl24b-TAP. TAPs were performed with strains expressing Rei1-13Myc together with Ssf1-TAP, Rlp24-TAP, Rpl24-TAP, or in a nontagged strain. The components of the purified complexes were separated by SDS-PAGE as shown on the Coomassie staining of the TEV eluate. Rei1-13Myc and Nog1 were detected in the TEV eluates by immunoblotting. As a loading control, Rei1-13Myc was detected in the input fractions (top). (C) Rei1 is associated with 60S particles. Whole cell extracts were prepared from a strain expressing Rpl24b-TAP and separated on a sucrose gradient by ultracentrifugation. Absorbance at 254 nm was measured, and 0.5-ml fractions of the gradient were collected. Peaks corresponding to the 40S, 60S, and 80S particles or to the polysomes are indicated. The proteins of each fraction were TCA precipitated and analyzed by Western blotting with antibodies directed against Rei1 or with PAP for the detection of the TAP fusion protein.

Rei1 is associated with Rpl24-containing 60S complexes but is absent from the polysomes

The two-hybrid link between Rei1 and Rpl24 suggested that Rei1 might participate in molecular events involving the large ribosomal subunit together with the late-associating ribosomal protein Rpl24. This hypothesis was supported by previous tandem affinity purifications (TAPs), which had revealed the presence of Rei1 in several pre-60S complexes (Gavin et al., 2002; Nissan et al., 2002). The clustering of these TAP data (for review see Fromont-Racine et al., 2003) had already shed light on Rei1 as a putative late pre-60S factor. Therefore, we further investigated the possible role of Rei1 in the cytoplasmic events of 60S biogenesis.

In addition to its cytoplasmic localization (Iwase and Toh-e, 2004), the interaction of Rei1 with Rpl24 prompted us to determine whether this factor was associated with ribosomal or pre-ribosomal complexes in the cytoplasm. We performed TAP experiments on strains producing a Rei1 protein fused to a 13Myc epitope and either Rlp24 or Rpl24b fused to the TAP tag. Rei1-13Myc was enriched in the Rpl24b-TAP–associated complexes compared with the Rlp24-TAP–associated complexes or to the strictly nuclear Ssf1-TAP–associated complexes used as negative controls (Fig. 1 B). In contrast, the presence of Nog1 was observed, as expected, in both Ssf1-TAP– and Rlp24-TAP–associated pre-ribosomal complexes but not in the Rpl24b-TAP–associated complex. These data suggest that Rei1 is specifically associated with Rpl24-containing cytoplasmic complexes.

To analyze a potential association of Rei1 with mature translating ribosomes, total cellular extracts from cells producing Rpl24b-TAP were fractionated on a sucrose gradient. As expected, Rpl24b-TAP was found in fractions corresponding to the 60S, 80S, and polysomes. We observed that Rei1 was absent from the 80S and polysomal fractions but present in the 60S fraction (Fig. 1 C), indicating that in contrast to Rpl24, Rei1 is not associated with mature ribosomes during translation. Exclusive association with 60S particles supported the hypothesis that Rei1 is a late pre-60S factor that transiently binds to pre-ribosomal complexes in the cytoplasm after the release of Rlp24 from the particles.

Rei1 is a late cytoplasmic 60S pre-ribosomal factor

The presence of Rei1 in the 60S fractions of a sucrose gradient and not in polysome fractions suggested that it might participate in the late events of the large subunit biogenesis or be involved in the very early steps of translation initiation.

To determine whether Rei1 could be involved in ribosome biogenesis or in translation, the *rei1Δ* strain and the corresponding wild-type strain were used for sucrose gradient analysis. The *rei1Δ* strain displayed a slow growth phenotype at 30°C and was cold sensitive as previously observed in another genetic background (Iwase and Toh-e, 2004). In the *rei1Δ* strain, the polysome profile was clearly affected. At 30°C, the amount of 60S subunit decreased significantly (unpublished data). At 23°C, not only a decrease of the 60S subunit amount was observed, but also a drop in the average level of polysomes and the appearance of half-mers, which can be explained by abortive 48S preinitiation complexes being formed but remaining complexes being blocked on mRNA because of a lack of mature large ribosomal subunits (Fig. 2 A).

The clearly affected polysome profiles in the *rei1Δ* strain correlated with a defect in rRNA maturation (Fig. 2, C and D). Ethidium bromide staining of agarose gels, Northern blots, and primer extensions were performed to determine the relative levels of various rRNA intermediates and mature species. The rRNA defect was already significant at 30°C (unpublished data) but increased at 23°C. At this temperature, we observed a drop in the levels of total 27S species, $27SA_2$ and 7S nuclear pre-rRNAs, as well as mature 5.8S rRNA normalized relatively to U2 small nuclear RNA levels. The $27SB/27SA_2$ pre-rRNA ratio was increased by 3.1 ± 0.4, and the 27SB/7S ratio was increased by 4.7 ± 0.5. Altogether, these data are typical of a defect in the ITS2 processing step (Fig. 2 B). They are in correlation with the drastic decrease in the 60S peak on sucrose gradients, which results in a stoichiometric imbalance between the small/large ribosomal subunit (Fig. 2 A).

Curiously, although Rei1 appears to be a cytoplasmic protein, its absence displayed rRNA maturation defects at the nuclear level. To investigate whether Rei1 might be a shuttling factor, we monitored Rei1-GFP localization in a strain defective for the export of pre-60S particles (Fig. 2 E). We used a strain in which a version of the *nmd3Δ100* dominant-negative mutant was overexpressed compared with the same strain overexpressing a wild-type *NMD3* version (Ho et al., 2000b). As a control, we monitored the localization of the ribosomal protein Rpl25-GFP. As expected, Rpl25-GFP, which is normally mainly cytoplasmic, was accumulated in the nucleus when *nmd3Δ100* was overexpressed. In contrast, no accumulation was seen for Rei1-GFP, which appears to be an exclusively cytoplasmic pre-60S factor.

We additionally tested the shuttling ability of pre-ribosomal factor Rlp24-TAP and of ribosomal protein Rpl24b-TAP (Fig. 2 E). In the *nmd3Δ100* dominant-negative mutant, Rlp24-TAP accumulated in the yeast nuclei compared with wild-type conditions. Meanwhile, Rpl24b-TAP remained exclusively cytoplasmic. This confirmed previous data (Saveanu et al., 2003) in favor of Rlp24 being a shuttling nucleocytoplasmic pre-60S factor, whereas Rpl24 appears to be a ribosomal protein that associates with pre-60S particles in the very last cytoplasmic steps of ribosome biogenesis.

As a late pre-60S factor, Rei1 was a candidate for participating in the export of pre-60S particles from the nucleus to the cytoplasm. Therefore, we monitored the localization of an Rpl25-GFP reporter construct in a *rei1Δ* strain. Because no export defect was observed (unpublished data), we assume that Rei1 is not required for the export of precursors of the large ribosomal subunit.

Altogether, these results are consistent with Rei1 being involved in the large ribosomal subunit biogenesis. Though it is a cytoplasmic nonshuttling protein, its absence results in defects in nuclear steps of the 60S maturation, suggesting that

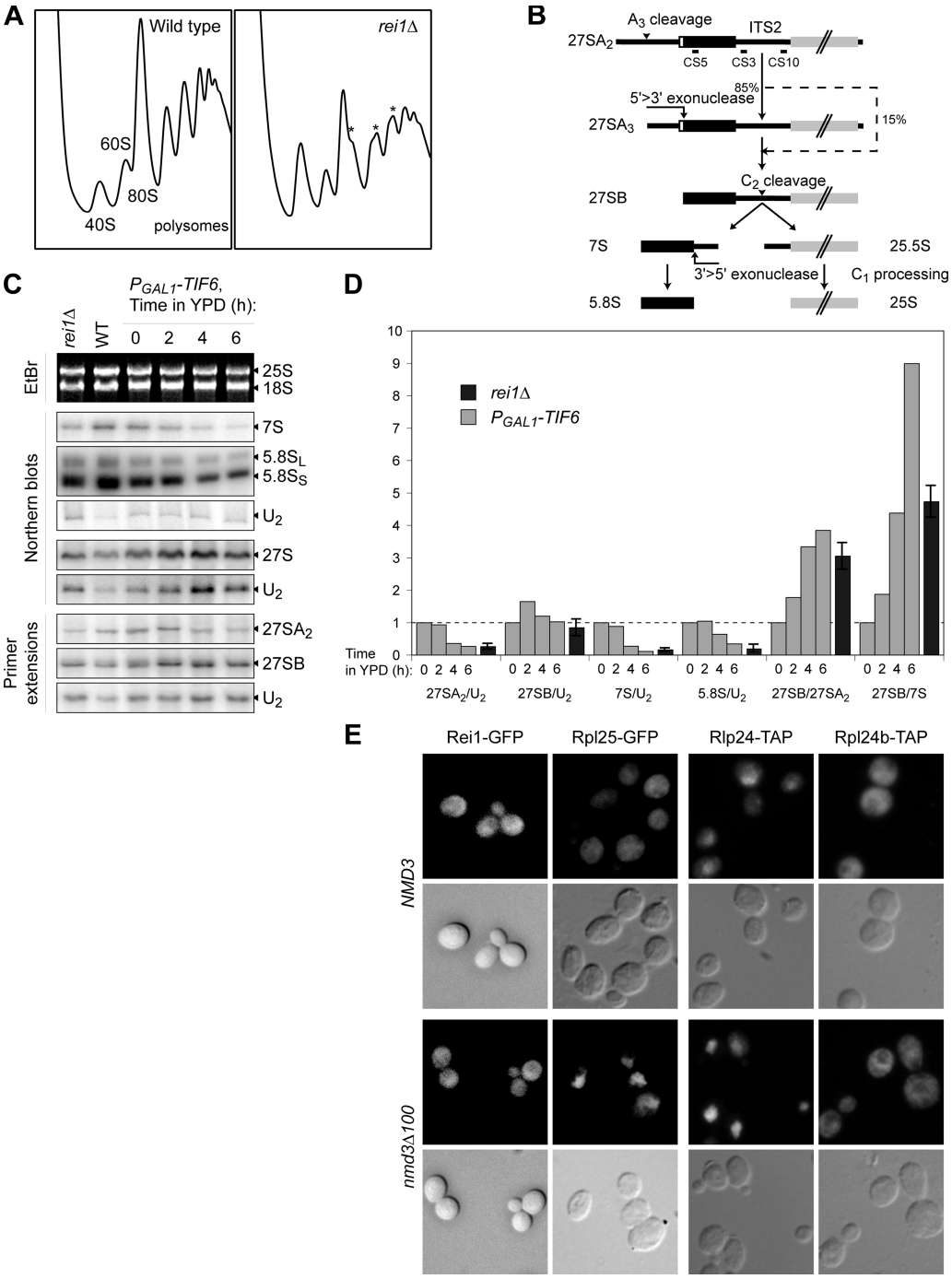


Figure 2. **Absence of Rei1 affects the 60S maturation.** (A) The *rei1Δ* strain displays an altered polysome profile. The disrupted strain and wild-type strain were grown for 16 h at 23°C in yeast extract–peptone–D-glucose (YPD). Whole cell extracts were separated on sucrose gradients as described in Fig. 1 C. In the *rei1Δ* strain (right), the position of half-mers is highlighted by asterisks. (B) Schematic representation of the maturation of the large subunit rRNA from $27SA_2$ to 5.8S and 25S. The positions of the oligonucleotide probes used in this study are indicated. (C) Effects of *rei1Δ* on pre-rRNA processing are similar to those of a *TIF6* repression. Total RNAs were extracted from a *rei1Δ* or wild-type strain grown for 16 h at 23°C in YPD or from a P_{GAL1}-*TIF6* strain shifted to YPD from 0 to 6 h. 25S and 18S rRNAs were detected by ethidium bromide staining. $27SA_2$ and 27SB pre-rRNAs were detected by primer extension with probe CS10 (see Fig. 2 B). 7S pre-rRNA, 5.8S rRNA, and total 27S species were detected by Northern blotting with the CS3, CS5, and CS10 probes, respectively. (D) The absence of Rei1 or Tif6 correlates with a defect in the $C_1 + C_2$ rRNA processing step. Ratios were calculated either between two mature rRNA or pre-rRNA detected in the same samples on the same gel or after normalization with a control RNA (U2 small nuclear RNA) detected with oligonucleotide MFR457. RNA levels in the *rei1Δ* strain were standardized to the wild-type levels, indicated as a dotted line; for the *TIF6* repression, the levels were indicated relative to those at time = 0. For *rei1Δ*, the calculation was performed on four distinct experiments; error bars represent SD. (E) Rei1 is not a shuttling factor. Strains producing Rei1-GFP, Rpl25-GFP, Rlp24-TAP, or Rpl24b-TAP were transformed with plasmids pAJ544 and pAJ368 overexpressing wild-type *NMD3* or the dominant-negative *nmd3Δ100* allele, respectively. The TAP fusion proteins were revealed by immunocytochemistry, and all samples were observed by epifluorescence microscopy.

Rei1 could be required for the recycling of shuttling pre-60S factors from the cytoplasm to the nucleus.

The absence of Rei1 affects nuclear import of the shuttling factors Arx1 and Tif6

Considering the previous hypothesis, we investigated the possible role for Rei1 in the recycling of shuttling pre-60S factors such as Tif6 (Senger et al., 2001), Rlp24 (Saveanu et al., 2003), and Arx1 (Nissan et al., 2002).

We looked at the localization at 23°C of the Arx1-GFP, Tif6-GFP, or Rlp24-TAP fusion proteins in a *rei1Δ* strain compared with a wild-type strain (Fig. 3 A). In the wild-type strains, Arx1-GFP and Tif6-GFP were mainly observed in the nucleus, and a small fraction of the proteins was found in the cytoplasm. In the absence of Rei1, Arx1-GFP or Tif6-GFP were mainly cytoplasmic. This confirmed our hypothesis that nuclear import of some shuttling factors could be impaired in the absence of Rei1. In contrast, no recycling defect was observed for Rlp24-TAP, which even appeared somewhat concentrated in the nucleolus of the *rei1Δ* strain compared with the wild-type strain, where it appeared more equally distributed between the nucleolus, nucleoplasm, and cytoplasm.

These data offer a simple explanation for the nuclear rRNA maturation defect observed in the *rei1Δ* strain. Indeed, the absence of Rei1 affects the processing of ITS2 in a manner similar to the repression of Tif6 (Basu et al., 2001). To better illustrate this, a strain in which *TIF6* was placed under the control of a P_{GAL1} promoter was shifted to glucose from 0 to 6 h, and pre-rRNA species were analyzed and quantified along these kinetics (Fig. 2, C and D). The rRNA intermediates ratio of the *rei1Δ* strain to the wild type were comparable with the effects of a *TIF6* repression for 4–6 h.

We also tested the phenotype of an *ARX1* deletion, but no obvious rRNA maturation impairment was detected (unpublished data). Therefore, the 60S maturation defects observed in the *rei1Δ* strain are likely caused by a decrease of nuclear Tif6. We tested whether the overexpression of *TIF6* could compensate this phenotype, but *TIF6* overexpression appeared to be toxic in wild-type as well as in *rei1Δ* strains (Fig. S1, available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200510080/DC1).

As Arx1-GFP and Tif6-GFP accumulated in the cytoplasm in the absence of Rei1, we wondered whether they were still associated with pre-60S complexes. To address this question, we separated extracts from a *rei1Δ* or wild-type strain expressing chromosomal *ARX1-GFP* or *TIF6-GFP* on sucrose gradients (Fig. 3 B). In the wild-type strain, we could detect Arx1-GFP in the 60S fractions of the gradient. In the absence of Rei1, Arx1 appeared to sediment closer to the top of the gradient, which suggested that in such conditions, Arx1-GFP was

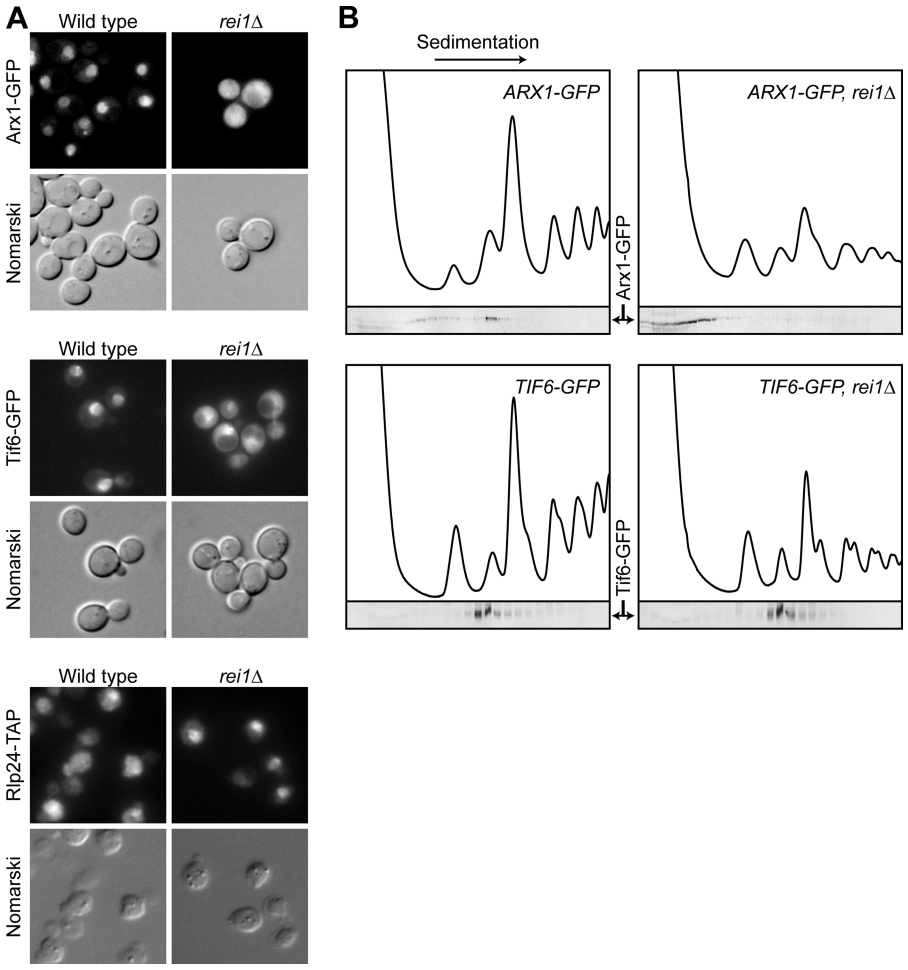


Figure 3. **Rei1 is functionally linked to the shuttling factors Arx1 and Tif6.** (A) In the absence of Rei1, Arx1 and Tif6 are redistributed to the cytoplasm. The localization of Arx1-GFP, Tif6-GFP, or Rlp24-TAP was observed after the growth of *rei1Δ* or wild-type strains for 8 h in minimal medium at 23°C. (B) Rei1 is required for the binding of Arx1 to pre-60S complexes. *rei1Δ* or wild-type strains expressing *ARX1-GFP* or *TIF6-GFP* were grown for 8 h at 23°C, and whole cell extracts were prepared. The extracts were separated on sucrose gradients and analyzed as described in Fig. 1 C. The immunoblots, which were performed using antibodies against GFP, are displayed below the corresponding profile.

present in the cytoplasm as a small complex or as an oligomeric protein. In contrast, in the absence of Rei1, the Tif6-GFP fusion protein was still associated with particles of the size of 60S. Although the absence of Rei1 leads to a cytoplasmic retention of both shuttling pre-60S factors Tif6 and Arx1, Tif6 is still stably associated with 60S particles, whereas Arx1 accumulates as a small complex in the cytoplasm.

Yjl122w/Alb1 is a novel 60S-associated factor that is tightly linked with Arx1

The presence of Arx1 in a small cytoplasmic complex in the absence of Rei1 suggested the possibility that Arx1 could associate and act together with other proteins. We performed a two-hybrid screen using Arx1 as bait to identify the physical partners of Arx1. The most frequent prey we selected was *YJL122W*, which is hereafter referred to as *ALB1* (A*RX1* little brother 1). This prey was found as seven distinct inserts; all of the inserts shared a minimal interacting domain from amino acids 148 to 175 (Fig. 4 A). The deletion of *ALB1* had little effect on growth and displayed no obvious rRNA maturation impairment. In the *arx1Δ*, *alb1Δ* double mutant, the growth phenotype as well as the polysome profile resembled that of the *arx1Δ* single mutant (Fig. S3, available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.2005010080/DC1).

To confirm the physical interaction between Arx1 and Alb1, we purified the complexes associated with Alb1 (Fig. 4 B). Arx1- and Alb1-TAP–associated complexes look very similar on the Coomassie staining compared with Rei1-TAP. We could detect Arx1 and Rei1 in the three complexes. These results corroborate previous affinity precipitations (Ho et al., 2002; Krogan et al., 2004) where Alb1 had been identified in both Rei1- and Arx1-associated complexes. They not only confirm that Arx1 and Alb1 are physically associated under physiological conditions but also suggest that Alb1 could be a pre-60S–associated factor. Note that Rlp24 was present in Arx1- and Alb1-TAP–associated complexes but was absent from Rei1-TAP complexes, which confirms that Rei1 loads onto the particles after the release of Rlp24. In addition, we observed that Alb1-TAP sedimented around the 60S peak but was absent from the polysomal fractions on a sucrose gradient (Fig. 4 C); therefore, it is likely to associate with precursors of the large ribosomal subunit.

To determine whether any direct interaction could be detected between these factors, we performed in vitro GST pull-down experiments with GST-tagged baits (GST-Alb1, GST-Rei1, or GST) and the His6-Arx1 fusion protein as prey (Fig. 4 D). His6-Arx1 copurified with GST-Alb1 but not with GST or GST-Rei1 used as negative controls. Thus, we conclude that Arx1

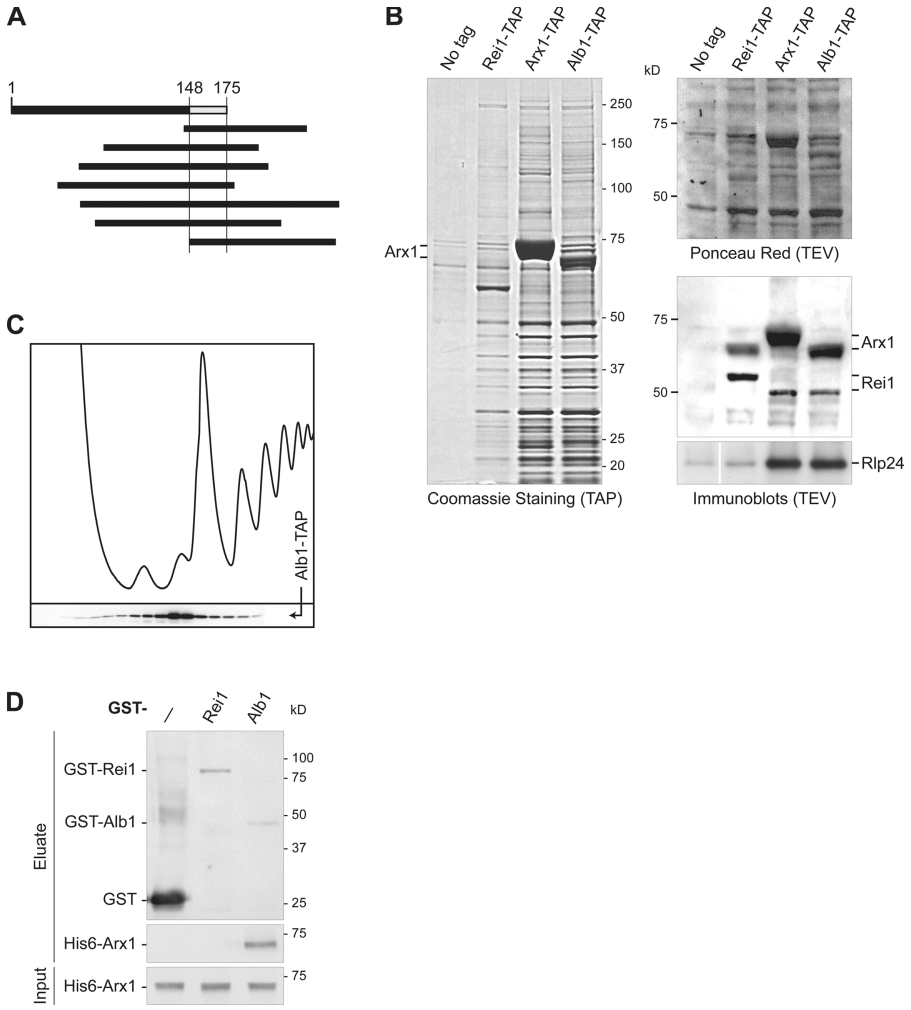


Figure 4. **Yjl122w/Alb1 is a physical partner of Arx1.** (A) Alb1 is a two-hybrid prey of Arx1. *YJL122W* (*ALB1*) was found as prey ORF in a genomic two-hybrid screen performed with *ARX1* as bait. The results are presented as in Fig. 1 A. (B) Rei1, Arx1, and Alb1 are associated with the same complexes. Rei1-, Arx1-, and Alb1-TAP–associated complexes were TAP purified. The Coomassie staining is displayed on the left. The presence of Arx1, Rei1, or Rlp24 in the TEV eluates was assessed by immunoblotting with specific antibodies against each of these proteins, as shown on the right, with the corresponding Ponceau red staining. (C) Alb1-TAP is associated with 60S particles. Whole cell extracts were prepared from a strain expressing Alb1-TAP, separated on a sucrose gradient, and analyzed as described in Fig. 1 C. Alb1-TAP was detected by Western blotting with PAP. (D) Arx1 and Alb1 interact directly in vitro. GST, GST-Rei1, GST-Alb1, and His6-Arx1 fusion proteins were produced in *Escherichia coli* BL21. Crude extracts containing the GST-tagged baits were mixed with equal amounts of crude extracts containing the His6-Arx1 putative prey and were purified on glutathione–Sepharose beads. The input samples as well as the eluted proteins were separated on a 10% polyacrylamide-SDS gel. The bait proteins were detected in the eluted fractions by Western blotting with antibodies against GST (top). His6-Arx1 was detected with antibodies against Arx1 in the fractions where it is co-eluted (middle). As a charge control, His6-Arx1 was also detected in the input (bottom).

and Alb1 are able to interact directly even in the absence of other yeast components.

The absence of Rei1 affects nuclear import of Alb1 and its binding to pre-60S particles

Because the nuclear import of Arx1 was affected in the absence of Rei1, we wondered whether Alb1 participated with Arx1 in the small cytoplasmic complex detected in these conditions. Therefore, we assessed the effects of the absence of Rei1 on Alb1 localization and association with 60S particles.

First, we tested whether Alb1 was an additional shuttling factor by monitoring the localization of an Alb1-GFP reporter construct in a wild-type or *rei1Δ* strain at 23°C (Fig. 5 A). In the wild-type strain, Alb1-GFP localization was similar to that of Arx1-GFP, with a strong nuclear–nucleolar signal and a weak cytoplasmic signal. In the *rei1Δ* mutant, Alb1 was relocalized to the cytoplasm, as was the case for Arx1.

Second, in a sucrose gradient analysis (Fig. 5 B), Alb1-GFP could be detected in the 60S fractions in the wild-type strain together with Arx1, whereas in the *rei1Δ* strain, it was found mainly in the same fractions as Arx1 at the top of the gradient. Thus, the association of Alb1 to nuclear pre-60S particles was impaired, as it was for Arx1, in a *rei1Δ* strain.

We tried to further characterize the small complex observed in the absence of Rei1 by purifying the Arx1- and Alb1-TAP–associated complexes in these conditions (Fig. 5 C). The Coomassie staining showed a weak decrease of the levels of most proteins in the *rei1Δ* strain compared with the wild-type profiles, except for Arx1. In the absence of Rei1, immunoblots performed on the purified fractions revealed a loss of the pre-ribosomal factors Nog1 and Tif6. These results suggest that Arx1 and Alb1 can form cytoplasmic subcomplexes in the absence of Rei1 independently from pre-ribosomal particles.

To confirm these results, purified complexes associated with Alb1-TAP were separated on a sucrose gradient in the

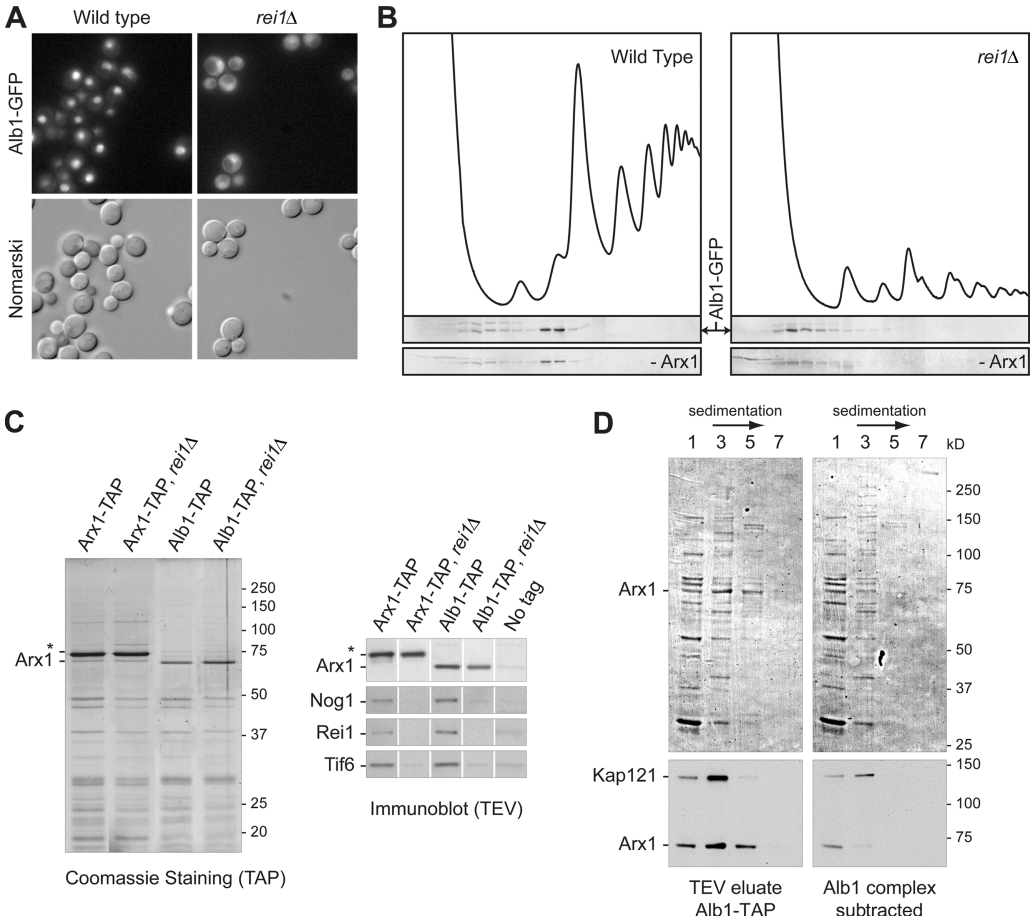


Figure 5. **Alb1 is an additional shuttling pre-60S factor and target of Rei1.** (A) In the absence of Rei1, Alb1 is blocked in the cytoplasm. The localization of Alb1-GFP was observed in *rei1Δ* or wild-type strains and grown for 8 h in minimal medium at 23°C. (B) Rei1 is required for the anchoring of Alb1 to pre-60S complexes. *rei1Δ* or wild-type strains expressing *ALB1-GFP* were grown for 16 h at 23°C, and whole cell extracts were prepared. The extracts were separated on sucrose gradients and analyzed as described in Fig. 1 C. The immunoblots, performed using antibodies against GFP or Arx1, are displayed below the corresponding profile. (C) Arx1 and Alb1 form a small nonribosomal complex in the absence of Rei1. Arx1- and Alb1-TAP–associated complexes were purified in wild-type or *rei1Δ* strains grown at 23°C. The Coomassie staining is shown on the left; the right panel displays the results of immunoblots using antibodies against Arx1, Nog1, Rei1, and Tif6 against the TEV eluates. Protein amounts were adjusted relative to Arx1. Positions of the tagged proteins are indicated by asterisks. (D) Arx1 and Kap121 cosediment with Alb1-TAP in *rei1Δ* strains. The TEV eluate from a purification of Alb1-TAP in the absence of Rei1 was further separated on sucrose gradients either directly (left) or after preincubation with calmodulin affinity resin (right; Alb1 complex subtracted). The components of the fractions were analyzed by immunoblotting using Arx1 and Kap121 antibodies after membrane staining by Ponceau red.

absence of Rei1 (Fig. 5 D). These complexes sedimented in the first five fractions of the gradient and contained Arx1 and Kap121, as discussed in the following paragraphs. In contrast to the other Ponceau-stained bands, these two proteins could be depleted by preincubating the TEV eluate with calmodulin affinity resin, which retains Alb1-CBP, indicating that they are strongly associated with this bait.

Reimport of shuttling factors into the nucleus in the absence of Rei1 restores growth

To gain more insights into the molecular events involved in the observed phenotypes in the absence of Rei1, we performed a high copy number suppressor screen with a strain deleted for *REI1* grown at 20°C. In addition to *REI1* itself, we selected the homologous gene *REH1/YLR387C*. The overexpression of this gene was able to partially complement the cold-sensitive phenotype of *rei1Δ* (Fig. 6 A) as previously shown (Iwase and Toh-e, 2004), yet we could not detect any defect in *reh1Δ* strains on polysome profiles nor on rRNA maturation (not depicted). Thus, we assume that although it shares partial functional overlap with Rei1, Reh1 is not limiting for the biogenesis of the large ribosomal subunit under physiological conditions.

The third gene identified in our screen was *KAP121/YMR308C* (Fig. 6 A). It was selected as seven distinct DNA inserts containing the whole *KAP121* ORF. The smallest insert constituted a DNA fragment extending from 589 bp upstream of the initiation codon to 762 bp downstream of the stop codon. Kap121, also known as Pse1, is a β-karyopherin, which was shown to be involved in the import of various ribosomal proteins (Rout et al., 1997) as well as pre-ribosomal factors such as Nop1 and Sof1 from the cytoplasm to the nucleus (Leslie et al., 2004). The mislocalization to the cytoplasm of Arx1-GFP, Alb1-GFP, or Tif6-GFP in a *rei1Δ* strain could be compensated by overexpression of either *REI1* or *KAP121* (Fig. 6 B). Both constructs were able to relocalize the three fusion proteins to the nuclear compartment compared with a strain transformed with an empty vector.

Because overexpression of the β-karyopherin Kap121 was sufficient to overcome the import defect of all three shuttling factors in the *rei1Δ* strain, one might wonder whether Kap121 was the physiological importin for these proteins. Such a hypothesis was supported by the presence of Kap121 in Arx1- and Alb1-TAP–associated complexes (Figs. 5 D and 6 C; Gavin et al., 2002; Nissan et al., 2002) and by two-hybrid data (Fig. S4, available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200510080/DC1).

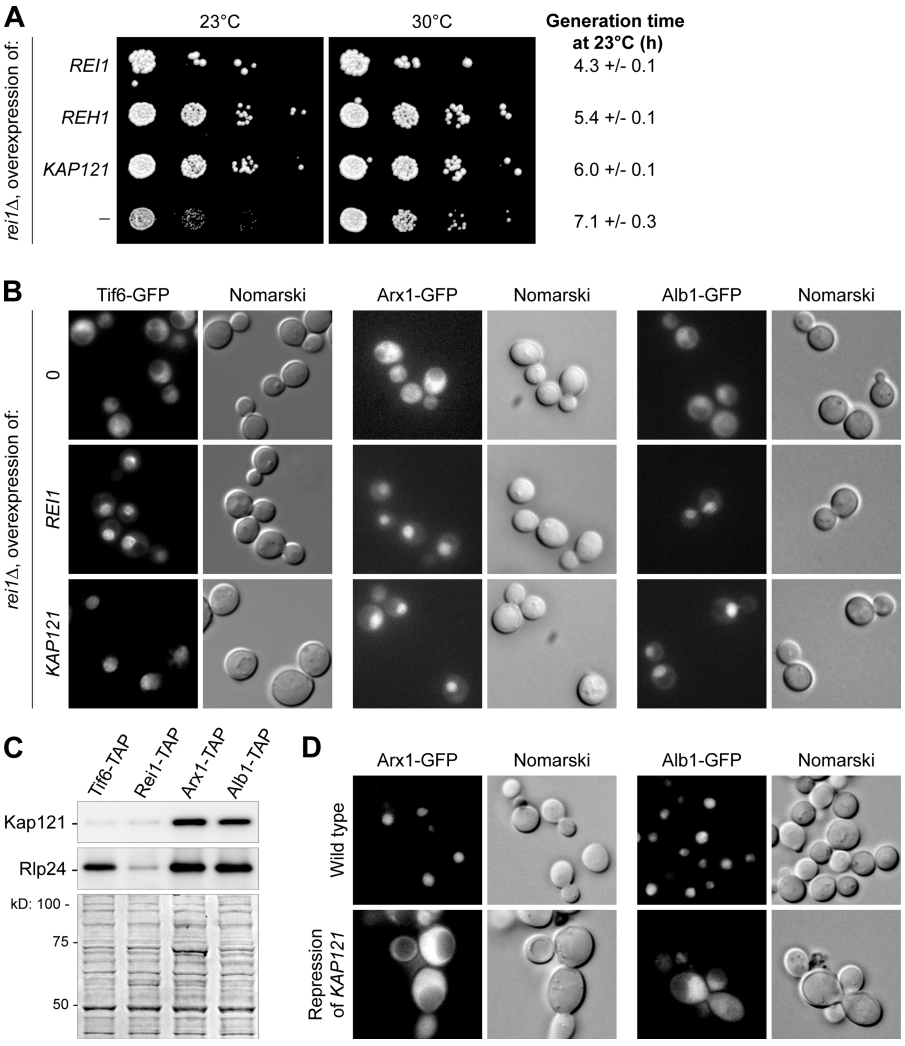


Figure 6. **Kap121 is involved in the Rei1-dependent nuclear import of pre-60S factors.** (A) *KAP121* is a high copy number suppressor of *rei1Δ*. A *rei1Δ* strain was transformed with high copy number plasmids carrying distinct DNA inserts (*REI1*, *REH1*, *KAP121*, or no insert) and plated in 10^{-1} dilution series on synthetic medium without uracil at 23 or 30°C for 3 and 2 d, respectively. Generation times at 23°C were calculated from growth curves performed in liquid synthetic medium without uracil over a period of 30 h. The confidence intervals were calculated for a probability of 95%. (B) Overexpression of *KAP121* is sufficient to overcome the import defect in *rei1Δ* strains. *rei1Δ* strains expressing *ARX1-GFP*, *ALB1-GFP*, or *TIF6-GFP* were transformed with vectors overexpressing *REI1*, *KAP121*, or nothing. The localization of Arx1-, Alb1-, or Tif6-GFP was detected after growth for 8 h in minimal medium without uracil at 23°C. (C) Kap121 copurifies with Arx1-TAP and Alb1-TAP. Tif6-, Rei1-, Arx1-, and Alb1-TAP–associated complexes were purified by TAP. The presence of Kap121 or Rlp24 in the eluates was assessed by Western blotting with specific antibodies against each of these proteins. The Ponceau red staining is shown on the bottom. (D) In the absence of Kap121, Arx1-GFP is blocked in the cytoplasm. *KAP121* was placed under the control of the P_{GAL1} promoter in strains expressing *ARX1-GFP* or *ALB1-GFP*. The localization of Arx1-GFP or Alb1-GFP was detected in this mutant or in the corresponding wild-type strain after growth in glucose-containing medium for 16 h.

In contrast, Kap121 was not detected in Tif6-TAP–associated complexes; therefore, we did not further assess the possibility that Kap121 is the specific importin for this factor. As a control, Rlp24 was as efficiently copurified with Tif6-TAP as with Alb1-TAP or Arx1-TAP compared with Rei1-TAP, which was associated with neither Kap121 nor Rlp24 (Fig. 6 C).

Further evidence for Arx1 and Alb1 being Kap121 cargoes was provided by localization of the Arx1-GFP and Alb1-GFP fusion proteins in strains in which the expression of *KAP121* was repressed (Fig. 6 D). Both fusions were redistributed to the cytoplasm compared with wild-type strains, where we observed bright nuclear–nucleolar signals. This result suggested that the karyopherin Kap121 might be the physiological importin for Arx1 and Alb1. Altogether, these results show that the nuclear import of Arx1 and Alb1 is Kap121 dependent. In the absence of Rei1, the return of Arx1–Alb1 to the nucleus as well as that of Tif6 can be restored by overexpressing this karyopherin.

The accumulation of Alb1–Arx1 in the cytoplasm prevents dissociation and recycling of Tif6 in *rei1Δ* strains

In the absence of Rei1, Arx1 and Alb1 accumulate in the form of a small complex, whereas Tif6 remains bound to the pre-60S particle. We hypothesized that the nonphysiological levels of the Arx1–Alb1 cytoplasmic subcomplex could prevent the dissociation of Tif6 from the premature large ribosomal subunit and subsequent return of this factor to the nucleus.

The deletion of either *ARX1* or *ALB1* in the *rei1Δ* strain restored growth at 23°C almost up to the levels of *arx1Δ* or *alb1Δ* single mutant strains, respectively (Fig. 7 A). Therefore, the cytoplasmic accumulation of Arx1–Alb1 accounts for the observed cold-sensitive phenotype of the *rei1Δ* strain.

According to our hypothesis, Arx1–Alb1 might also explain the cytoplasmic retention of Tif6. Thus, we monitored the localization of Tif6-GFP in *rei1Δ alb1Δ* or *rei1Δ arx1Δ* double mutant strains (Fig. 7 B). In these mutants, Tif6 was mainly nuclear, as in the wild-type strain, compared with the mostly cytoplasmic signal in the *rei1Δ* strain. Thus, we conclude that in the absence of Rei1, Arx1 and Alb1 participate in a cytoplasmic subcomplex that prevents the adequate release of Tif6 from pre-60S particles and its correct return to the nucleus for a new round of biogenesis.

Discussion

End of ribosome biogenesis and recycling of shuttling pre-60S factors are intertwined processes

At the end of ribosome biogenesis, all remaining pre-ribosomal factors on the particles are released into the cytoplasm. Recycling of these factors for a new round of biogenesis, instead of synthesizing new ones, constitutes a logical spare of resources for yeast cells. As far as shuttling factors such as Rlp24, Nmd3, Arx1, and Tif6 are concerned, this recycling involves reimport into the nucleus.

Previous studies have shown that some of the latest pre-60S factors can be involved in recycling shuttling factors. Indeed, the GTPase Lsg1 was shown to participate in the release and recycling of Nmd3 (Hedges et al., 2005). An additional GTPase, Efl1, is required for release from the particles and recycling of the pre-60S factor Tif6 (Senger et al., 2001). In this study, we characterized Rei1 as a new pre-60S–associated cytoplasmic factor at the center of maturation events taking place in the nucleus. We provide evidence for the role of this factor in the recycling of Arx1, Tif6, and a novel pre-60S shuttling factor, Alb1.

Arx1 and Alb1 are interacting pre-60S factors

Arx1 was first characterized as a component of pre-60S complexes by TAP experiments (Bassler et al., 2001; Nissan et al., 2002).

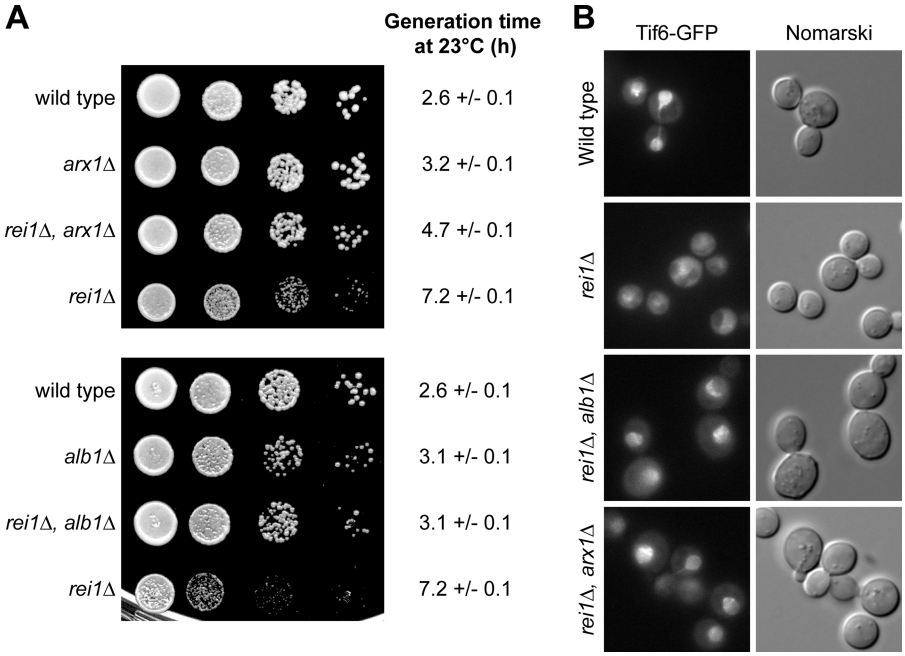


Figure 7. **In the absence of Rei1, the cytoplasmic Arx1–Alb1 complex prevents the recycling of Tif6.** (A) Disruptions of *ARX1* or *ALB1* compensate the cold-sensitive phenotype of a *rei1Δ* strain. Wild-type, *rei1Δ*, *arx1Δ*, or *rei1Δ*, *arx1Δ* strains were spotted on YPD medium in 10^{-1} dilution series (top); the same was performed for wild-type, *rei1Δ*, *alb1Δ*, or *rei1Δ*, *alb1Δ* strains (bottom). Cold-sensitive phenotypes were tested by incubating the plates for 3 d at 23°C. Generation times at 23°C were calculated from growth curves performed in liquid synthetic medium over a period of 30 h. The confidence intervals were calculated for a probability of 95%. (B) Disruptions of *ARX1* or *ALB1* compensate the Tif6 shuttling defect in a *rei1Δ* strain. The localization of Tif6-GFP was detected by epifluorescence microscopy in a wild-type, *rei1Δ*, and *rei1Δ*, *alb1Δ* or *rei1Δ*, *arx1Δ* double mutant strains.

This nonessential protein, which is present both in the nucleus and cytoplasm of yeast cells, contains a domain that is characteristic of methionine amino peptidases.

This study sheds light on an additional shuttling pre-60S factor, Alb1. Our data suggest that Arx1 and Alb1 can form a dimer because (1) they interact in a two hybrid (Fig. 4 A), (2) Arx1 is overrepresented in Alb1-TAP–associated complexes (Fig. 4 B), (3) they interact directly in vitro (Fig. 4 D), and (4) they can be copurified as a nonribosomal subcomplex (Fig. 5 D).

In physiological conditions, both Arx1 and Alb1 participate in pre-60S complexes from the nucleus to the cytoplasm. Nevertheless, neither of them seems to be essential for the maturation of the large ribosomal subunit. Indeed, in the absence of either factor, we failed to detect any strong rRNA maturation, export, or polysome profile defect (Fig. S3 and not depicted). In the absence of Rei1, both factors are retained in the cytoplasm (Figs. 3 A and 5 A) in the form of a small complex (Figs. 3 B and 5, B and D); they are not imported into the nucleus and, consequently, are not incorporated into new pre-60S complexes.

Recycling of the pre-60S factors Arx1 and Alb1 is Kap121 dependent

Ribosome biogenesis needs the import into the nucleus of many proteins through the nuclear pore complexes. In addition to ribosomal proteins, all of the factors that participate in the transcription of rRNA or in ribosome biogenesis must be imported into the nucleolus. Two main β-karyopherins have been shown to be involved in this directional transport: Kap123 and Kap121/Pse1 (Rout et al., 1997). Each of these importins is responsible for the nuclear import of specific cargoes: Kap123 imports most of the ribosomal proteins, and Kap121 also carries nucleolar proteins such as Nop1 and Sof1 (Leslie et al., 2004).

Although we did not detect any consensus Kap121-specific NLS in the sequence of Arx1 or Alb1, three independent pieces of evidence indicate that both factors are imported into the nucleus by a mechanism involving Kap121: (1) the cytoplasmic accumulation of Arx1 and Alb1, released from pre-60S complexes in the absence of Rei1, can be overcome by the overexpression of Kap121 (Fig. 6 B); (2) Arx1 and Alb1 remain in the cytoplasm in the absence of Kap121 (Fig. 6 D); and (3) Kap121 can be found in Arx1- and Alb1-associated complexes (Fig. 5 C; Nissan et al., 2002) and was found as a two-hybrid partner of Alb1 in a matrix assay (Fig. S4). Thus, one might assume that Arx1 and Alb1 are additional Kap121 cargoes. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that the observed effects could be indirect.

So far, the nature of the nuclear import signal for Arx1–Alb1, which is affected when they dissociate from pre-60S particles in the absence of Rei1, is still unclear. However, the binding with Kap121 is not affected because Kap121 is still copurified with Arx1 and Alb1 in such conditions (Fig. 5 D).

Rei1 controls the exit from 60S biogenesis

Fig. 8 recapitulates the conclusions of this study concerning the cytoplasmic events that take place at the end of the large subunit biogenesis in wild-type conditions or in the absence of Rei1. In the model that we propose, we only took into account the factors that had shown physical or functional links in our study. At the exit of the nucleus, pre-60S particles still contain shuttling pre-ribosomal factors such as Rlp24, Tif6, Arx1, and Alb1. At this stage in the pathway, the cytoplasmic pre-60S factor Rei1 and the late-associating ribosomal protein Rpl24 associate on the particle. So far, we could not determine which of the factors loads first; however, our data suggest that they associate with the particle after the dissociation of Rlp24 (Fig. 1 B). Arx1, Alb1, and Tif6 then leave the particle and return to the nucleus, where they can enter a new round of biogenesis.

In the absence of Rei1, we showed that the Kap121-dependent recycling of Arx1–Alb1 was impaired and that the cytoplasmic accumulation of this duplex inhibited the release of Tif6 from pre-60S particles and subsequent return of this factor to the nucleus. Because Tif6 and its homologues were described as putative antiassociation factors in several eukaryotic species (Valenzuela et al., 1982; Si and Maitra, 1999), we believe that stalling of Tif6 on the particles at the end of the 60S biogenesis could result in the observed *rei1Δ* phenotypes. Because Efl1 was previously characterized as the GTPase that triggers the dissociation of Tif6 from the particle (Senger et al., 2001), it was a good candidate for explaining the recycling defect observed for Tif6. However, Efl1 was always found as a free protein in sucrose gradients, whatever the presence of Rei1 (Fig. S2, available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200510080/DC1). Additionally, it was never found to be associated with Arx1 or with Alb1 in TAP experiments (unpublished data). Lastly, the overexpression of wild-type or mutant forms of Efl1 did not complement a *rei1Δ* strain (Fig. S2). Consequently, the retention of Tif6 on pre-60S particles in the absence of Rei1 is not likely caused by a lack of Efl1. Possibly, the Arx1–Alb1 cytoplasmic complex might sequester another, as yet unknown, factor required for the release of Tif6.

The late pre-60S network could be linked with the cell cycle control

Rei1 (required for isotropic bud growth) was previously described as a member of the mitotic signaling network (Iwase and Toh-e, 2004). This factor was proposed to be involved in the regulatory network around the Swe1 kinase by way of Nis1. The Swe1 kinase is the converging platform for several events that result in the negative regulation of cyclin-dependent kinases, which, in turn, control the switch between polar growth and isotropic growth at the bud neck. These data are not in contradiction with the present results and even offer the possibility that Rei1 might be involved in coupling ribosome biogenesis with cell cycle control.

Indeed, other factors appear to be implicated in both pathways. For instance, Nap1, which belongs to this mitotic signaling network, also displays interactions with proteins involved in ribosome biogenesis and, in particular, with Rei1 (Krogan et al., 2004). According to these data, Rei1 could also act at the intersection between these two major cellular pathways.

One way to address the question would be to confirm the existence of an E-MAP-115 domain in Rei1. This domain was characterized in ensconsin, a microtubule-associated protein of 115 kD. In higher eukaryotes, this protein was shown to bind

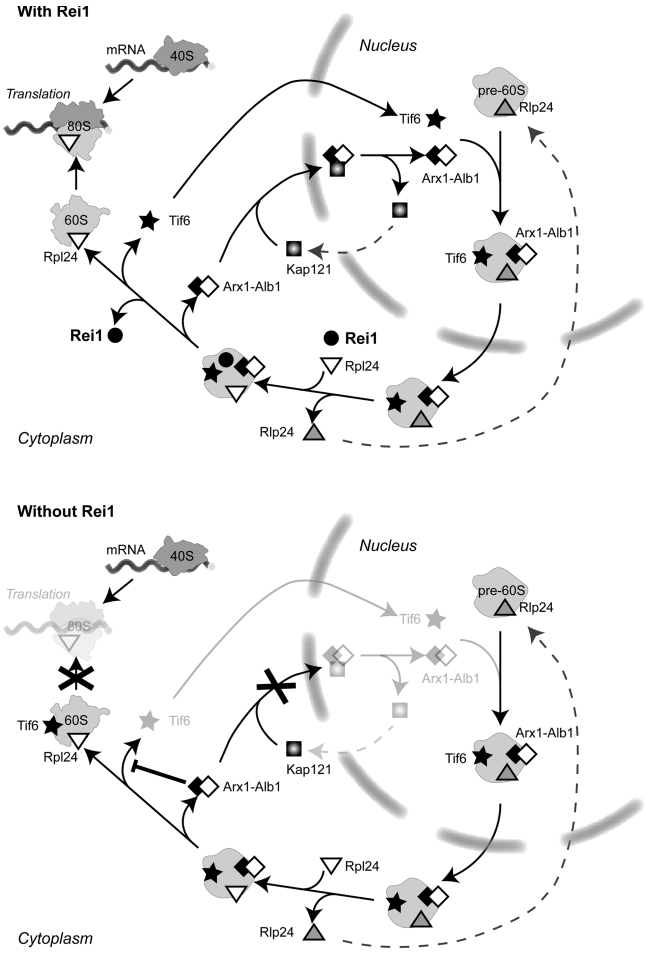


Figure 8. **Model for the function of Rei1 at the exit of large ribosomal subunit biogenesis.** Arx1, Alb1, and Tif6 are shuttling pre-60S factors that load on the precursors of the large ribosomal subunit in the nucleus and dissociate from the particles in the cytoplasm. At this last stage in biogenesis, the late ribosomal protein Rpl24 and the pre-60S factor Rei1 load on the particle. Rei1 triggers the Kap121-dependent recycling of Arx1 and Alb1 and subsequent dissociation and return of Tif6 to the nucleus. In the absence of Rei1, an Arx1, Alb1-containing subcomplex accumulates in the cytoplasm, which inhibits the dissociation of Tif6 from pre-60S particles. Thus, Tif6 antiassociation activity prevents the participation of novel large ribosomal subunits to translation initiation, and the lack of nuclear Tif6 results in pre-60S maturation defects.

microtubules in cell lines of epithelial origin (Masson and Kreis, 1993). To further speculate, we could imagine that Rei1, if it also interacted with microtubules, could orient newly synthesized large ribosomal subunits to the bud neck, where a high rate of protein synthesis is required for bud growth. An appealing hypothesis would be that Rei1 triggers the dissociation of Tif6 only once the 60S particles have reached active translation sites.

Materials and methods

Yeast strains, plasmids, and oligonucleotides

The yeast strains used in this study are listed in Table S1 (available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200510080/DC1). They were generated by homologous recombination using PCR products to transform either MGD353-13D or BY4741/4742 (S288C background) strains (Baudin et al., 1993). The pBS1479 vector was obtained from B. Seraphin (Centre National de la Recherche Scientifique [CNRS], Gif-sur-Yvette, France). A pFA6a-TAP plasmid was obtained from F. Stutz (University of Geneva, Geneva, Switzerland). The SC0708 and SC0406 strains were obtained from Euroscarf and have been constructed by CellZome AG. Disrupted strains in the BY4741/4742 background with the KanMX4 marker came from the Euroscarf collection of deletion strains (Brachmann et al., 1998). Plasmids for two-hybrid screens were obtained by Gateway cloning in pAS2ΔΔ and pACTIIst destination vectors (gift from E. Bertrand, CNRS). The sequence of oligonucleotides used for Northern hybridization and primer extension analysis were previously described (Saveanu et al., 2003).

Yeast two-hybrid genomic screen

The yeast two-hybrid screens were performed using a cell-to-cell mating strategy as previously described (Fromont-Racine et al., 2002). The strain CG1945, transformed with either pAS2ΔΔ-RPL24 or pAS2ΔΔ-ARX1 baits, was mated with the strain Y187 transformed with an *S. cerevisiae* DNA library cloned in pACTIIst. Diploids were spread on minimal medium without leucine, tryptophan, and histidine. 55 and 36 positive clones were recovered in the Rpl24b and Arx1 screens, respectively.

High copy number suppressor genetic screen

The BY4741 *rei1Δ* strain was transformed with a yeast genomic high copy number vector library constructed in pFL44L (provided by F. Lacroute, CNRS). The transformants were grown on solid synthetic minimal medium lacking uracil at 20°C. Colonies that had lost their cold-sensitive phenotype when compared with the same strain transformed with an empty vector were selected. Plasmidic DNA was recovered, and DNA inserts were sequenced. The suppressor plasmids were checked by retransformation of the *rei1Δ* strain; their growth phenotypes were compared by spotting transformants in 10^{-1} dilution steps on minimal medium without uracil at 23 and 30°C.

RNA extraction, Northern blotting, and primer extension

Cells were broken with glass beads, and total RNAs were subjected to phenol-chloroform extraction. RNAs were resolved on 6% polyacrylamide-urea gels or on 1% agarose gels, transferred to Hybond-N+ membranes, and probed with various ^{32}P-labeled oligonucleotides. Primer extensions were performed with ^{32}P-labeled oligonucleotides; the products were then resolved on 5% polyacrylamide-urea gels. Quantifications were performed with ImageQuant software (GE Healthcare).

Sucrose gradients and Western blotting

Total protein extracts were prepared from exponentially growing yeast cells as previously described (Saveanu et al., 2001) and were separated on 10–50% sucrose gradients by centrifugation for 3 h at 190,000 *g* (SW41 rotor; Beckman Coulter). In each fraction of the gradient, the proteins were precipitated with 10% TCA, separated on 10% polyacrylamide-SDS gels, and transferred to nitrocellulose membranes. TAP-tagged proteins were detected with a 1:10,000 dilution of the peroxidase–antiperoxidase (PAP) soluble complex (Sigma-Aldrich). Native, 13Myc-tagged, and GFP-tagged proteins were detected by indirect immunoblotting using specific polyclonal rabbit antibodies as primary antibodies at a 1:5,000 dilution, anti-cMyc mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) at a 1:2,000 dilution, or anti-GFP rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) at a 1:400 dilution. TAP-tagged proteins were detected with PAP (Sigma-Aldrich) at a 1:10,000 dilution. Anti-Nog1 antibodies were described previously (Saveanu et al., 2003). Antibodies against Kap121 and Tif6/Efl1 were obtained from J.D. Aitchison (Institute for Systems Biology, Seattle, WA) and F. Fasiolo (CNRS), respectively. Anti-Arx1 and anti-Rei1 antibodies were produced by the immunization of rabbits with specific immunogenic peptides and were affinity purified (Covalab). Secondary antibodies (goat anti–rabbit or goat anti–mouse HRP conjugate; Bio-Rad Laboratories) were used at a 1:10,000 dilutions. Visualization of the peroxidase activity was performed with the ECL+ chemiluminescence kit (GE Healthcare).

Purification of complexes

Complexes were purified according to the standard TAP protocol (Rigaut et al., 1999), starting from 4 liters of yeast culture. The TEV eluate was precipitated with 10% TCA and analyzed by Western blotting as described above.

In vitro binding assay

Interactions between the GST-tagged baits and the His6-Arx1 fusion prey were assessed as previously described (Saveanu et al., 2003).

Fluorescence microscopy

Cells transformed with a centromeric plasmid expressing *RPL25-eGFP* (gift from E. Hurt, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany) or cells expressing chromosomal reporter constructs were cultured as indicated and

mounted in liquid minimal culture medium on glass slides. Immunofluorescence detection of the TAP-tagged fusion proteins was performed as previously described (Pringle et al., 1991). The fluorescence of GFP or Cy3 was detected with an epifluorescence microscope (model DMRB; Leica) at room temperature with 100× NA 1.30–0.60 oil immersion objective lenses (Leica). Images were acquired with a dual mode cooled CCD camera (C4880; Hamamatsu) and the HiPic32 acquisition software (Hamamatsu). The pAJ368/544 vectors were provided by A.W. Johnson (University of Texas, Austin, TX).

Online supplemental material

Table S1 recapitulates all yeast strains used in this study. Fig. S1 shows the results of TIF6 overexpression. Fig. S2 presents the data showing that a lack of Efl1 is likely not the cause of the recycling defect observed for Tif6 in the absence of Rei1. Fig. S3 displays the phenotypes on growth and polysome profiles of *arx1Δ* or *alb1Δ* single or double mutants. Fig. S4 shows the two-hybrid interactions between Arx1 and Alb1 and between Alb1 and Kap121. Online supplemental material is available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200510080/DC1.

We would like to thank Dr. J.D. Aitchison and Dr. F. Fasiolo for providing antibodies against Kap121 and Tif6/Efl1, respectively. We are grateful to Professor F. Lacroute, Dr. B. Seraphin, Dr. Edouard Bertrand, Dr. F. Stutz, Dr. E. Hurt, and Dr. A.W. Johnson, who provided the genomic bank in pFL44L for high copy number suppressor screens, the pBS1479 vector, the two-hybrid Gateway plasmids, the pFA6a-TAP-Tag-His3MX6 vector, the centromeric plasmid expressing *RPL25-eGFP*, and pAJ368/544, respectively.

This work was supported by grants from the European Union, the RNomics network (QLG2-CT-2001-01554), and the Ministère délégué à l'Enseignement Supérieur et à la Recherche (ACI-BCM0089-2003). A. Lebreton received a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Submitted: 14 October 2005
Accepted: 5 April 2006

References

Bassler, J., P. Grandi, O. Gadal, T. Lessmann, E. Petfalski, D. Tollervey, J. Lechner, and E. Hurt. 2001. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol. Cell*. 8:517–529.

Basu, U., K. Si, J.R. Warner, and U. Maitra. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 21:1453–1462.

Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute, and C. Cullin. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21:3329–3330.

Brachmann, C.B., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, and J.D. Boeke. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 14:115–132.

Dez, C., and D. Tollervey. 2004. Ribosome synthesis meets the cell cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:631–637.

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

Fromont-Racine, M., J.C. Rain, and P. Legrain. 2002. Building protein-protein networks by two-hybrid mating strategy. *Methods Enzymol.* 350:513–524.

Fromont-Racine, M., B. Senger, C. Saveanu, and F. Fasiolo. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*. 313:17–42.

Gadal, O., B.D. Strau, J. Kessl, B. Trumpower, D. Tollervey, and E. Hurt. 2001. Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol. Cell. Biol.* 21:3405–3415.

Gavin, A.C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J.M. Rick, A.M. Michon, C.M. Cruciat, et al. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 415:141–147.

Hedges, J., M. West, and A.W. Johnson. 2005. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *EMBO J*. 24:567–579.

Ho, J.H., G. Kallstrom, and A.W. Johnson. 2000a. Nascent 60S ribosomal subunits enter the free pool bound by Nmd3p. *RNA*. 6:1625–1634.

Ho, J.H., G. Kallstrom, and A.W. Johnson. 2000b. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell Biol.* 151:1057–1066.

Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G.D. Bader, L. Moore, S.L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, et al. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. 415:180–183.

Hurt, E., S. Hannus, B. Schmelzl, D. Lau, D. Tollervey, and G. Simos. 1999. A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J. Cell Biol.* 144:389–401.

Iwase, M., and A. Toh-e. 2004. Ybr267w is a new cytoplasmic protein belonging to the mitotic signaling network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Struct. Funct.* 29:1–15.

Johnson, A.W., E. Lund, and J. Dahlberg. 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* 27:580–585.

Kallstrom, G., J. Hedges, and A. Johnson. 2003. The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol. Cell. Biol.* 23:4344–4355.

Krogan, N.J., W.T. Peng, G. Cagney, M.D. Robinson, R. Haw, G. Zhong, X. Guo, X. Zhang, V. Canadien, D.P. Richards, et al. 2004. High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol. Cell*. 13:225–239.

Kruiswijk, T., R.J. Planta, and J.M. Krop. 1978. The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*. 517:378–389.

Leslie, D.M., W. Zhang, B.L. Timney, B.T. Chait, M.P. Rout, R.W. Wozniak, and J.D. Aitchison. 2004. Characterization of karyopherin cargoes reveals unique mechanisms of Kap121p-mediated nuclear import. *Mol. Cell. Biol.* 24:8487–8503.

Masson, D., and T.E. Kreis. 1993. Identification and molecular characterization of E-MAP-115, a novel microtubule-associated protein predominantly expressed in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 123:357–371.

Moy, T.I., and P.A. Silver. 1999. Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev.* 13:2118–2133.

Nissan, T.A., J. Bassler, E. Petfalski, D. Tollervey, and E. Hurt. 2002. 60S preribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* 21:5539–5547.

Pringle, J.R., A.E. Adams, D.G. Drubin, and B.K. Haarer. 1991. Immunofluorescence methods for yeast. *Methods Enzymol.* 194:565–602.

Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17:1030–1032.

Rout, M.P., G. Blobel, J.D. Aitchison, and M. Tyers. 1997. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell*. 89:715–725.

Saveanu, C., D. Bienvenu, A. Namane, P.E. Gleizes, N. Gas, A. Jacquier, and M. Fromont-Racine. 2001. Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J.* 20:6475–6484.

Saveanu, C., A. Namane, P.E. Gleizes, A. Lebreton, J.C. Rousselle, J. Noaillac-Depeyre, N. Gas, A. Jacquier, and M. Fromont-Racine. 2003. Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol. Cell. Biol.* 23:4449–4460.

Senger, B., D.L. Lafontaine, J.S. Graindorge, O. Gadal, A. Camasses, A. Sanni, J.M. Garnier, M. Breitenbach, E. Hurt, and F. Fasiolo. 2001. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol. Cell*. 8:1363–1373.

Si, K., and U. Maitra. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Mol. Cell. Biol.* 19:1416–1426.

Sydorskyy, Y., D.J. Dilworth, E.C. Yi, D.R. Goodlett, R.W. Wozniak, and J.D. Aitchison. 2003. Intersection of the Kap123p-mediated nuclear import and ribosome export pathways. *Mol. Cell. Biol.* 23:2042–2054.

Tschochner, H., and E. Hurt. 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13:255–263.

Valenzuela, D.M., A. Chaudhuri, and U. Maitra. 1982. Eukaryotic ribosomal subunit anti-association activity of calf liver is contained in a single polypeptide chain protein of Mr = 25,500 (eukaryotic initiation factor 6). *J. Biol. Chem.* 257:7712–7719.

Online Supplemental Material

Table S1

Strain	Genotype	Reference or source
MGD353–13D	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4*	(Rigaut et al., 1999)
BY4741	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0*	(Brachmann et al., 1998)
BY4742	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0*	(Brachmann et al., 1998)
SC0708	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, REI1–TAP:URA3*	(Gavin et al., 2002)
SC0406	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, TIF6–TAP:URA3*	(Gavin et al., 2002)
YSC1178-7501205	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ALB1–TAP:HIS3*	(Ghaemmaghami et al., 2003)
Invitrogen YPR016C	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, TIF6-GFP(S65T):His3MX6*	(Ghaemmaghami et al., 2003)
LMA160	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, RLP24–TAP:TRP1*	(Saveanu et al., 2001)
LMA331	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, rei1Δ::KanMX4*	This study
LMA333	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, RPL24B–TAP:TRP1*	This study
LMA346	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, RPL24B–TAP:TRP1, REI1–myc:KanMX6*	This study
LMA351	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, REI1–13Myc:KanMX6*	This study
LMA352	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, RLP24–TAP:TRP1, REI1–13Myc:KanMX6*	This study
LMA373	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, SSF1–TAP:TRP1, REI1–13Myc:KanMX6*	This study
LMA397	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1–TAP:His3MX6*	This study
LMA399	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1–TAP:His3MX6, rei1Δ::KanMX4*	This study
LMA401	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1–GFP(S65T):His3MX6*	This study
LMA411	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1–GFP(S65T):His3MX6, rei1Δ::KanMX4*	This study
LMA472	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, rei1Δ::NAT*	This study
LMA510	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1–GFP(S65T):His3MX6, KanMX6:*P_{GAL1}*-KAP121*	This study
LMA524	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, alb1Δ::NAT*	This study
LMA532	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ALB1-GFP(S65T):His3MX6*	This study
LMA536-C	*MATa ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?*[1]*, met15?, alb1Δ::NAT, rei1Δ::KanMX4*	This study
LMA538	*MATa ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ALB1-GFP(S65T):His3MX6*	This study
LMA543	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, KanMX6:*P_{GAL1}*-KAP121, ALB1-GFP(S65T):His3MX6*	This study
LMA545-A	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, ALB1-GFP(S65T):HIS3MX6, rei1Δ ::KanMX4*	This study
LMA567-A	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15? TIF6-GFP(S65T):His3MX6, rei1Δ::PrαNAT*	This study
LMA570	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, alb1Δ::KANMX6, rei1Δ::NAT, TIF6-GFP(S65T):His3MX6*	This study
LMA572	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, arx1Δ::KANMX6, rei1Δ::NAT, TIF6-GFP(S65T):His3MX6*	This study
LMA576	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ALB1–TAP:HIS3, rei1Δ::KanMX4*	This study
LMA577	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:*P_{GAL1}*-TIF6*	This study

Table S1. **Yeast strains used in this study**

References

Brachmann, C.B., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, and J.D. Boeke. 1998. Designer deletion strains derived from Saccharomyces cerevisiae S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 14:115-32.

Gavin, A.C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J.M. Rick, A.M. Michon, C.M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M.A. Heurtier, R.R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, and G. Superti-Furga. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 415:141-7.

Ghaemmaghami, S., W.K. Huh, K. Bower, R.W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E.K. O'Shea, and J.S. Weissman. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 425:737-41.

Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. 17:1030-1032.

Saveanu, C., D. Bienvenu, A. Namane, P.E. Gleizes, N. Gas, A. Jacquier, and M. Fromont-Racine. 2001. Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *Embo J*. 20:6475-6484.

[1] Question marks indicate that the genotype was not determined for this auxotrophy marker in this strain.

Figure S1

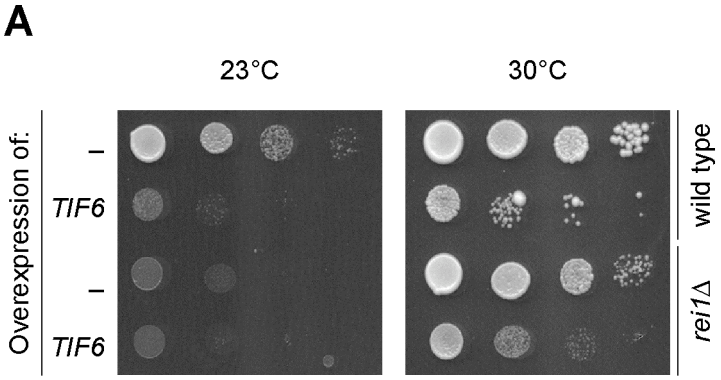


Figure S1. **The overproduction of Tif6 is toxic.** A wild type and a *rei1*Δ strains were transformed with a multicopy plasmid overexpressing *TIF6*, or with the corresponding empty vector pFL44L. The strains were plated in 10^{-1} dilution series on minimal medium without uracil and grown for 40 hours at 23°C or 30°C.

Figure S2

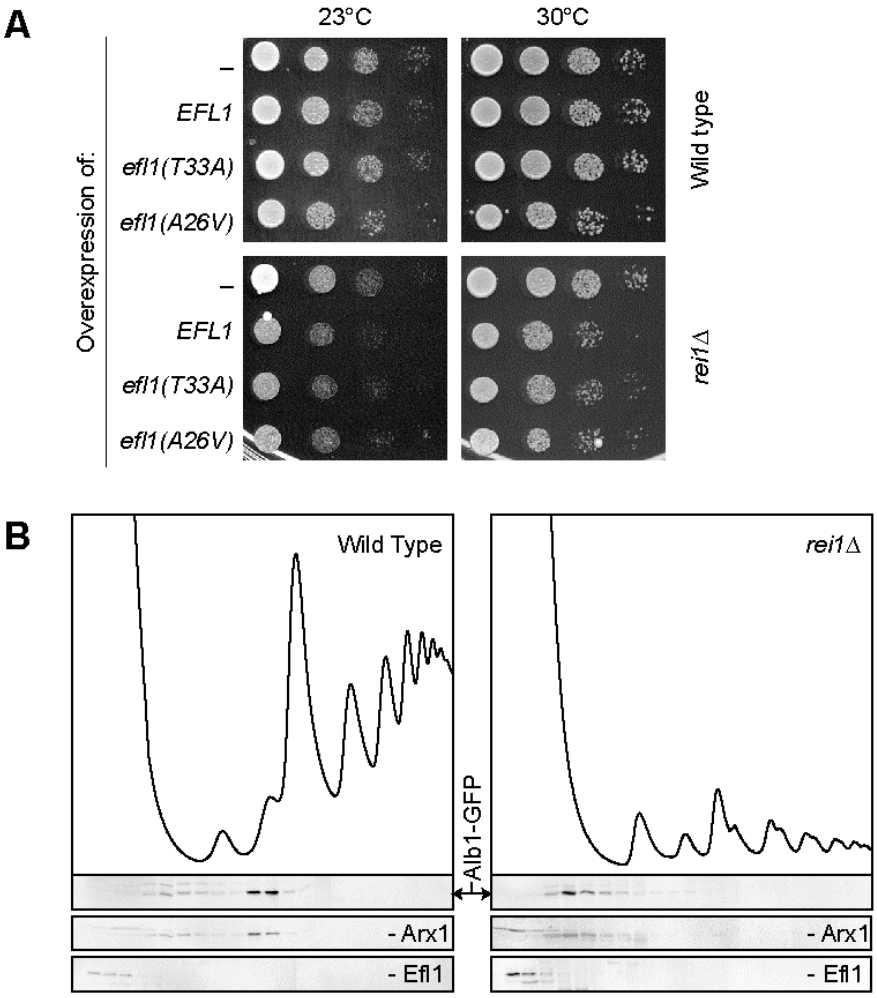


Figure S2. **Efl1 may not be involved in the observed recycling defect of Tif6 in absence of Rei1.** (A) The overproduction of Efl1 does not complement a *rei1*Δ strain. A wild type and a *rei1*Δ strains were transformed with multicopy plasmids expressing *EFL1*, or with the corresponding empty vector pFL44L. We also tested the overproduction of mutant forms of Efl1, where critical residues in the P-loop motif had been substituted. All strains were plated in 10^{-1} dilution series on minimal medium without uracil, and grown for 40 to 70 hours at 23°C or 30°C. Mutant Efl1(A26V), which was designed by homology with the "hyperactive" form of EF-G, EF-G(G16V) (Martemyanov et al., 1998), was able to complement an *efl1*Δ strain; conversely, mutant Efl1(T33A), which was designed by homology with a form of EF-Tu which does not bind GTP correctly, EF-Tu(T25A) (Krab and Parmeggiani, 1999), displayed a loss of function. (B) Efl1 sediments at the top of sucrose gradients, whatever the presence of Rei1. *rei1*Δ or wild type strains expressing *ALB1-GFP* were grown for 16 hours at 23°C, then whole cell extracts were prepared. The extracts were separated on sucrose gradients and analyzed as described in Fig. 1 C. The immunoblots, performed using antibodies against GFP, Arx1 or Efl1, are displayed below the corresponding profile.

Krab, I.M., and A. Parmeggiani. 1999. Functional-structural analysis of threonine 25, a residue coordinating the nucleotide-bound magnesium in elongation factor Tu. J Biol Chem. 274:11132-8.

Martemyanov, K.A., A. Liljas, and A.T. Gudkov. 1998. Increased functional activity of elongation factor G with G16V mutation in the GTP-binding domain. Biochemistry (Mosc). 63:1216-9.

Figure S3

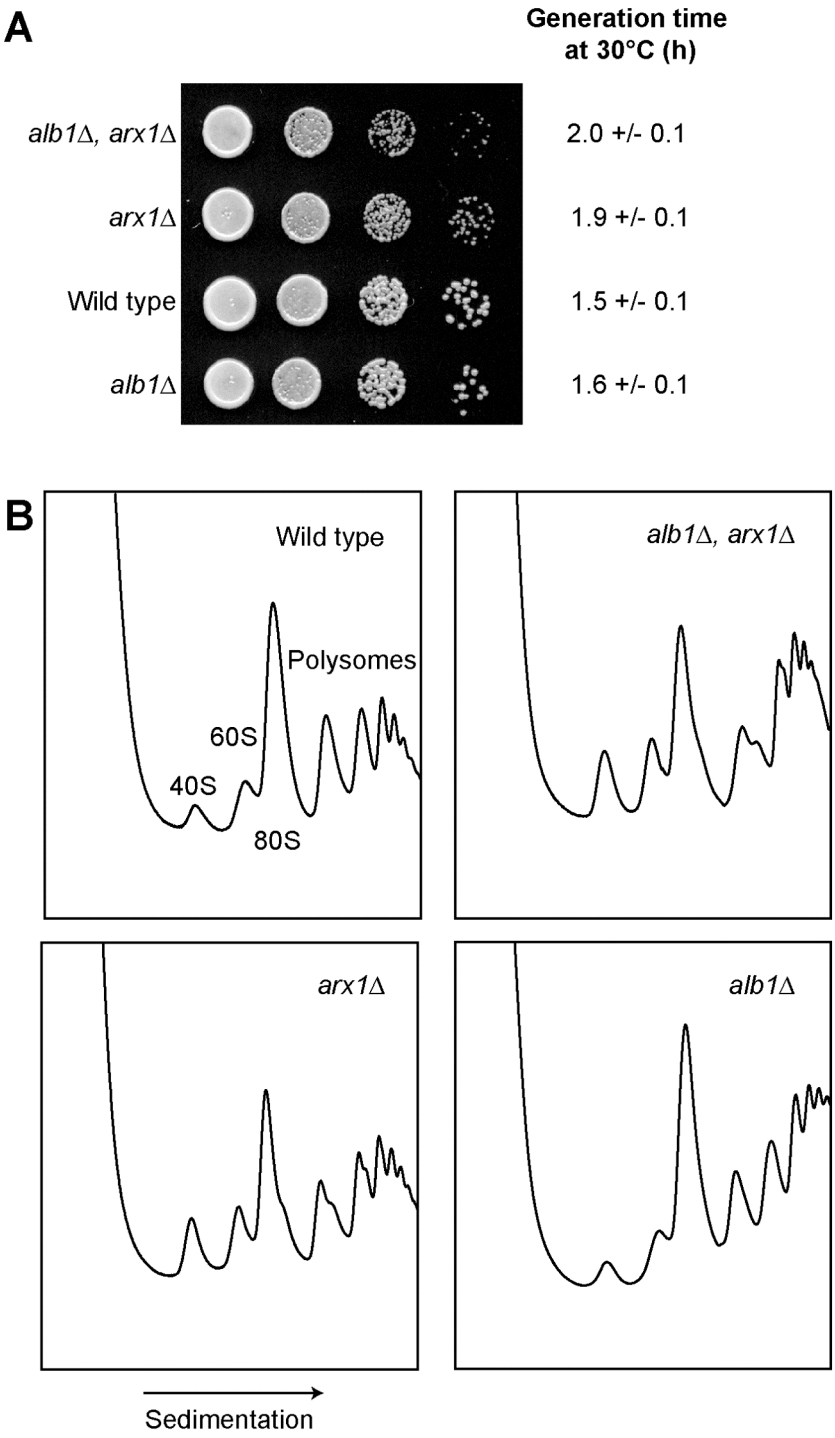


Figure S3. ***arx1Δ* and *alb1Δ* are epistatic.** (A) Growth phenotypes of the single or double mutants. The strains were plated in 10-1 dilution series on YPD and grown for 48 hours at 30°C. Generation times and confidence intervals were calculated from growth curves in liquid cultures as described in Figure 6. (B) Polysome profiles of the single or double mutants. The whole cell extracts were prepared and separated on sucrose gradients as described in Fig. 1 C.

Figure S4

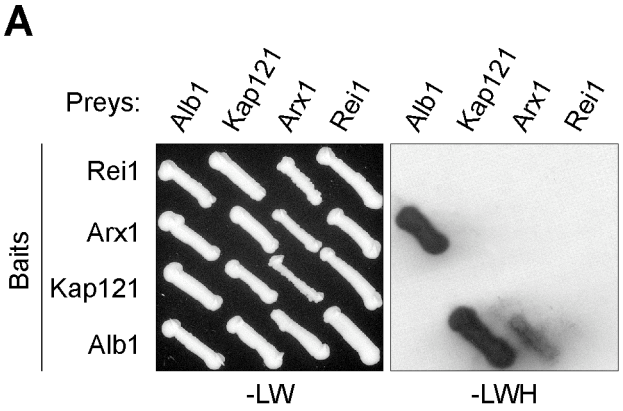


Figure S4. **Alb1 interacts in two-hybrid with Arx1 and Pse1**. The strain CG1945, transformed with pAS2ΔΔ-Rei1, Arx1, Kap121 or Alb1 baits, was mated with the strain Y187 transformed with pACTIIst-Alb1, Kap121, Arx1 or Rei1 preys. Diploids were selected on minimal medium without leucine and tryptophan (left panel). Positive clones were selected on minimal medium without leucine, tryptophan and histidine, and the intensity of the two-hybrid interaction was estimated by hydrolysis of X-Gal, which confers them a dark color (right panel).

SOUCHES, PLASMIDES ET OLIGONUCLEOTIDES

4. Souches utilisées au cours de cette étude

Souche	Génotype	Source
MGD353-13D	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4*	(Rigaut et al., 1999)
BMA64	*MATa/α, ura3–1/ura3–1, trp1Δ1/trp1Δ1, ade2-1/ade2-1, his3-11,-15/his3-11,-15, leu2-3,-112/leu2-3,-112*	(Baudin-Baillieu et al., 1997)
BY4741	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0*	(Brachmann et al., 1998)
BY4742	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0*	(Brachmann et al., 1998)
BY4743	*MATa/α ura3Δ0/ura3Δ0, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2, met15Δ0/MET15*	(Brachmann et al., 1998)
SC0708	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, REI1-TAP:URA3*	(Gavin et al., 2002)
SC0406	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, TIF6-TAP:URA3*	(Gavin et al., 2002)
SC0935	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, NSA2-TAP:URA*	(Gavin et al., 2002)
YSC1178-7501205	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ALB1-TAP:HIS3*	(Ghaemmaghami et al., 2003)
Invitrogen YPR016C	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, TIF6-GFP(S65T):His3MX6*	(Ghaemmaghami et al., 2003)
LMA158	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, NOG1-TAP:TRP1*	(Saveanu et al., 2001)
LMA160	*MATa, trp1-289, ura3–52, ade2, leu2,-3-112, arg4, RLP24-TAP:TRP1*	(Saveanu et al., 2001)
LMA240	*MATa, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, nog1Δ::KanMX6 [pFL36-NOG1]*	Ce travail
LMA241	*MATα, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, nog1Δ::KanMX6 [pFL36-nog1-2]*	Ce travail
LMA242	*MATα, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, nog1Δ::KanMX6 [pFL36-nog1-3]*	Ce travail
LMA244	*MATa, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, nog1Δ::KanMX6 [pFL36-nog1-4]*	Ce travail
LMA245	*MATα, ura3-1, trp1Δ1, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, nog1Δ::KanMX6 [pFL36-nog1-5]*	Ce travail
LMA271	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:P_{GAL1}-NSA2*	Ce travail
LMA272	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:P_{GAL1}-NSA2, NOG1-TAP:TRP1*	Ce travail
LMA275	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:P_{GAL1}-NOG1, NSA2-TAP:TRP1*	Ce travail
LMA276	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:P_{GAL1}-RLP24, NSA2-TAP:TRP1*	Ce travail

Souche	Génotype	Source
LMA277	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:P$_{GAL1}$-SSF1, ssf2Δ::NAT, NSA2-TAP:TRP1*	Ce travail
LMA331	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2,-3-112, arg4, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA332	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, RLP24–TAP:TRP1, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA333	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2,-3-112, arg4, RPL24B-TAP:TRP1*	Ce travail
LMA334	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, rei1Δ::KanMX4, RPL24B–TAP:TRP1*	Ce travail
LMA344	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2-3,-112, arg4, KanMX6:P$_{GAL1}$-NOG2, NSA2-TAP:URA3*	Ce travail
LMA346	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2,-3-112, arg4, RPL24B-TAP:TRP1, REI1-myc:KanMX6*	Ce travail
LMA351	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2,-3-112, arg4, REI1-13Myc:KanMX6*	Ce travail
LMA352	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2,-3-112, arg4, RLP24–TAP:TRP1, REI1–13Myc:KanMX6*	Ce travail
LMA373	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2,-3-112, arg4, SSF1–TAP:TRP1, REI1–13Myc:KanMX6*	Ce travail
LMA378	*MATα ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, rpl24aΔ::NAT*	Ce travail
LMA379	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, rpl24bΔ::HYG*	Ce travail
LMA380	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, rpl24aΔ::NAT, rpl24bΔ::HYG*	Ce travail
LMA387	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, REI1-GFP(S65T):His3MX6*	Ce travail
LMA389	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1-TAP:His3MX6*	Ce travail
LMA392	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, rpl24aΔ::NAT, rpl24bΔ::HYG, REI1–TAP:URA3*	Ce travail
LMA393	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, REI1-TAP:URA3*	Ce travail
LMA394	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, REI1-GFP(S65T):His3MX6*	Ce travail
LMA397	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1-TAP:His3MX6*	Ce travail
LMA399	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1-TAP:His3MX6, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA401	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1-GFP(S65T):His3MX6*	Ce travail
LMA402	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:P$_{GAL1}$-NOG1, NSA2-TAP:His3MX6*	Ce travail
LMA403	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0,*	Ce travail

Souche	Génotype	Source
	KanMX6:P$_{GAL1}$-NOG1-TAP:His3MX6	
LMA404	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:P$_{GAL1}$-NSA2-TAP:His3MX6*	Ce travail
LMA405	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:P$_{GAL1}$-NSA2, NOG1-TAP:His3MX6*	Ce travail
LMA410	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, REI1–GFP(S65T):His3MX6, arx1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA411	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1-GFP(S65T):His3MX6, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA432	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, reh1Δ::NAT*	Ce travail
LMA463	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, rpl24aΔ::NAT, rpl24bΔ::HYG, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA472	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2,-3-112, arg4, rei1Δ::NAT*	Ce travail
LMA473	*MATa, trp1–289, ura3–52, ade2, leu2,–3–112, arg4, rei1Δ::NAT, RLP24-TAP:TRP1*	Ce travail
LMA479	*MATa, trp1-289, ura3-52, ade2, leu2,-3-112, arg4, rei1Δ::NAT, KanMX6:P$_{GAL1}$-REH1*	Ce travail
LMA510	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1-GFP(S65T):His3MX6, KanMX6:P$_{GAL1}$-KAP121*	Ce travail
LMA523	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, rei1Δ::NAT*	Ce travail
LMA524	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, alb1Δ::NAT*	Ce travail
LMA532	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ALB1-GFP(S65T):His3MX6*	Ce travail
LMA533	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ARX1-GFP(S65T):His3MX6, alb1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA535-A	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?*[1]*, met15?, arx1Δ::KanMX4, alb1Δ::NAT*	Ce travail
LMA535-B	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, arx1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA536-C	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, alb1Δ::NAT, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA543	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, KanMX6:P$_{GAL1}$-KAP121, ALB1-GFP(S65T):His3MX6*	Ce travail
LMA544-B	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, arx1Δ::KanMX4, ALB1-GFP(S65T):His3MX6*	Ce travail
LMA544-C	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, arx1Δ::KanMX4*	Ce travail

[1] Les points d'interrogation indiquent que le génotype n'a pas été testé pour ce marqueur d'auxotrophie dans cette souche.

Souche	Génotype	Source
LMA545-A	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, ALB1-GFP(S65T):HIS3MX6, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA545-C	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA567-A	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15? TIF6-GFP(S65T):His3MX6, rei1Δ::PrαNAT*	Ce travail
LMA570	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, alb1Δ::KANMX6, rei1Δ::NAT, TIF6-GFP(S65T):His3MX6*	Ce travail
LMA572	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2?, met15?, arx1Δ::KANMX6, rei1Δ::NAT, TIF6-GFP(S65T):His3MX6*	Ce travail
LMA576	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ALB1-TAP:HIS3, rei1Δ::KanMX4*	Ce travail
LMA577	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, KanMX6:*P_{GAL1}*-TIF6*	Ce travail

5. Plasmides utilisés au cours de cette étude

Ces travaux ont requis la construction d'un certain nombre de vecteurs d'expression. Deux stratégies de clonage ont été employées : d'une part la stratégie Gateway® développée par Invitrogen, permettant, à partir d'un clonage unique, d'exprimer ensuite le gène d'intérêt dans une panoplie de vecteurs eucaryotes ou procaryotes ; d'autre part, une stratégie de clonage plus classique par enzymes de restriction. Par ailleurs, d'autres plasmides ont été obtenus par sélection de proies dans des cribles génétiques, par exemple les cribles suppresseurs multicopie ; ces plasmides ne sont pas décrits dans cette partie.

5.1. Vecteurs d'entrée pour le système Gateway®

Afin d'exprimer des fusions traductionnelles entre un rapporteur et un gène d'intérêt, aussi bien chez la levure que chez la bactérie, nous avons cloné un certain nombre de gènes de protéines ribosomiques, de facteurs pré-ribosomiques ou de candidats dignes d'intérêt dans le vecteur donneur pDONR201 (Invitrogen). Ce vecteur possède un gène de résistance à la kanamycine et, de part et d'autre de la séquence des gènes clonés, des séquences permettant une recombinaison spécifique de site avec le vecteur d'expression.

La stratégie de clonage utilisée permet une production de protéines fusionnées avec un rapporteur dans leur partie N-terminale. Pour ceci, les gènes d'intérêt ont été clonés de sorte à être « en phase » dans les vecteurs d'expression, sans codon initiateur mais avec leur codon de terminaison.

5.1.1. Principe du clonage dans les vecteurs d'entrée

Nous avons choisi d'amplifier les gènes d'intérêt grâce à une double PCR, dont les produits possèdent des sites de recombinaison attB1 et attB2 aux extrémités (Figure 57).

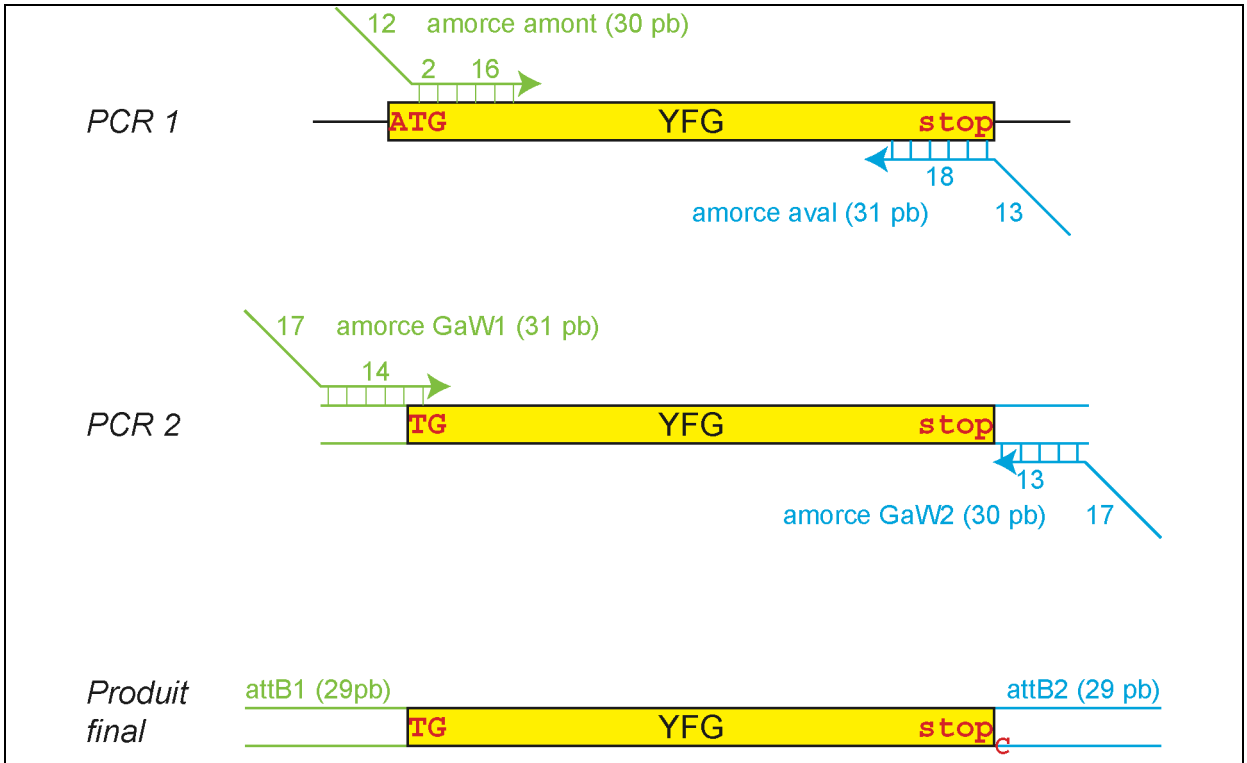


Figure 57 : Double PCR permettant l'amplification des gènes pour les clonages par stratégie Gateway®. YFG, *Your favourite gene*, est le gène d'intérêt à cloner.

La première PCR est effectuée avec des amorces spécifiques de chaque gène à amplifier, comportant dans leur partie 5' une extension commune pour la deuxième étape de PCR. L'amorce amont est choisie de sorte à placer les nucléotides TG du codon initiateur derrière le site attB1 ; l'amorce aval place le codon stop avant le site attB2. La deuxième PCR permet d'étendre les produits précédents de 17 paires de bases (pb) afin de reconstituer des sites attB1 et attB2 complets et fonctionnels.

À partir de ces produits, on procède à la réaction « BP ». C'est une recombinaison spécifique entre les sites attB du fragment PCR et attP du vecteur donneur, qui conduit à l'échange entre la cassette contenant *ccdB* de pDONR201 et le gène à cloner (Figure 58).

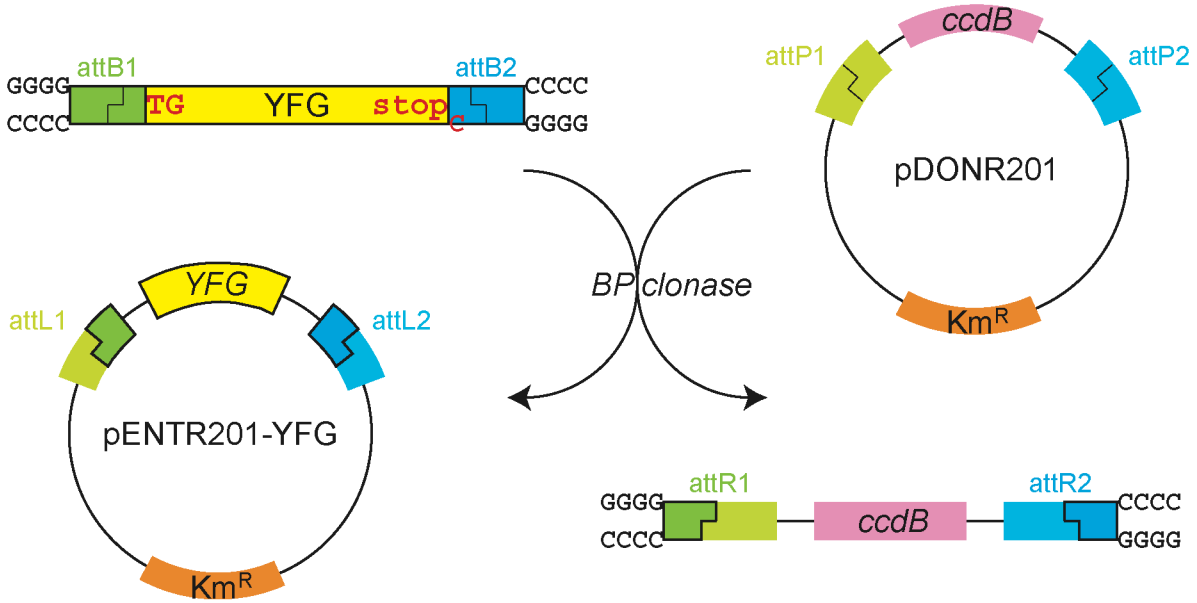


Figure 58 : Principe de la réaction « BP ». Le mélange enzymatique « BP clonase » catalyse la recombinaison spécifique des sites attB et attP pour formet des sites attL et attR. Ceci permet le transfert du gène d'intérêt YFG du fragment de PCR vers le plasmide donneur pDONR201. Le produit pENTR201-YFG permet aux bactéries DH5α de croître sur milieu contenant de la kanamycine ; on sélectionne ainsi le vecteur d'entrée. Le sous-produit de réaction et le plasmide donneur portent la cassette *ccdB*, toxique pour DH5α.

Le gène *ccdB* est toxique chez *E. coli* DH5α. En transformant le produit de la réaction dans ces bactéries et en sélectionnant sur milieu contenant de la kanamycine, on récupère les plasmides d'entrée contenant le gène d'intérêt (« YFG », *Your Favourite Gene*).

5.1.2. Gènes clonés dans le système Gateway® pour cette étude

Les gènes *ALB1*, *ARX1*, *FPR4*, *KAP121*, *MAK11*, *NOG1*, *NOG2*, NOP2, *NSA2*, *RLP24*, *REH1*, *REI1*, *RLP24*, *RSA1*, *TINP1* (humain), *RPL3*, *RPL4A*, *RPL10*, *RPL15A*, *RPL18A*, *RPL23A*, *RPL24B*, *RPP1A*, *RPP1B* et *RPS28B* ont été clonés dans ce système à partir d'ADN génomique, ou d'ADN complémentaire (ADNc) lorsque les séquences contenaient un ou plusieurs introns. Par ailleurs, divers mutants de ces gènes ont été obtenus :

- Pour *NOG1*, les mutants bloqués sous forme liée au GTP (*nog1-GTP*) produisant la protéine Nog1(P176V) ou au GDP (*nog1-GDP*) produisant la protéine Nog1(S181N), ainsi que divers fragments de *NOG1* (*nog1(2-100)*, *nog1(2-160)*, *nog1(2-300)*, *nog1(101-160)*, *nog1(101-300)*, *nog1(101-647)*, *nog1(161-300)*, *nog1(161-647)*, et *nog1(301-647)*) permettant la production de protéines contenant les résidus de Nog1 indiquées entre parenthèses.

- Pour *NOG2*, les mutants bloqués sous forme liée au GTP (*nog2-6*) produisant la protéine Nog2(P324V) ou au GDP (*nog2-11*) produisant la protéine Nog2(S329N),
- Des fusions entre les gènes de *RLP24* et *RPL24* permettant la production de chimères (A, *RLP24(2-43)-RPL24(40-155)* ; B, *RPL24(2-43)-RLP24(40-199)* ; C, *RLP24(2-149)-RPL24(142-155)* ; D, *RPL24(2-142)-RLP24(149-199)* ; E, *RLP24(2-43)-RPL24(40-142)-RLP24(149-199)* ; F, *RPL24(2-43-RLP24(40-149)-RPL24(142-155)*). Notons que les résidus 40 à 43 sont identiques dans les séquences de Rlp24 et Rpl24 ; par conséquent, la transition entre les domaines N-terminaux et centraux des chimères est retrouvées dans les deux protéines. De même pour le résidu 142 de Rpl24 qui correspond au résidu 149 de Rlp24.

5.1.3. Passage ultérieur dans les vecteurs d'expression

À partir des vecteurs d'entrée, ces gènes ont ensuite été transférés dans des vecteurs d'expression adéquats pour nos études par la réaction « LR » entre les sittes attL du vecteur d'entrée et attR du vecteur de destination :

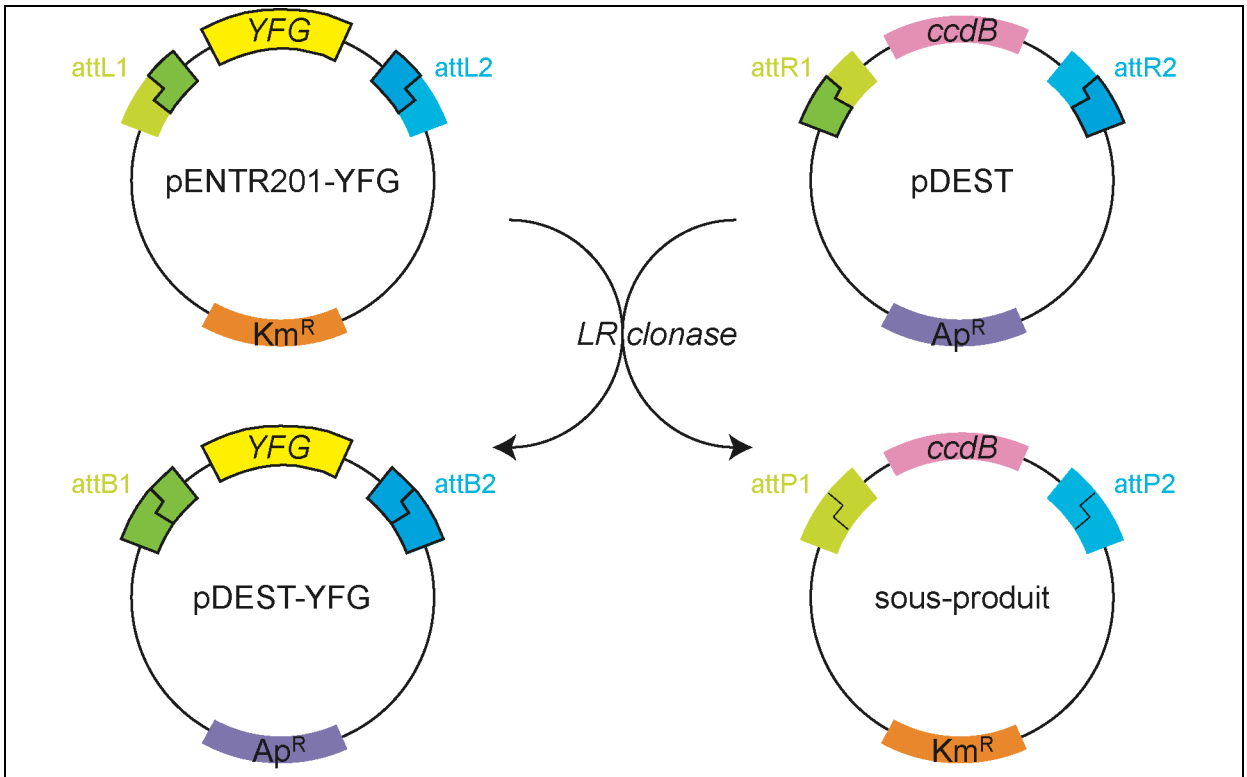


Figure 59 : Principe de la réaction « LR ». Le mélange enzymatique « LR clonase » catalyse la recombinaison spécifique des sites attL et attR pour formet des sites attB et attP. Ceci permet le transfert du gène d'intérêt YFG du vecetur d'entrée vers le plasmide de destination pDEST. Le produit pDEST-YFG permet aux bactéries DH5α de croître sur milieu contenant de l'ampicilline. Le sous-produit de réaction et pDEST portent la cassette *ccdB*, toxique pour DH5α**.**

Lorsque l'on transforme *E. coli* DH5α et que l'on sélectionne sur milieu contenant de l'ampicilline, seuls les plasmides d'expression ayant intégré le gène d'intérêt peuvent donner des colonies.

5.2. Vecteurs d'expression modifiés pour le système Gateway®

En plus des vecteurs d'expression préexistants, cette étude a nécessité la construction de nouveaux vecteurs d'expression chez la levure. En particulier, pour réaliser des tests de

complémentation, nous souhaitions disposer de plasmides permettant l'utilisation de la stratégie Gateway®, mais sans gène rapporteur fusionné dans la partie N-terminale, et avec un promoteur dont l'activité soit proche de celle des promoteurs de gènes pré-ribosomiques classiques.

Les plasmides pFL36-P_{RLP24}-RfC, pFL38-P_{RLP24}-RfC et pFL44-P_{RLP24}-RfC sont tous trois des vecteurs dérivés des plasmides de la série pFL créée par F. Lacroute. J'ai introduit la cassette RfC, permettant le clonage de gènes par la stratégie Gateway® développée par Invitrogen, dans le plasmide pFL36 (plasmide centromérique portant le marqueur d'auxotrophie *LEU2*). En amont de cette cassette, j'ai introduit la séquence 5' non transcrite du gène de *RLP24*, de sorte à placer les gènes à exprimer sous contrôle d'un promoteur pré-ribosomique (Figure 60). L'ensemble du site de clonage a par la suite été transféré dans pFL38 (centromérique) et pFL44 (multicopie) portant le marqueur *URA3*.

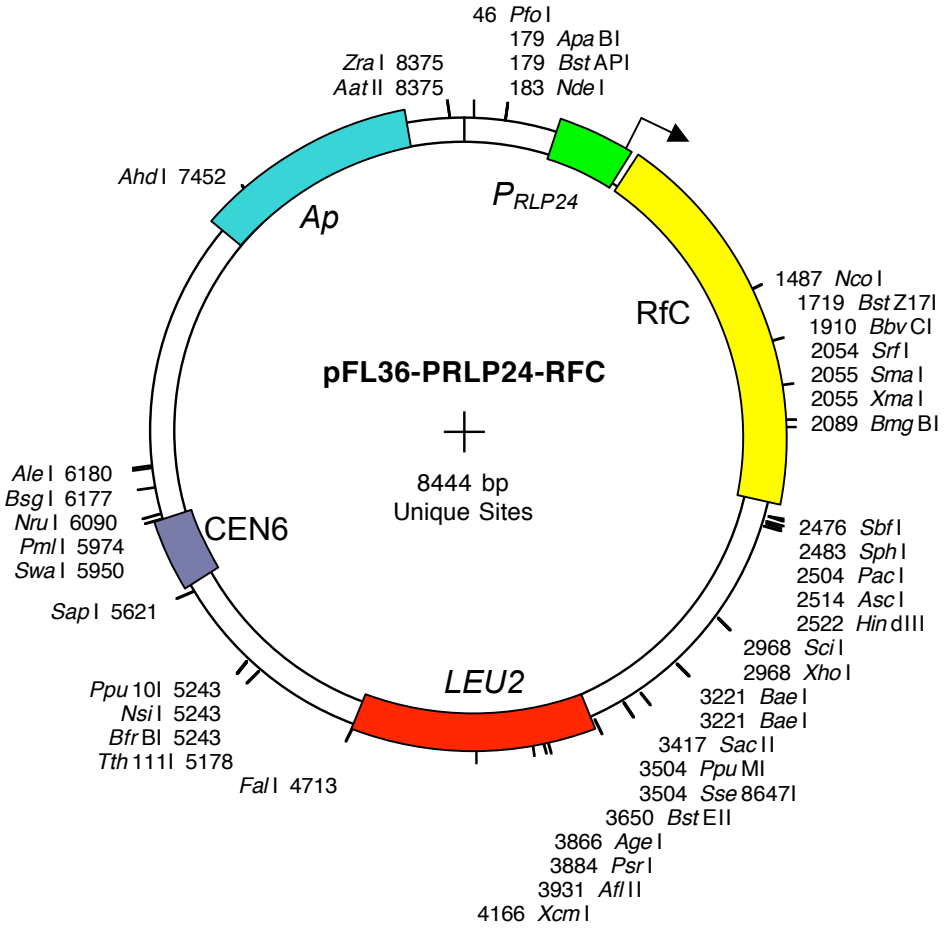


Figure 60 : Carte de restriction du plasmide pFL36-PRLP24-RfC. P_{RLP24}, promoteur de *RLP24* ; RfC, cassette du système Gateway® comprenant les sites attP ainsi que les gènes *ccdB* et *Cm* (résistance au chloramphénicol) ; *LEU2*, marqueur d'auxotrophie pour la leucine ; CEN6, région centromérique du chromosome 6, *Ap*, gène de résistance à l'ampicilline. La flèche indique la position du codon d'initiation de traduction.

Par recombinaison spécifique de site entre un plasmide d'entrée dans lequel le gène à exprimer est cloné et les vecteurs de destination, on obtient des fusions transcriptionnelles permettant l'expression du gène d'intérêt sous contrôle du promoteur de *RLP24*. Les protéines

produites possèdent, dans leur partie N-terminale, 18 acides aminés supplémentaires provenant du site de recombinaison (MGPELGTHQTSLYKKAGL).

5.3. Clonages dans des vecteurs d'expression « classiques »

Certains gènes ont également été clonés par des techniques « classiques », c'est-à-dire que les fragments amplifiés par PCR sur ADN génomique ont été introduits au site multiple de clonage des vecteurs choisis par digestion avec des enzymes de restriction puis ligature. Cette technique a principalement été utilisée pour le clonage de gènes entiers sous contrôle de leurs propres séquences régulatrices et terminatrices.

Les génotypes des plasmides ainsi obtenus sont répertoriés dans la Table 2.

Nom	Type	Plasmide père	Insert	Résistance	ADN source	Sites	Oligonucléotides
pAS2ΔΔ-NOG1	2μ	pAS2ΔΔ	*NOG1*	TRP1	pGEX-NOG1	*Nco*I-*Sal*I	
pAS2ΔΔ-RLP24	2μ	pAS2ΔΔ	*RLP24*	TRP1	pGEX-RLP24	*NcoI*-*Sal*I	
pACTII-RLP24	2μ	pACTIIst	*RLP24*	LEU2, Ap	pGEX-RLP24	*Nco*I-*Xho*I	
pAL01	CEN	pGID	*NOG1*	URA3, Ap	pAL11	*Not*I-*Bam*HI	
pAL04	CEN	pGID	*RLP24*	URA3, Ap	pAL14	*Not*I-*Bam*HI	
pAL11	B	pCR2.1-TOPO	*NOG1*	Km, Ap	PCR génomique		AL11-12
pAL14	B	pCR2.1-TOPO	*RLP24*	Km, Ap	PCR génomique		AL9-10
pAL24	2μ	pFL46sII	*RLP24*	LEU2, Ap	pAL04	*Not*I-*Bam*HI	
pAL26	CEN	pFL46sII	*NSA2*	LEU2, Ap	pAL46	*Bam*HI-*Pst*I	
pAL26-h	CEN	pFL46sII	P_{NSA2}-*TINP1*	LEU2, Ap	pAL66-h	*Bam*HI-*Pst*I	
pAL41	2μ	pFL44sII-ADE8	*NOG1*	URA3, Ap, ADE8	pAL01	*Not*I-*Bam*HI	
pAL44	2μ	pFL44sII-ADE8	*RLP24*	URA3, Ap, ADE8	pAL04	*Not*I-*Bam*HI	
pAL46	2μ	pFL44sII-ADE8	*NSA2*	URA3, Ap, ADE8	PCR génomique	*Bam*HI-*Pst*I	MFR492-493
pAL46-h	2μ	pFL44sII-ADE8	P_{NSA2}-*TINP1*	URA3, Ap, ADE8	pAL66-h	*Bam*HI-*Pst*I	
pAL47	2μ	pFL44sII	*EFL1*	URA3, Ap	PCR génomique	*Pst*I-*Not*I	AL129-130
pAL47-1	2μ	pAL47	*efl1(T33A)*	URA3, Ap	PCR sur pAL47		AL139-140
pAL47-2	2μ	pAL47	*efl1(A26V)*	URA3, Ap	PCR sur pAL47		AL141-142
pAL48	2μ	pFL44sII	*TIF6*	URA3, Ap	PCR génomique	*Pst*I-*Not*I	AL131-132
pAL61	CEN	pFL36cII	*NOG1*	LEU2, Ap	pAL01	*Not*I-*Bam*HI	
pAL61-1	CEN	pFL36cII	*nog1-1*	LEU2, Ap	PCR mutagène sur pAL01		FP4-5
pAL61-2	CEN	pFL36cII	*nog1-2*	LEU2, Ap	PCR mutagène sur pAL01		FP4-5
pAL61-3	CEN	pFL36cII	*nog1-3*	LEU2, Ap	PCR mutagène sur pAL01		FP4-5
pAL61-4	CEN	pFL36cII	*nog1-4*	LEU2, Ap	PCR mutagène sur pAL01		FP4-5
pAL61-5	CEN	pFL36cII	*nog1-5*	LEU2, Ap	PCR mutagène sur pAL01		FP4-5
pAL64	CEN	pFL36cII	*RLP24*	LEU2, Ap	pAL04	*Not*I-*Bam*HI	
pAL66	CEN	pFL36cII	*NSA2*	LEU2, Ap	pAL46	*Bam*HI-*Pst*I	
pAL66-h	CEN	pAL66	P_{NSA2}-*TINP1*	LEU2, Ap	PCR sur ADNc et pAL66		AL125-126-127-128
pAL76	B	pET16b	*NSA2*	Ap	PCR génomique	*Nco*I-*Xho*I	AL28-29
pAL86	B	pGEX4676	*NSA2*	Ap	PCR génomique	*Nco*I-*Xho*I	AL28-29

Table 2 : Plasmides construits par des techniques de clonage « classique » au cours de cette étude. CEN : plasmide centromérique ; B : plasmide pour expression en cellules bactériennes ; Ap, cassette de résistance à l'ampicilline ; Km, cassette de résistance à la kanamycine. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont détaillées dans la **Table 3**.

En plus des gènes sauvages clonés dans ces vecteurs, un certain nombre d'allèles mutants ont été obtenus. Les mutants thermosensibles de *NOG1* ont été obtenus par PCR mutagène. Les mutants ponctuels des GTPases, les chimères *RLP24-RPL24* et la fusion transcriptionnelle P_{NSA2}-*TINP1* ont été obtenues par PCR « haute fidélité » successives avec des amorces chevauchantes. Pour les mutants ponctuels et les chimères, le produit de PCR

final comprenait la séquence du gène à cloner avec des sites de restriction adéquats. Pour pAL66-h (Figure 61), le produit de PCR recouvrait la séquence totale du plasmide père pAL66, en intégrant *TINP1* à la place de *NSA2*.

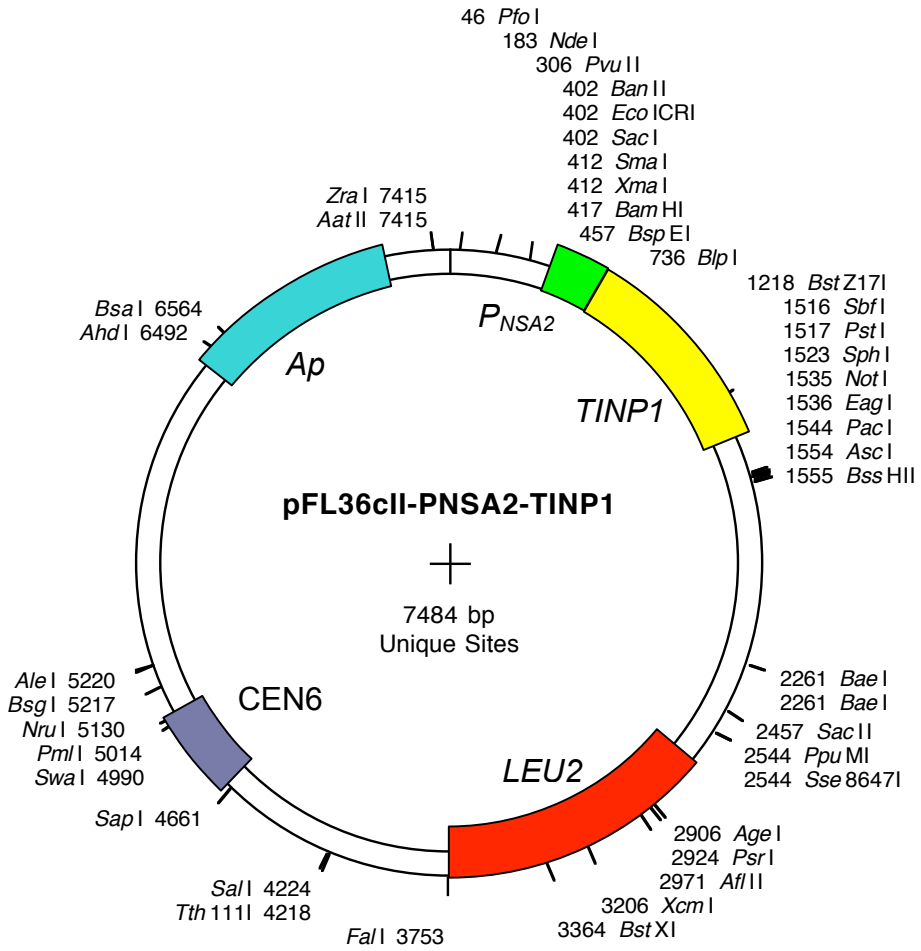


Figure 61 : Carte de restriction du plasmide pAL66-h. Il s'agit d'un plasmide centromérique portant le marqueur d'auxotrophie *LEU2*, et permettant l'expression du gène humain *TINP1* sous contrôle du promoteur de *NSA2*.

6. Oligonucléotides utilisés au cours de cette étude

Nom	taille	gène	for/rev	nature	séquence
AL9	19	*RLP24*	for	-324 > -305 5'UTR	TGGTCCGATTCTCGCTCTT
AL10	20	*RLP24*	rev	+239 > +120 3'UTR	AGAATGTAAGAGGACCCTTG
AL11	20	*NOG1*	for	-220 > -201 5'UTR	AACGACACGTCTATTCCGTC
AL12	20	*NOG1*	rev	+249 > +230 3'UTR	GGGTCGGCTTGTTGGATAAT
AL28	28	NSA2	for	PCR génomique + *Nco*I	catgCCATGGacaacgaaacaATGCCTC
AL29	27	NSA2	rev	PCRgénomique + *Xho*I	ccgCTCGAGttgcTCATACAAGCAAAA
AL63	27	*NOG1-GDP*	for	PCR, mutation (S181N)	TGTCGGTAAGaaCTCGTTTTTGAGATG
AL64	27	*NOG1-GDP*	rev	PCR, mutation (S181N)	CAAAAACGAGttCTTACCGACATTTGG
AL65	27	*NOG1-GTP*	for	PCR, mutation (P176V)	CTGTGGTTATgtAAATGTCGGTAAGTC
AL66	27	*NOG1-GTP*	rev	PCR, mutation (P176V)	ACCGACATTTacATAACCACAGATCAG
AL76	30	*RLP24/rpl24b*	for	RLP24(106>117), rpl24b(118>135)	TGTCACAAGGCAttcaaacaaagaaagaac
AL77	30	*RLP24/rpl24b*	rev	rpl24b(129>118), RLP24(117>100)	tctttgtttgaaTGCCTTGTGACACTTAGA
AL78	30	*RLP24/rpl24b*	for	rpl24b(106>117), RLP24(118>135)	tctgcttctttgTTCAAGCAACGTCGTAAC
AL79	30	*RLP24/rpl24b*	rev	RLP24(129>118), rpl24b(117>100)	ACGTTGCTTGAAcaaagaagcagatttgga
AL80	30	*RLP24/rpl24b*	for	RLP24(436>447), rpl24b(427>444)	GCTAAAGAACAAgctaagggtgctttccaa
AL81	30	*RLP24/rpl24b*	rev	rpl24b(438>427), RLP24(447>430)	agcacccttagcTTGTTCTTTAGCCAACTT
AL82	30	*RLP24/rpl24b*	for	rpl24b(415>426), RLP24(448>465)	tccaagcaacaaGAAAGAGCTGAATCAGTA
AL83	30	*RLP24/rpl24b*	rev	RLP24(459>448), rpl24b(426>409)	TTCAGCTCTTTCttgttgcttggaaacctt
AL84	27	P_{RLP24}	for	PCR P_{RLP24}, *Sac*I	CGAGCTCtggtccgattctcgctcttt
AL85	33	P_{RLP24}	rev	PCR P_{RLP24}, *Apa*I, *Sac*I	CGAGCTCgggcccCATtttttatacttactaa
AL125	30	pFL/*TINP1*	for	pFL36- P_{NSA2} (586>597), *TINP1*(1>18)	tacaacgaaacaATGCCACAGAATGAATAT
AL126	30	pFL/*TINP1*	rev	pFL36- P_{NSA2} (1395>1384), *TINP1*(783>766)	gcactttttgcTCAAACCAGTAAGACTGC
AL127	30	*TINP1*/pFL	for	*TINP1*(772>783), pFL36-P_{NSA2}(1384>1401)	TTACTGGTTTGAgcaaaaaagtgctccgtt
AL128	30	*TINP1*/ pFL	rev	*TINP1*(12>1), pFL36-P_{NSA2}(597>580)	ATTCTGTGGCATtgtttcgttgtatatatc
AL129	29	*EFL1*	for	-274 > -255 5'UTR + *Pst*I	CAGCGCTGCAGTCGGGCTTATCAGACATC
AL130	29	*EFL1*	rev	+469 > +450 3'UTR + *Not*I	CAGCGGCCGCCTCCACAGATGCATTAGTC
AL131	29	*TIF6*	for	-355 > -336 5'UTR + *Pst*I	GCGCTGCAGCACCTATTTCACTGGCATGG
AL132	29	*TIF6*	rev	+336 > +317 3'UTR + *Not*I	AGCGGCCGCAGAAGCGGACGGAAAATCCA
AL139	22	*efl1(T33A)*	for	PCR, mutation T33A	CACGGTAAAgctTCACTTTCAG
AL140	22	*efl1(T33A)*	rev	PCR, mutation T33A	CTGAAAGTGAagcTTTACCGTG
AL141	25	*efl1(A26V)*	for	PCR, mutation A26V	GTATTGTTgTtCATGTTGATCACGG
AL142	25	*efl1(A26V)*	rev	PCR, mutation A26V	CCGTGATCAACATGaAcAACAATAC
CS3	19	ARNr	rev	Northern 7S (position 3055-73)	GGCCAGCAATTTCAAGTTA
CS5	24	ARNr	rev	Northern 5,8S (position 2913-36)	CGGAATTCTGCAATTCACATTACG
CS8	18	ARNr	rev	Northern 25S (position 3288-3305)	CTCCGCTTATTGATATGC
CS10	21	ARNr	rev	Northern 27S (position 3207-28)	CGCCTAGACGCTCTCTTCTTA
CS14	20	ARNr	rev	Northern 18S (position 732-751)	CATGGCTTAATCTTTGAGAC
CS19	19	ARNr	rev	Northern 35S	GTTTGACGAGGCCATTTAC
FP4	27	pFL	for	PCR mutagène sur pFL36/38	AGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATC
FP5	21	pFL	rev	PCR mutagène sur pFL36/38	CGACTGGAAAGCGGGCAGTGA
GaW1	31	attB1	For	Clonage Gateway, PCR2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTG
GaW2	30	attB2	rev	Clonage Gateway, PCR2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
MFR422	16	ARNr	rev	Northern 5S	CTACTCGGTCAGGCTC
MFR492	24	*NSA2*	for	PCR génomique + *Bam*HI	CGGGATCCGCAACGGTTCTAGTAA
MFR493	25	*NSA2*	rev	PCR génomique + *Pst*I	AACTGCAGGAACAGGACAGAGCGTA
MFR457	23	snARN U2	rev	Northern + PE	GCTTAAAAAGTCTCTTCCCGTCC
MFR520	21	snARN U3	rev	Northern + PE	CCAAGTTGGATTCAGTGGCTC

Table 3 : Oligonucléotides utilisés au cours de cette étude. *PE*, extension d'amorce (*Primer Extension*) ; *for* et *rev*, oligonucléotides dont la séquence est, respectivement, dans le même sens que le transcrit (*forward*) ou complémentaire au transcrit (*reverse*) ; *5'* et *3'UTR*, séquences 5' et 3' non transcrites. Les oligonucléotides utilisés pour les constructions ou vérifications de souches, les séquençages, ou les clonages par stratégie Gateway ont été omis.

RESUME

Les travaux de ce mémoire portent sur la dynamique d'assemblage, de dissociation et de recyclage des protéines impliquées dans la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ils permettent une meilleure compréhension de deux points de contrôle de cette voie métabolique, l'un dans le noyau, l'autre dans le cytoplasme.

Nous avons montré que la protéine nucléaire Nsa2, extrêmement conservée chez les Eucaryotes, est requise pour la maturation correcte de l'intermédiaire d'ARN ribosomique 27SB. Nsa2 est un facteur instable et régulé en fonction de l'activité de la biogenèse des ribosomes ; à ce titre, il pourrait centraliser différents signaux de contrôle de la voie métabolique. Par ailleurs, la technique de SILAC nous a permis de définir des groupes de facteurs pré-ribosomiques précoces ou tardifs par rapport au point d'action de Nsa2.

Dans le cytoplasme, nous avons mis en évidence un réseau de protéines marquant la transition entre la fin de la biogenèse de la grande sous-unité et l'initiation de la traduction. La protéine cytoplasmique Rei1 et la ß-karyophérine Kap121 sont requises pour le recyclage du dimère de facteurs navettes Arx1-Alb1, du cytoplasme vers le noyau. Ce recyclage conditionne la dissociation entre le facteur d'anti-association Tif6 et la grande sous-unité ribosomique, qui peut dès lors se lier à la petite sous-unité ribosomique et participer à la traduction.

ABSTRACT

This work focuses on the dynamics of assembly, dissociation and recycling of proteins involved in the biogenesis of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. It sheds some light on two control points in this metabolic pathway, localised in the nucleus and the cytoplasm respectively.

We have shown that the nuclear protein Nsa2, which is very conserved throughout the eukaryotic kingdom, is required for the correct maturation of the 27SB ribosomal RNA precursor. Nsa2 is an unstable factor, regulated in correlation with the activity of ribosome biogenesis; it thus constitutes a good candidate for the integration of various signals resulting in the regulation of this metabolic pathway. Besides, using the SILAC technique, we could define groups of early or late acting factors relative to the Nsa2 action time.

In the cytoplasm, we identified a protein network, which marks the end of ribosome biogenesis and triggers the entry of new ribosomal subunits into translation. The cytoplasmic protein Rei1 and the ß-karyopherin Kap121 are both required for the recycling from the cytoplasm to the nucleus of a dimer of shuttling factors, Arx1-Alb1. This recycling enables the dissociation of the anti-association factor Tif6 from the large ribosomal subunit, which can consequently bind the small ribosomal subunit and enter translation.