



HAL
open science

Etudes structurales et fonctionnelles de complexes entre Trm112 et différentes méthyltransférases impliquées dans la traduction

Juliette Létouquart

► **To cite this version:**

Juliette Létouquart. Etudes structurales et fonctionnelles de complexes entre Trm112 et différentes méthyltransférases impliquées dans la traduction. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT: 2014PA114821 . tel-01845687

HAL Id: tel-01845687

<https://theses.hal.science/tel-01845687>

Submitted on 20 Jul 2018

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

DISCIPLINE :

STRUCTURE, FONCTION ET INGÉNIERIE DES PROTÉINES

ANNÉE 2013 - 2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1282

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 17/09/2014

par

Juliette LÉTOQUART

Etudes structurales et fonctionnelles de complexes entre Trm112 et différentes méthyltransférases impliquées dans la traduction

Directeur de thèse : Marc GRAILLE Directeur de recherche CNRS (Ecole Polytechnique, Palaiseau)
Co-directeur de thèse : Dominique LIGER Maître de conférences (Université Paris-Sud, Orsay)

Composition du jury :

Président du jury :

Rapporteurs :

Examineurs :

Jean CAVARELLI
Yuri MOTORIN

Béatrice GOLINELLI
Bertrand SÉRAPHIN
Herman VAN TILBEURGH

Professeur (Université de Strasbourg, Illkirch)
Professeur (Université de Lorraine, Nancy)
Directeur de recherche CNRS (Collège de France, Paris)
Directeur de recherche CNRS (IGBMC, Illkirch)
Professeur (Université Paris-Sud, Orsay)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail, ainsi que toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'accomplissement de ma thèse.

Particulièrement, j'adresse un immense MERCI à mes deux directeurs de thèse, Marc Graille & Dominique Liger, un duo de choc, deux encadrants bienveillants, disponibles, brillants, passionnés, passionnants, débordant de connaissances et d'envie de les partager. J'ai passé trois années géniales, merci de m'avoir donné ma chance, pour cette synergie de trio et toute cette bonne énergie. A côté des points communs qui permettent de vous associer, la force du duo est aussi fondée sur vos différences. Merci Marc pour toutes tes idées, tes conseils, ton organisation, ta réactivité et les challenges. Merci Dom pour tes phrases rassurantes, ta pédagogie, ta patience, tes encouragements et ton humour.

Un grand MERCI aussi à mon premier chef, Bertrand Séraphin, sans qui rien ne serait arrivé. Merci pour ton soutien, tes recommandations, ta confiance et toutes tes qualités scientifiques et humaines.

Je remercie Herman van Tilbeurgh de m'avoir accueillie au sein de son équipe FAAM pendant la première année de thèse ainsi que pour les conseils concernant les questions d'avenir. Merci à Yves Méchulam pour l'accueil dans le Laboratoire de Biochimie et pour l'intégration dans l'équipe enseignante de l'Ecole Polytechnique.

Merci à tous mes collègues de l'équipe FAAM : Nouredine pour ta gentillesse, ton soutien, tes conseils avisés et le partage de ton savoir et de ton expérience ; Inès pour ton aide en cristallographie, pour ton calme, ta disponibilité et ton sourire ; Bruno pour ton savoir-faire MALLS et ta bonne humeur ; Et bien sûr, merci à tous ceux de l'équipe avec qui j'ai pu échanger et partager de bons moments : Sophie, Karine, Andrea, Marion, Dyana, Cynthia, Véronika, Sylvie, Antoine, Miao. Un merci particulier à Joseph ou Rocépé, pour ses talents de chanteur et d'informaticien, ses blagues, sa bonne humeur, son écoute et j'en passe... A Wenhua pour sa bonne humeur et les échanges franco-chinois qui ouvrent l'esprit. Merci aussi à Johnny pour sa simplicité, sa gentillesse, ses bons conseils et sa force de croire en ses rêves.

Merci aux collègues des autres équipes de l'IBBMC : Michel Desmadril pour l'accueil dans son laboratoire, l'équipe MIP et spécialement Magali pour son savoir-faire ITC et sa gentillesse, Marielle, Agathe et Thibaut, mais aussi Marie-Hélène, Zahra, Romain, Stéphanie... Un merci tout particulier à Pierre-Christian, Cathy et Amel pour tous ces bons moments partagés, pour leur simplicité et leur bonne humeur et cette ambiance au sein de ce petit groupe bien agréable et bien sûr merci à Anne pour tout ça mais aussi pour ton authenticité, ton énergie et ta joie de vivre.

Je remercie également tous mes collègues de BIOC : Pierre, Catherine, Marc, Clara, Thomas, Karène, Zoltan, Cédric, Aza et Loreline... Un merci spécial à Emma, Titine, Michou, Michel et Mimi pour l'accueil dans le labo et tous leurs bons conseils ; Merci à Alexey pour les jolis modèles structuraux, à David pour sa patience et son savoir en informatique, à Auriane pour les anecdotes félines, à Guillaume pour sa culture musicale et son savoir faire technique et créatif, à Pascale pour sa bonne humeur et sa gentillesse et à Pascal pour les moments partagés en courant, à Mélanie pour sa disponibilité, son efficacité et sa bonne humeur, à Hervé pour son énergie et tous ses échanges enrichissants, à Etienne pour sa simplicité, le partage des expériences de rando et la cohésion Ch'ti, à Clément pour son humour piquant et son esprit vif, à Vonny pour sa gentillesse et pour tout le travail accompli sur le projet Trm112 & Co, à Pierre-Damien pour son calme, sa gentillesse, son ouverture d'esprit, sa simplicité, ses conseils, le partage d'expériences de connaissances, et pour tous les bons moments de course à pied, merci aussi à Anne-Gaëlle pour les échanges et les bons contacts. Un grand MERCI aux lorrains, Gaby et Régis, mes chers voisins de bureau, merci pour vos conseils, le partage de vos savoirs & savoir-faire nancéens ; Merci Gaby pour ton aide pour la biogenèse du ribosome, pour ta simplicité, ton humour, ta gentillesse et ta joie de vivre :D ; Merci Régis pour ton calme, tes paroles rassurantes, ton esprit de précision et toutes les taquineries ;). MERCI beaucoup à Zaineb, ce déménagement nous a rapprochées et ce fut un plaisir d'apprendre à te connaître, merci pour tous tes sages conseils, pour ta simplicité, le partage de ton expérience, pour ton soutien dans les moments délicats et pour ces bons moments avec ou sans Patrick ;).

Merci à mes collègues du monitorat : Julia, Kamel, Théo et à Catherine particulièrement pour son efficacité.

Je remercie mes collègues du LOB. Merci Roxane pour cette super collaboration, de m'avoir fait découvrir *Haloferax*, pour avoir relu et corrigé une partie de ma prose, pour tes conseils et les divers échanges toujours enrichissants. Merci Floriane pour toutes les boites de pétri, pour les discussions partagées, pour ton humour et pour ta personnalité ;).

Je tiens également à remercier tous les collaborateurs. Merci à Mélanie pour la note chimique, à Denis pour les échanges sur la biogenèse du ribosome, à Valérie pour cette collaboration enrichissante et pour le transfert de savoir-faire des tests de méthylation, à Emeline pour cette super purif qui a mené à la structure de Bud23.

Merci aussi à Marie-Claire pour m'avoir enseigné l'art des EMSA, et merci à l'équipe de Doménico Libri de m'avoir accueillie pour la réalisation de ces manips.

Au cours de ma thèse, j'ai également eu le plaisir d'échanger avec les anciens et nouveaux de la Bertrand's team, merci à Céline, Francesca, Hervé, Mano, Maria, Alice, Jérôme, Fabienne, Tonnie et Valério.

Je tiens particulièrement à remercier mes anciens collègues de GB. Merci à Macha et Sabine d'avoir convaincu Marc de me laisser faire ce fameux bilan de compétences ; Merci à Lan, JB, Tigrou, Sonia, Flo et Lulu pour leur soutien quand j'ai fait le choix de me lancer dans cette grande aventure, et merci pour toutes les attentions au cours de ces 3 ans.

Un énorme MERCI à Romain ! Sans toi je serai aujourd'hui peut-être prof en collège en train de préparer mon cours sur « qu'est-ce qu'une fleur ? » ;) Tu as été la personne déterminante ! Merci d'avoir donné de ton temps si précieux pour discuter avec moi. L'œil du tigre, ça ne s'oublie pas!

Un grand MERCI à Thomas. Tu m'as toujours encouragée, soutenue, tu as toujours cru en moi et cela m'a donné la force de franchir ce premier pas vers le doctorat. Merci pour ça et pour tout le reste !

Je tiens aussi à remercier ma famille formidable : Maman, Papa, merci pour tout votre amour et toutes ces valeurs que vous m'avez transmises et qui font ma force à ce jour. Merci également pour la relecture du manuscrit. Merci à Mamy Paulette et une pensée toute spéciale pour Mamy Jacqueline. Merci à Tonton Jeannot pour ses conseils et son soutien tout au long de mes études qui s'achèvent bientôt. Merci à Katy pour son soutien et toutes ses bonnes soirées entre cousines.

Merci à mes amis, voisins et êtres chers : Diane pour ton soutien et pour les bols d'air et de soleil du sud, Vieux pour la relecture des 30 premières pages et d'être toujours là, Guigui pour ton soutien, ton écoute, ta bienveillance et pour tous ces bons moments à la coloc, les dominos-Rocky... Merci à Ysaline & Fred, Xavier & Julia, Franck & Danielle, des couples d'amis qui me sont chers. Merci à Sacha pour ces échanges franco-russes et ses repas et évènements de l'X. Merci à Mélie, mon amie de toute la vie & César pour ces super vacances en Argentine ; Merci à Vincent pour m'avoir inspirée et pour l'étincelle « *Et si vous commenciez à vivre ?* ». Merci à Pluton et à Happy pour tous les câlins et les ronrons, des rigolos plein de poils qui prennent une grande place dans mon cœur !

Je tiens aussi à remercier Jean-Jacques, Rocky, Patrick, Frédéric Lenoir et Sarah W_Papsun !

Et le plus important pour la fin... Un immense MERCI à Mylène... mais comme le dit si bien JJG : « *Je ne vous parlerai pas d'elle...* »... Ce serait trop long et trop humide !

LISTE DES ABREVIATIONS

aa-RS :	« amino-acyl tRNA Synthetase »
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomique
ARNt :	ARN de transfert
BSA:	« Bovin Serum Albumine »
CBC :	« Cap Binding Complex »
cm ⁵ U :	5-carboxymethylUridine
co-IP	co-ImmunoPrécipitation
dNTPs :	desoxyNucléotides TriPhosphates
eEF :	« eukaryotic Elongation Factor »
eIF :	« eukaryotic Initiation Factor »
eRF :	« eukaryotic Release Factor »
ETS :	« External Transcribed Spacer »
HU :	HydroxyUrée
ITS :	« Internal Transcribed Spacer »
MAD :	« Multiwavelength Anomalous Dispersion »
mcm ⁵ U :	5-methoxycarbonylmethylUridine
MMS :	MéthylMéthane Sulphonate
MTase :	MéthylTransferase
NOR :	Région Organisatrices du Nucléole
NTS :	« Non Transcribed Spacer »
RNP :	RiboNucléo Protéine
PEG :	PolyEthylène Glycol
Poly(A) :	Poly-Adénosine
PTC :	« PeptidylTransferase Center »
RFLP :	« Restriction Fragment length polymorphism »
RNR :	RiboNucléotide Réductase
RRM :	« RNA recognition motifs »
SAH :	S-Adénosyl-Homocystéine
SAM :	S-Adénosyl-Méthionine
snoRNA :	« small nucleolar RNA »
snoRNP :	« small nucleolar RNP »
WT :	« Wild Type »

Sommaire

SOMMAIRE

Remerciements.....	
Liste des abréviations.....	
Sommaire.....	
Avant-propos.....	- 1 -
INTRODUCTION	
1. La traduction chez les eucaryotes.....	- 3 -
1.1. Les acteurs	- 3 -
1.1.1. L'ARN messager	- 3 -
1.1.1.1. Une coiffe à l'extrémité 5'	- 3 -
1.1.1.2. Une queue poly(A) à l'extrémité 3'.....	- 4 -
1.1.1.3. Un épissage des introns.....	- 4 -
1.1.2. Les ARN de transfert.....	- 4 -
1.1.2.1. La structure des ARNt	- 5 -
1.1.2.2. Fonctions des ARNt.....	- 7 -
1.1.3. Le ribosome	- 8 -
1.2. Les étapes de la traduction chez les eucaryotes	- 9 -
1.2.1. L'initiation	- 9 -
1.2.2. L'élongation	- 9 -
1.2.3. La terminaison	- 10 -
1.2.4. Le recyclage	- 12 -
1.3. Archées & eucaryotes : des traductions proches	- 12 -
2. Trm112 et ses 4 méthyltransférases Partenaires	- 14 -
2.1. Méthylations et méthyltransférases.....	- 14 -
2.1.1. La méthylation, une modification omniprésente.....	- 14 -
2.1.2. Présentation de la SAM	- 15 -
2.1.3. Les MTases dépendantes de la SAM	- 16 -
2.1.3.1. Les MTases de classe I	- 16 -
2.1.3.2. Les MTases de classe II à V	- 17 -
2.1.4. Mécanisme enzymatique	- 18 -
2.1.5. Les MTases indépendantes de la SAM	- 20 -
2.2. Trm112 interagit avec et active 4 MTases.....	- 21 -
2.2.1. Trm112 possède un domaine en doigt de zinc conservé.....	- 21 -
2.2.2. Trm112 seule forme un homodimère	- 22 -
2.2.3. Trm112 : une plateforme d'activation d'enzymes impliquées dans la traduction.....	- 23 -
2.2.3.1. Quatre partenaires connus impliqués dans la traduction.....	- 23 -

2.2.3.2. D'autres partenaires ?	- 24 -
2.2.3.3. Systèmes similaires	- 24 -
3. Mtq2-Trm112 et la terminaison de la traduction	- 25 -
3.1. Le motif GGQ est universel et méthylé.....	- 25 -
3.2. Orthologue bactérien prmC.....	- 26 -
3.3. Le complexe Mtq2-Trm112.....	- 27 -
3.3.1. Les eucaryotes ont recours à Trm112	- 27 -
3.3.2. Description de la structure cristallographique de EcMtq2-Trm112.....	- 28 -
3.3.3. Description de l'interface	- 28 -
3.3.4. Analyse du site actif.....	- 29 -
3.4. Mtq2-Trm112 : un modèle pour les autres complexes	- 30 -
4. Bud23-Trm112 et la biogenèse du ribosome.....	- 32 -
4.1. La biogenèse du ribosome chez les eucaryotes.....	- 32 -
4.1.1. Le nucléole : lieu de synthèse des ARNr.....	- 32 -
4.1.2. Organisation des ADNr et transcription	- 33 -
4.1.3. Premier clivage et formation de la particule 90S.....	- 34 -
4.1.4. Formation de la particule pré-40S.....	- 34 -
4.1.4.1. Du pré-ARN 35S au pré-ARN 20S.....	- 34 -
4.1.4.2. Une machinerie de maturation : le SSU-processome	- 34 -
4.1.4.3. Rôle spécifique des snoRNP.....	- 35 -
4.1.5. Export et assemblage de la sous-unité 40S.....	- 36 -
4.1.6. Modifications des ARNr	- 37 -
4.2. Dhr1 et Bud23, deux enzymes impliquées dans la maturation de la sous-unité 40S.....	- 38 -
4.2.1. L'hélicase Dhr1.....	- 38 -
4.2.1.1. Les ARN hélicases à boîtes DEAD/H.....	- 38 -
4.2.1.2. Dhr1 s'associe à la snoRNP U3.....	- 39 -
4.2.2. La MTase Bud23.....	- 40 -
4.2.2.1. Bud23 modifie la guanosine 1575 de l'ARNr 18S.....	- 40 -
4.2.2.2. Bud23 et la biogenèse de la sous-unité 40S.....	- 40 -
4.2.2.3. Bud23 d'un point de vue structural.....	- 41 -
4.3. Interaction Bud23 – Trm112 – Dhr1	- 41 -
4.3.1. Trm112 interagit avec et active Bud23	- 42 -
4.3.1.1. Chez <i>S. cerevisiae</i>	- 42 -
4.3.1.2. Chez les eucaryotes supérieurs	- 42 -
4.3.2. Bud23-Trm112 interagit avec Dhr1	- 43 -
5. Trm112 et la modification des ARNt.....	- 44 -
5.1. Biosynthèse des ARNt.....	- 44 -

5.1.1.	Transcription & formation des extrémités.....	- 44 -
5.1.2.	Epissage de l'intron.....	- 45 -
5.1.3.	Modifications des ARNt.....	- 46 -
5.1.3.1.	Les nucléotides modifiés des ARNt.....	- 47 -
5.1.3.2.	Fonctions des modifications.....	- 48 -
5.1.3.3.	Les enzymes de modification.....	- 50 -
5.1.3.4.	Localisation cellulaire.....	- 51 -
5.1.4.	Amino-acylation des ARNt.....	- 51 -
5.2.	Trm11-Trm112 méthyle la Guanosine en position 10 des ARNt.....	- 52 -
5.2.1.	Formation de m ² G ₁₀	- 52 -
5.2.2.	Trm11 d'un point de vue structural.....	- 53 -
5.2.3.	Rôle de cette modification.....	- 53 -
5.3.	Trm9-Trm112 modifie l'Uridine 34 de certains ARNt.....	- 55 -
5.3.1.	La formation de la mcm ⁵ (s ²)U ₃₄	- 55 -
5.3.2.	Un outil : la zymocine.....	- 56 -
5.3.3.	Le complexe Trm9-Trm112 d'un point de vue structural.....	- 57 -
5.3.4.	Rôle de la modification.....	- 58 -
5.3.4.1.	D'un point de vue moléculaire.....	- 58 -
5.3.4.2.	Trm9 et les stress génotoxiques.....	- 58 -
5.3.4.3.	Réparation ADN et RNR.....	- 58 -
5.3.5.	Deux orthologues humains impliqués dans plusieurs cancers.....	- 60 -

OBJECTIFS DE LA THESE

Objectifs de la thèse.....	- 61 -
----------------------------	--------

RESULTATS & DISCUSSION

1^{re} partie : Etude structurale et fonctionnelle du complexe Trm9-Trm112 de levure

1.	Vers la structure du complexe Trm9-Trm112 de <i>Yarrowia lipolytica</i>	- 64 -
1.1.	Dégradation de Y/Trm9-Trm112 et formes tronquées.....	- 64 -
1.1.1.	Analyse de la protéolyse naturelle du complexe Y/Trm9-Trm112.....	- 64 -
1.1.2.	Formes tronquées de Y/Trm9.....	- 65 -
1.2.	Expression et purification du complexe Y/Trm9N38-Trm112.....	- 65 -
1.3.	Cristallisation du complexe Y/Trm9N38-Trm112.....	- 66 -

1.4.	Résolution de la structure du complexe <i>Y</i> Trm9N38-Trm112	67 -
1.4.1.	Diffraction, collecte des jeux de données	67 -
1.4.2.	Traitement des données.....	68 -
1.4.3.	Phasage et obtention des cartes de densité électronique.....	72 -
1.4.4.	Construction du modèle dans les cartes expérimentales	73 -
1.4.5.	Amélioration de la résolution.....	73 -
1.4.6.	Affinement.....	74 -
2.	Etude du complexe <i>in vivo</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76 -
2.1.	Cartographie du site actif.....	76 -
2.1.1.	Stratégie pour cibler les résidus du site actif de Trm9-Trm112	76 -
2.1.2.	Construction de souches possédant une version mutée de <i>TRM9</i>	77 -
2.1.3.	Phénotype de résistance à la zymocine des souches mutantes	79 -
2.1.4.	Nouveaux résidus cibles de mutations basés sur la structure cristallographique du complexe <i>Y</i> Trm9N38-Trm112	79 -
2.1.5.	Analyses approfondies des complexes mutés <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	80 -
2.1.6.	Etude de l'interaction Trm9-Trm112 /ARnt.....	82 -
2.2.	Etude de complémentation	84 -
2.2.1.	Construction des souches pour l'étude de complémentation.....	84 -
2.2.2.	Test de résistance à la zymocine par effet dose	86 -
3.	Manuscrit soumis à PNAS pour publication le 10 juillet 2014.....	87 -
4.	Effet des drogues et stress génotoxiques	88 -
4.1.	Effet du MMS et de la bléomycine sur la croissance.....	88 -
4.2.	MMS vs bléomycine & mécanismes de réparation impliqués	88 -
4.3.	Perspectives : Niveau d'expression de Rnr3.....	89 -

2^e partie : Trm112 chez *Haloferax volcanii*

1.	<i>Haloferax volcanii</i> : un organisme modèle.....	90 -
2.	Etude du complexe <i>Hvo</i> Trm9-Trm112 <i>in vitro</i>	90 -
2.1.	Expression du complexe <i>Hvo</i> Trm9-Trm112.....	91 -
2.2.	Analyse de l'état d'oligomérisation par SEC-MALLS.....	92 -
2.3.	Confirmation de la composition du complexe par spectrométrie de masse	93 -
2.4.	Activité enzymatique de <i>Hvo</i> Trm9-Trm112.....	93 -
3.	Etudes <i>in vivo</i> chez <i>Haloferax volcanii</i>	94 -
3.1.	Construction de souches.....	94 -
3.1.1.	Construction des plasmides.....	94 -
3.1.2.	Pop-in pop-out.....	95 -
3.1.3.	Criblage	96 -

3.2. Analyse de la croissance	97 -
4. Conclusions et perspectives	97 -

3^e partie : Etude structurale du complexe Bud23-Trm112 de levure

1. Vers la structure du complexe Bud23-Trm112+/-SAM	99 -
1.1. Cristallisation du complexe ScBud23C202-Trm112	99 -
1.2. Résolution de la structure de ScBud23C202-Trm112 à 2Å	100 -
1.2.1. Résolution de la structure à 2,4 Å	100 -
1.2.2. Amélioration de la résolution à 2 Å et affinement	102 -
1.3. Résolution de la Structure de ScBud23C202-Trm112-SAM à 2,2Å	102 -
2. Manuscrit soumis à PNAS pour publication le 10 juillet 2014	104 -

CONCLUSION, DISCUSSION & PERSPECTIVES

1. Le complexe Trm9-Trm112	105 -
1.1. Trm9-Trm112 : retour sur les principaux résultats	105 -
1.2. Perspectives : vers une validation du modèle	106 -
1.3. Interaction Trm9-Trm112/ARNt	107 -
1.4. Trm9 chez les procaryotes	109 -
2. Trm112 : plateforme d'activation	111 -
2.1. Trm112 et ses 4 partenaires : retour sur les principaux résultats	111 -
2.2. Comparaison structurale avec d'autres MTases hétérodimériques	111 -
2.3. Perspectives : Etudes <i>in vivo</i> de la régulation de la plateforme d'activation	113 -

MATERIEL & METHODES

1. Matériel	114 -
1.1. Les Souches	114 -
1.1.1. Les souches d' <i>E. coli</i>	114 -
1.1.2. Les souches de levures	114 -
1.1.3. Les souches d' <i>Haloferax volcanii</i>	115 -
1.2. Les Plasmides	116 -
1.2.1. Les plasmides pour l'expression chez <i>E. coli</i>	116 -
1.2.2. Le plasmide pour l'expression chez <i>S. cerevisiae</i>	118 -
1.2.3. Le plasmide pour l'expression chez <i>Haloferax volcanii</i>	118 -
1.3. Les Oligonucléotides	119 -
1.3.1. Les oligonucléotides utilisés pour la construction des souches mutantes de <i>S. cerevisiae</i>	119 -

1.3.2.	Les oligonucléotides utilisés pour la construction des plasmides pour l'expression chez <i>E. coli</i>	119 -
1.3.3.	Les oligonucléotides utilisés pour la construction des souches de <i>H. volcanii</i> mutantes	120 -
1.4.	Milieus de culture	120 -
1.4.1.	Pour la culture des bactéries	120 -
1.4.2.	Pour la culture des levures	121 -
1.4.3.	Pour la culture de <i>H. volcanii</i>	121 -
1.5.	Les solutions et tampons	122 -
1.5.1.	Pour la transformation de <i>H. volcanii</i>	122 -
1.5.2.	Pour la transformation de <i>S. cerevisiae</i>	122 -
1.5.3.	Pour l'usage courant.....	122 -
2.	Méthodes	122 -
2.1.	Techniques de Génie génétique	122 -
2.1.1.	Clonage	122 -
2.1.2.	Mutagenèse dirigée	124 -
2.2.	Surexpression heterologue chez <i>E. coli</i>	124 -
2.2.1.	Tests d'expression à petite échelle (3mL)	124 -
2.2.2.	Expression à échelle moyenne (1L)	124 -
2.3.	Techniques de Biochimie	125 -
2.3.1.	Purification des protéines.....	125 -
2.3.2.	ITC (Isothermal Titration Calorimétrie) ou microcalorimétrie	126 -
2.3.3.	MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering).....	127 -
2.3.4.	Expériences de retard sur gel	127 -
2.4.	Cristallogénèse	128 -
2.5.	Cristallographie	129 -
2.6.	Techniques chez <i>S. cerevisiae</i>	129 -
2.6.1.	Préparation d'ADN génomique	129 -
2.6.2.	Transformation de <i>S. cerevisiae</i>	129 -
2.6.3.	Préparation d'extrait de protéines solubles et co-immunoprécipitation	130 -
2.7.	Techniques chez <i>Haloferax volcanii</i>	131 -
2.8.	Transcription d'ARN <i>in vitro</i>	133 -

BIBLIOGRAPHIE

AVANT-PROPOS

La biologie d'aujourd'hui est dominée par les acides nucléiques. Tout commence en 1869 avec leur découverte par Friedrich Miescher. Très rapidement, les scientifiques identifient deux sortes d'acides nucléiques : l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN). S'en suit la détermination de leur composition chimique et de leurs propriétés physico-chimiques. Chaque nucléotide est composé d'une base azotée, d'un sucre (désoxyribose ou ribose) et d'un groupement phosphate. Il y a trois bases communes à l'ADN et l'ARN : l'adénine, la guanine et la cytosine. La quatrième base est la thymine pour l'ADN et l'uracile pour l'ARN. Il faudra attendre les années 1940 pour qu'Oswald Avery définisse l'ADN comme support de l'hérédité et pour que Jean Brachet émette l'hypothèse de l'implication de l'ARN dans la synthèse protéique. En 1953, la structure cristallographique en double hélice de l'ADN est décrite par James Watson et Francis Crick. La même année, Georges Palade observe les ribosomes sous le microscope électronique. Cinq ans plus tard, Malhon Hoagland et Paul Zamecnik publient la découverte des ARN de transfert (ARNt), Matthew Meselson et Franklin Stahl démontrent la stabilité de l'hérédité via une répllication de l'ADN semi-conservative. En 1961, François Jacob et Jacques Monod décrivent l'ARN messenger (ARNm) comme un intermédiaire instable transportant l'information des gènes vers les ribosomes en vue de la synthèse protéique. De plus, ils introduisent les notions de gènes structuraux et de gènes régulateurs. Un peu plus tard, avec le déchiffrement du code génétique, le phénomène de la traduction semble élucidé. La biologie moléculaire arrive ainsi à une première conclusion : le transfert de l'information génétique se fait de l'ADN vers les protéines par l'intermédiaire des ARN.

A la fin du XX^e siècle, l'intérêt scientifique se tourne principalement vers l'étude des gènes et le séquençage des génomes. La séquence entière du génome humain est publiée en 2000 et révèle la présence d'environ 20 000 gènes et d'une immense quantité d'ADN non codant. Un nouvel engouement scientifique se développe alors : le XXI^e siècle sera celui de l'ARN. En effet, la fonction des ARN n'est pas réduite au transfert de l'information génétique de l'ADN vers les protéines : l'ARN est une molécule polyvalente qui peut jouer le rôle d'enzyme (ribozyme) ou de cofacteurs protéiques pour le ciblage de sites spécifiques (les petits ARN nucléolaires). L'ARN est également impliqué dans la régulation de l'activité des gènes.

Il existe par ailleurs, des ARN interférents qui ont pour cible un ARNm spécifique. La formation d'ARN double brin entraîne alors sa dégradation et/ou la diminution de sa traduction. Ses multiples rôles font de l'ARN l'objet de nombreux projets à visée thérapeutique.

Afin d'assurer ses fonctions, l'ARN subit des modifications post-transcriptionnelles. Le premier nucléotide modifié a été découvert en 1957 et, aujourd'hui, plus de cent modifications de nucléotides sont décrites. Les enzymes catalysant ces modifications présentent un intérêt particulier car elles ont été conservées au cours de l'évolution.

Mes travaux de recherche portent sur l'étude d'une petite protéine qui interagit et active quatre méthyltransférases. Ces enzymes de modification ont pour cible les acteurs de la traduction (ARNt, ARNr, facteurs de terminaison). L'approche structurale et fonctionnelle utilisée permet d'explorer d'un point de vue moléculaire l'interaction, l'activation ainsi que le mécanisme enzymatique mis en jeu.

L'introduction s'organise en cinq parties de manière à traiter la traduction dans son ensemble pour ensuite décrire précisément Trm112 et ses différents partenaires. La première partie présente les grands acteurs de la traduction et les différentes étapes du processus général. La deuxième partie est dédiée aux différents types de méthyltransférases et à la protéine Trm112. Les différents partenaires font l'objet des trois parties suivantes. Le complexe Mtq2-Trm112 et son rôle dans la terminaison de la traduction est dépeint dans la troisième partie. La quatrième partie traite de la biogenèse du ribosome et du complexe Bud23-Trm112. Enfin, la partie finale décrit la maturation des ARNt et les complexes de modification Trm11-Trm112 et Trm9-Trm112.

Introduction

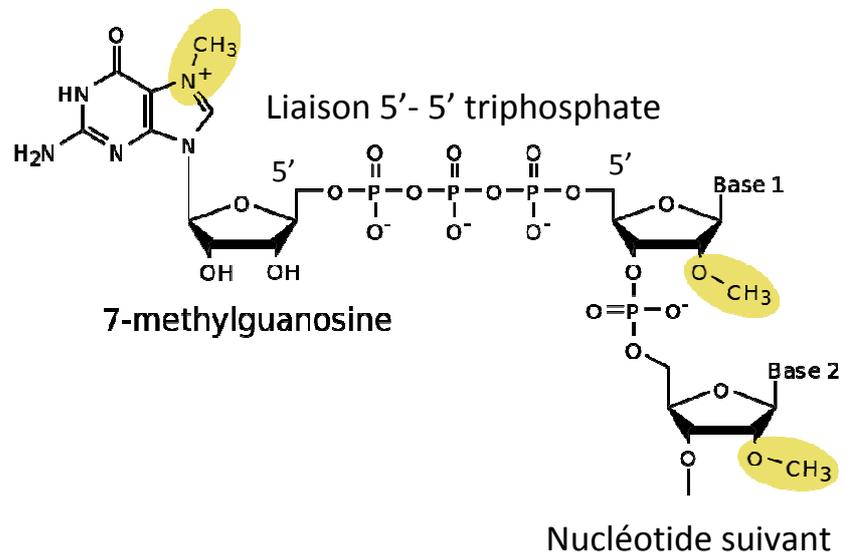


Figure 1 : Structure chimique de la coiffe m⁷GpppN

INTRODUCTION

1. LA TRADUCTION CHEZ LES EUCARYOTES

La biosynthèse des protéines est au centre de l'activité cellulaire. Ce processus nécessite une régulation fine et résulte de deux événements successifs de transfert de l'information génétique. La transcription se déroule dans le noyau et consiste en la synthèse fidèle d'un ARN pré-messager (pré-ARNm) à partir de l'ADN du gène d'intérêt utilisé comme matrice. Ce pré-messager subit alors une maturation en ARN messager (ARNm) puis est exporté vers le cytoplasme où sa traduction permettra la synthèse d'une protéine spécifique. Par ce processus, l'information portée initialement par l'ADN puis l'ARNm est transférée à la protéine néo-synthétisée.

1.1. LES ACTEURS

Le mécanisme de la traduction fait intervenir de nombreux acteurs en plus de l'ARNm. Les ARN de transfert (ARNt), comme leur nom l'indique, assurent le transfert de l'information, via le code génétique, de l'ARNm vers les protéines. Le ribosome, assemblage d'ARN ribosomiques (ARNr) et de protéines, joue le rôle de tête de lecture de l'information génétique et de synthétiseur de protéines. Enfin, en plus de celles du ribosome, de nombreuses protéines sont également impliquées dans ce processus.

1.1.1. L'ARN messager

Chez les eucaryotes, le précurseur de l'ARNm est transcrit dans le noyau par l'ARN polymérase II à partir du gène correspondant. Afin d'être fonctionnel pour la traduction, le transcrit primaire subit une maturation qui consiste en la modification des extrémités 5' et 3' ainsi qu'en un épissage des séquences non codantes appelées introns.

1.1.1.1. Une coiffe à l'extrémité 5'

À l'extrémité 5', la modification se caractérise par l'ajout d'une coiffe (figure 1). Celle-ci est composée d'une guanosine méthylée en position N7 qui est reliée au premier nucléotide de l'ARNm par une liaison 5'-5' triphosphate (m^7GpppN) (Moss *et al*, 1976). A cette coiffe vient ensuite se lier le « Cap Binding Complex » (CBC), composé des protéines CBP20 et CBP80 (Izaurrealde *et al*, 1994). La présence de la coiffe en 5' stabilise l'ARNm en le protégeant de l'action des exo-nucléases 5'-3' (Furuichi *et al*, 1977).

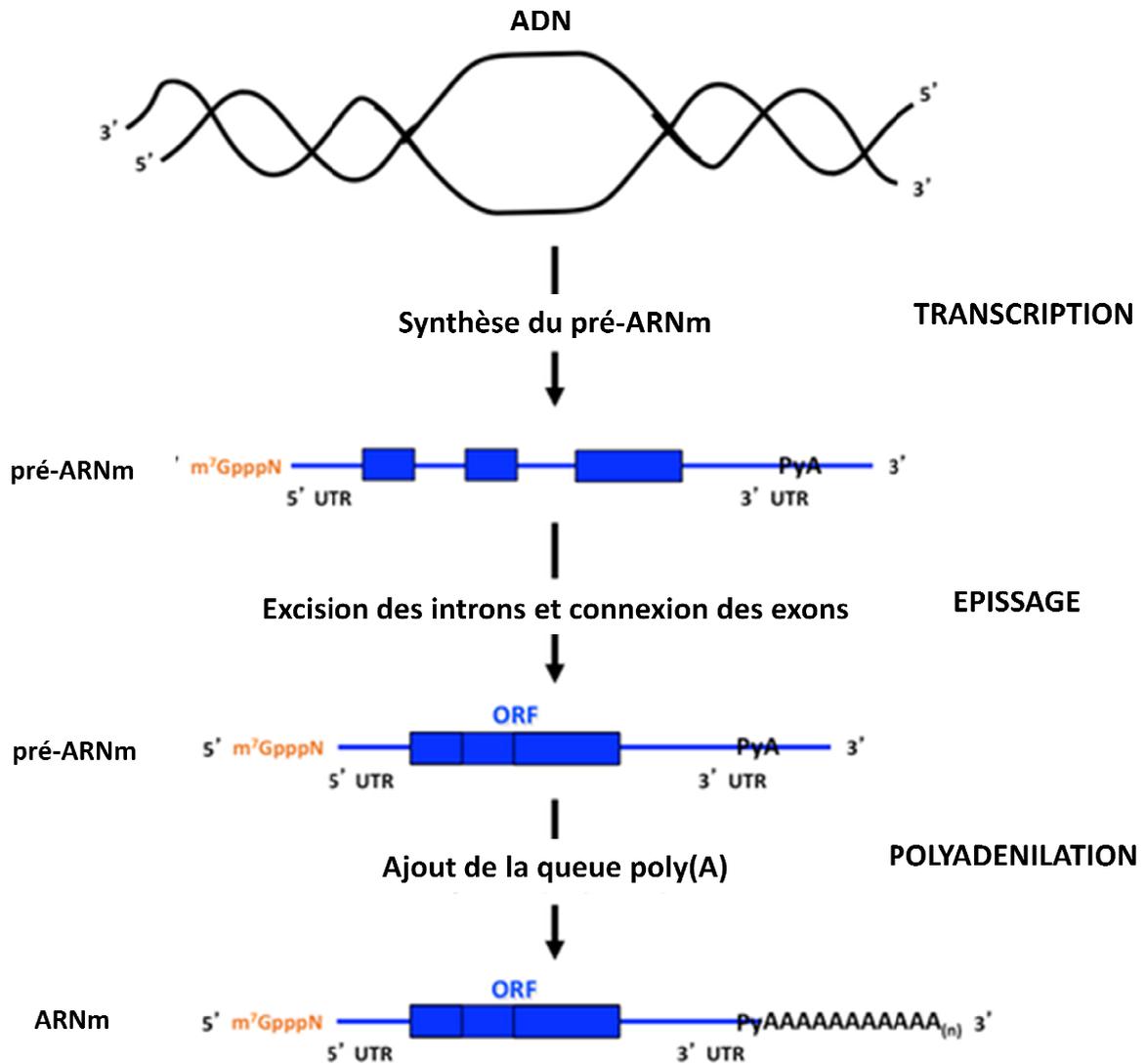


Figure 2 : Epissage et maturation de l'ARNm.

De plus, elle intervient dans l'épissage et l'export de l'ARNm vers le cytoplasme (Izaurre et al, 1995). Enfin, elle augmente l'efficacité de la traduction en interagissant avec les particules RiboNucléoProtéiques (RNP) et certains facteurs d'initiation (Banerjee, 1980; Kaempfer et al, 1978).

1.1.1.2. Une queue poly(A) à l'extrémité 3'

La modification de l'extrémité 3' consiste en l'ajout d'une queue poly(A) composée respectivement de 50 à 250 nucléotides chez la levure et chez les mammifères (Proudfoot & O'Sullivan, 2002). Comme la coiffe, la queue poly(A) joue différents rôles par son association avec des protéines spécifiques, les PABP (Poly(A) Binding Proteins). Dans le noyau, elle participe à l'export de l'ARNm vers le cytoplasme (Mangus et al, 2003). De plus, elle stabilise l'ARNm en le protégeant des exo-nucléases à activité 3'-5'. Enfin, elle est impliquée dans l'efficacité de la traduction en s'associant aux facteurs d'initiation (Le et al, 1997).

1.1.1.3. Un épissage des introns

La transcription d'un gène eucaryote donne naissance à un ARN pré-messager contenant une alternance de séquences codantes (exons) et de séquences non codantes (introns). L'épissage est une étape indispensable à la maturation des ARNm et consiste en l'excision des introns et en la jonction des exons (figure 2), réaction réalisée par cinq snRNP formant le spliceosome (Grabowski et al, 1985).

Ainsi coiffé, polyadénylé et épissé, l'ARNm mature exporté vers le cytoplasme peut être pris en charge par la machinerie de traduction.

1.1.2. Les ARN de transfert

Les ARNt sont des courtes séquences d'ARN simple brin non codant. Ce sont des molécules adaptatrices qui jouent le rôle d'intermédiaire entre les codons portés par l'ARNm et les acides aminés de la protéine selon les règles du code génétique. Il s'agit des acteurs clés de la traduction et, afin de remplir leur fonction, ils adoptent une structure très caractéristique.

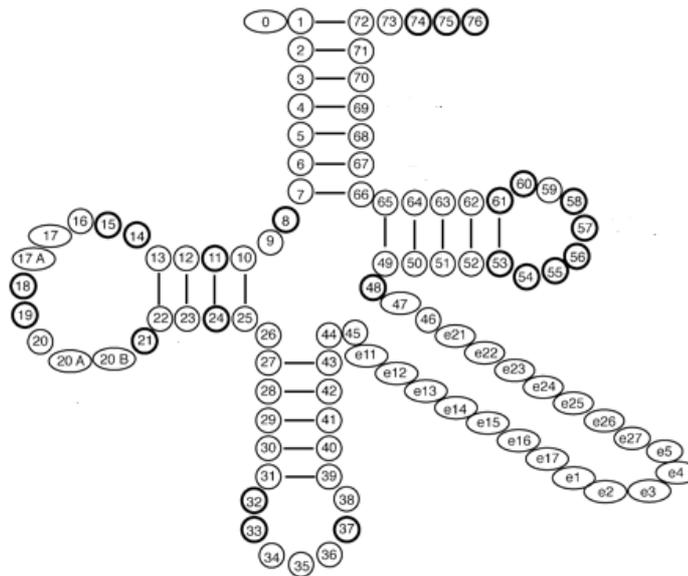


Figure 3 : Numérotation conventionnelle des ARNt (Extrait de Sprintz *et al* 1998).

Les cercles représentent les nucléotides qui sont toujours présents, les ovales les nucléotides qui ne sont pas toujours présents, les cercles en gras indiquent les nucléotides souvent invariables.

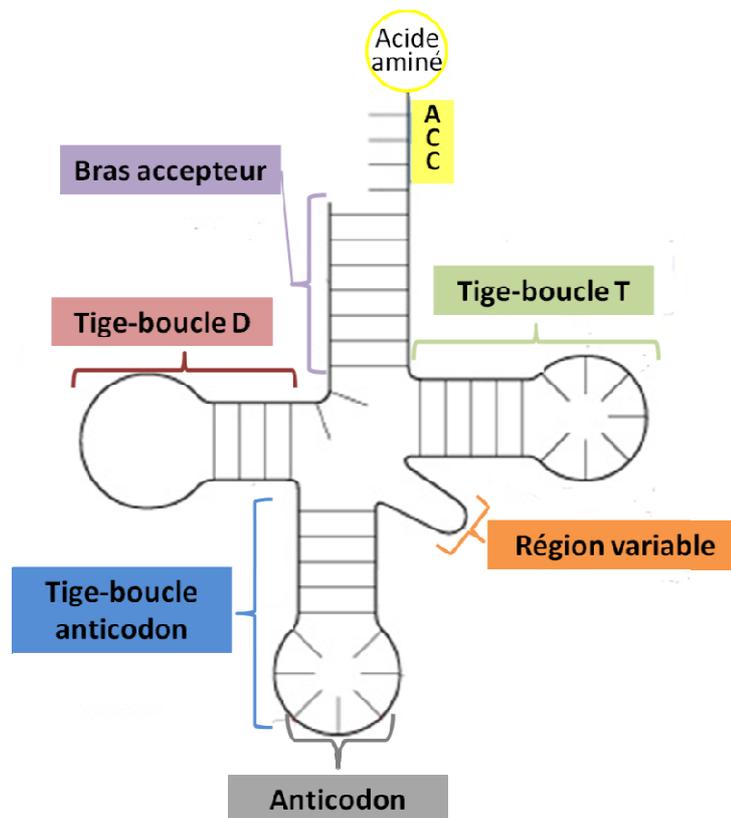


Figure 4 : Structure secondaire en forme de trèfle (adapté de Klug & Cummings, 2000).

1.1.2.1. La structure des ARNt

❖ Structure primaire

Pour la grande majorité, les ARNt se composent d'une séquence d'environ 70 à 100 nucléotides, avec une moyenne de 76. Néanmoins, il a été mis en évidence récemment l'existence de petits ARNt mitochondriaux de 42 nucléotides présents chez certains nématodes (Wende *et al*, 2014). Par mesure d'homogénéité, une nomenclature conventionnelle a été adoptée afin de numéroter la séquence des ARNt (Sprinzl *et al*, 1998). Le numéro 1 est assigné au nucléotide situé à l'extrémité 5' et le numéro 76 à celui de l'extrémité 3' (figure 3). De plus, les nucléotides conservés portent toujours le même numéro afin que l'insertion ou la délétion de certains nucléotides moins conservés n'affectent pas la numérotation générale. Ainsi, les nucléotides 34, 35 et 36 correspondent toujours à la boucle anticodon.

De nombreux nucléotides des ARNt sont modifiés. Ces modifications sont variées et font intervenir des enzymes spécifiques. Ce point sera détaillé dans le paragraphe 5.1.3.

❖ Structure secondaire

La plupart des ARNt ont une structure secondaire caractéristique dite en « feuille de trèfle » (figure 4). Celle-ci résulte d'appariements canoniques des nucléotides de type Watson-Crick mais également d'appariements non canoniques. Ces appariements entraînent la formation de cinq régions caractéristiques des ARNt (Dudock *et al*, 1969). La tige supérieure appelée « bras accepteur » est formée des extrémités 5' et 3'. Elle est nommée ainsi car l'adénosine 76 peut lier l'acide aminé spécifique. La tige-boucle D est appelée ainsi car elle contient au moins un nucléotide modifié en dihydrouridine (D). La présence d'uridines modifiées en ribothymidines (T) donnera le nom à la tige-boucle T. La tige-boucle inférieure est celle de l'anticodon. Enfin, les ARNt possèdent une région variable située entre les tiges-boucles T et anticodon.

Cette structure en feuille de trèfle est très conservée que ce soit chez les procaryotes ou chez les eucaryotes. Cependant, certains ARNt mitochondriaux - et particulièrement ceux présents chez certains nématodes - n'adoptent pas ce repliement caractéristique car ils possèdent une séquence très courte (Okimoto & Wolstenholme, 1990).

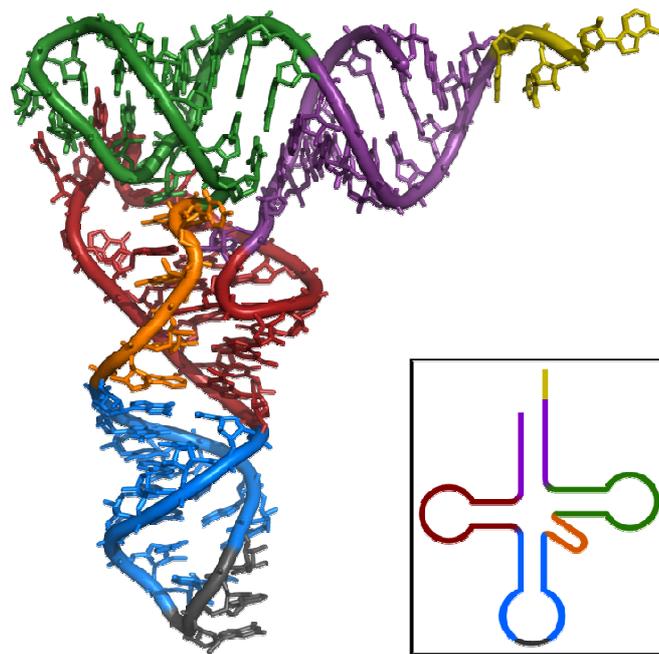


Figure 5 : Structure tertiaire en forme de « L ».

Dans le repliement en feuille de trèfle, le nombre de nucléotides composant le bras accepteur et les tiges-boucles T et anticodon est très conservé. Le bras accepteur contient 7 paires de bases et 4 nucléotides non appariés, dont la séquence CCA à l'extrémité 3'. Les tiges-boucles T et anticodon se composent de 5 paires de bases et de 7 nucléotides non appariés formant la boucle. La tige-boucle D présente des différences d'un ARNt à l'autre ; elle se compose d'une tige de 3 ou 4 paires de bases et d'une boucle de 7 à 11 nucléotides. La taille de la région variable permet de classer les ARNt en deux groupes. La classe I comprend les ARNt composés d'une boucle variable de 4 ou 5 nucléotides et la classe II regroupe ceux avec une boucle variable de 10 à 24 nucléotides. L'alignement des ARNt selon cette structure secondaire a permis d'identifier des positions invariantes ou semi-variantes particulièrement situées dans les tiges-boucles T et D qui participent au repliement en structure tertiaire (Rich & RajBhandary, 1976).

❖ Structure tertiaire

La première structure cristallographique d'un ARNt a été publiée en 1974. Il s'agit de celle de l'ARNt^{Phe} de *Saccharomyces cerevisiae*, qui présente une structure compacte en forme de « L » (Kim *et al*, 1974). La conservation de cette structure tridimensionnelle caractéristique a été mise en évidence avec la résolution de nombreuses structures d'ARNt de levure et d'*Escherichia coli*. Cette forme canonique se compose de deux domaines orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre formant les deux branches du « L » (figure 5). L'un des domaines se compose du bras accepteur et de la tige T assemblés en double hélice. L'autre domaine se conforme de manière similaire et comprend les tiges anticodon et D. Les boucles T et D se positionnent à la jonction entre les deux domaines. Ainsi, l'anticodon se trouve à l'opposé du site de fixation de l'acide aminé. Le maintien de la structure tridimensionnelle est assuré par l'établissement de liaisons hydrogènes entre les nucléotides situés à des positions invariantes ou semi-invariantes (Oliva *et al*, 2006). C'est pourquoi, malgré les différences de séquence, les ARNt adoptent tous une structure tertiaire similaire, essentielle à leur interaction avec les différents acteurs de la traduction (Selmer *et al*, 2006).

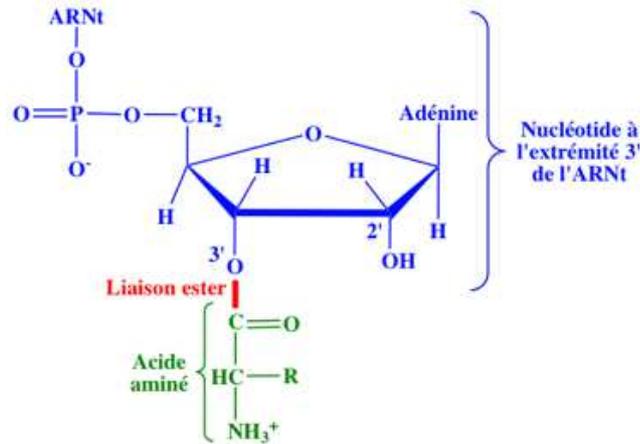


Figure 6 : Structure chimique de la liaison ester entre l'A₇₆ d'un ARNt et un acide aminé (d'après Jaspard, 2013).

Tableau 1 : Le code génétique.

		NUCLÉOTIDE 2 ^{ème} POSITION					
		U	C	A	G		
NUCLÉOTIDE 1 ^{ère} POSITION	U	UUU } phényl-alanine UUC } UUA } leucine UUG }	UCU } UCC } sérine UCA } UCG }	UAU } tyrosine UAC } UAA } non-sens UAG }	UGU } cystéine UGC } UGA } non-sens UGG } tryptophane	U C A G	
	C	CUU } leucine CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } proline CCA } CCG }	CAU } histidine CAC } CAA } glutamine CAG }	CGU } arginine CGC } CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } isoleucine AUC } AUA } AUG } méthionine	ACU } ACC } thréonine ACA } ACG }	AAU } asparagine AAC } AAA } lysine AAG }	AGU } sérine AGC } AGA } arginine AGG }	U C A G	
	G	GUU } valine GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } alanine GCA } GCG }	GAU } acide aspartique GAC } GAA } acide glutamique GAG }	GGU } glycine GGC } GGA } GGG }	U C A G	
						NUCLÉOTIDE 3 ^{ème} POSITION	

1.1.2.2. Fonctions des ARNt

La fonction principale des ARNt lors de la traduction est d'assurer la continuité physique entre l'anticodon complémentaire du codon de l'ARNm et l'acide aminé correspondant porté en 3' qui sera introduit dans la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. Le chargement de l'un des 20 acides aminés spécifiques sur l'ARNt revêt une importance particulière puisque la fidélité de la traduction dépendra très fortement de cette réaction qui crée ce lien physique entre la séquence anticodon et un acide aminé déterminé par cette séquence. Elle est réalisée par l'aminoacyl-ARNt synthétase (aa-RS). Il s'agit d'une réaction d'estérification de la fonction carboxylique de l'acide aminé par le groupement hydroxyle en 2' ou 3' du ribose de l'A₇₆ de l'ARNt (figure 6) (Sprinzl & Cramer, 1975). La spécificité de ces enzymes sera développée dans le paragraphe 5.1.4.

Le code génétique universel est composé de 61 codons sens et de 3 codons stop (tableau 1). Comme il n'existe que 20 acides aminés protéiques, cela implique qu'un acide aminé donné puisse être associé à plusieurs codons. Par ailleurs, en fonction des organismes, le nombre d'ARNt différents ne varie que de 30 à 46 (Marck & Grosjean, 2002). Un ARNt donné est donc potentiellement susceptible de reconnaître plusieurs codons. La stratégie mise en place pour décoder les 61 codons sens est la possibilité de la présence d'une base « flottante » en position 34 de l'ARNt qui correspond à la 1^{re} base de l'anticodon. En effet, les 1^e et 2^e bases du codon sont complémentaires respectivement des 3^e et 2^e bases de l'anticodon et suivent les règles d'appariement canonique Watson-Crick. Par contre, la 3^e base du codon n'est pas toujours strictement complémentaire de la 1^{re} base de l'anticodon : il apparaît un certain flottement (wobble), d'où le nom de « wobble base » donné à la position 34 des ARNt (Crick, 1966; Murphy & Ramakrishnan, 2004). Cette position sera décrite plus précisément dans le paragraphe 5.1.3.

Par ailleurs, les ARNt possèdent d'autres fonctions que celle du décodage : ils sont notamment impliqués dans la régulation de la transcription, de la traduction et du recyclage des protéines (Hurto, 2011). Ils jouent également le rôle de précurseurs pour la synthèse d'autres aa-ARNt et peuvent être impliqués dans la synthèse des tétrapyrroles (Francklyn & Minajigi, 2010). Ils auraient en outre un rôle catalytique dans certaines réactions de transpeptidation, aminoacylation et déacylation (Weinger & Strobel, 2006). Enfin, ils peuvent faire office d'amorce pour la réplication inverse des rétrovirus (Marquet *et al*, 1995).

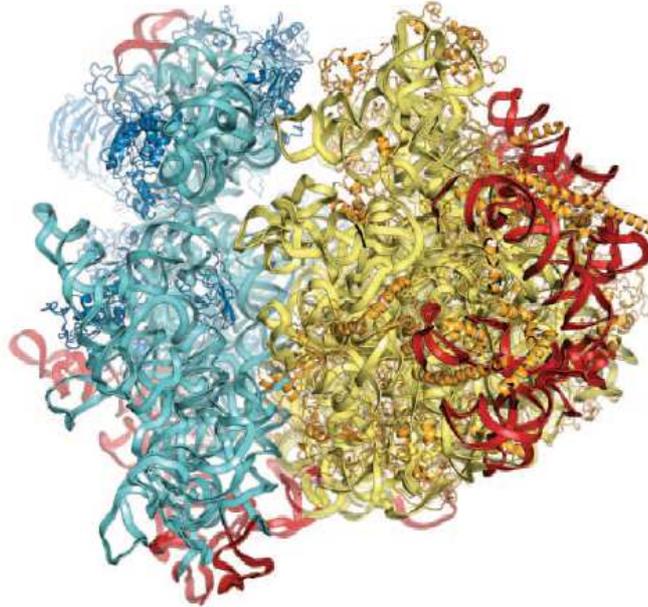


Figure 7 : Structure cristallographique du ribosome de *S. cerevisiae* 80S (d'après Ben-Shem *et al*, 2010).

Les protéines et l'ARNr de la sous-unité 40S sont respectivement en bleu foncé et bleu clair, ceux de la 60S sont respectivement en orange et jaune clair. En rouge, sont représentés les segments supplémentaires acquis au cours de l'évolution.

1.1.3. Le ribosome

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique (RNP) composé d'une grande et d'une petite sous-unités qui s'assemblent autour de l'ARNm pour former un complexe fonctionnel pour la traduction (figure 7). Ces sous-unités sont constituées d'ARN ribosomiques (ARNr) qui forment un cœur compact auquel s'associent les protéines ribosomiques. Le ribosome possède une activité catalytique : on le qualifie donc de ribozyme. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il possède une masse moléculaire de 3,3 MDa et présente un coefficient de sédimentation de 80S. La petite sous-unité (40S) est constituée d'un ARNr 18S et de 33 protéines. Elle joue un rôle de décodage en permettant l'interaction entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt. La grande sous-unité (60S) se compose de 3 ARNr (5S, 5.8S, 25S) et de 49 protéines. Elle assure l'assemblage des acteurs de la traduction et contient le centre catalytique peptidyl-transférase (PTC) où a lieu la formation de la liaison peptidique. Le ribosome possède 3 sites spécifiques d'interaction avec les ARNt : le site A (Aminoacyl) accueille l'aa-ARNt entrant dans le ribosome, le site P (Peptidyl) contient l'ARNt portant la chaîne polypeptidique en cours de synthèse et le site E (Exit) est occupé par l'ARNt déacylé sortant du ribosome.

Le cœur compact du ribosome composé d'ARNr est très conservé au cours de l'évolution ; sa périphérie qui comprend principalement les protéines ribosomiques, l'est beaucoup moins. De même, la complexité du ribosome va croissante au cours de l'évolution du fait de l'augmentation du nombre de ses composantes. Les études cristallographiques, de microscopie électronique et la résolution des structures des ribosomes bactérien, de levure et humain ont permis de mettre en évidence cette tendance (Ban *et al*, 2000; Ben-Shem *et al*, 2010; Anger *et al*, 2013).

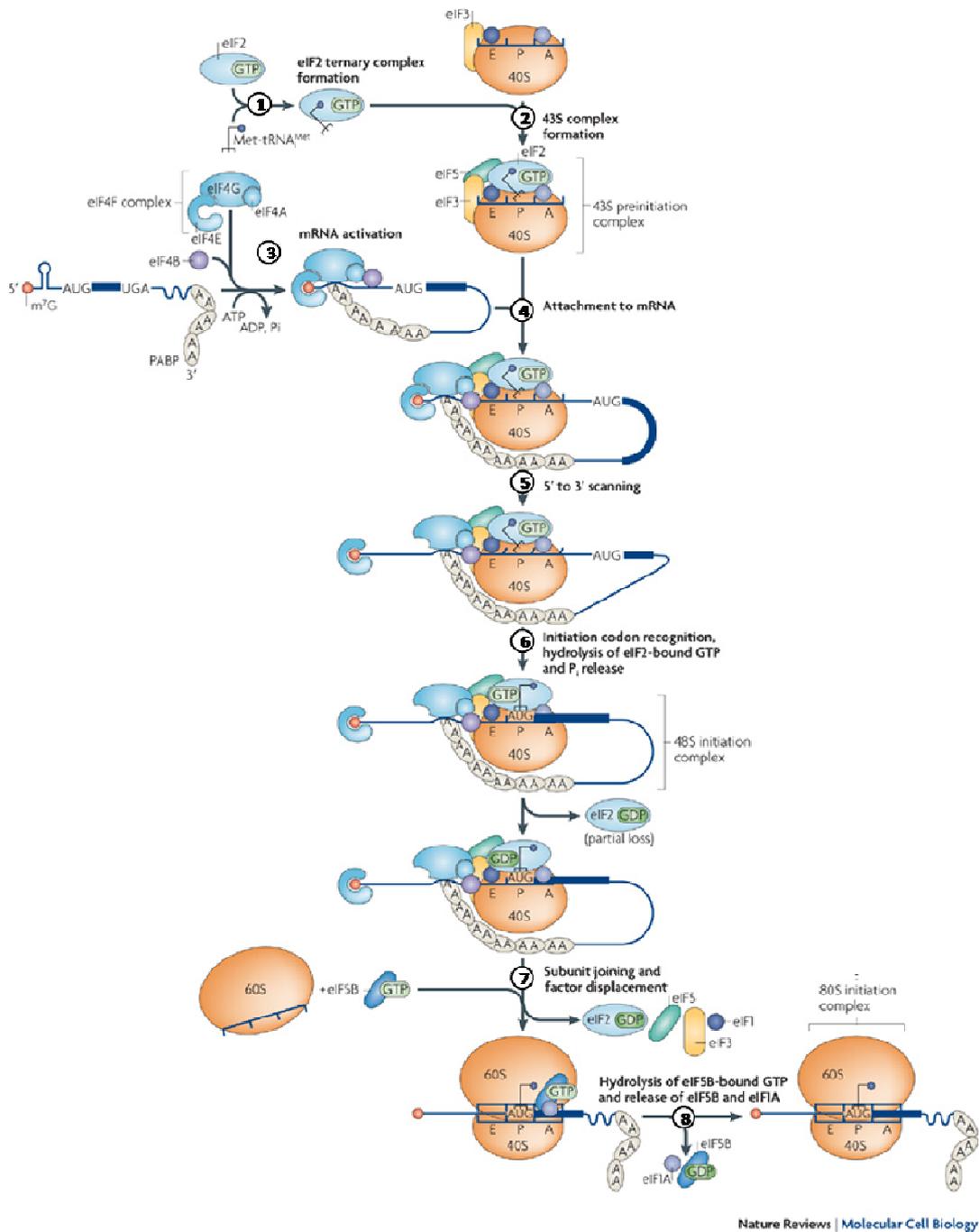


Figure 8 : Etapes de l'initiation de la traduction eucaryote (adapté de Jackson *et al*, 2010).

1.2. LES ETAPES DE LA TRADUCTION CHEZ LES EUCARYOTES

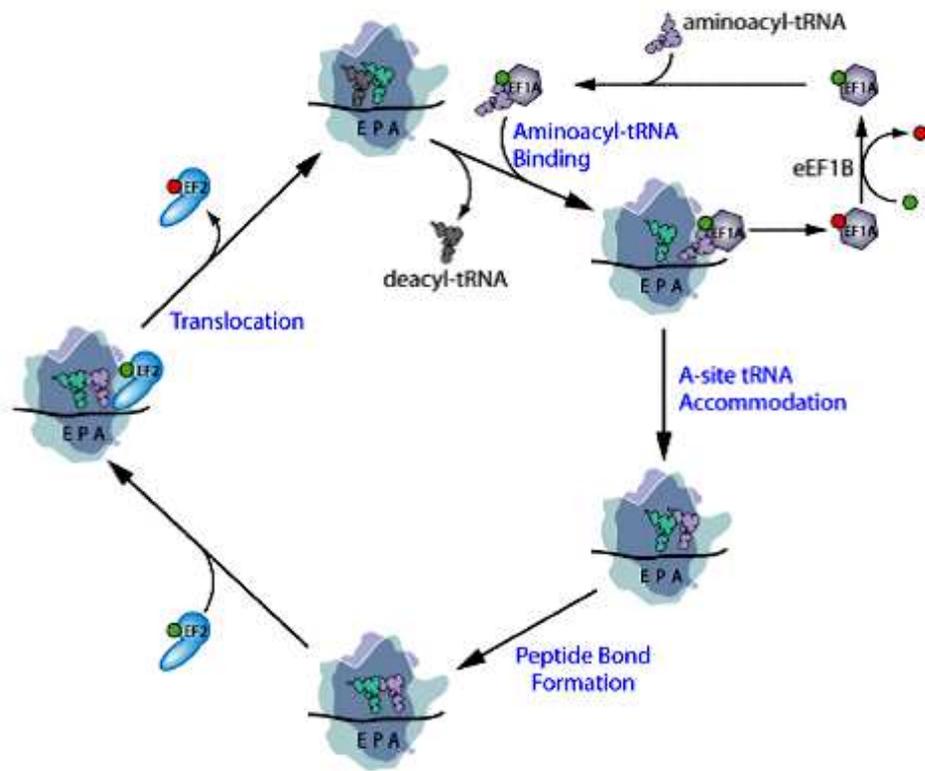
1.2.1. L'initiation

L'initiation constitue la première étape de la traduction. Elle peut être divisée en 8 phases et fait intervenir de nombreux facteurs d'initiation : eIF pour « eukaryotic Initiation Factor » (figure 8). Dans un premier temps, il y a formation d'un complexe ternaire entre l'ARNt initiateur méthionylé (Met-ARNt), eIF2 et une molécule de GTP (1). Ensuite, ce complexe s'associe à la sous-unité 40S du ribosome liée à eIF1A, eIF1, eIF5 et eIF3 : ceci constitue le complexe pré-initiateur 43S (2). D'autre part, l'activation de l'ARNm est dépendante d'une molécule d'ATP et de son interaction avec le complexe d'association de la coiffe eIF4F (composé de eIF4A, eIF4E et eIF4G) et avec eIF4B. L'interaction de eIF4G associée à la coiffe avec PABP liée à la queue poly(A) entraîne la fermeture d'une boucle ARNm, spécifique de l'étape d'initiation eucaryote (3). De plus, la fixation de eIF4G sur eIF3 ou eIF5 (chez les mammifères ou chez la levure respectivement) provoque l'assemblage de l'ARNm activé et du complexe pré-initiateur 43S (4). Commence alors le « scan » de l'ARNm dans le sens 5' vers 3' jusqu'à la lecture du codon initiateur AUG (5). La reconnaissance de l'AUG entraîne la formation du complexe 48S qui change de conformation, eIF1 est déplacé et eIF5 participe à l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 (6). Simultanément, les facteurs eIF2-GDP, eIF1, eIF3 et eIF5 se dissocient et la sous-unité 60S ainsi que eIF5B-GTP sont recrutés (7). Enfin, l'hydrolyse du GTP lié à eIF5B provoque la dissociation de eIF1A et de eIF5B-GDP (8). A la fin de l'étape d'initiation, le Met-ARNt initiateur occupe le site P du ribosome 80S fonctionnel qui est prêt pour l'étape d'élongation.

1.2.2. L'élongation

Lors de cette étape, le ribosome se déplace par pas de 3 nucléotides sur l'ARNm, d'un codon au suivant afin de leur associer les aa-ARNt correspondants et ainsi permettre l'ajout de l'acide aminé adéquat à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. Un cycle d'élongation peut se diviser en 5 étapes. Il consiste en l'incorporation d'un acide aminé et fait intervenir 2 facteurs : eEF1A/B et eEF2 pour « eukaryotic Elongation Factor » (figure 9A) (Andersen *et al*, 2003; Dever & Green, 2012).

A



B

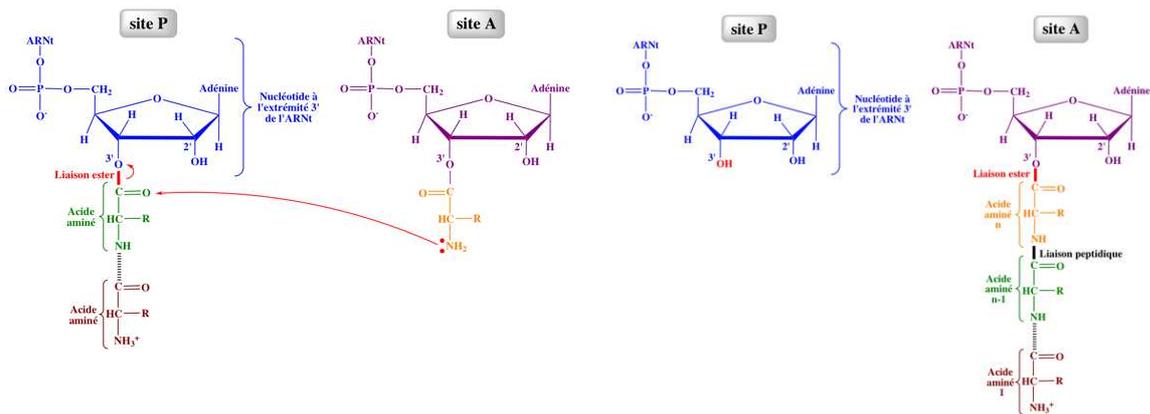


Figure 9 : L'élongation

A : Modèle du mécanisme d'élongation de la traduction eucaryote (d'après Denver & Green, 2012) ;

B : Mécanisme réactionnel de formation de la liaison peptidique (d'après Jaspard, 2013).

Au début de chaque cycle d'élongation, le site P est occupé par le dernier ARNt apparié à l'ARNm portant la chaîne polypeptidique. Lors du premier cycle, le site P accueille l'ARNt^{Met} apparié sur le codon initiateur. La première étape consiste en la formation d'un complexe ternaire entre eEF1A, une molécule de GTP et l'aa-ARNt complémentaire du codon suivant l'AUG sont situés face au site A. En cet endroit, l'appariement correct entre l'anticodon et le codon provoque l'hydrolyse du GTP et la dissociation de eEF1A-GDP. L'aa-ARNt du site A se réoriente alors de manière à rapprocher son extrémité 3' de celle de l'ARNt en place dans le site P. eEF1A-GDP est recyclé en eEF1A-GTP via le facteur d'échange eEF1B. La formation de la liaison peptidique entre la fonction carboxylique estérifié de l'acide aminé porté par l'ARNt au site P et la fonction amine de celui porté par l'ARNt au site A est assurée par le ribosome au niveau du PTC (figure 9B). Elle s'accompagne d'une transition des ARNt des sites A et P vers une position intermédiaire positionnant leurs bras accepteurs au niveau des sites P et E respectivement. Le recrutement de eEF2-GTP et l'hydrolyse du GTP entraînent la translocation complète des ARNt des sites A et P vers les sites P et E respectivement. eEF2-GDP est libéré et l'ARNt déacylé se trouvant dans le site E se dissocie du ribosome. Le site P contient alors l'ARNt portant le peptide allongé d'un acide aminé et le site A vide est disponible pour accueillir l'aa-ARNt suivant pour réaliser un nouveau cycle d'élongation. Ce cycle se répète jusqu'à l'arrivée d'un codon stop (UAA, UAG ou UGA) au site A.

1.2.3. La terminaison

L'étape de terminaison de la traduction consiste en la reconnaissance d'un codon stop au site A du ribosome qui provoque l'hydrolyse de la liaison ester entre la chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée et l'ARNt occupant le site P. Cette étape fait intervenir les facteurs de terminaison de classe I et II, respectivement eRF1 et eRF3 pour « Release Factor ».

eRF1 est responsable de la reconnaissance du codon stop et induit la réaction d'hydrolyse. Il est composé de trois domaines : N, M et C (figure 10A) (Song *et al*, 2000). Le domaine N est impliqué dans la reconnaissance du codon stop. Des motifs très conservés NIKS et YxCxxxF, situés à l'extrémité du domaine N et mimant la boucle anticodon, participent à cette reconnaissance (Chavatte *et al*, 2001; Kolosov *et al*, 2005; Song *et al*, 2000). Le domaine M contient le motif GGQ, universellement conservé, indispensable au déclenchement de l'hydrolyse (Frolova *et al*, 1999).

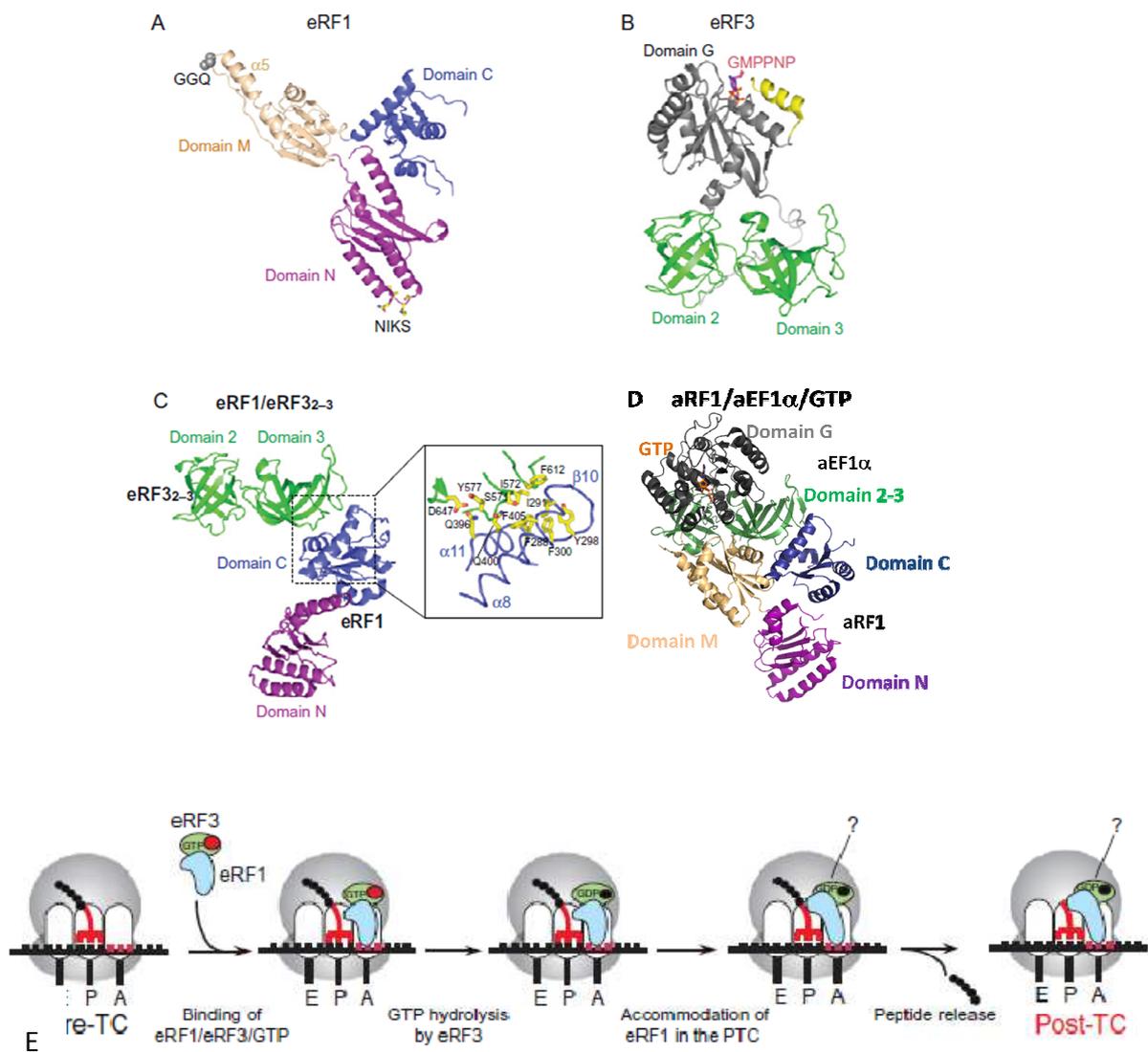


Figure 10 : Structures des facteurs eRF1 et eRF3 et mécanisme de la terminaison de la traduction (adaptés de Jackson *et al*, 2012).

A : Structure cristallographique de eRF1 humain (pdb 1DT9) ;

B : Structure cristallographique de eRF3-GTPNP de *Schizosaccharomyces pombe* (pdb 1R5B) ;

C : Gauche : Complexe eRF1-eRF3₂₋₃ de *S. pombe*, Droite : Agrandissement de l'interaction entre les deux protéines ;

D : Structure cristallographique du complexe de terminaison d'Archaea (pdb 3VMF) (Kobayachi *et al*, 2012);

E : Modèle de mécanisme de terminaison de la traduction.

La méthylation de la glutamine de ce motif par le complexe Mtq2-Trm112 sera détaillée dans le paragraphe 3.4. Le domaine C est impliqué dans l'interaction avec eRF3.

Le facteur de terminaison de classe II eRF3 est un membre de la famille des GTPases dépendantes du ribosome. eRF3 possède une région C-terminale essentielle comprenant le domaine G de liaison au GTP (Kisselev & Buckingham, 2000) et deux domaines(2 et 3) en tonneaux β . eRF3 est structuralement proche de eEF1A (figure 10B) (Kong *et al*, 2004). Par contre, la région N-terminale de la protéine est peu conservée et n'est pas indispensable à la terminaison (Kushnirov *et al*, 1988).

Les deux facteurs de terminaison eRF1 et eRF3 interagissent via leurs domaines C-terminaux (figure 10C-D) (Ito *et al*, 1998). Cette association stabilise la fixation spécifique du GTP sur eRF3 (Hauryliuk *et al*, 2006). Ceci a pour conséquence la formation d'un complexe ternaire très stable par un changement conformationnel de eRF1 qui mime alors la structure d'un ARNt (Cheng *et al*, 2009; Kobayashi *et al*, 2012). Par ailleurs, le ribosome 80S et eRF1 sont tous deux requis pour induire l'activité GTPase de eRF3 (Frolova *et al*, 1996). De plus, les domaines C et M de eRF1 sont indispensables aux activités de fixation et d'hydrolyse du GTP de eRF3 (Kononenko *et al*, 2008).

Le mécanisme exact de terminaison de la traduction eucaryote n'est pas complètement élucidé à ce jour mais les études réalisées convergent vers un modèle commun (figure 10E) (Jackson *et al*, 2012; Taylor *et al*, 2012). Il y aurait dans un premier temps formation du complexe eRF1-eRF3 qui entrainerait la fixation du GTP pour constituer le complexe ternaire stable. Ce dernier serait recruté au site A et le domaine N de eRF1 interagirait avec le codon stop. Ceci provoquerait un changement conformationnel du complexe de terminaison. La liaison au ribosome entrainerait l'hydrolyse du GTP par eRF3 induisant une modification de la conformation du domaine M de eRF1, présentant alors le motif GGQ au niveau du PTC pour permettre l'hydrolyse de la liaison ester du peptidyl-ARNt, libérant ainsi la protéine nouvellement synthétisée puis le relargage de eRF3-GDP.

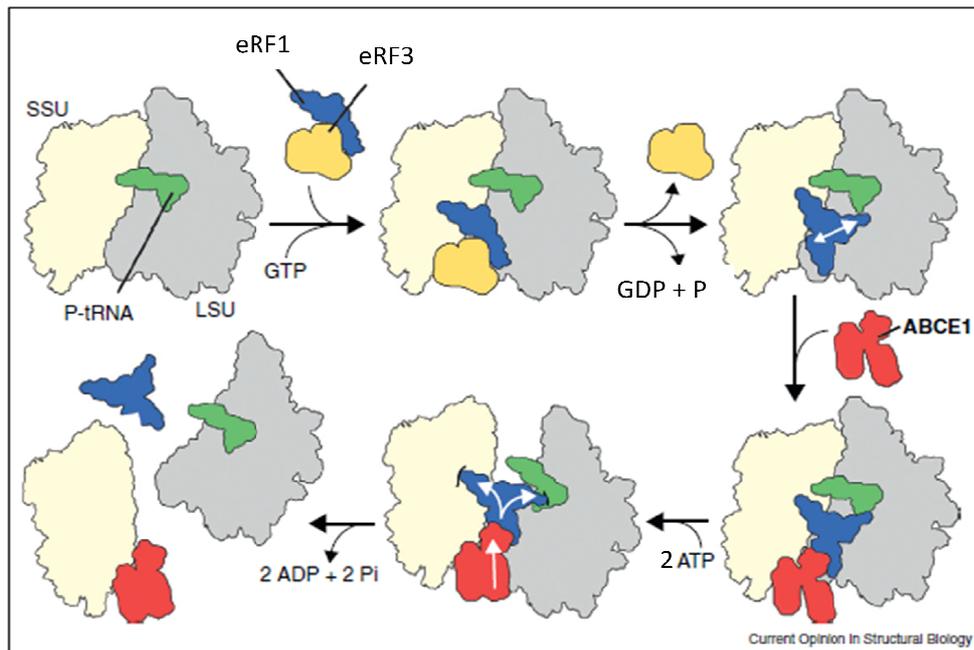


Figure 11 : Modèle de mécanisme de recyclage du ribosome chez les eucaryotes (adapté de Franckenberg *et al*, 2012).

1.2.4. Le recyclage

La dernière étape de la traduction est le recyclage des ribosomes. Elle consiste en la dissociation du complexe de terminaison ayant pour but la mise à disposition des différents acteurs pour une nouvelle initiation de la traduction. La protéine ATPase très conservée ABCE1 est le facteur essentiel de cette étape (Pisarev *et al*, 2010). Son mécanisme exact n'est pas complètement connu à ce jour, mais les études structurales s'accordent sur un modèle commun (figure11) (Jackson *et al*, 2012; Becker *et al*, 2012; Franckenberg *et al*, 2012).

Au début du recyclage, le complexe de post-terminaison se compose du ribosome 80S, de l'ARNt déacylé dans le site P, de l'ARNm et de eRF1 dans le site A. Suite à la dissociation de eRF3-GDP lors de la terminaison, le domaine C de eRF1 est disponible pour permettre l'interaction avec ABCE1 qui s'introduit entre les deux sous-unités du ribosome (Becker *et al*, 2012). Ceci induirait un changement conformationnel de eRF1 et stimulerait l'hydrolyse du peptidyl-ARNt (Shoemaker & Green, 2011). Néanmoins, son action dans le recyclage nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP qui provoque une cascade allostérique menant à la dissociation des deux sous-unités du ribosome et de eRF1 (Franckenberg *et al*, 2012). Par ailleurs, des études montrent qu'ABCE1 interagit avec des facteurs d'initiation de la traduction (Dong *et al*, 2004). Cette observation souligne le fait qu'ABCE1 serait à la fois impliqué dans les étapes de terminaison, de recyclage et de ré-initiation, trois événements qui sont corrélés et coordonnés.

1.3. ARCHEES & EUCARYOTES : DES TRADUCTIONS PROCHES

Les études phylogénétiques réalisées au niveau moléculaire montrent que les archées présentent un statut taxonomique à part entière et constituent le troisième domaine de la vie (Woese *et al*, 1990). Elles se rapprochent des bactéries sur de nombreux aspects, que ce soit au niveau de leur structure cellulaire ou de leur métabolisme. Cependant, les mécanismes et les protéines impliquées dans la réplication, la transcription et la traduction possèdent des similitudes avec ceux rencontrés chez les eucaryotes (Brown & Doolittle, 1997).

Tableau 2 : Comparaison des facteurs de la traduction chez les archées et chez les eucaryotes.

Etapes	Facteurs de la traduction chez les Archaea	Homologues eucaryotes
Initiation	aIF1	eIF1
	aIFA	eIF1A
	aIF2/5B	eIF5B
	aIF2	elf2
	aIF6	eIF6
Elongation	aEF1 α	eEF1
	aEF2	eEF2
Terminaison	aRF1	eRF1
	aEF1 α	eRF3
Recyclage	aABCE1	ABCE1

Dans les trois domaines de la vie (bactéries/archées/eucaryotes), la synthèse des protéines est globalement comparable. Elle fait intervenir des acteurs principaux similaires (ARNm, ARNt, ribosome) et se compose des mêmes grandes étapes (initiation, élongation, terminaison et recyclage). Cependant, chaque domaine possède ses propres caractéristiques (Benelli & Londei, 2011).

Chez les archées, les acteurs de la traduction se rapprochent de ceux des bactéries. Le ribosome 70S se compose de deux sous-unités 30S (16S) et 50S (23S ; 5S), l'ARNm ne subit pas de modifications post-transcriptionnelles et peut être polycistronique. Certains gènes sont précédés par une séquence riche en purines dite Shine-Dalgarno (SD), site de liaison spécifique de la sous-unité 30S lors de l'étape d'initiation bactérienne.

Même si l'aboutissement de l'étape d'initiation est identique pour les 3 domaines de la vie, le mécanisme est très différent entre les bactéries et les eucaryotes. Chez les bactéries, la sous-unité 30S se lie directement sur l'ARNm au niveau de la séquence SD assistée de 3 facteurs d'initiation (IF1-2-3) et d'une molécule de GTP. Ceci permet la fixation de l'ARNt initiateur formyl-méthionylé au niveau du site P. La dissociation de IF3 entraîne la fixation de la sous-unité 50S sur le complexe d'initiation, ce qui provoque l'hydrolyse du GTP et la libération de IF1 et IF2.

Chez les archées, le processus d'initiation est particulier car il combine les caractéristiques observées chez les bactéries et chez les eucaryotes. En effet, les 5 facteurs d'initiation mis en jeu sont homologues des facteurs eucaryotes qui sont très éloignés des facteurs bactériens (tableau 2) (Dennis, 1997; Benelli & Londei, 2011). Cependant, il existe plusieurs mécanismes permettant l'interaction entre l'ARNm et la petite sous-unité du ribosome. En effet, seule une minorité de gènes possède en amont du codon initiateur une séquence SD qui entrainerait une initiation de type « bactérienne ». Par conséquent, un autre mécanisme a été développé pour traduire les ARNm possédant une séquence « leader » courte ou inexistante. Des études suggèrent qu'il s'apparenterait à celui observé chez les eucaryotes, c'est-à-dire à un processus de « scan » de l'ARNm par le complexe d'initiation (Ring *et al*, 2007).

Pour les étapes d'élongation, de terminaison et de recyclage, les archées adoptent des mécanismes comparables et mettent en jeu des facteurs homologues à ce qui est décrit chez les eucaryotes (tableau 2) (Dennis, 1997; Becker *et al*, 2012).

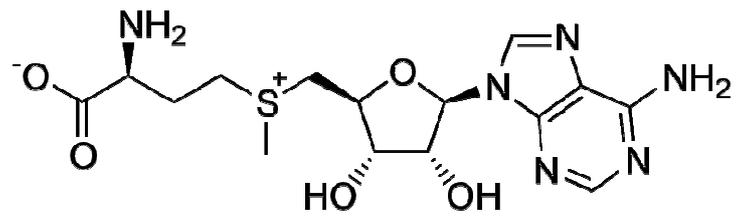


Figure 12 : Structure chimique de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM).

2. TRM112 ET SES 4 METHYLTRANSFERASES PARTENAIRES

Trm112 est une petite protéine qui interagit et active 4 méthyltransférases, toutes impliquées dans le processus de la traduction. En complexe avec Mtt2, Trm112 modifie le facteur de terminaison eRF1 ; associée à Bud23, elle est impliquée dans la biogenèse du ribosome et elle modifie les ARNt lorsqu'elle est en complexe avec Trm11 ou Trm9. Cette partie est dédiée à la description des méthyltransférases en général et de Trm112. Les différents complexes formés par Trm112 et ses partenaires ainsi que les mécanismes biologiques concernés seront présentés dans les parties 3 à 5.

2.1. METHYLATIONS ET METHYLTRANSFERASES

2.1.1. La méthylation, une modification omniprésente

L'addition d'un groupement méthyle sur les molécules biologiquement actives telles que des hormones, des neurotransmetteurs, des lipides, des protéines ou des acides nucléiques provoque un changement de leurs propriétés physicochimiques et donc de leurs activités biologiques. Il s'agit d'une modification très fréquente dans les trois domaines de la vie. Les fonctions biologiques de la méthylation sont extrêmement vastes et concernent des processus comme la biosynthèse, le métabolisme, la détoxification, la transduction du signal, la sécrétion et la réparation des protéines et la biogenèse des acides nucléiques.

La méthylation tient un rôle très important dans la régulation épigénétique où elle a pour cibles principales l'ADN et les protéines histones. Chez les vertébrés, l'ADN est méthylé majoritairement sur les cytosines au niveau de sites CpG, c'est-à-dire lorsque dans la séquence, une cytosine et une guanine se succèdent. L'ADN humain contient entre 80 et 90% des sites CpG méthylés. Cependant, il existe des zones riches en bases GC, appelées îlots CpG, qui ne sont pas méthylées et qui sont souvent associées à des régions promotrices (Jabbari & Bernardi, 2004). La méthylation des histones se réalise sur des résidus spécifiques, arginine ou lysine et permet d'activer ou de réprimer l'expression des gènes (Grewal & Rice, 2004). Les processus de méthylation/déméthylation sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes et jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, postnatal ainsi que dans le développement de certains cancers.

La méthylation est catalysée par une grande diversité d'enzymes appelées méthyltransférases (MTases) (EC 2.1.1) qui pour la majorité dépendent du même cofacteur : la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) (figure 12) (Cheng & Blumenthal, 1999; Martin & McMillan, 2002).

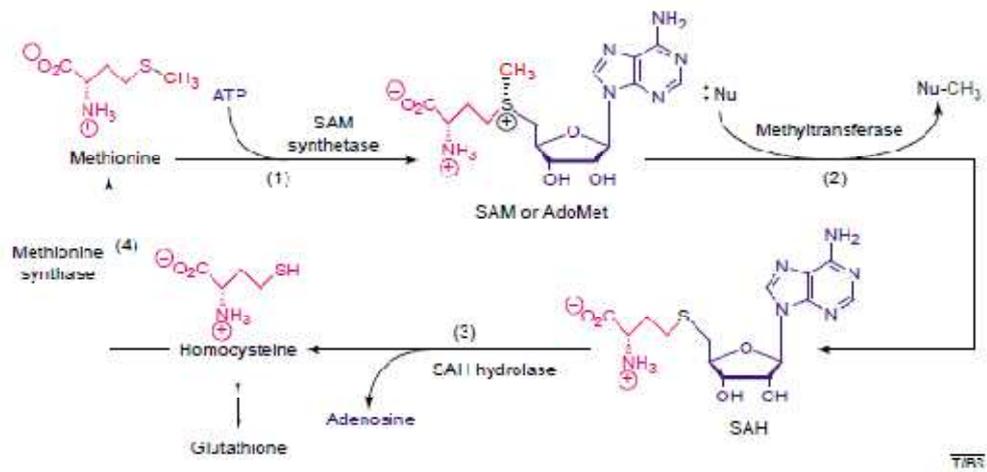


Figure 13 : Le cycle de la SAM (d'après Fontecave *et al*, 2004).

2.1.2. Présentation de la SAM

La SAM est un composé biologique essentiel à de nombreux processus biochimiques. Il s'agit du deuxième substrat le plus largement utilisé après l'ATP (Cantoni, 1975). Elle est synthétisée par la SAM synthétase à partir de L-méthionine et d'ATP (figure 13-(1)). La SAM possède une fonction sulfonium centrale dont seul le stéréoisomère S est produit lors de sa synthèse. La SAM est un donneur de méthyle activé car la fonction sulfonium portant le méthyle est chimiquement instable et fait de ce méthyle un bon groupement partant. Durant le transfert du groupement méthyle, la SAM est convertie en S-adenosyl-L-homocystéine (SAH). L'enthalpie libre de cette réaction est de $-17 \text{ kcal.mol}^{-1}$ libérant ainsi plus de deux fois plus d'énergie que l'hydrolyse de l'ATP en ADP+Pi, dont l'enthalpie est de $-7,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (Cantoni, 1975; Cheng & Blumenthal, 1999). La SAH est ensuite hydrolysée en adénosine et homocystéine par la SAH hydrolase (figure 13-(2-3)) (Palmer & Abeles, 1979). Puis, l'homocystéine peut être soit transformée en glutathion, antioxydant majeur de la cellule, soit méthylée pour régénérer la méthionine (figure 13-(4)). Ces réactions constituent un cycle qui fait partie du métabolisme des dérivés d'acides aminés contenant du soufre. Ce cycle est lui-même régulé par la SAM au niveau génétique (Fontecave *et al*, 2004).

La fonction principale de la SAM est de donner un méthyle mais ce n'est pas son unique caractéristique : elle est aussi la source d'autres groupements chimiques à transférer. Ceci s'explique principalement par le caractère électrophile des carbones liés à l'atome de soufre chargé positivement mais également par le fait que la SAM peut réagir dans des réactions ioniques ou radicalaires (Fontecave *et al*, 2004).

La SAM peut être la source de groupements méthylène pour la synthèse de certains acides gras. Elle donne par exemple son groupement amine pour former le DAPA lors de la synthèse de la biotine. Elle est utilisée comme donneur de ribosyle pour la modification de certaines bases d'ARNt et peut être source de groupement aminoalkyle pour la synthèse de polyamines ou encore pour la modification des ARN (Fontecave *et al*, 2004). Par ailleurs, la SAM peut intervenir dans des réactions radicalaires en tant que source de radicaux 5'-désoxyadénosyle qui interviennent dans de nombreuses réactions biologiques, dans des voies de dégradation ou de modification des ARNt et dans la réparation de l'ADN (Jarrett, 2003).

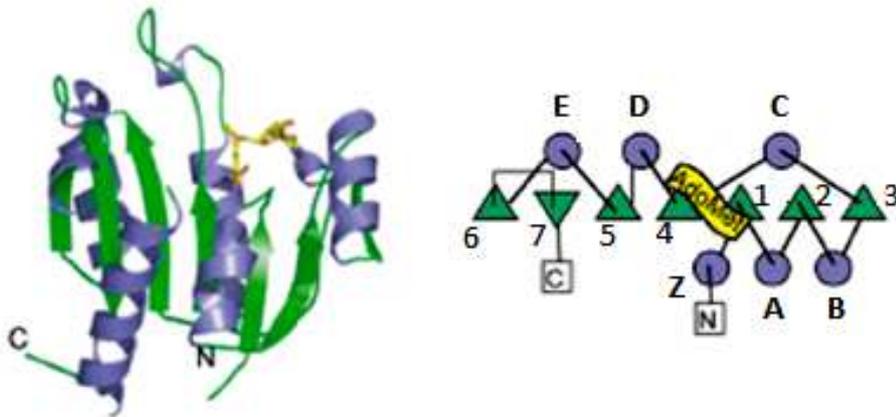


Figure 14 : Organisation tridimensionnelle des MTases de classe I.

Repliement caractéristique des MTases de classe I, les brins β sont en vert et les hélices α en bleu. A gauche, la structure est celle de l'enzyme M.HhaI (pdb : 6MHT) (d'après Schubert et al, 2003).

2.1.3. Les MTases dépendantes de la SAM

La SAM est utilisée dans de nombreuses réactions enzymatiques mais son rôle principal est celui de cofacteur dans les réactions catalysées par les enzymes MTases. Bien qu'il existe plusieurs types de MTases, la grande majorité est dépendante de la SAM (Cheng & Blumenthal, 1999). Dans cette famille de MTases, 31 classes d'enzymes ont été identifiées en fonction de leur substrat et du type d'atome méthylé (EC 2.1.1.X.). Cependant, le développement des études structurales permettra de définir 5 classes de MTases différentes (Schubert *et al*, 2003a). La première structure cristallographique d'une MTase en complexe avec la SAM a été résolue en 1993. Il s'agit de l'ADN C5-cytosine MTase M.HhaI dont le repliement représente une caractéristique des MTases de classe I (Cheng *et al*, 1993).

2.1.3.1. Les MTases de classe I

Malgré des cibles différentes et une faible identité de séquence, les MTases de classe I adoptent un repliement canonique de type Rossmann très conservé auquel peuvent venir s'ajouter des domaines supplémentaires (Martin & McMillan, 2002). Le cœur conservé se compose d'un feuillet β central à 7 brins avec le 7^e brin antiparallèle aux autres (6 \uparrow 7 \downarrow 5 \uparrow 4 \uparrow 1 \uparrow 2 \uparrow 3 \uparrow ; figure 14). Ce feuillet est entouré de chaque côté par 3 hélices α formant un sandwich $\alpha\beta\alpha$. Les hélices Z, A et B se situent d'un côté du feuillet et les hélices C, D et E de l'autre (Schubert *et al*, 2003a).

Le site de liaison de la SAM est localisé dans la partie N-terminale du feuillet β et implique les résidus des boucles situées entre les brins 1, 2 et 3. La région de fixation du substrat se situe au niveau de la partie C-terminale du feuillet β . Etant donné la diversité de substrats possibles, cette région est structurellement très variable au sein de la même classe d'enzymes. Les domaines supplémentaires peuvent s'ajouter dans la partie C-terminale et participent ainsi à l'interaction avec des substrats de grande taille. Cependant, ils peuvent également s'insérer entre le brin 5 et l'hélice E ou entre les brins 6 et 7 pour former un « couvercle » sur le dessus du site actif (Martin & McMillan, 2002).

Même si le site de liaison de la SAM est à une position équivalente chez toutes les MTases de classe I, et que le cofacteur adopte une conformation identique au sein du site actif, les résidus impliqués dans cette interaction sont très peu conservés (Cheng & Blumenthal, 1999). L'alignement de séquences basé sur les superpositions de structures a permis d'identifier deux motifs intervenant dans la liaison de la SAM dans la partie N-terminale de la structure.

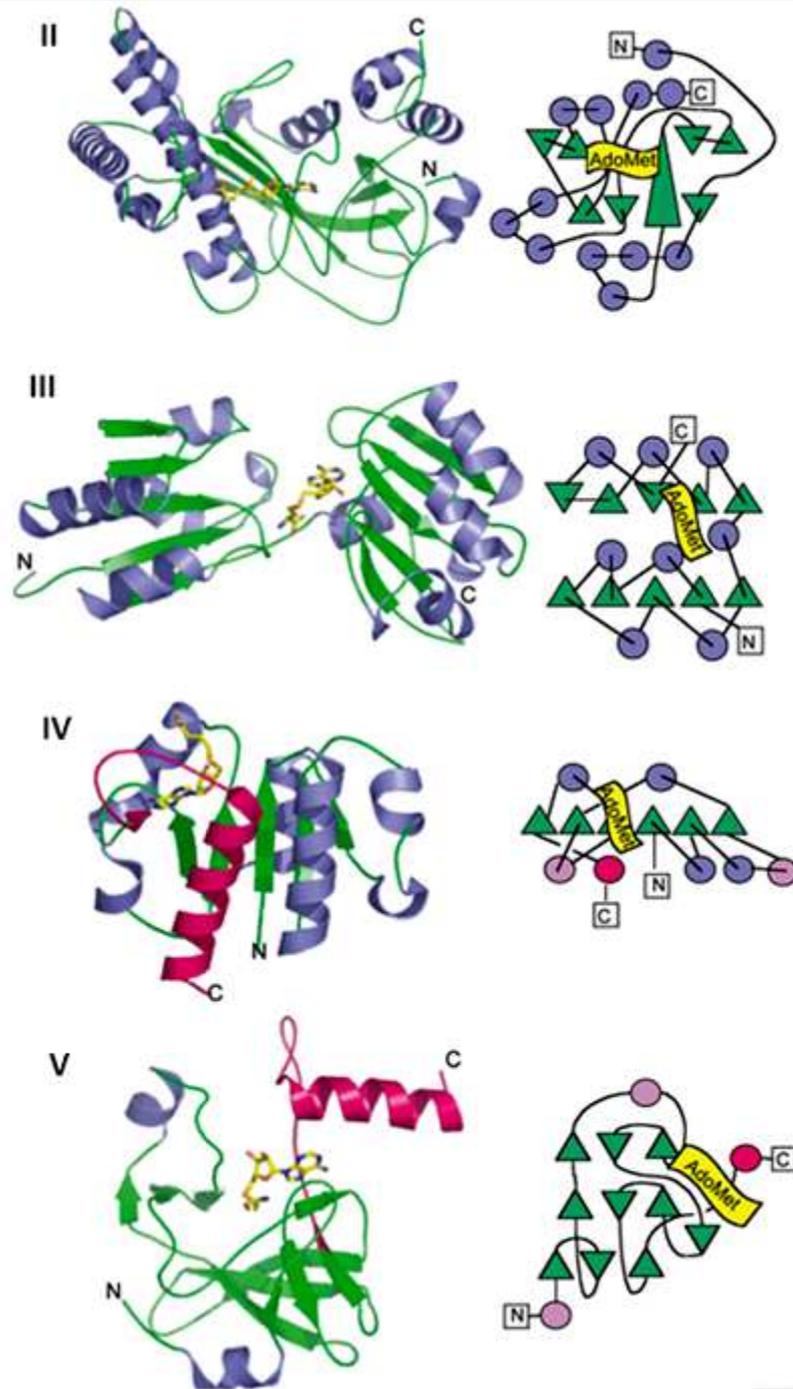


Figure 15 : Organisation tridimensionnelle des MTases de classe II à V (d'après Schubert *et al*, 2003).

Pour chaque classe, à gauche apparaît une structure tertiaire représentative et à droite le diagramme topologique correspondant. Du haut vers le bas, la figure montre les structures de MetH (pdb : 1MSK), de CbiF (pdb : 1CBF), de YibK (pdb : 1MXI) et Set7/9 (pdb : 1O9S). Les brins β sont représentés en vert, les hélices α en bleu pour celles du cœur de l'enzyme, en magenta pour celles formant le nœud et en rose pour celles non conservées au sein d'une même famille.

Le motif I est une séquence riche en glycines (E/D)XGXGXG située entre le brin 1 et l'hélice A qui interagit avec la partie aminoacylée de la SAM. Le motif II est une boucle acide localisée entre le brin 2 et l'hélice B qui réalise des liaisons hydrogènes avec les fonctions hydroxyles du ribose de la SAM. Les fonctions aromatiques et alkyles de la SAM interagissent avec des résidus hydrophobes dont la nature et la position sont variables au sein de la même classe de MTases (Martin & McMillan, 2002).

Les MTases de classe I méthylent une grande variété de substrats : protéines, acides nucléiques, petites ou grosses molécules. Ceci peut s'expliquer par le fait que les MTases ont une forte spécificité pour la position cible et son environnement immédiat. Cependant, cette hypothèse met en exergue le problème de l'accessibilité à l'atome cible. Avec la structure cristallographique de la MTase HhaI en complexe avec la SAM et un fragment d'ADN double brin, on observe que la base ciblée est retournée de 180°. En effet, une rotation au niveau de la liaison phosphodiester entraîne un retournement de la base qui prend place dans le site catalytique de la MTase (Klimasauskas *et al*, 1994). Le mécanisme de retournement n'implique pas la destruction de liaisons covalentes mais la rupture des liaisons hydrogènes impliquées dans l'appariement et la perte des interactions Π de l'empilement avec les bases adjacentes (Cheng & Roberts, 2001; Klimasauskas *et al*, 1994).

2.1.3.2. Les MTases de classe II à V

Les études structurales de différentes MTases ont montré que celles-ci pouvaient adopter différents repliements alors que ces enzymes catalysent toutes une réaction de méthylation (Schubert *et al*, 2003a).

❖ Classe II

En 1996, la structure de la méthionine synthétase cobalamine-dépendante MetH d'*E.coli* a donné naissance à une nouvelle classe de MTases. Le repliement observé pour le domaine C-terminal portant l'activité de méthylation est très différent de celui décrit pour les MTases de classe I (figure 15) (Dixon *et al*, 1996). En effet, ce domaine se compose d'un large feuillet β antiparallèle bordé de chaque côté par des groupes d'hélices α . La SAM se lie dans une conformation étendue dans un petit sillon sur le bord des brins β et forme des liaisons hydrogènes avec un motif conservé de type RxxxGY (Dixon *et al*, 1996).

❖ Classe III

Deux ans plus tard, une autre classe de MTases devait être créée. En effet, la MTase CbiF impliquée dans la biosynthèse de la vitamine B12 présente une structure à deux domaines (Schubert *et al*, 1998). Le site actif de cette nouvelle famille structurale s'insère dans une crevasse formée par le contact entre 2 domaines $\alpha\beta\alpha$, chacun constitué de 5 brins et 4 hélices (figure 15). Malgré la présence d'un motif GxGxG similaire à celui des MTases de classe I situé à l'extrémité C-terminale du premier brin β , celui-ci n'est pas impliqué dans la liaison avec la SAM. Le donneur de méthyle est dans ce cas fermement replié et se lie à l'interface des deux domaines (Schubert *et al*, 2003a).

❖ Classe IV

Cette quatrième famille de MTases est également nommée SPOUT, pour SpoU-TrmD (Anantharaman *et al*, 2002). La structure des MTases de classe IV ressemble à celle des MTases de classe I par le repliement de type Rossmann. Cependant, les enzymes de cette famille se distinguent par 3 aspects : elles possèdent un feuillet β , composé de 6 brins parallèles, entouré de 7 hélices α ; le site actif est localisé au niveau de l'interface entre les sous-unités de l'homodimère et fait intervenir des résidus des deux monomères ; la partie C-terminale, composée de 30 résidus incluant la dernière hélice, est plaquée sur la structure et forme un nœud impliqué dans la fixation de la SAM (figure 15) (Schubert *et al*, 2003a).

❖ Classe V

Les MTases de la famille structurale la plus récente sont également appelées protéines à domaine SET. Certaines de ces enzymes méthylent les résidus lysines présents dans les boucles flexibles des histones (Yeates, 2002). Le repliement des MTases de classe V se caractérise par une série de 8 brins β incurvés formant 3 petits feuilletts (figure 15). Comme pour la classe IV, la partie C-terminale se plaque sous une boucle de la surface et forme un « nœud » impliqué dans la fixation de la SAM.

2.1.4. Mécanisme enzymatique

Le mécanisme enzymatique de toutes les MTases dépendantes de la SAM se réalise par transfert direct du groupement méthyle vers le site nucléophile du substrat avec une inversion de symétrie selon un mécanisme de type SN2 (Woodard *et al*, 1980). Cette réaction requiert une déprotonation du substrat qui peut avoir lieu avant, pendant ou après le transfert de méthyle.

Les MTases de classe I ont été les plus étudiées et même au sein d'une famille structurellement conservée, une grande diversité de mécanismes a été développée du fait de la grande diversité de la nature chimique du nucléophile ciblé pour la méthylation (Schubert *et al*, 2003a).

❖ N-méthylation

La méthylation d'un azote est très répandue que ce soit dans la modification des acides nucléiques ou dans celle des protéines. Trois des MTases activées par Trm112 ont pour cible un atome d'azote (Trm11, Mtq2 et Bud23). Deux d'entre elles (Mtq2 et Trm11) présentent un motif (D/N/S)PP(Y/F) conservé (Armengaud *et al*, 2004; Liger *et al*, 2011). Celui-ci n'est pas spécifique d'un nucléotide ou d'un résidu en particulier, mais permet de cibler un atome d'azote conjugué à un système plan tel qu'une fonction amide ou une base nucléotidique (Bujnicki, 2000). Pour les MTases de classe I, ce motif se situe à l'extrémité C-terminale du brin β 4. La résolution de structures cristallographiques de MTases en complexe avec la SAM et leur substrat (ADN N6-adénine MTase, ADN N4-cytosine MTase, N5-glutamine MTase PrmC) ont permis de décrire le réseau d'interactions du site actif (Goedecke *et al*, 2001; Gong *et al*, 1997; Schubert *et al*, 2003b; Graille *et al*, 2005). La succession des deux prolines permet d'orienter l'extrémité C-terminale du brin β 4 vers la surface du site actif. Deux liaisons hydrogènes se forment entre l'azote nucléophile et l'oxygène de la chaîne latérale du résidu (D/N/S) ainsi qu'entre l'azote nucléophile et l'oxygène du groupement carbonyle de la première proline. Celles-ci permettent de positionner le substrat afin que la paire d'électrons libres de l'azote pointe vers le groupement méthyle (Malone *et al*, 1995). Après le transfert de méthyle, l'intermédiaire méthylamine est chargé positivement et retrouvera sa neutralité en perdant un proton lors de la libération du produit (Schubert *et al*, 2003b). Certaines MTases de classe I telles que Bud23, ne possèdent pas ce motif mais peuvent avoir recours à des résidus acides pour neutraliser la charge positive du groupement amine (Schubert *et al*, 2003a).

❖ C-méthylation

De nombreuses structures d'ADN C5-cytosine MTases telles que M.HhaI, en complexe avec leur substrat, ont été résolues (Klimasauskas *et al*, 1994) et leur site actif a pu être cartographié. Le dipeptide PC est universellement conservé dans le site actif des C5-cytosine MTases et ressemble d'un point de vue structural à la deuxième moitié du motif (D/N/S)PP(Y/F). De plus, un résidu aspartate se situe dans la même région que (D/N/S). Dans l'exemple de M.HhaI, l'azote N4 de la cytosine est orienté par rapport à la SAM par des liaisons hydrogènes de façon à présenter le carbone C5 en tant que cible de méthylation.

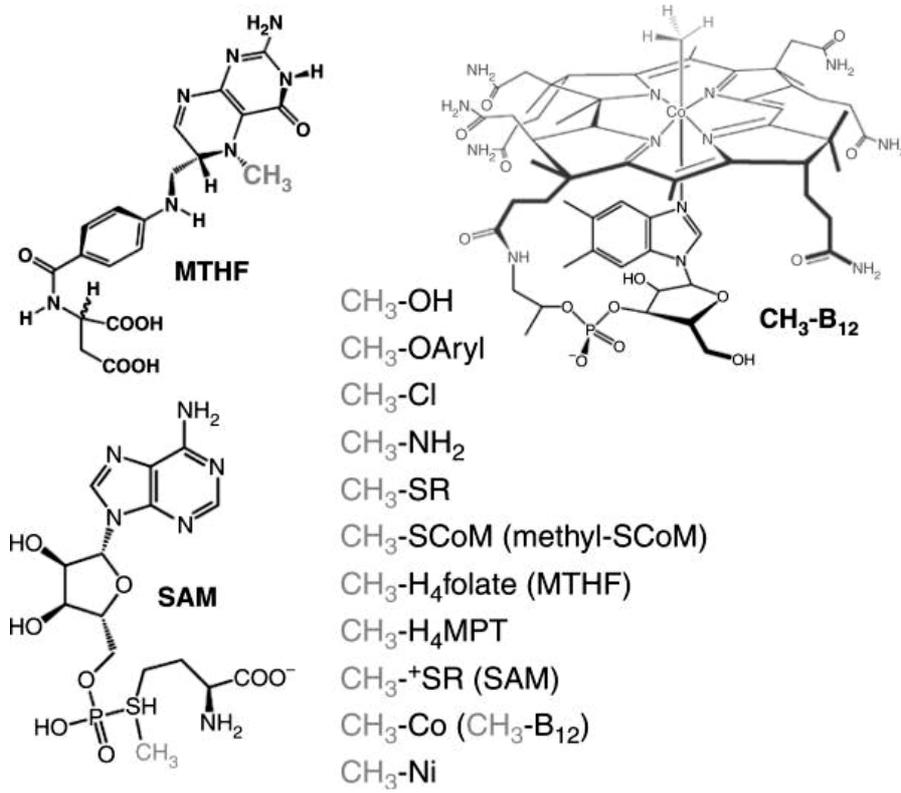


Figure 16 : Molécules donneur de méthyle (d'après Ragsdale *et al*, 2008).

La méthylation des atomes de carbone est plus difficile que celle des atomes d'azote polarisables. Le nucléotide doit donc être activé par la formation d'une liaison covalente entre le thiol de la cystéine du motif PC et le carbone 6 (Wu & Santi, 1987). Ceci génère une charge négative sur le carbone 5 qui facilite alors le transfert de méthyle.

❖ O-Méthylation

Pour la méthylation sur un atome d'oxygène, il existe plusieurs mécanismes possibles qui diffèrent en fonction du groupement contenant l'oxygène cible. Pour la catéchol O-MTase, un ion Mg^{2+} est requis afin de lier et orienter les deux hydroxyles du catéchol dans le site actif (Vidgren *et al*, 1994). Un résidu lysine présent à proximité, permet de déprotoner le substrat avant l'attaque nucléophile sur le groupement méthyle. Les chalcone et isoflavone O-MTases n'utilisent pas d'ion Mg^{2+} mais un résidu histidine afin de déprotoner les hydroxyles des métabolites végétaux (Zubieta *et al*, 2001).

La O-méthylation peut également viser une fonction acide carboxylique. C'est le cas de la quatrième MTase activée par Trm112, Trm9 (Kalhor & Clarke, 2003). Par ailleurs, l'étude des structures de TYW4 (MTase impliquée dans la modification d'ARNt) (Suzuki *et al*, 2009), de CheR (une glutamate MTase) (Djordjevic & Stock, 1997), et de PPM1/LCMT1 (responsables de la méthylation de la leucine C-terminale de PP2A chez la levure et chez l'Homme respectivement) (Leulliot *et al*, 2004; Stanevich *et al*, 2011) ont mis en évidence deux résidus R et Y très conservés pointant vers le site actif de l'enzyme. Ces résidus pourraient positionner précisément le substrat afin que le groupement carboxylique chargé négativement puisse attaquer le méthyle de la SAM. Par ailleurs, une autre paire de résidus, Q et W, peut être utilisée pour le positionnement du carboxylate dans le site actif. Ceci a été observé chez les MTases telles que SAMT, BAMT et JAMT ayant pour substrats de petits acides carboxyliques (Zubieta *et al*, 2003).

2.1.5. Les MTases indépendantes de la SAM

Une grande partie des MTases dépend de la SAM. Il existe cependant certaines enzymes qui utilisent d'autres molécules comme donneurs de méthyle : le méthanol, les méthylamines et les méthanethiols. Les réactions enzymatiques impliquent alors des cofacteurs tels que le méthyltétrahydrofolate et ses dérivés (MTHF) ou la méthylcobalamine ou méthylvitamine B12 (CH_3-B_{12} ; figure 16) et participent aux voies métaboliques de biosynthèse de la méthionine, de méthanogénèse et d'acétogénèse et à la modification d'ARN ou à la synthèse de thymidylate.

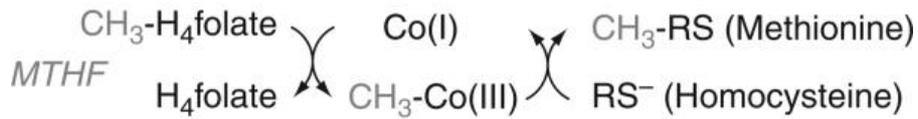


Figure 17 : Réactions de transfert de méthyle dans le cas de la méthionine synthase (d'après Ragsdale *et al*, 2008).

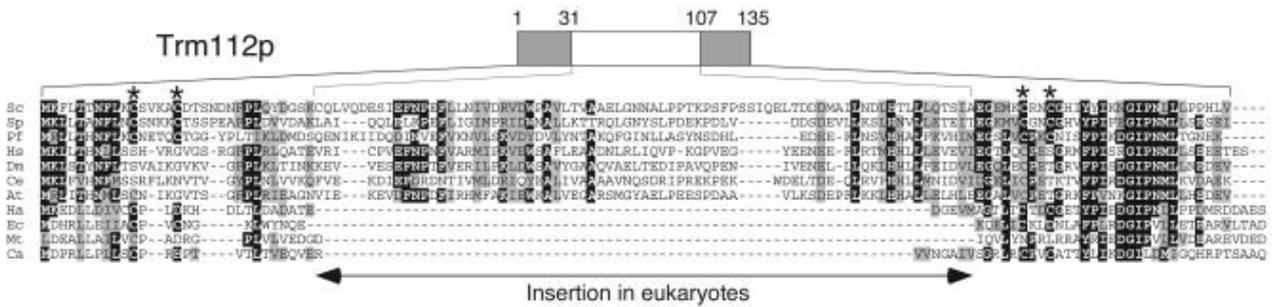


Figure 18 : Alignement de séquences de Trm112 (d'après Purushothaman *et al*, 2005).

7 séquences de protéines eucaryotes (Sc, *Saccharomyces cerevisiae* ; Sp, *Schizosaccharomyces pombe* ; Pf, *Plasmodium falciparum* ; Hs, *Homo sapiens* ; Dm, *Drosophila melanogaster* ; Ce, *Caenorhabditis elegans* ; At, *Arabidopsis thaliana*), 1 séquence de protéine d'Archaea (Ha; *Halobacterium* sp. NRC-1), 3 séquences de protéines bactériennes (Ec, *E. coli*; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Ca, *C. aurantiacus*).

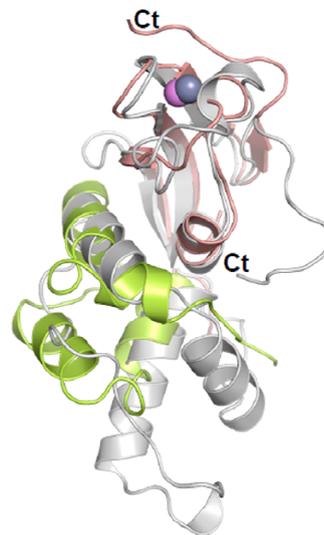


Figure 19 : Superposition des structures cristallographiques de Trm112 (d'après Liger *et al*, 2011).

La structure de Sc est en gris et la structure de Ec est en rose pour le domaine en doigt de zinc et en vert pour le domaine central. Les atomes de zinc sont représentés par des sphères rose et grise.

Contrairement à la SAM, les autres donneurs de méthyle ne sont pas activés ; la réaction de méthylation se fait en plusieurs étapes et nécessite un intermédiaire. Par exemple, la méthionine synthase utilise le MTHF comme donneur de méthyle et la vitamine B12 comme intermédiaire afin de méthyler l'accepteur final : l'homocystéine. La vitamine B12 dans l'état d'oxydation Co(I) est un puissant nucléophile qui réagit avec le méthyle du MTHF pour générer un intermédiaire organométallique MeCbl. Le groupement méthyle est ensuite transféré sur l'homocystéine pour former la méthionine (figure 17). Les MTases dépendantes de la vitamine B12 contiennent trois composants impliqués dans la liaison et l'activation du donneur de méthyle dans la fixation et l'oxydation de la vitamine B12 ainsi que dans la liaison de l'accepteur final.

2.2. TRM112 INTERAGIT AVEC ET ACTIVE 4 MTases

La structure cristallographique de la protéine Trm112 de *S. cerevisiae* (*Sc*) a été établie à 1,7Å de résolution (Heurgue-Hamard *et al*, 2006) et celle de *Encephalitozoon cuniculi* (*Ec*) en complexe avec Mtq2 à 2,1Å de résolution (Liger *et al*, 2011).

2.2.1. Trm112 possède un domaine en doigt de zinc conservé

Les analyses de séquences révèlent l'existence d'orthologues de Trm112 dans les trois domaines de la vie (Purushothaman *et al*, 2005). Les protéines d'archées ou de bactéries sont plus courtes : elles possèdent environ 55 à 65 résidus (7kDa), alors que les protéines eucaryotes contiennent environ 130 résidus (15kDa) (figure 18). Chez les eucaryotes, il apparaît une région centrale supplémentaire (résidus 39 à 101, numérotation de la protéine Trm112 de la levure *S. cerevisiae*) au milieu de régions conservées (résidus 1 à 38 et 102 à 135) (Heurgue-Hamard *et al*, 2006). Les structures cristallographiques de Trm112 montrent que ces régions s'organisent en deux domaines : un domaine central peu conservé et un domaine en doigt de zinc conservé regroupant les régions N et C-terminales. Les deux structures sont très similaires malgré une faible identité de séquence (Z-score = 9,3 – RMSD = 2,9Å – 18% d'identité de séquence ; figure 19) (Liger *et al*, 2011). Le domaine en doigt de zinc se compose d'une hélice α et d'un feuillet β formé de 3 ou 4 brins antiparallèles pour *Sc* et *Ec* respectivement. La valeur de RMSD pour ce domaine est de 1,4Å et l'identité de séquence de 30%, ce qui traduit la conservation de ce domaine par rapport au reste de la protéine.

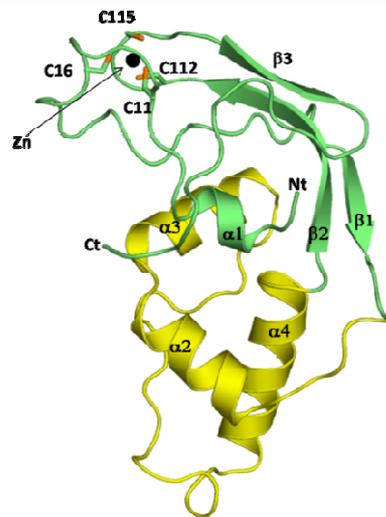


Figure 20 : Représentation en ruban de la structure cristallographique de Trm112 de *Sc*. Le domaine en doigt de zinc est coloré en vert et le domaine central en jaune, l'atome de zinc est schématisé en une sphère noire.

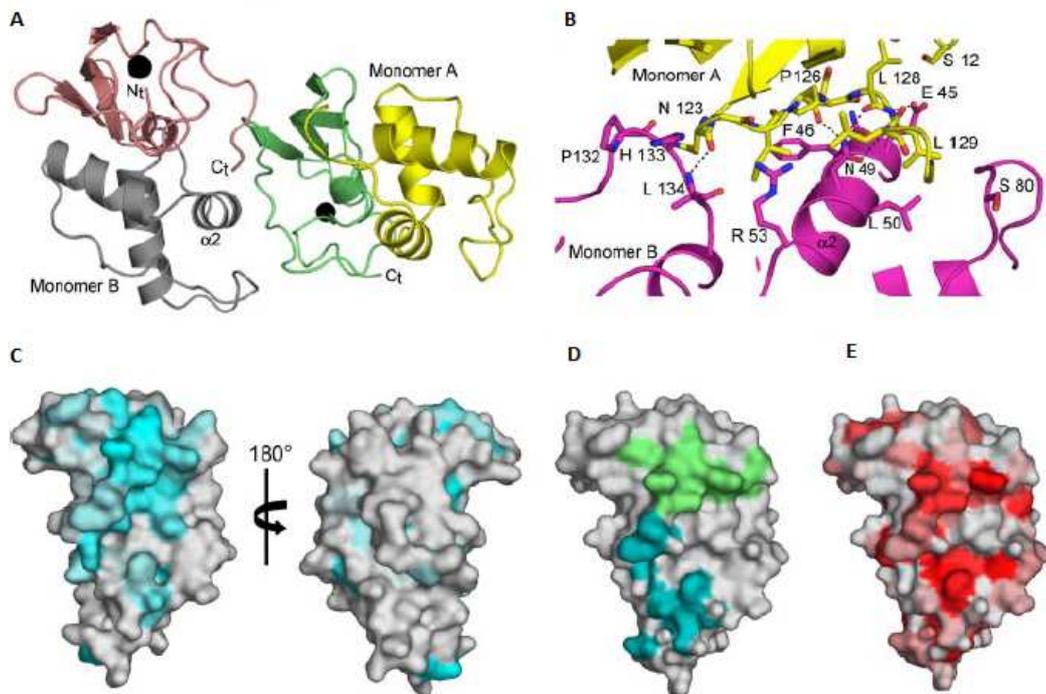


Figure 21 : Trm112 forme un homodimère (d'après Heurgué-Hamard *et al*, 2006).

A : Formation de l'homodimère au sein du cristal. Pour les monomères A et B, les domaines en doigt de zinc sont en vert et rose respectivement, et les domaines centraux en jaune et gris respectivement.

B : Gros plan sur les résidus situés à l'interface des monomères, le monomère A est en jaune et le B en magenta, les liaisons hydrogènes sont symbolisées par des pointillés noirs.

C : Représentation de la conservation des résidus à la surface parmi les orthologues eucaryotes de Trm112. Les résidus les moins conservés sont en blanc alors que les plus conservés sont en cyan.

D : Cartographie à la surface des résidus impliqués dans la formation de l'homodimère, ceux du monomère A sont en vert et ceux du B sont en bleu.

E : Représentation des résidus hydrophobes (rouge) et polaires (blanc) à la surface du monomère.

L'atome de zinc est coordonné par 4 cystéines dont la signature est particulièrement conservée chez les champignons et les levures et qui consiste en $^{11}\text{Cx}_5\text{C}^{16}$ et $^{112}\text{Cx}_2\text{C}^{115}$ avec x correspondant à un résidu quelconque (figure 20). Dans la partie N-terminale, les deux cystéines sont situées sur la boucle reliant l'hélice 1 et le brin 1 ; dans la région C-terminale, elles sont placées entre les brins 2 et 3 (Heurgue-Hamard *et al*, 2006). Par ailleurs, ce domaine présente des similitudes avec des protéines composées d'un feuillet β à 4 brins et d'un doigt de zinc qui ont pour propriété spécifique de lier les acides nucléiques (Purushothaman *et al*, 2005).

Le domaine central, peu conservé, est formé de 3 ou 4 hélices α pour *Sc* et *Ec* respectivement. La superposition de ces domaines uniquement présente un RMSD de 3,4Å et une identité de séquence de 5%, ce qui confirme la divergence observée lors de l'analyse de séquences. Par ailleurs, une différence notable entre les structures est la conformation de l'extrémité C-terminale très conservée. En effet, chez *Ec*, cette région en brin β est impliquée dans l'interaction avec Mtq2. Si celle-ci adoptait le même repliement que celui observé dans la structure de la protéine Trm112 de *Sc* sous sa forme isolée, l'interaction serait détruite du fait de plusieurs chocs stériques (Liger *et al*, 2011). Cependant, cette conformation n'empêche pas la formation d'un homodimère chez *Sc*.

2.2.2. Trm112 seule forme un homodimère

L'analyse de Trm112 de *Sc* par tamisage moléculaire en présence de 500mM NaCl montre que celle-ci est éluée en homodimère à un poids moléculaire de 34kDa. De plus, l'analyse de l'empilement cristallin révèle la présence d'un homodimère asymétrique avec une surface enfouie inaccessible au solvant de 1400Å. Cette valeur correspond à l'aire moyenne caractéristique observée dans des complexes protéine-protéine stables (Lo Conte *et al*, 1999). Dix résidus de chaque monomère sont impliqués dans l'interaction et huit résidus sur dix d'un des monomères sont localisés dans la région C-terminale très conservée. Les résidus impliqués de l'autre monomère sont quant à eux situés au sein du domaine central moins conservé et à l'extrémité de la molécule (figure 21). Cette interface est constituée de cinq liaisons hydrogènes et d'interactions hydrophobes ; la formation de l'homodimère permet d'enfouir des régions hydrophobes et donc de solubiliser la protéine elle-même (Heurgue-Hamard *et al*, 2006).

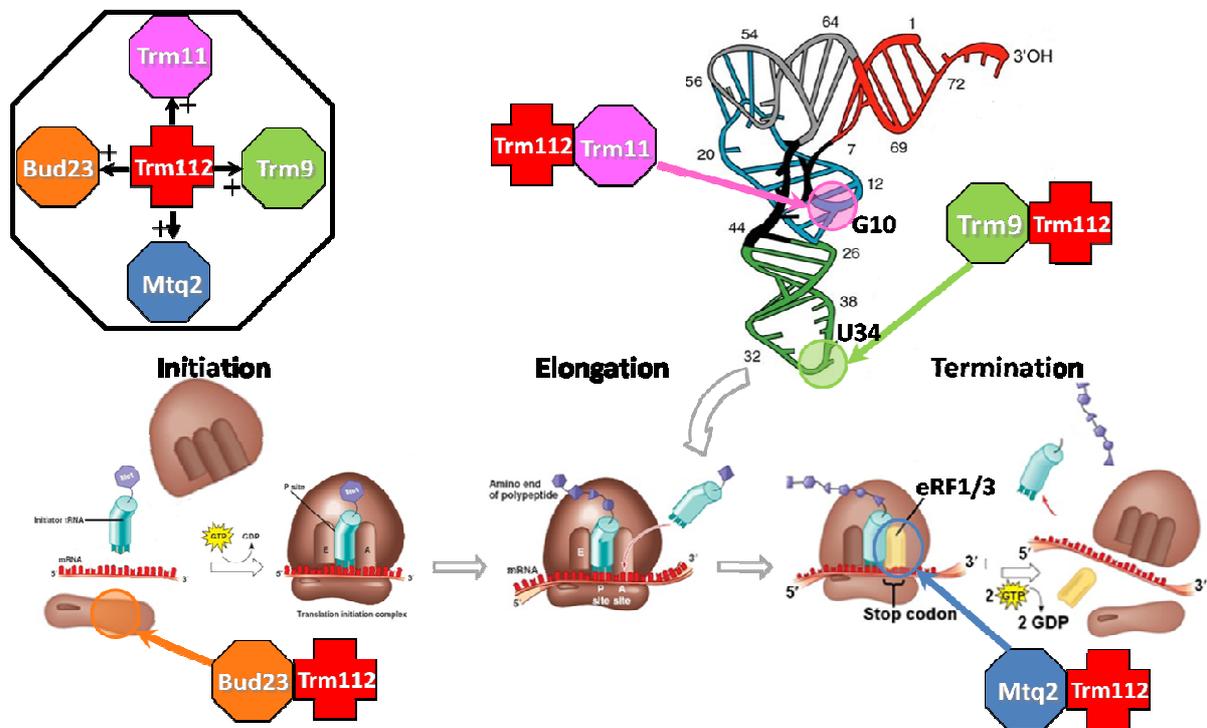


Figure 22 : Schématisation de la plateforme d'activation Trm112.

2.2.3. Trm112 : une plateforme d'activation d'enzymes impliquées dans la traduction

2.2.3.1. Quatre partenaires connus impliqués dans la traduction

A ce jour, Trm112 est décrite pour interagir avec 4 MTases chez les eucaryotes. Des analyses globales de complexes protéiques chez la levure ont suggéré l'existence de trois partenaires dont l'interaction avec Trm112 a été validée par la suite : il s'agit de Mtq2, Trm9 et Trm11 (Gavin *et al*, 2002). La quatrième, Bud23, a été identifiée plus récemment (Figaro *et al*, 2012). Ces quatre partenaires sont des MTases de classe I dépendantes de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) et sont toutes impliquées dans le processus de la traduction (figure 22).

- ✓ Le complexe Mtq2-Trm112 méthyle le facteur de terminaison eRF1 et en particulier la chaîne latérale de la glutamine du motif GGQ universellement conservé (Heurgue-Hamard *et al*, 2005, 2006).
- ✓ Le complexe Trm11-Trm112 modifie la guanosine en position 10 de certains ARNt (Purushothaman *et al*, 2005).
- ✓ Le complexe Trm9-Trm112 catalyse la dernière étape de la modification de l'uridine 34 de certains ARNt (Kalhor & Clarke, 2003; Mazauric *et al*, 2010; Studte *et al*, 2008).
- ✓ Le complexe Bud23-Trm112 est impliqué dans la biogenèse de la petite sous-unité du ribosome et méthyle la guanosine 1575 de l'ARNr 18S (White *et al*, 2008; Figaro *et al*, 2012).

In vivo, la délétion du gène *TRM112* chez la levure *S. cerevisiae* cause un défaut de croissance qui multiplie par 4 le temps de génération, passant ainsi de 90 à 360 minutes (Mazauric *et al*, 2010). Ce phénotype prouve l'importance du rôle de Trm112 dans la traduction et dans les différents mécanismes biologiques où sont impliquées les MTases partenaires. En effet, cette petite protéine occupe une place à l'interface entre la synthèse du ribosome et sa fonction, ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un rôle de régulateur de ces processus. Si c'est le cas, son niveau d'expression *in vivo* doit être finement régulé afin de maîtriser l'interaction avec chaque MTase (Figaro *et al*, 2012). La quantification *in vivo* du nombre de copies de Trm112 chez *S. cerevisiae* et de ses partenaires amène à penser que Trm112 est limitante et qu'il y aurait une compétition entre les MTases pour interagir avec la protéine activatrice. En effet, la somme des nombres de copies de chaque partenaire équivaut à deux fois le nombre de copies de Trm112 disponibles dans la cellule (Ghaemmaghami *et al*, 2003).

2.2.3.2. D'autres partenaires ?

Certaines études de purification de complexes de levure à grande échelle ont proposé Lys9 comme partenaire potentielle de Trm112 (Gavin *et al*, 2002). Lys9 est une alcool-déshydrogénase impliquée dans la voie de biosynthèse de la lysine. Cependant, il ne s'agit pas d'une MTase et elle adopte un repliement différent avec un brin β manquant par rapport à la structure spécifique des MTases de classe I. De plus, aucune analyse n'a été publiée sur l'implication de Trm112 dans l'activité catalytique de Lys9.

Des études réalisées sur le complexe Bud23-Trm112 et sur la biogenèse des ribosomes ont suggéré l'existence de deux partenaires supplémentaires, les MTases Nop2 et Rcm1, qui sont impliquées dans la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome (Sardana & Johnson, 2012). Cependant, malgré l'interaction physique *in vivo* mise en évidence par les expériences de co-immunoprécipitation, la présence de Trm112 n'est pas nécessaire à l'activité des deux MTases. Les chercheurs émettent alors l'hypothèse d'un rôle partiel de Trm112 pour l'interaction avec Nop2 et Rcm1 (Sharma *et al*, 2013b).

2.2.3.3. Systèmes similaires

Il existe plusieurs exemples de MTases ayant besoin d'une protéine activatrice, tels que les MTases d'ARNt Trm6 et Trm8 qui forment un complexe avec Trm61 et Trm82 respectivement. Chez la levure, le complexe Trm8-Trm82 est responsable de la modification m7G en position 46 des ARNt. Trm8 possède un site de liaison à la SAM et aux ARNt. Trm82 aurait quant à elle un rôle de chaperonne : elle protégerait Trm8 de la dégradation en la stabilisant dans une conformation active (Alexandrov *et al*, 2005; Leulliot *et al*, 2008b). Dans le complexe Trm6-Trm61, les deux composants participent à la fixation des ARNt mais seule Trm6 lie la SAM et catalyse la réaction de méthylation de l'adénine en position 58 (Ozanick *et al*, 2007).

Des études chez les mammifères portant sur la biogenèse des ribosomes dans la mitochondrie ont mis en exergue le rôle essentiel de la protéine MTERF4 qui forme un complexe avec NSUN4, une MTase d'ARNr. Le repliement MTERF est décrit comme ayant la propriété de lier les acides nucléiques. La formation du complexe entre les deux partenaires entraîne une augmentation de la spécificité et de l'efficacité de méthylation de l'ARNr 16S mitochondrial (Yakubovskaya *et al*, 2012). Bien que structurellement très différente, MTERF4 semble jouer un rôle similaire à celui de Trm112.

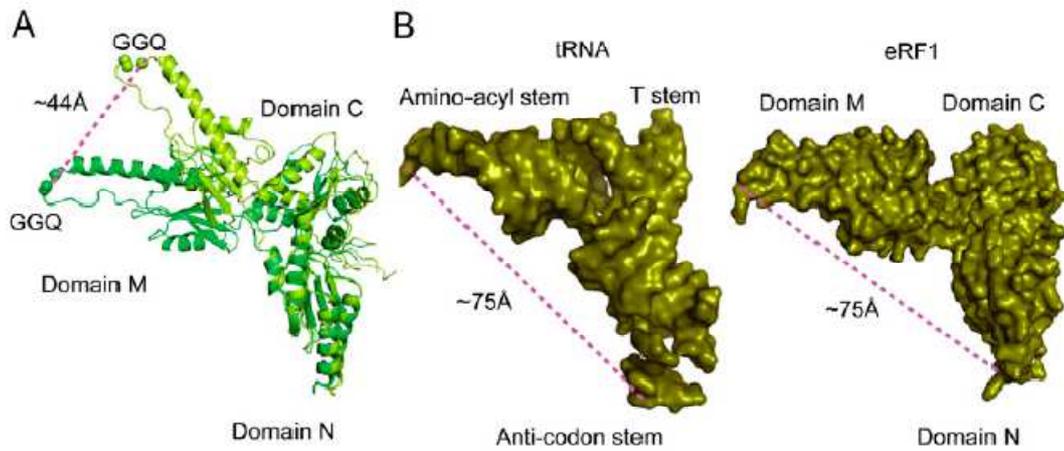


Figure 23 : Comparaison structurale d'eRF1 et d'un ARNt (d'après Cheng *et al*, 2009).

A : Localisation du motif GGQ lorsque eRF1 est lié ou non avec eRF3, représenté en vert et en vert clair respectivement.

B : Représentation de la surface d'un ARNt lorsqu'il est en complexe avec EF-Tu-GTP et de eRF1 lorsqu'il est lié à eRF3.

3. MTQ2-TRM112 ET LA TERMINAISON DE LA TRADUCTION

Le complexe Mttq2-Trm112 est impliqué dans la terminaison de la traduction en méthylant le motif GGQ universellement conservé du facteur de terminaison eRF1.

3.1. LE MOTIF GGQ EST UNIVERSEL ET METHYLE

Comme vu précédemment dans le paragraphe 1.2.3., l'étape de terminaison de la traduction fait intervenir des facteurs de terminaison (RFs). Ceux-ci reconnaissent, dans un premier temps, les codons stop au site A du ribosome et induisent, dans un second temps, l'hydrolyse de la liaison ester entre le polypeptide néosynthétisé et l'ARNt présent au site P. Chez les bactéries, il existe deux facteurs de terminaison de classe I, RF1 et RF2, qui reconnaissent respectivement les codons UAG/UAA et UAA/UGA. Chez les archées et les eucaryotes, un seul facteur suffit pour reconnaître les trois codons stop : il s'agit d'aRF1 et eRF1 respectivement (Kisselev & Buckingham, 2000). Malgré des fonctions similaires, les facteurs bactériens ont évolué indépendamment des facteurs eucaryotes et archéens et appartiennent par conséquent à des familles de protéines différentes (Kisselev, 2002). L'unique élément de séquence commun aux RFs des trois domaines de la vie est le motif GGQ (Frolova *et al*, 1999). Celui-ci est essentiel à la fonction des RFs. En effet, la mutation d'un des trois résidus du motif en alanine empêche la terminaison de la traduction (Song *et al*, 2000; Frolova *et al*, 1999). Chez tous les RFs, ce tripeptide se situe dans une boucle à l'extrémité d'une région en forme de tige qui appartient au domaine M d'eRF1. En complexe avec eRF3 (un membre de la famille EF-Tu/eEF1A), eRF1 mime structurellement l'ARNt et le motif GGQ de eRF1 se positionnerait sur eRF3 comme la séquence CCA de la tige accepteur de l'ARNt au niveau d'EF-Tu (figure 23) (Cheng *et al*, 2009). L'entrée du motif GGQ dans le PTC du ribosome est nécessaire à l'hydrolyse de la liaison ester (Frolova *et al*, 1999; Loh & Song, 2010). Les études menées à la fois sur les RFs bactériens et eucaryotes ont montré que l'atome d'azote de la fonction amide de la glutamine était méthylé (Dincbas-Renqvist *et al*, 2000; Heurgue-Hamard *et al*, 2005). Chez *E.coli*, la MTase responsable de cette modification est le produit du gène *prmC* situé juste en aval du gène *prfA* codant pour RF1 (Heurgué-Hamard *et al*, 2002; Nakahigashi *et al*, 2002). Historiquement, la MTase PrmC bactérienne a été décrite avant les orthologues eucaryotes et a servi de base pour l'étude de ceux-ci.

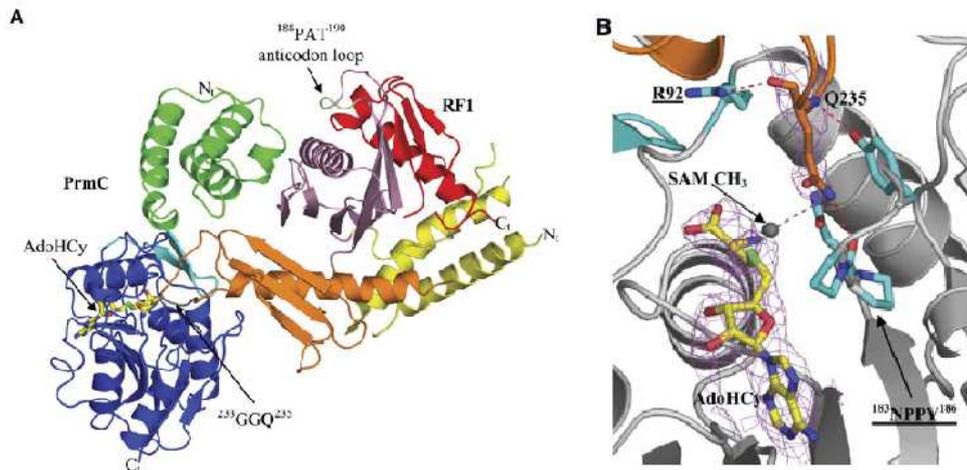


Figure 24 : Structure cristallographique du complexe PrmC-RF1 et agrandissement du site actif de PrmC d'après Graille *et al*, 2005.

A : Les domaines N-terminal, C-terminal et le lien entre ces domaines de PrmC sont représentés en vert, bleu et cyan respectivement. Les différents domaines de RF1 sont représentés en jaune, orange, rouge et violet.

B : La SAH est en jaune, PrmC en gris avec les chaînes latérales de certains résidus en bleu turquoise, et RF1 en orange. Le groupement méthyle à transférer est représenté par une sphère grise.

3.2. ORTHOLOGUE BACTERIEN PrmC

Les orthologues de PrmC ont été mis en évidence chez toutes les bactéries caractérisées mais la juxtaposition des gènes *prmC* et *prfa* n'est pas toujours conservée (Yang *et al*, 2004). La méthylation du motif GGQ est nécessaire pour une terminaison de traduction bactérienne efficace *in vivo*. L'inactivation du gène *prmC* provoque une diminution de l'activité spécifique de terminaison : celle-ci est alors divisée par trois ou quatre. Dans la souche K12 d'*E.coli*, l'absence de méthylation est létale pour les cellules cultivées en milieu minimum mais n'entraîne qu'un défaut de croissance en milieu riche (Heurgué-Hamard *et al*, 2002). Ceci suggère que l'absence de méthylation limite la synthèse de protéines essentielles pour la croissance dans certaines conditions (Mora *et al*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* : en effet, l'efficacité de terminaison utilisant RF2 non méthylé est au moins trois fois plus faible que celle impliquant le facteur méthylé (Dincbas-Renqvist *et al*, 2000). La résolution des structures cristallographiques du ribosome 70S en complexe avec RF1 ou RF2 et un ARNm contenant un codon stop a permis de comprendre le mécanisme de reconnaissance du codon stop coordonnée avec l'hydrolyse simultanée de la liaison ester (Loh & Song, 2010; Jin *et al*, 2010; Korostelev *et al*, 2010). La structure de RF1 lié au complexe de pré-terminaison révèle que la chaîne latérale de la glutamine du motif GGQ permettrait d'exclure les nucléophiles autre que l'eau de la réaction et optimiserait l'affinité de RF1/2 pour le ribosome (Korostelev, 2011). La méthylation de la chaîne latérale stabiliserait le réseau de liaisons hydrogènes dans le PTC et contribuerait également à l'amélioration de l'affinité de RF1/2 pour le ribosome en augmentant les interactions hydrophobes (Korostelev *et al*, 2010).

Les MTases bactériennes sont formées par un domaine N-terminal hélicoïdal et par un domaine C-terminal caractéristique des MTases de classe I dépendantes de la SAM. Ces deux domaines sont connectés via une structure β en épingle à cheveux (Graille *et al*, 2005) (figure 24A). PrmC possède une signature NPPY très conservée typique des MTases agissant sur un atome d'azote conjugué à un système plan, ce qui est le cas pour l'azote de la chaîne latérale de la glutamine du motif GGQ (Schubert *et al*, 2003a). Dans la structure du complexe PrmC-SAH-RF1 d'*E.coli*, le motif situé sur une boucle de RF1 plonge dans le site actif de PrmC localisé à l'interface des domaines N et C-terminaux (Graille *et al*, 2005). Le résidu glutamine est entièrement enfoui et l'azote de la chaîne latérale se situe en face du soufre de la SAH. De plus, la signature NPPY forme des liaisons hydrogènes avec le motif GGQ, qui le positionnent de manière idéale pour la méthylation (Graille *et al*, 2005) (figure 24B).

3.3. LE COMPLEXE MTQ2-TRM112

3.3.1. Les eucaryotes ont recours à Trm112

La méthylation du motif GGQ du facteur eRF1 est conservée chez tous les eucaryotes. Les MTases responsables de cette modification ont des séquences divergentes de celles des protéines bactériennes. Les seules homologues de séquence se localisent au centre de la protéine, du motif riche en glycine VL(D/E)xGxGxG jusqu'à la signature NPPY du site actif (Heurgue-Hamard *et al*, 2005). D'un point de vue structural, elles présentent un domaine MTase de classe I mais ne possèdent pas de domaine équivalent au domaine N-terminal hélicoïdal des PrmC. Les tentatives de production hétérologues de la MTase de levure Mtq2 ont montré que cette protéine, exprimée seule, était insoluble et inactive. En effet, chez les eucaryotes, cette modification est réalisée par un hétérodimère faisant intervenir Trm112 : Mtq2/Trm112 et HEMK2a/hTRM112 chez la levure et l'Homme respectivement (Heurgue-Hamard *et al*, 2006; Liu *et al*, 2010). Dans ce complexe, Mtq2 lie la SAM et catalyse le transfert de méthyle et Trm112 stabilise et active Mtq2 (Figaro *et al*, 2008; Heurgue-Hamard *et al*, 2006). Une autre différence par rapport aux MTases bactériennes est que le substrat de Mtq2-Trm112 est un complexe : eRF1-eRF3-GTP, où eRF3 est le facteur de terminaison de classe II appartenant à la famille des GTPases décrit précédemment dans le paragraphe 1.2.3. (Heurgue-Hamard *et al*, 2006; Kong *et al*, 2004). La région d'eRF1 impliquée dans l'interaction avec eRF3 est localisée au niveau du domaine C-terminal à une distance importante du motif GGQ. Le rôle d'eRF3 lié au GTP entraînerait un changement de conformation de eRF1 qui permettrait à la glutamine d'être accessible pour la méthylation (Heurgue-Hamard *et al*, 2005). Comme chez les bactéries, le rôle de la méthylation semble être lié à l'environnement du ribosome et des simulations de dynamique moléculaires semblent indiquer que l'ajout du groupement méthyle ne modifie pas la structure intrinsèque d'eRF1 (Ander & Aqvist, 2009). La délétion chez *S.cerevisiae* du gène codant pour Mtq2 provoque un doublement du temps de génération à 30°C ainsi qu'un phénotype de sensibilité à la paromomycine. Ceci traduit un défaut de traduction lié à la fonction du site A du ribosome (Polevoda *et al*, 2006). Le besoin de Mtq2 pour une croissance optimale chez la levure peut être lié à la méthylation d'eRF1 mais, étant données ces observations, le fait que Mtq2-Trm112 soit impliqué dans la modification d'une autre protéine ou d'un acide nucléique peut également être envisageable (Heurgue-Hamard *et al*, 2005).

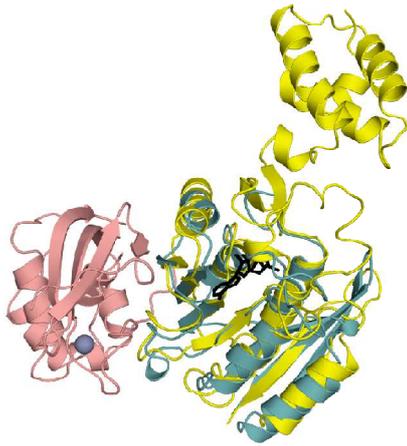


Figure 25 : Superposition des structures de Mtq2-Trm112 et de PrmC (d'après Liger et al, 2011).

Mtq2 est représenté en bleu, Trm112 en rose, PrmC en jaune, la SAM en noir et le zinc en gris.

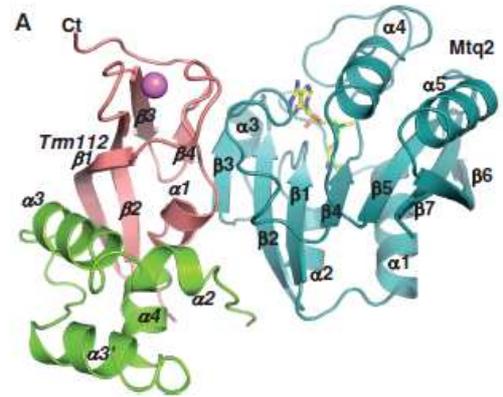


Figure 26 : Représentation en ruban de la structure cristallographique du complexe EcMtq2-Trm112 (d'après Liger et al, 2011).

Mtq2 est représenté en bleu, les domaines de fixation au zinc et central de Trm112 en rose et vert respectivement. La SAM est en jaune et le zinc est représenté par une sphère rose.

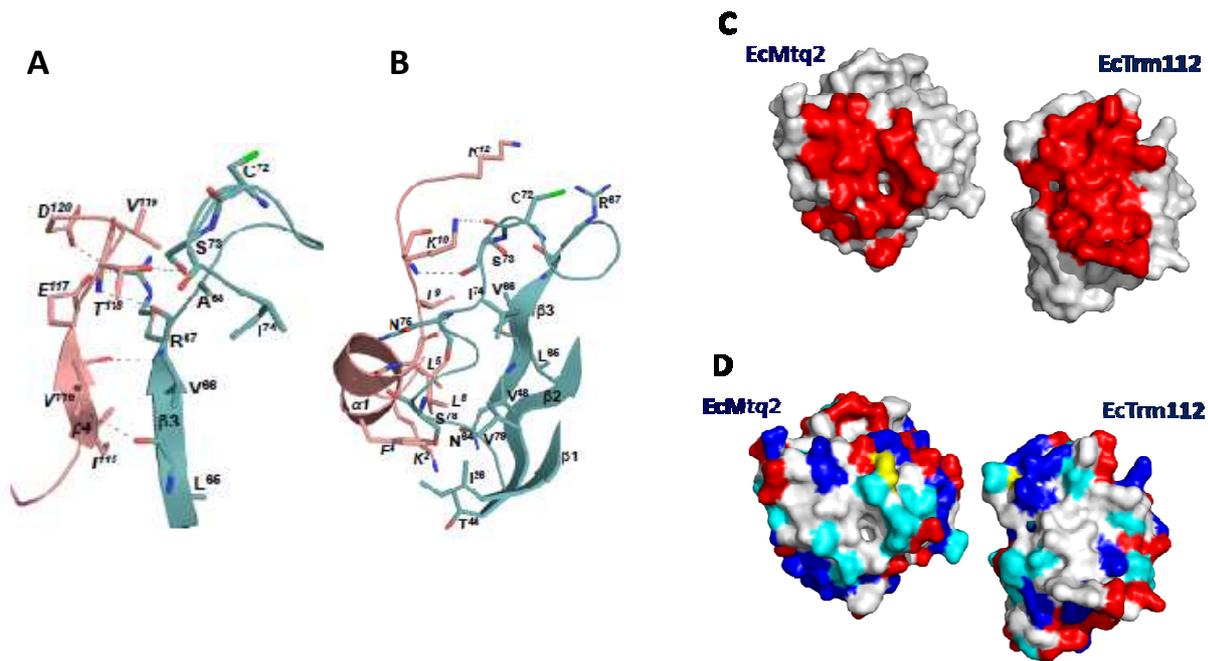


Figure 27 : Détails de l'interface du complexe EcMtq2-Trm112 (d'après Liger et al, 2011).

A : Agrandissement du « β -zipper » ; les liaisons hydrogènes sont indiquées en pointillés noirs, Trm112 est en rose et Mtq2 en bleu.

B : Détails des résidus impliqués dans l'interaction, le code couleur est identique à celui du panel A.

C : Représentation en livre ouvert de la surface du complexe Mtq2-Trm112, les régions à l'interface sont en rouge.

D : Représentation en livre ouvert de la surface du complexe Mtq2-Trm112, les résidus sont colorés en fonction de leur type, les hydrophobes, aromatiques et aliphatiques sont en gris clair, les chargés positivement en bleu, les chargés négativement en rouge, les polaires en cyan et les cystéines en jaunes.

Chez la levure, Trm112 est nécessaire pour solubiliser et activer Mtq2. Il en va de même chez l'Homme où l'activité de méthylation n'est observée qu'après une incubation de HEMK2a avec HsTRM112 (Heurgue-Hamard *et al*, 2006; Figaro *et al*, 2008).

3.3.2. Description de la structure cristallographique de *Ec*Mtq2-Trm112

La structure cristallographique du complexe Mtq2-Trm112 du parasite *Encephalitozoon cuniculi* (*Ec*) confirme que Mtq2 se compose uniquement du domaine MTase de classe I SAM dépendante. Mtq2 ne possède pas le domaine équivalent au domaine N-terminal de PrmC impliqué dans l'interaction avec RF1/2 ; de plus la superposition du complexe PrmC-RF1 et de Mtq2-Trm112 montre clairement que Trm112 ne remplace pas ce domaine N-terminal (figure 25) (Liger *et al*, 2011).

Mtq2 se compose donc d'un feuillet β central à 7 brins entouré de 3 hélices α d'un côté et de 2 hélices α de l'autre. Trm112 présente 2 domaines : le domaine conservé en doigt de zinc formé d'un feuillet β à 4 brins et d'une hélice α et le domaine central hélicoïdal (Figure 26).

3.3.3. Description de l'interface

Dans ce complexe, Mtq2 se lie principalement au domaine doigt de zinc de Trm112 via une interaction de type « β zipper » entre les brins β_3 de Mtq2 et β_4 de Trm112 qui interagissent de manière parallèle. Par conséquent, les feuillets β des deux protéines forment un large feuillet β composé de onze brins. L'interaction se fait également via des résidus essentiellement situés dans la boucle entre β_3 et β_4 de Mtq2 et dans l'hélice α_1 et la boucle entre α_1 et β_1 de Trm112 (figure 27A-B). La surface enfouie au niveau de cette interface est de 2000 Å² et contient douze liaisons hydrogènes concentrées dans les deux régions évoquées précédemment. Par ailleurs, au centre de la surface de contact se trouve une région hydrophobe contenant des résidus non polaires conservés et qui représente les deux tiers de l'interface. Ceci explique l'instabilité de Mtq2 en l'absence de Trm112 (figure 27C-D). En dehors de ces régions, d'autres contacts existent : entre la boucle connectant β_1 et α_2 de Trm112 et le brin β_2 et la boucle entre β_3 et β_4 de Mtq2. La superposition de la structure de ScTrm112 montre que l'hélice α_2 de ScTrm112 correspond à la boucle entre β_1 et α_2 d'*Ec*Trm112. L'importance de cette boucle pour la formation du complexe a été confirmée par l'étude du mutant R53A de ScTrm112 qui déstabilise le complexe et entraîne la perte de l'activité de méthylation (Liger *et al*, 2011).

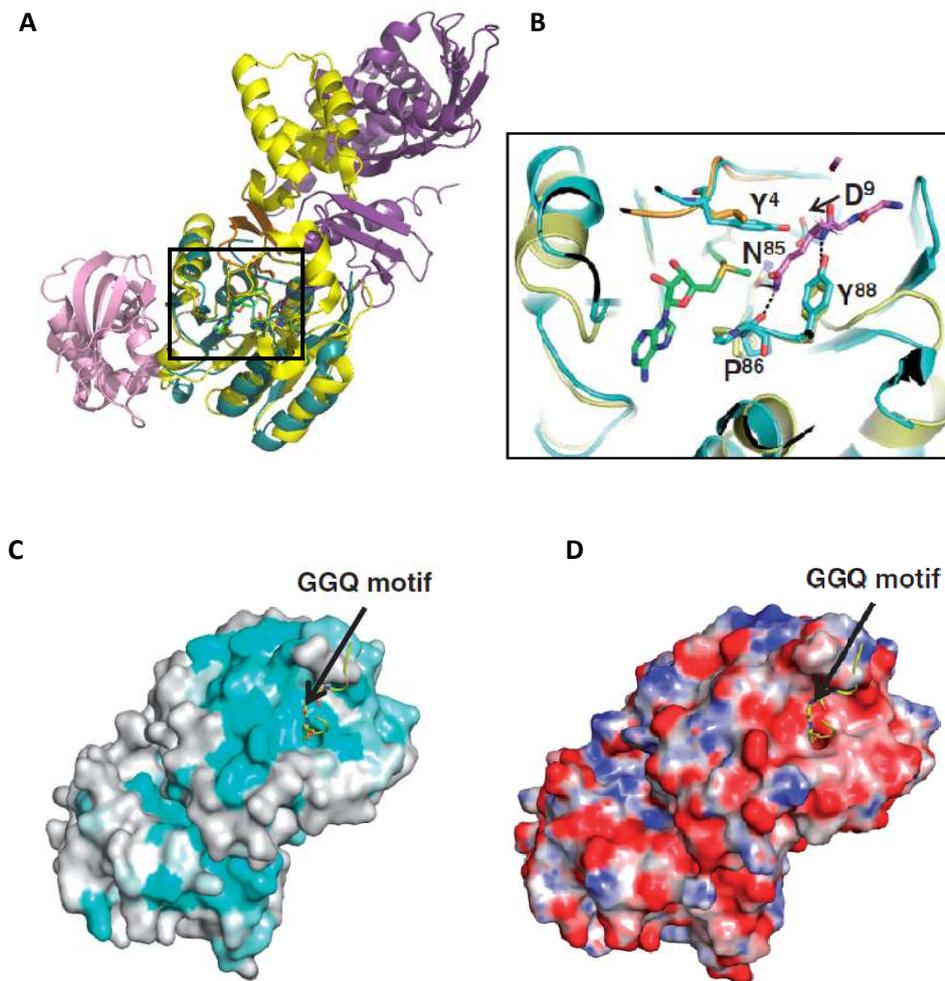


Figure 28 : Site actif de Mtq2 (adapté de Liger *et al*, 2011).

A : Superposition des complexes Mtq2-Trm112 (pdb : 3Q87 ; Liger *et al*, 2011) et PrmC-RF1 (pdb : 2B3T ; Graille *et al*, 2005).

B : Agrandissement du site actif de Mtq2. Pour ces deux panels, Trm112 est en rose, Mtq2 en bleu, le lien entre les domaines N et C-terminaux en jaune de PrmC est en orange, RF1 en violet, la SAM fixée à Mtq2 est en vert, le motif GGQ et la signature NPPY représentés en bâtonnets.

C : Cartographie de la conservation des résidus à la surface du complexe Mtq2-Trm112, le motif GGQ de RF1 a été modélisé en jaune grâce à la superposition présentée dans le panel A. Les résidus les plus conservés sont en cyan et les moins conservés sont en blanc.

D : Cartographie du potentiel électrostatique à la surface du complexe Mtq2-Trm112. Les régions chargées positivement (10kT/e) et négativement (-10kT/e) sont colorées en bleu et rouge, les régions neutres sont en blanc.

3.3.4. Analyse du site actif

En plus de solubiliser Mtq2, Trm112 permet de stabiliser la boucle connectant les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ de Mtq2 dans une conformation favorisant une meilleure fixation de la SAM. La superposition des complexes PrmC-RF1 et Mtq2-Trm112 montre que la région conservée autour de la SAM de Mtq2 correspond au site actif de PrmC avec, en particulier, la conservation de la signature NPPY spécifique des MTases qui méthyle un atome d'azote conjugué à un système plan (figure 28A-B-C) (Graille *et al*, 2005; Schubert *et al*, 2003a). Comme pour PrmC, le résidu asparagine de ce motif est crucial pour l'activité enzymatique de Mtq2. De plus, deux résidus strictement conservés, situés dans la partie N-terminale de Mtq2 sont importants pour le maintien de l'activité MTase : il s'agit chez *Sc* de la tyrosine 15 (Y4 chez *EcMtq2*) et de l'aspartate 20 (D9 chez *EcMtq2*). D'après la superposition des complexes, Y15 et D20 pourraient être impliqués dans la coordination du motif GGQ via des liaisons hydrogènes et le cycle aromatique de Y15 se plaquerait sur le groupement méthyle sulphonium de la SAM. De plus, cette région qui entoure la signature NPPY présente un potentiel électrostatique de surface négatif, ce qui compense le potentiel électrostatique positif entourant le motif GGQ de eRF1 (figure 28D). L'étude de mutations par inversion de charge dans l'hélice $\alpha 1$ de Mtq2 confirme que celle-ci est impliquée dans la reconnaissance du substrat hétérotrimérique.

Par ailleurs, l'étude de mutations de Trm112 sur des résidus conservés exposés au solvant montre que ces mutations affectent partiellement l'activité enzymatique, ce qui suggère que Trm112 interviendrait également dans l'interaction avec le substrat (Liger *et al*, 2011).

En outre, la protéine possédant la plus haute similarité structurale avec le complexe Mtq2-Trm112 est la protéine bactérienne RlmA(I) qui est impliquée dans la méthylation de l'ARNr 23S à la position G745 (Liu & Douthwaite, 2002). Cette protéine se compose d'un domaine N-terminal en doigt de zinc et d'un domaine MTase de classe I dépendante de la SAM en C-terminal (Das *et al*, 2004). La superposition du complexe Mtq2-Trm112 et de RlmA(I) donne une valeur de RMSD de 2.6 Å avec 7% d'identité de séquence. Ceci met en évidence que le domaine en doigt de zinc de Trm112 se superpose correctement sur le domaine N-terminal de RlmA(I) qui a été décrit comme pouvant intervenir dans la liaison avec l'ARN 23S (Das *et al*, 2004) (figure 29). Cette comparaison suggère que Trm112 assisterait Mtq2 dans la reconnaissance du substrat.

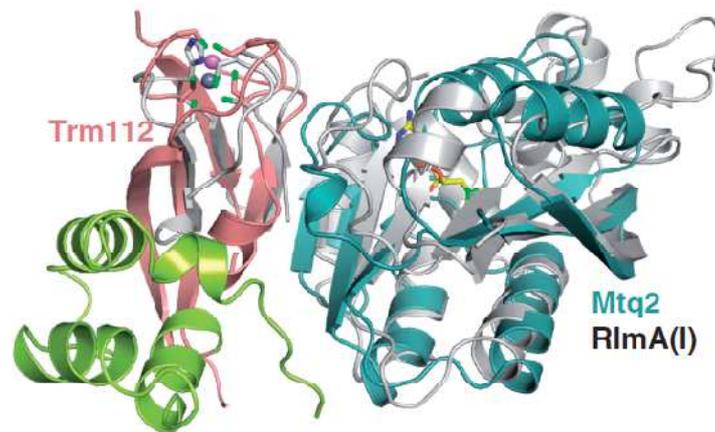


Figure 29 : Superposition de RlmA(I) d'*E.coli* sur le complexe Mtq2-Trm112 (d'après Liger *et al*, 2011).

RlmA(I) est en gris, Mtq2 en bleu, le domaine central de Trm112 est en vert et le domaine de liaison au zinc est en rose, la SAM est en jaune, les atomes de zinc liés à Trm112 et à RlmA(I) sont en rose et en gris respectivement.

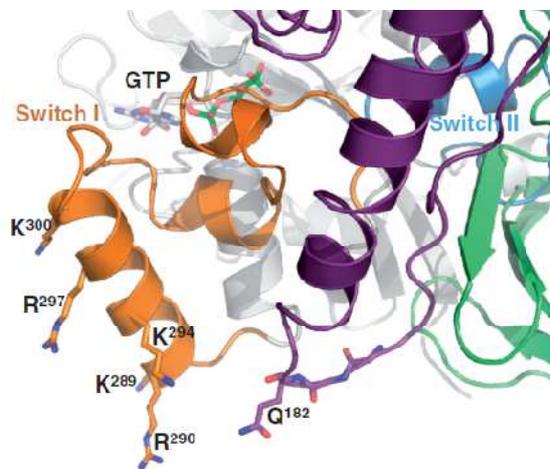


Figure 30 : Modélisation du complexe eRF1-eRF3-GTP (d'après Liger *et al*, 2011).

Seul le domaine central d'eRF1 est indiqué en violet. Les domaines GTPase, II et III d'eRF3 sont colorés en gris, vert clair et vert foncé respectivement. Les régions switch I et II d'eRF3 sont respectivement en orange et bleu. Le GTP lié à eRF3 est en gris. Ce modèle a été généré en superposant le domaine GTPase d'eRF3 et le domaine C d'eRF1 sur les domaines correspondant de la structure cristallographique du complexe d'Archaea Pelota/Dom34-aEF1a-GTP (Song *et al*, 2000 ; Kong *et al*, 2004 ; Toulmay *et al*, 2006).

La protéine eRF3 seule a une très faible affinité pour le GTP car les régions « switch I et II » situées dans le domaine C-terminal sont désordonnées. L'interaction d'eRF3 avec eRF1 entraîne une structuration de ces régions et permet la liaison de la molécule de GTP (Kong *et al*, 2004; Cheng *et al*, 2009). La réalisation d'un modèle du complexe eRF1-eRF3-GTP a permis aux chercheurs de proposer une explication concernant la spécificité de Mtq2-Trm112 pour le substrat hétérotrimérique (Liger *et al*, 2011). Premièrement, le motif GGQ du domaine M d'eRF1 est entouré par plusieurs résidus chargés positivement : ceux-ci seraient impliqués dans l'interaction avec les résidus chargés négativement du site actif de Mtq2. Deuxièmement, au moins une lysine ou arginine de l'hélice d'eRF1 - suivant le motif GGQ - interagirait et stabiliserait la région switch I d'eRF3 et, ainsi, augmenterait l'affinité d'eRF3 pour la molécule de GTP. Ceci stabiliserait également le domaine M d'eRF1, en particulier, le motif GGQ et/ou optimiserait l'orientation et la position du motif GGQ dans le site actif de Mtq2. Enfin, l'hélice $\alpha 4$ d'eRF3, contenant des résidus chargés positivement conservés du domaine GTPase, se situe dans le complexe à proximité du motif GGQ et pourrait être impliquée dans la fixation de Mtq2-Trm112 (Liger *et al*, 2011) (figure 30).

3.4. MTQ2-TRM112 : UN MODELE POUR LES AUTRES COMPLEXES

En plus de Mtq2, Trm112 interagit et active trois autres MTases. Les analyses de séquences prédisent que les quatre partenaires de Trm112 appartiendraient à la même famille de MTases de classe I dépendantes de la SAM (Schubert *et al*, 2003a; Purushothaman *et al*, 2005; Kalhor & Clarke, 2003; White *et al*, 2008). De plus, la surexpression de Mtq2 ou de Trm11 affecte l'interaction entre Trm9 et Trm112 et inhibe l'activité enzymatique de Trm9. (Studte *et al*, 2008). Ces observations suggèrent que Trm112 interagirait indépendamment avec chacun de ses partenaires et que ceux-ci seraient en compétition pour lier la petite protéine activatrice (Purushothaman *et al*, 2005).

La structure cristallographique de Mtq2-Trm112 montre que l'interaction implique un « β zipper » entre les brins $\beta 4$ de Trm112 et $\beta 3$ de Mtq2. Les liaisons hydrogènes stabilisant cette structure s'établissent entre atomes des chaînes principales des partenaires et ne présentent donc que peu de spécificité de séquence. En conséquence, ce mode d'interaction permet à une protéine donnée de reconnaître par le même mécanisme des partenaires sans homologies de séquences mais adoptant des repliements similaires.

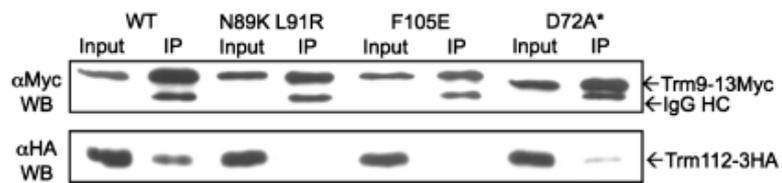


Figure 31 : Effet des mutations de Trm9 sur l'interaction entre Trm9 et Trm112 in vivo (d'après Liger *et al*, 2011).

1/50^e d'extrait de protéines solubles (Input) et 1/10^e des immunoprécipitations (IP) sont analysés par western blot. Les anticorps primaires utilisés sont des α-myc et des α-HA de souris, les anticorps secondaires sont des α-anticorps de souris conjugués à la HRP. Le mutant Trm9 D72A marqué d'une astérisque possède 11 répétitions de l'épitope Myc au lieu de 13, ce qui explique la différence de migration observée.

De plus, l'étude de mutations de résidus de Trm9 prédits pour être à l'interface (N89K/L91R-F105E) montre que ces mutations entraînent une perte d'interaction avec Trm112 (figure 31) et inactivent Trm9 (Liger *et al*, 2011). Ces résultats confirment donc l'hypothèse d'une interaction similaire entre Trm112 et ses différents partenaires à activité MTase.

La structure de Mtq2 en complexe avec Trm112 suggère également un mécanisme d'activation de Mtq2 par Trm112. En effet, la formation du complexe permet de masquer une région hydrophobe de Mtq2, ce qui explique pratiquement la nécessité de co-exprimer Trm112 et Mtq2 pour que cette dernière soit soluble et active (Heurgue-Hamard *et al*, 2006). De plus, Trm112 stimule la fixation de la SAM par Mtq2 via son interaction avec la boucle entre les brins β 3 et β 4. Le mutant Trm9 D72A, prédit pour être déficient pour la liaison avec la SAM, interagit plus faiblement avec Trm112 comparé à Trm9 sauvage (figure 31). Tout ceci suggère une interaction synergique entre la SAM, Trm112 et Mtq2/Trm9. Enfin, étant donné l'implication de Trm112 dans l'interaction avec eRF1-eRF3-GTP et la superposition avec la protéine RlmA(I), Trm112 pourrait assister également ses partenaires pour la fixation de substrats très différents : ARNt, ARNr ou protéine (Liger *et al*, 2011).

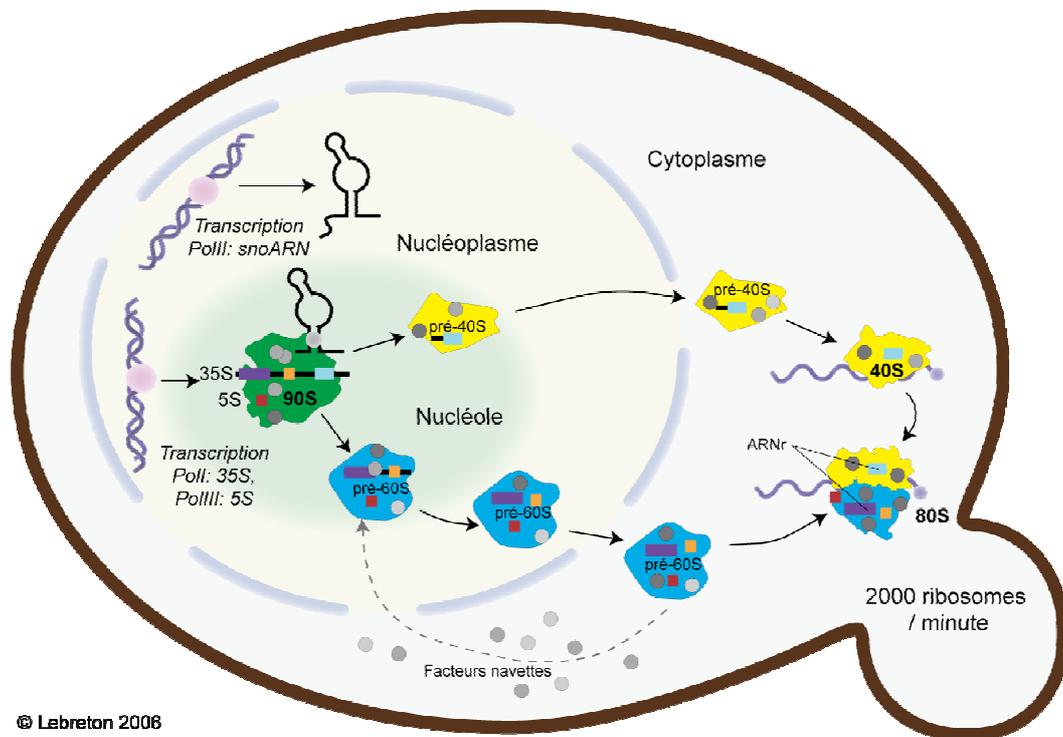


Figure 32 : Aperçu global de la biogénèse du ribosome chez *S. cerevisiae* (d'après <http://alicelebreton.free.fr/biogenese.html>).

4. BUD23-TRM112 ET LA BIOGENESE DU RIBOSOME

Le ribosome constitue l'un des acteurs principaux de la traduction et sa synthèse représente une des activités métaboliques les plus importantes de la cellule. La levure *Saccharomyces cerevisiae* en phase active de croissance produit environ 2000 ribosomes par minute, chacun étant constitué de 79 protéines ribosomiques (Rps et Rpl) et de 4 ARNr.

4.1. LA BIOGENESE DU RIBOSOME CHEZ LES EUCARYOTES

Contrairement au ribosome bactérien, le ribosome eucaryote ne peut être assemblé *in vitro* (Green & Noller, 1999). Sa biogenèse fait intervenir plus de 200 facteurs transactivateurs (protéines et petits ARNs nucléolaires « snoRNA ») dont 42 sont essentiels (Fromont-Racine *et al*, 2003; Woolford & Baserga, 2013). Cette synthèse mobilise ainsi les trois ARN polymérase soit 70% de l'activité transcriptionnelle de la cellule, 90% de son activité d'épissage et plus de 25% de son activité traductionnelle (Warner, 1999).

La synthèse du ribosome est un processus extrêmement dynamique impliquant un remodelage continu des interactions ARN/ARN, protéine/protéine et protéine/ARN. Ces interactions permettent des changements structuraux et conformationnels synchronisés indispensables à l'assemblage d'un ribosome fonctionnel (Henras *et al*, 2008; Karbstein, 2011). Les nombreux facteurs transactivateurs interagissent de manière transitoire avec le pré-ribosome et sont recrutés puis relargués au cours des différentes étapes de synthèse, de maturation et d'assemblage (figure 32).

La biogenèse du ribosome est un processus organisé dans le temps et dans l'espace, elle commence dans une structure spécialisée du noyau : le nucléole.

4.1.1. Le nucléole : lieu de synthèse des ARNr

Ce corps nucléaire dynamique est le siège central de l'expression des gènes ribosomiaux (ADNr) (Hadjiolov, 1980). L'activité du nucléole varie en fonction de la synthèse des ARNr qui est directement liée à la croissance et à la prolifération cellulaire. En effet, la biogenèse du ribosome est interrompue pendant la mitose, ce qui entraîne une disparition du nucléole juste avant la division cellulaire. La transcription des ADNr induit la formation du nucléole dès la sortie de la mitose.

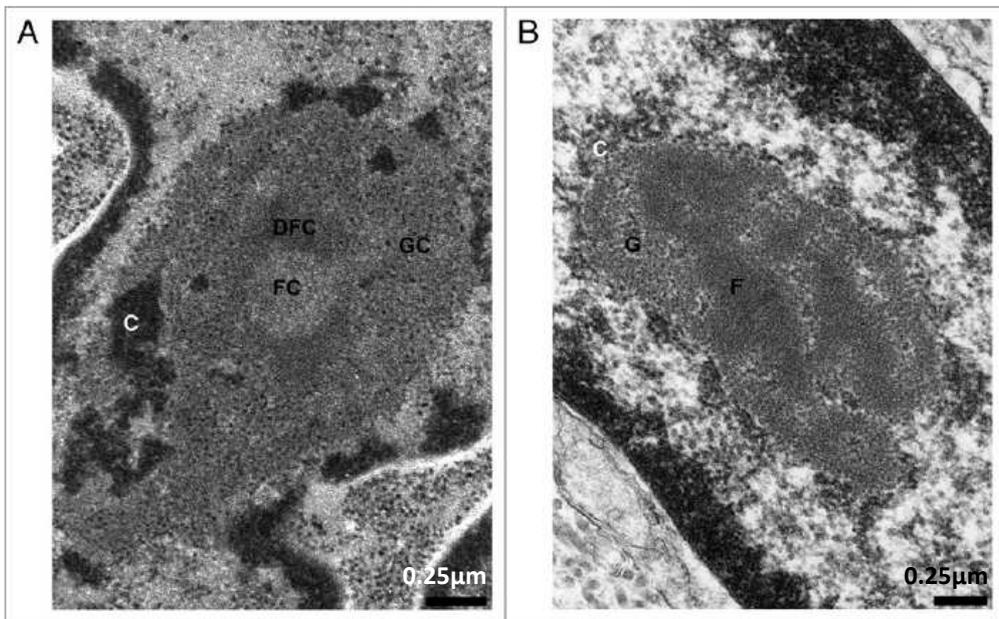


Figure 33 : Organisation du nucléole (d'après Thiry *et al*, 2011).

A : Nucléole d'une cellule épithéliale mammaire bovine, observation de 3 compartiments : les centres fibrillaires (FC), les composantes fibrillaires denses (DFC) et les composantes granulaires (GC).

B : Nucléole d'une cellule ovarienne de triton, observation de 2 compartiments, une zone fibrillaire entourée par une zone granulaire (G). Dans les deux photographies, des groupements de chromatine condensée (C) sont présents autour et à l'intérieur du corps nucléaire.

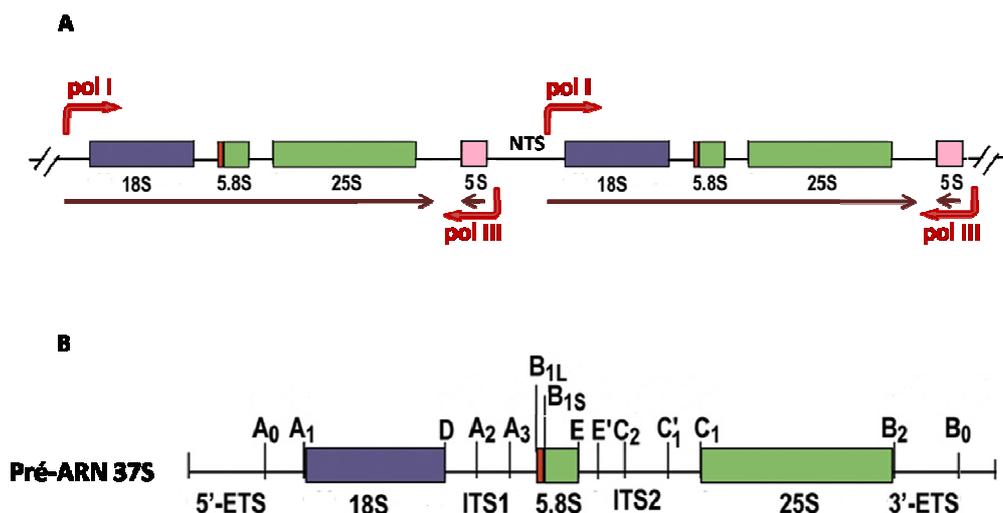


Figure 34 : Schématisation de l'organisation des ADNr (A) et du pré-ARNr 37S (B) chez *S. cerevisiae* (adapté de Lafontaine et Tollervey, 2006 et de Mullineux & Lafontaine, 2012).

Le nucléole est présent chez tous les eucaryotes. D'un point de vue cytologique, il peut y avoir un ou plusieurs nucléoles dans le noyau. Ce domaine nucléaire apparaît en microscopie électronique comme une zone très dense aux électrons qui contient deux à trois composantes distinctes. Le nombre de composantes a augmenté au cours de l'évolution. Le nucléole de levure contient deux composantes : une zone fibrillaire (F) entourée par une zone granulaire (G). Le nucléole d'une cellule mammifère comporte trois composantes morphologiquement distinctes : les centres fibrillaires (FC) partiellement entourés par les composantes fibrillaires denses (DFC) eux-mêmes entourés par les composantes granulaires (GC) (figure 33) (Thiry *et al*, 2011). Suivant le type cellulaire, le nucléole présente un nombre variable de FC de tailles différentes.

Les premières étapes de la biogenèse du ribosome se déroulent successivement dans les différentes composantes du nucléole. Les FC sont des zones riches en ARN polymérase I et en facteurs de transcription, ils sont le lieu d'initiation de la transcription des ADNr. Les ARNr naissants apparaissent à la jonction entre FC et DFC (Cheutin *et al*, 2002). L'élongation de la transcription et les premières étapes de clivage, de modification et d'assemblage des pré-ribosomes se déroulent au sein du DFC. Enfin, le GC situé en périphérie proche de l'enveloppe nucléaire est le lieu de stockage des sous-unités pré-40S et pré-60S précédant l'exportation vers le cytoplasme.

4.1.2. Organisation des ADNr et transcription

Chaque copie d'ADNr se compose de deux unités transcriptionnelles et chaque segment est séparé du suivant par une courte région non transcrite appelée NTS (Non Transcribed Spacer). La première unité est transcrite dans le nucléole par l'ARN polymérase I et code le pré-ARNr 37S/47S, chez la levure et chez l'Homme respectivement. Cet ARN précurseur contient les ARNr 18S, 5.8S et 25S/28S et est flanqué en 5' et en 3' par des séquences ETS pour « External Transcribed Spacer » et chaque ARNr est séparé par une séquence appelée ITS pour « Internal Transcribed Spacer » (figure 34). La deuxième unité transcriptionnelle code pour l'ARNr 5S transcrit dans le nucléoplasme par l'ARN polymérase III (Henras *et al*, 2008).

Chez les eucaryotes, les ADNr s'organisent en tandem et sont répétés plusieurs centaines de fois. L'ensemble des copies des ADNr sont également appelées Régions Organisatrices du Nucléole (NOR). Chez l'Homme, il y a environ 300 à 400 copies par région et cinq NOR se forment sur les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22.

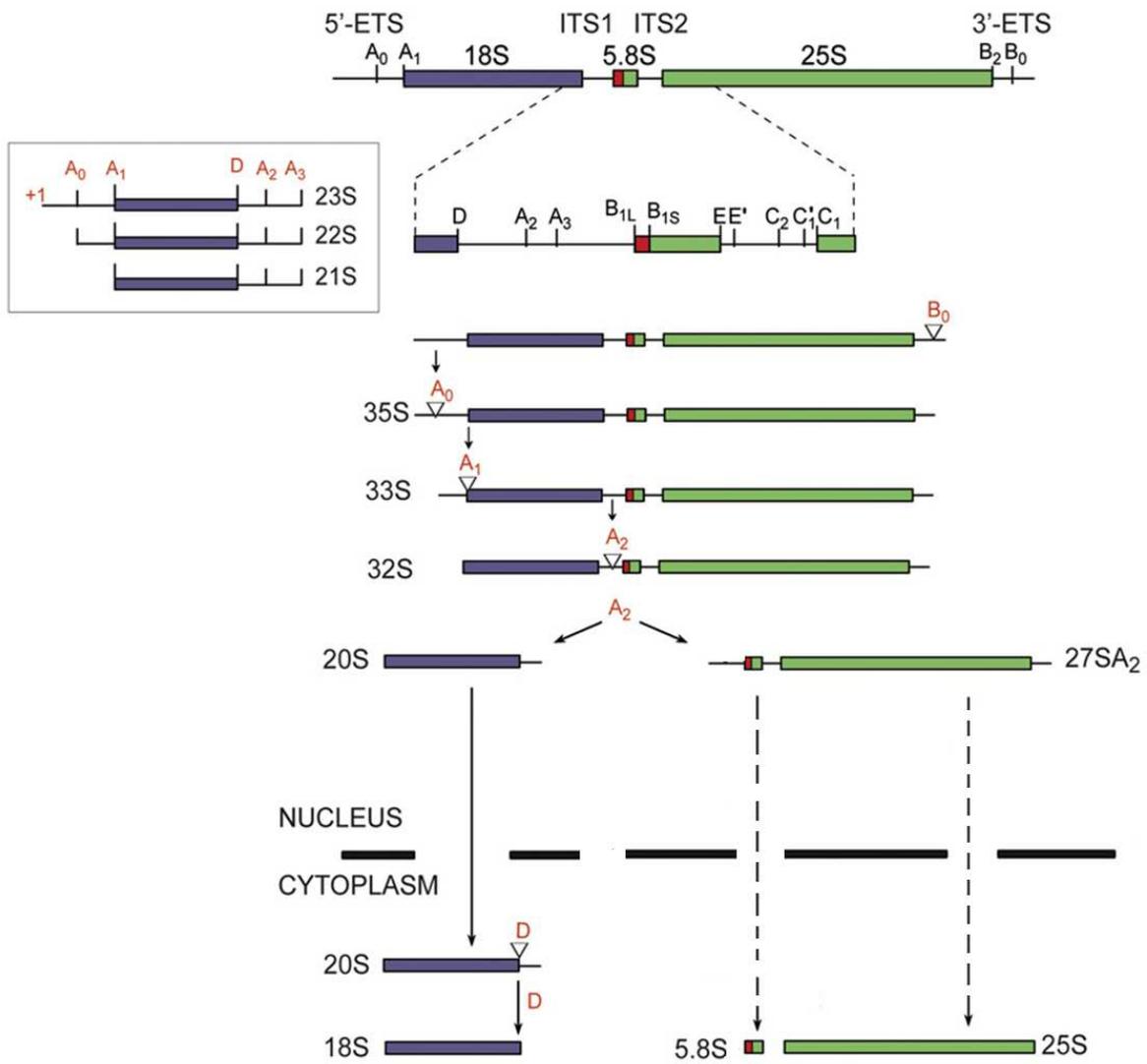


Figure 35 : Schématisation des étapes de clivages du pré-ARNr 37S à l'ARNr 18S chez *S. cerevisiae* (d'après Mullineux et Lafontaine, 2012).

Chez *S.cerevisiae*, le gène codant pour l'ARNr 5S est présent entre chaque copie de l'ADNr, répétée entre 100 et 200 fois sur le chromosome XII (figure 34) (Lafontaine & Tollervey, 2006).

4.1.3. Premier clivage et formation de la particule 90S

Les étapes de clivage du pré-ARNr permettent de séparer les différents ARNr et d'éliminer les séquences non codantes ETS et ITS. Ces étapes sont conservées dans les trois domaines de la vie et se sont complexifiées au cours de l'évolution (Mullineux & Lafontaine, 2012). La levure *S.cerevisiae* est le modèle eucaryote qui a été le plus étudié et qui sera principalement décrit ci-après.

Le premier clivage catalysé par Rnt1 est co-transcriptionnel : il intervient au site B0 dans la région 3'ETS (figure 35) et libère le complexe 90S contenant le pré-ARNr 35S associé au SSU-processome (« Small SubUnit-processome ») qui sera précisément décrit dans le paragraphe 4.1.4.2 (Grandi *et al*, 2002; Henras *et al*, 2008).

Le complexe Bud23-Trm112 étant impliqué dans la synthèse de la petite sous-unité 40S, les événements de maturation décrits concerneront principalement cette sous-unité du ribosome.

4.1.4. Formation de la particule pré-40S

4.1.4.1. Du pré-ARN 35S au pré-ARN 20S

L'extrémité 5'ETS du pré-ARNr 35S est clivée successivement aux sites A0 et A1 générant respectivement les intermédiaires 33S et 32S (figure 35). De manière concomitante à la coupure en A1 se déroule le clivage en A2 dans la région ITS1 aboutissant aux pré-ARNr 20S et 27SA2 qui sont alors maturés par deux voies distinctes en ARNr 18S 5.8S/25S respectivement (Henry *et al*, 1994). En 2006, des études avaient suggéré que la protéine Utp24 était responsable des clivages A1 et/ou A2. Cependant des études plus récentes proposent que le clivage A2 serait réalisé par l'endo-ribonucléase Rcl1 (Bleichert *et al*, 2006; Horn *et al*, 2011).

4.1.4.2. Une machinerie de maturation : le SSU-processome

Le SSU-processome est une snoRNP (« small nucleolar RiboNucleo protein Particule ») de 2.2 MDa. Il est essentiellement organisé autour du snoRNA U3 qui est impliqué dans les étapes de maturation de l'ARN 18S ainsi que dans l'assemblage de la petite sous-unité 40S (Phipps *et al*, 2011).

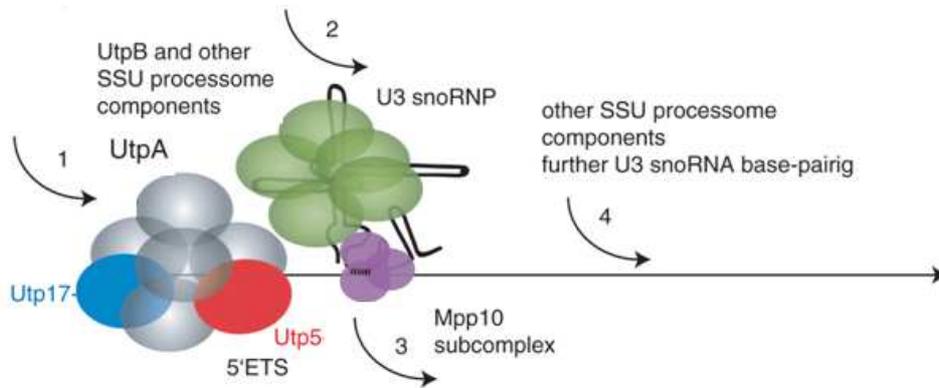


Figure 36 : Modèle des étapes d'assemblage du SSU-processome (adapté de Dutca *et al*, 2011).

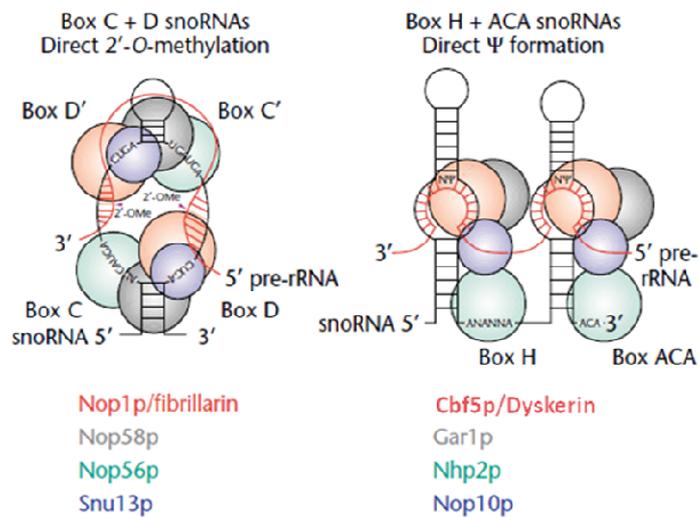


Figure 37 : Schématisation des snoRNP à boîtes C/D et à boîtes H/ACA (d'après Lafontaine & Tollervey, 2006).

Il se compose de plusieurs sous complexes qui s'assemblent sur le pré-ARNr néo-transcrit : UtpA, UtpB, UtpC, Mpp10, la snoRNP U3 et le complexe constitué de Utp7, Utp14 et Sof1 (Krogan *et al*, 2004; Karbstein, 2011). La caractérisation de certains de ces complexes a permis de définir la chronologie des étapes d'assemblage du SSU-processome (figure 36). Dans un premier temps, le sous complexe UtpA lie le pré-ARNr néo-transcrit afin d'en modifier la structure et ainsi de faciliter les premières étapes de clivage. Il est suivi par le complexe UtpB et la snoRNP U3. L'interaction ARN/ARN entre le snoRNA U3 et le 5'ETS permet la fixation du complexe Mpp10. Le snoRNA U3 s'apparie également aux séquences spécifiques du futur ARNr 18S ce qui provoque le recrutement d'autres composants du SSU-processome. L'association de la snoRNP U3 et des différents complexes coordonnent, via l'appariement du snoRNA U3, les étapes de clivage en A0, A1 et A2 (Dutca *et al*, 2011; Karbstein, 2011).

4.1.4.3. Rôle spécifique des snoRNP

❖ Deux classes de snoRNP : à boîtes C/D et H/ACA

Les étapes de clivage et de modifications des pré-ARNr font intervenir de nombreux snoRNP qui se composent de différentes protéines associées à un snoRNA. Il existe deux classes de snoRNP, les snoRNP à boîtes C/D et les snoRNP à boîtes H/ACA. Les snoRNP à boîtes C/D catalysent la 2'-O-méthylation et chez la levure ils sont composés de la MTase Nop1/fibrillarine et des protéines Snu13, Nop56 et Nop58. Les snoRNA à boîtes H/ACA catalysent la pseudouridylation et sont associés aux protéines Cbf5, Gar1, Nop10 et Nhp2 (figure 37). Les snoRNA s'apparient à des séquences spécifiques du pré-ARNr et guident ainsi les RNP vers leur site de modification.

Les premiers clivages endonucléolytiques aux sites A0, A1 et A2 impliquent deux snoRNP à boîtes C/D, U3 et U14, ainsi que deux snoRNP à boîtes H/ACA, snR10 et snR30/U17 (Dutca *et al*, 2011; Kiss *et al*, 2010). Les snoRNP à boîtes C/D interviennent de façon co-transcriptionnelle par leur interaction avec les composants de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase I (Strunk & Karbstein, 2009). La cartographie des sites de liaison des snoRNA à boîtes C/D sur l'ARNr indique que ces appariements empêchent la formation d'éléments de structures secondaires et/ou tertiaires et faciliterait ainsi l'insertion des protéines ribosomiques (Karbstein, 2011). Par ailleurs, la snoRNP à boîtes H/ACA snR30 empêche la formation précoce d'une structure secondaire interne de l'ARN 18S, spécifique des eucaryotes (Fayet-Lebaron *et al*, 2009).

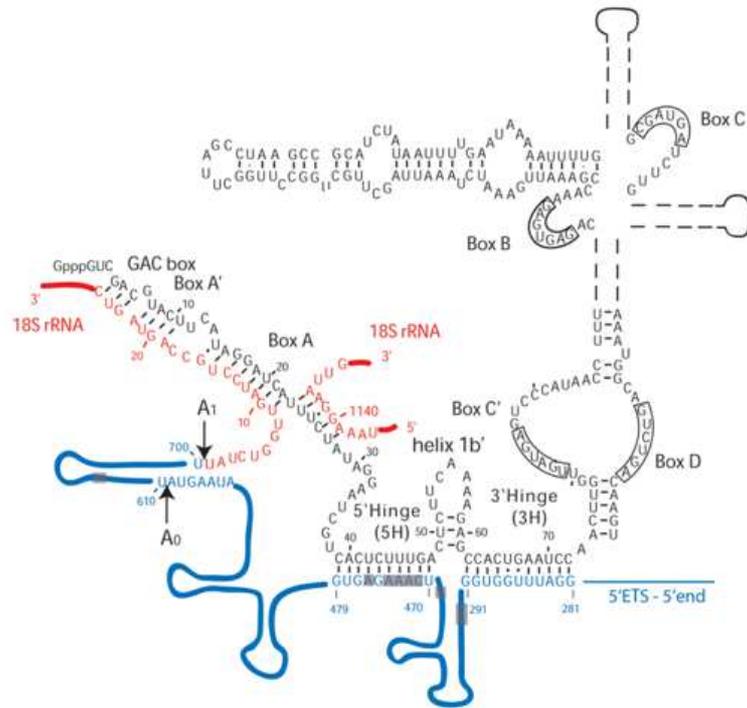


Figure 38 : Structure secondaire du snRNA U3 apparié au pré-ARNr 35S (d'après Ducta *et al*, 2011).

❖ Le snoRNP U3

La snoRNP U3 fait partie intégrante du SSU-processome et joue un rôle essentiel dans la réalisation des clivages précoces (Dragon *et al*, 2002). En effet, l'absence du snoRNA U3 ou d'une des cinq protéines associées inhibe les clivages aux sites A0, A1 et A2. Ceci conduit à la formation d'un intermédiaire d'ARNr aberrant, le 23S obtenu après un clivage en A3, qui est alors rapidement dégradé.

Chez *S.cerevisiae*, le snoRNA U3 peut être décomposé en deux domaines conservés, un domaine court en 5' lié par une région charnière à un long domaine en 3' (Samarsky & Fournier, 1998). La région 5' interagit via les boîtes GAC, A et A' avec deux domaines du pré-ARNr : en aval du site A1 et dans la région interne de l'ARN 18S. La partie en 5' de la région charnière s'apparie avec le 5' ETS du pré-ARN 35S (figure 38) (Sharma & Tollervey, 1999). Ces appariements participent à la formation du pseudo-nœud central, structure très conservée en 5' de l'ARN 18S. La snoRNP U3 jouerait un rôle de chaperonne dans le repliement des ARNr (Hughes, 1996; Henras *et al*, 2008; Dutca *et al*, 2011).

4.1.5. Export et assemblage de la sous-unité 40S

Les dernières étapes de la biogenèse de la sous-unité 40S se déroulent dans le cytoplasme. Celles-ci requièrent dix facteurs protéiques : l'adaptateur d'export Ltv1 et son partenaire associé Enp1, les MTases Dim1 et Bud23, la nucléase Nob1 et son régulateur Pno1, la kinase Rio2, la protéine GTPase-like Tsr1, la kinase Rio1 et l'ATPase Fap7. Tous ces facteurs interagissent de façon transitoire avec cette particule afin de produire une sous-unité 40S mature. Alors que les sites d'interaction de ces facteurs ont été récemment cartographiés, seuls quelques-uns ont une fonction connue (Karbstein, 2011). Ltv1 et Pno1 joueraient le rôle d'adaptateur pour l'export vers le cytoplasme. Elles contiennent des séquences riches en leucines qui interagiraient avec le récepteur nucléaire d'export Crm1 (Seiser *et al*, 2006). Dim1 catalyse la méthylation de deux adénosines successives conservées de l'ARNr 18S (Lafontaine *et al*, 1995). Bud23 méthyle la guanosine 1575 et sera particulièrement décrite dans le paragraphe 4.2.2. Pno1 module la fixation de Nob1 sur l'ARNr 20S et ces deux protéines sont requises pour le dernier clivage au site D et la formation de l'ARNr 18S (Woolls *et al*, 2011; Fatica *et al*, 2003).

Durant sa maturation, la particule pré-40S est chaperonnée par ces facteurs d'assemblage afin de prévenir la formation précoce d'un ribosome 80S non mature qui serait alors rapidement dégradé. Ainsi, certains facteurs d'assemblage se lient à l'interface pour éviter la fixation des facteurs d'initiation de la traduction, et d'autres préviennent l'ouverture du tunnel et empêchent la liaison avec l'ARNm. D'autre part, de nombreuses protéines ribosomiques de la sous-unité 40S (Rps0, Rps2, Rps3, Rps10, Rps20, Rps21, Rps26 et Rps28) sont également impliquées dans la maturation du pré-ARNr 20S. Elles permettraient de structurer le pré-ARNr 20S pour le clivage D et joueraient un rôle dans le recrutement des facteurs transactivateurs. L'assemblage de la sous-unité 40S se termine par des réarrangements conformationnels principalement au site de décodage et en la dissociation des facteurs d'assemblage (Karbstein, 2011). L'ordre et la régulation des étapes d'assemblage de la sous-unité 40S ne sont à ce jour pas complètement élucidés.

4.1.6. Modifications des ARNr

La plupart des modifications sont réalisées sur le pré-ARNr mais ont pour cible des séquences conservées dans les ARNr matures (Henras *et al*, 2008). Ces modifications ont lieu tout du long de la biogenèse du ribosome. Au cours des clivages nucléolytiques, le pré-ARNr subit majoritairement des 2'-O-méthylations et des pseudouridylation catalysées respectivement par les snoRNP à boîtes C/D et à boîtes H/ACA. De plus, un petit nombre de bases sont méthylées pendant la maturation par des MTases spécifiques. L'ARNr 25S possède 6 méthylations : m¹A2142 (l'enzyme responsable étant Bmt2), m⁵C2278 (Rcm1), m³U2634 (Bmt5), m³U2843 (Bmt6), m⁵C2870 (Nop2), m¹A645 (Rrp8) (Sharma *et al*, 2013b, 2014, 2013a; Peifer *et al*, 2013). L'ARNr 18S présente 4 bases méthylées : m¹Ψ1191 (Emg1), m⁷G1575 (Bud23), m⁶₂A1781 et m⁶₂A1782 (Dim1) (Liu & Thiele, 2001; White *et al*, 2008; Lafontaine *et al*, 1995).

La distribution des modifications est très conservée et leur nombre augmente avec la complexité de l'organisme (Chow *et al*, 2007). Une centaine de sites de modification ont été trouvés chez l'Homme alors que la levure en possède une cinquantaine. L'ensemble des nucléotides modifiés des ARNr se concentrent dans des régions fonctionnellement importantes telles que le centre de décodage, les régions A, P et E, les surfaces d'interaction entre la petite et la grande sous-unités et le PTC (Veldman *et al*, 1981). Cette localisation suggère que les nucléotides modifiés auraient un rôle dans la structure et la fonction du ribosome.

En effet, l'inhibition de la pseudouridylation en position 2919 du PTC, réalisée par le snR10 sur l'ARNr 25S de levure, entraîne un défaut d'efficacité de la traduction (King *et al*, 2003). Les modifications chimiques des ARNr améliorent donc l'efficacité du ribosome d'un point de vue fonctionnel mais ne présentent pas un caractère indispensable (Green & Noller, 1999). Par conséquent, les nucléotides modifiés au sein du ribosome auraient une importance collective et permettraient aux ARNr d'adopter une conformation optimale pour une efficacité maximale de traduction (Decatur & Fournier, 2002; Chow *et al*, 2007). Malgré ces observations, les fonctions exactes des modifications des ARNr restent largement inconnues.

4.2. DHR1 ET BUD23, DEUX ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA MATURATION DE LA SOUS-UNITE 40S

Les facteurs impliqués dans la biogenèse du ribosome eucaryote comprennent différentes enzymes telles que des GTPases, ATPases, kinases, ARN-hélicases et MTases. Ces enzymes peuvent stabiliser ou déstabiliser les complexes pré-ribosomiaux à des étapes spécifiques de la maturation (Strunk & Karbstein, 2009). Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à Dhr1 et Bud23.

4.2.1. L'hélicase Dhr1

Dhr1 (Ecm16) a été identifiée comme une hélicase à boîtes DEAD/H lors de l'analyse à grande échelle des gènes impliqués dans la biosynthèse et l'architecture de la surface cellulaire de *S. cerevisiae* (Lussier *et al*, 1997).

4.2.1.1. Les ARN hélicases à boîtes DEAD/H

Les ARN hélicases sont des modulateurs de structures d'ARN et jouent par conséquent des rôles clés dans de nombreux processus cellulaires tels que la transcription, la synthèse des ribosomes, la traduction, la dégradation des ARNm. En effet, les ARN hélicases permettent la séparation de deux brins d'ARN préalablement appariés en utilisant l'énergie de l'hydrolyse d'un nucléotide triphosphate, le plus souvent l'ATP.

Quatre familles d'hélicases à ARN peuvent être définies à partir d'analyses de séquences. La plupart des hélicases impliquées dans la biogenèse des ribosomes appartiennent aux deux familles d'hélicases dites à boîtes DEAD et DEAH.

Parmi les 19 ARN-hélicases impliquées dans la biogenèse des ribosomes chez la levure, 17 sont essentielles (Martin *et al*, 2013; Bernstein *et al*, 2006), 7 sont requises pour la formation de la sous-unité 40S : Dhr1, Dhr2, Dbp8, Rok1, Fal1, Rrp3 et Dbp4 (Colley *et al*, 2000; Strunk & Karbstein, 2009). Parmi ces ARN-hélicases, plusieurs sont impliquées dans le retrait de certains snoRNA appariés avec le pré-ARNr ou elles participent au remodelage des RNP aux sites d'interactions ARN/ARN ou protéine/ARN (Bohnsack *et al*, 2009). Ces réarrangements structuraux permettent, selon les cas, l'assemblage ou la dissociation de facteurs de la biogenèse. Ces changements peuvent être irréversibles ou provoquer des réactions irréversibles telles que les clivages de l'ARN (Woolford & Baserga, 2013).

D'un point de vue structural, ces enzymes possèdent un cœur hélicase central commun entouré par des extensions N et C-terminales spécifiques à chaque hélicase contenant les sites de liaison aux cofacteurs et substrats (Silverman *et al*, 2003). Le cœur hélicase est composé de domaines de type RecA organisés en tandem. Ces domaines présentent huit motifs conservés dont la boîte DEAH/D, impliqués dans la liaison de l'ATP et son hydrolyse, la liaison à l'ARN et aux cofacteurs ainsi que l'activité hélicase (Lüking *et al*, 1998).

La protéine Dhr1 est une ARN hélicase à boîte DEAH et, malgré des similitudes avec des hélicases impliquées dans l'épissage des ARNm, elle est impliquée dans les premières étapes de clivage de la biogenèse du ribosome (Shiratori *et al*, 1999; Colley *et al*, 2000).

4.2.1.2. Dhr1 s'associe à la snoRNP U3

Dhr1 est localisée dans le nucléole. Sa déplétion inhibe les clivages aux sites A1 et A2 du pré-ARNr et plus légèrement celui en A0. Ceci entraîne une accumulation des intermédiaires 35S et une réduction du 27SA2 et du 20S qui a pour conséquence une diminution du taux d'ARNr 18S (Colley *et al*, 2000). Sa maturation fait intervenir quatre snoRNP, U3, U14, snR10 et snR30. C'est pourquoi l'équipe de D. Lafontaine a réalisé des expériences de co-immunoprécipitation qui ont montré que Dhr1 s'associe de façon stable au snoRNA U3. De plus, les protéines du SSU-processome, Mpp10 et Rcl1, qui interagissent avec le snoRNA U3, co-précipitent également avec l'hélicase Dhr1 (Colley *et al*, 2000).

Par ailleurs, la déplétion du snoARN U3 entraîne un défaut de clivage à la fois aux sites A0, A1 et A2, alors que la déplétion de Dhr1 provoque majoritairement l'accumulation de l'intermédiaire aberrant 22S qui s'étend des sites A0 à A3, témoin des défauts de clivages en A1 et A2.

Ce phénotype a également été observé dans des cellules exprimant une forme tronquée en C-terminal de Mpp10, ce qui suggère que Mpp10 et Dhr1 contribueraient au clivage efficace aux sites A1 et A2 (Lee & Baserga, 1997). D'autre part, le clivage en A0 nécessite une interaction entre le snoRNA U3 et la séquence 5'ETS du pré-ARNr alors que la liaison de U3 avec la région de l'ARN 18S n'est pas nécessaire (Sharma & Tollervey, 1999). Par conséquent, la snoRNP U3 possède des fonctions distinctes, non couplées concernant le clivage en A0 d'une part et ceux en A1 et A2 d'autre part. L'hélicase Dhr1 interviendrait donc au niveau de l'appariement entre le snoRNA U3 et le fragment de l'ARNr 18S qui correspond au site de formation du pseudo-nœud central (Lee & Baserga, 1997; Colley *et al*, 2000).

4.2.2. La MTase Bud23

La modification de certaines bases des ARNr fait partie des étapes de maturation du ribosome. Les ARNr comptent un petit nombre de bases méthylées, cibles de MTases spécifiques qui ne sont pas guidées par des ARNs : chez la levure, l'ARNr 25S possède 6 bases méthylées et l'ARNr 18S, 4 bases méthylées.

4.2.2.1. Bud23 modifie la guanosine 1575 de l'ARNr 18S

Chez les eucaryotes, Bud23 est une enzyme qui catalyse l'ajout d'un groupement méthyle en position N7 de la guanosine 1575 de l'ARNr 18S (figure 39). Bud23 est conservée uniquement chez les eucaryotes, il en est de même pour la modification qu'elle catalyse. La guanine modifiée se situe au niveau du site P dans le centre de décodage de la petite sous-unité 40S. Cette modification pourrait donc être impliquée dans la liaison de l'ARNt dans le site P et par conséquent dans la fidélité de traduction (White *et al*, 2008; Piekna-Przybylska *et al*, 2008).

4.2.2.2. Bud23 et la biogenèse de la sous-unité 40S

Les études chez la levure ont montré que le gène *BUD23* n'est pas essentiel, néanmoins, sa délétion entraîne un ralentissement sévère de la croissance des cellules ainsi qu'un défaut important dans la biogenèse de la sous-unité 40S. L'analyse des différentes populations d'ARNr chez un mutant *bud23Δ* montre une accumulation du pré-ARNr 35S ainsi qu'une déplétion du 27SA2 indiquant que Bud23 est nécessaire pour un clivage efficace en A2. De plus, des analyses de localisation *in vivo* montrent que Bud23 est impliquée dans l'export de la sous unité 40S vers le cytoplasme (White *et al*, 2008).

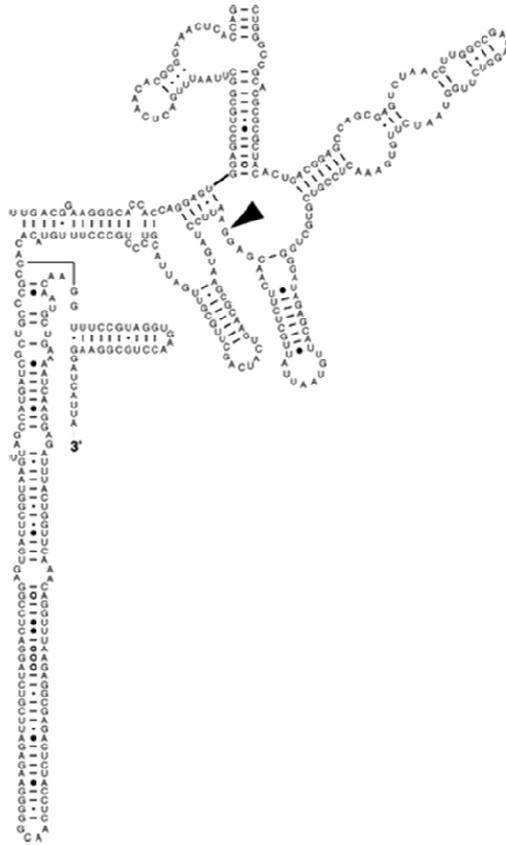


Figure 39 : Structure secondaire de la partie 3' de l'ARNr 18S de levure (d'après White et al, 2008).

La flèche noire indique la G1575 méthylée par Bud23.

Bud23 joue un rôle important dans la biogenèse du ribosome, cette MTase intervient dans les étapes précoces de maturation jusqu'à l'export de la petite sous-unité et pourrait être impliquée dans la dissociation du SSU-processome (Sardana & Johnson, 2012).

4.2.2.3. Bud23 d'un point de vue structural

Bud23 est une MTase de classe I dépendante de la SAM. Des analyses bioinformatiques de sa séquence prédisent la présence de deux domaines : un domaine N-terminal de type Rossmann spécifique des MTases de classe I constitué des 200 premiers résidus et un domaine C-terminal riche en acides aminés basiques qui pourrait être impliqué dans la liaison avec le substrat chargé négativement et qui est prédit pour être déstructuré. Le domaine N-terminal MTase est indispensable à la fonction de Bud23 alors que le domaine C-terminal pourrait être impliqué dans la localisation nucléolaire de la protéine (White *et al*, 2008).

Des mutants catalytiques de Bud23, tel D77K, mutation visant un résidu essentiel dans la liaison de la SAM, présentent un phénotype de croissance normal alors que leur activité de méthylation est nulle. L'activité MTase de Bud23 n'est pas essentielle à son rôle dans la biogenèse et dans l'export efficace de la petite sous-unité du ribosome mais sa présence est quant à elle nécessaire (White *et al*, 2008). Ce phénomène a également été observé pour la MTase Emg1 (Leulliot *et al*, 2008a) et pour la diméthylase Dim1. En effet, la délétion du gène *DIM1* entraîne un défaut de croissance sévère, en revanche ce phénotype n'est pas détectable dans le cas de mutants affectant uniquement l'activité catalytique de Dim1 (Lafontaine *et al*, 1995). Bud23 appartient à la grande famille des facteurs pré-ribosomiques qui présentent deux rôles distincts.

4.3. INTERACTION BUD23 – TRM112 – DHR1

Lors des études de purification de complexes protéiques à grande échelle chez la levure, la protéine Trm112 a été co-purifiée avec des pré-ribosomes, des composants du SSU-processome et avec l'hélicase Dhr1 (Gavin *et al*, 2002). Ceci suggérerait alors que cette petite protéine, en plus de ses fonctions déjà connues, jouerait un rôle dans la biogenèse des ribosomes.

4.3.1. Trm112 interagit avec et active Bud23

4.3.1.1. Chez *S. cerevisiae*

L'analyse de purifications d'affinité en tandem avec Trm112 fusionnée à une étiquette TAP a permis d'identifier la MTase Bud23 comme partenaire de Trm112. Des analyses *in vivo* chez *S. cerevisiae* ont montré que Trm112 est requise pour la stabilité de Bud23. De plus, la co-expression des deux protéines chez *E.coli* augmente la solubilité de Bud23 d'un facteur 5 et permet ainsi la purification du complexe stable *in vitro* (Figaro *et al*, 2012).

Par conséquent, la délétion du gène *TRM112* a un effet sur la biogenèse du ribosome. Les souches $\Delta trm112$ présentent un défaut de méthylation de la G1575 de l'ARNr 18S ainsi qu'un défaut de formation de la petite sous-unité du ribosome. De plus, l'analyse de gradients de polysomes montre que Trm112 se concentre dans les fractions contenant également les pré-ribosomes 90S et pré-40S. Trm112 jouerait ainsi le rôle d'activateur indispensable à l'activité MTase et à la fonction de Bud23. En l'absence de Trm112, Bud23 ne serait pas stable et ne pourrait pas interagir avec les pré-ribosomes (Figaro *et al*, 2012).

Afin de caractériser l'interaction Bud23-Trm112 d'un point de vue structural, l'équipe de M. Graille a généré un modèle du complexe en se basant sur la structure cristallographique du complexe Mtq2-Trm112. Celui-ci indique que Bud23, tout comme Mtq2, exposerait une région hydrophobe à l'interface avec Trm112 (Figaro *et al*, 2012; Liger *et al*, 2011).

4.3.1.2. Chez les eucaryotes supérieurs

Des études récentes ont montré que l'orthologue humain de Bud23 (WBSCR22) interagit avec l'orthologue humain de Trm112 (Jangani *et al*, 2014) et est impliqué dans la biogenèse du ribosome (Öunap *et al*, 2013). Dans une souche de levure $\Delta bud23$, l'expression de WBSCR22 permet de pallier partiellement les défauts de croissance et de production des sous-unités ribosomales (Öunap *et al*, 2013). Chez l'Homme, WBSCR22 est impliqué dans le développement de métastases tumorales (Nakazawa *et al*, 2011). De plus, le gène codant pour WBSCR22 est localisé dans une région du chromosome 7 qui est délétée chez les patients du syndrome de Williams-Beuren (Doll & Grzeschik, 2001). Enfin, WBSCR22 vient d'être caractérisée comme un régulateur du récepteur glucocorticoïde directement impliqué dans la réponse inflammatoire et dans les maladies pulmonaires (Jangani *et al*, 2014).

Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine orthologue de Bud23 (Rid2) joue un rôle dans la réactivation de la division cellulaire au cours du processus de différenciation, mécanisme essentiel à la régénération des organes chez les plantes. Les études ont montré qu'un allèle thermosensible, déficient pour les étapes de clivage du pré-ARNr, portait une seule substitution au niveau d'un résidu prédit pour être localisé à l'interface entre Bud23 et Trm112 (Ohbayashi *et al*, 2011).

L'ensemble de ces observations renforce l'hypothèse d'un mode d'interaction similaire entre Trm112 et ses différents partenaires à activité MTase.

4.3.2. Bud23-Trm112 interagit avec Dhr1

Des analyses globales de complexes protéiques chez la levure avaient suggéré l'existence d'une interaction entre Trm112 et Dhr1 (Gavin *et al*, 2002). A la suite de la mise en évidence du complexe Bud23-Trm112, une récente étude présente l'interaction physique et fonctionnelle entre Dhr1 et Bud23 (Sardana *et al*, 2014).

L'étude de mutants de Dhr1, supresseurs du défaut de croissance d'une souche $\Delta bud23$, a permis d'identifier les acides aminés impliqués dans ce phénotype. Ces résidus seraient situés dans le domaine hélicase au niveau de RecA1 et RecA2 et exposés au solvant. La mutation de ces résidus permet de pallier l'absence de Bud23 sans interférer avec l'activité hélicase de Dhr1. Ceci suggérerait que Bud23 pourrait intervenir dans la régulation de l'activité de Dhr1. Par ailleurs, Bud23 ne dépend pas de Dhr1 pour son recrutement dans la particule pré-40S mais celui-ci interviendrait avant la dissociation de Dhr1. Le modèle élaboré dans cette étude propose que le recrutement de Bud23 au niveau du SSU-processome encouragerait sa dissociation, possiblement via la stimulation de l'hélicase Dhr1 (Sardana *et al*, 2014).

Par ailleurs, des analyses de double-hybride ont montré que les résidus 195 à 252 localisés dans l'extension N-terminale non conservée de Dhr1 sont essentiels pour son interaction avec le domaine MTase de Bud23 (Sardana *et al*, 2014).

Ces trois protéines forment un réseau d'interaction impliqué dans la synthèse de la petite sous-unité 40S.

5. TRM112 ET LA MODIFICATION DES ARNt

Dans le mécanisme de la traduction, les ARNt jouent un rôle essentiel car ils permettent le décodage de l'information génétique. Afin d'être fonctionnels, les ARNt subissent plusieurs étapes de maturation post-transcriptionnelle dont la modification chimique d'un grand nombre de bases spécifiques. La petite protéine Trm112 prend part à ces étapes en activant deux enzymes de modification des ARNt : Trm11 et Trm9.

5.1. BIOSYNTHESE DES ARNt

La biosynthèse des ARNt est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses enzymes lors des étapes de transcription, maturation des extrémités 5' et 3', épissage et modification des bases.

5.1.1. Transcription & formation des extrémités

La première étape de la biosynthèse des ARNt est la transcription des gènes codant pour les différents ARNt (ADNt). Chez les eucaryotes, cette étape est catalysée par l'ARN polymérase III également responsable de la transcription de l'ADNr 5S. Chez la levure, il existe 274 gènes codant pour des ARNt répartis de manière aléatoire sur l'ensemble des chromosomes. Le lieu de transcription des ADNt varie en fonction du cycle cellulaire. En effet, ces gènes peuvent se regrouper au niveau du nucléole ou des centromères mais, également, s'associer au complexe du pore nucléaire au cours de la phase M du cycle cellulaire (Thompson *et al*, 2003; Chen & Gartenberg, 2014). Chez les procaryotes, les ADNt sont souvent réunis en opérons alors que, chez les eucaryotes, les ADNt sont généralement isolés et transcrits indépendamment (Komine *et al*, 1990; Hani & Feldmann, 1998).

Chez les eucaryotes, le nombre d'ADNt implique que plusieurs gènes codent pour le même ARNt. Ce nombre est réduit chez les bactéries et chez les Archaea : chaque ARNt est le plus souvent le produit d'un gène unique (Marck & Grosjean, 2002). La multiplicité observée chez les eucaryotes et les bactéries peut expliquer le fait que les différents ARNt ne soient pas en concentrations équivalentes dans la cellule. Ceci est également corrélé à la fréquence d'utilisation de certains codons (Kanaya *et al*, 1999).

Les produits de la transcription des ADNt sont les pré-ARNt qui doivent subir une maturation post-transcriptionnelle afin de devenir des ARNt fonctionnels (figure 40).

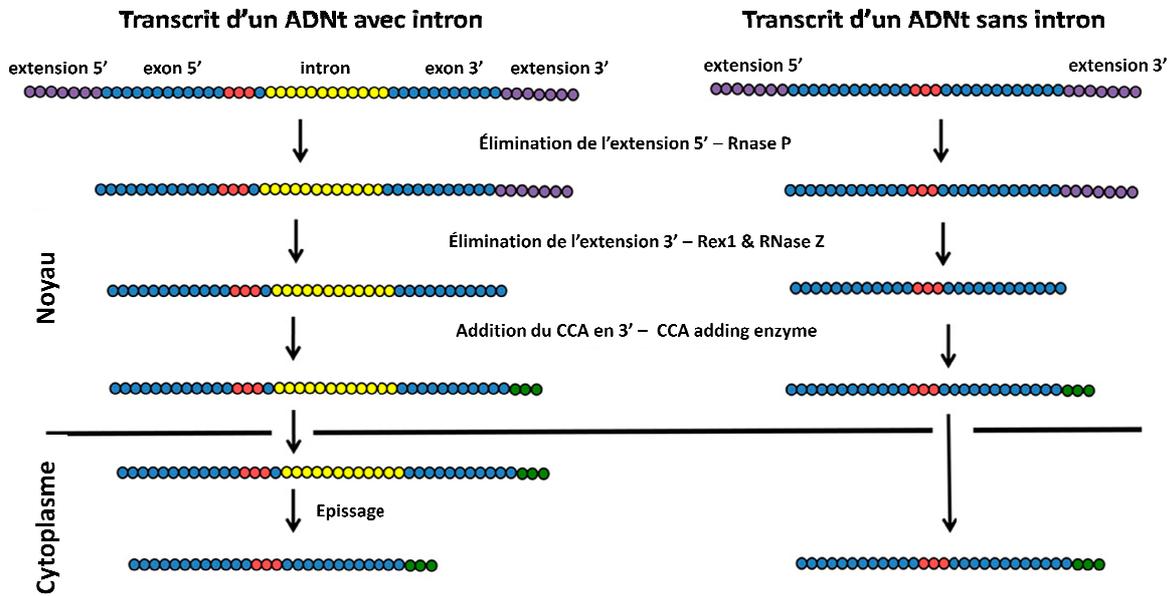


Figure 40 : Schématisation de l'élimination des extrémités 3' et 5' des ARNt (d'après Hopper, 2013).

Chez la levure, la plupart des pré-ARNt possède des extensions d'environ 12 nucléotides en 5' et en 3' (Hopper & Phizicky, 2003). L'élimination de l'extension en 5' précède généralement celle en 3'. Côté 5', la maturation est assurée par l'endonucléase RNase P (figure 40). Chez les organismes eucaryotes, la RNase P est un ribozyme constitué d'un ARN et de protéines (Hartmann & Hartmann, 2003).

La maturation de l'extrémité 3' est plus complexe, elle fait intervenir à la fois des endo et exonucléases (Phizicky & Hopper, 2010). Chez la levure, l'enzyme Rex1 est responsable de l'activité exonucléolytique dans le sens 3'-5' et la RNase Z, Trz1, possède l'activité endonucléolytique nécessaire au clivage de l'extrémité 3' (figure 40) (Papadimitriou & Gross, 1996).

Tous les ARNt matures possèdent à l'extrémité 3' une séquence CCA requise pour l'étape d'aminocyclation. La présence de cette séquence unique chez tous les ARNt est due à l'activité d'une ARNt nucléotidyl-transférase (ou CCA adding enzyme) (figure 40). En plus de catalyser l'ajout de la séquence CCA en 3', cette enzyme a une fonction de contrôle qualité qui permet de réparer les ARNt présentant un défaut dans cette séquence (Deutscher, 1990).

Toutes les étapes décrites ci-dessus se déroulent dans le noyau. Les pré-ARNt sont ensuite exportés vers le cytoplasme afin de subir les étapes suivantes de maturation.

5.1.2. Epissage de l'intron

Chez les eucaryotes et chez les archées, certains ADNt contiennent un intron qui doit être épissé au cours de la maturation des pré-ARNt. Chez les eucaryotes, l'intron se situe toujours en 3' de l'anticodon (bases 34 à 36), plus précisément entre les bases 37 et 38. Cependant, chez les archées, il peut être localisé ailleurs (Phizicky & Hopper, 2010). Le pourcentage d'ADNt possédant un intron varie entre les organismes. Chez la levure, parmi les 274 ADNt nucléaires, 59 (soit plus de 20%) contiennent un intron, ce chiffre atteint 50% chez certaines archées mais n'est que de 5% chez les eucaryotes supérieurs. Chez *S. cerevisiae*, la longueur de l'intron varie de 14 à 60 nucléotides, cependant au sein d'une même famille d'ARNt, la séquence et la longueur des introns varient peu.

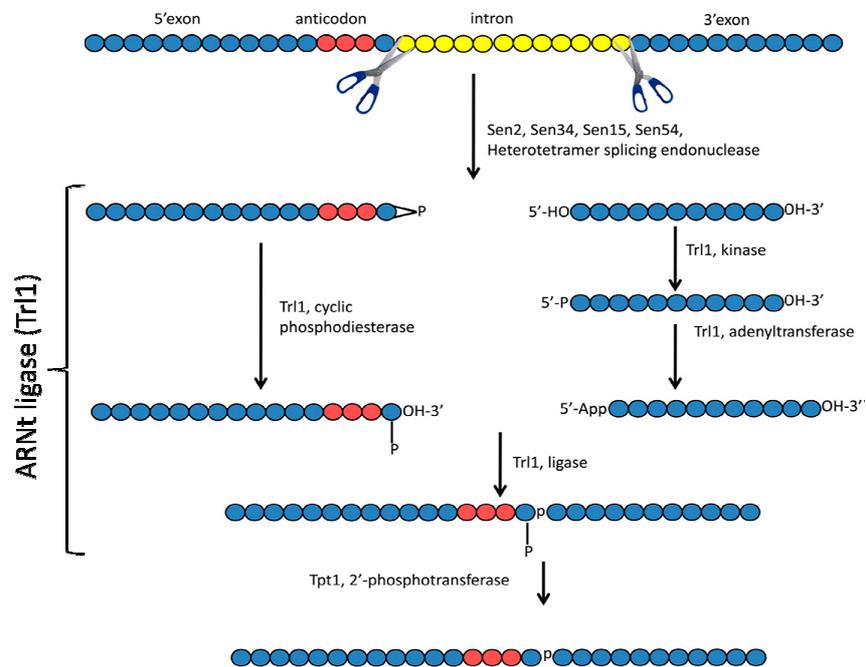


Figure 41 : Schématisation des étapes d'épissage de l'intron chez la levure (d'après Hopper, 2013).

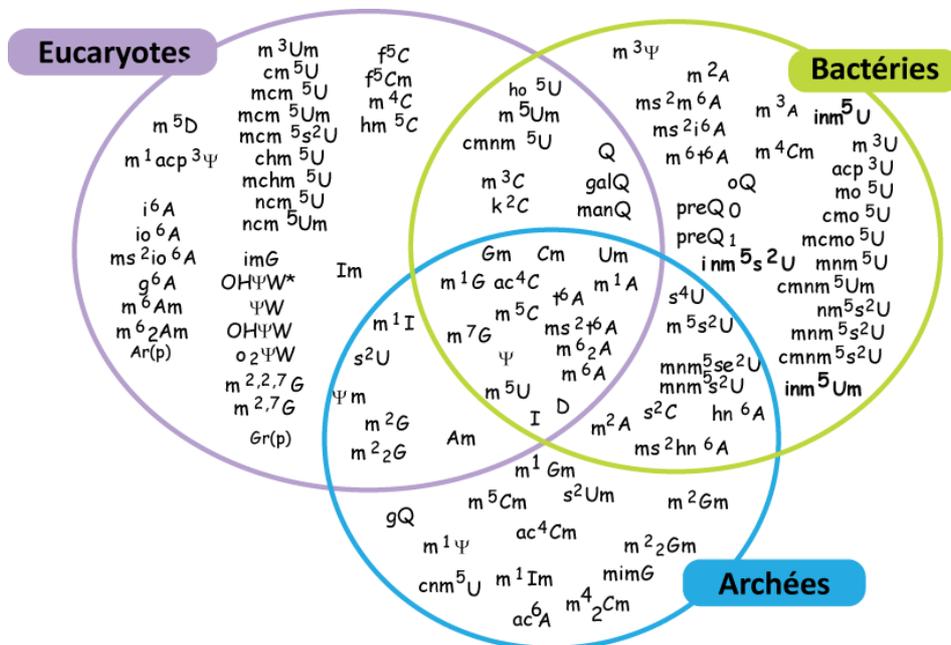


Figure 42 : Répartition des nucléotides modifiés dans les trois domaines de la vie (adapté de Motorin & Grosjean, 1998).

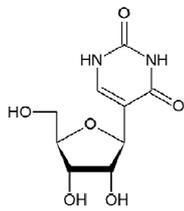
L'épissage des pré-ARNt se déroule en trois étapes où interviennent trois enzymes essentielles (figure 41) (Abelson *et al*, 1998). La première étape est catalysée par l'hétérotetramère Sen2-Sen15-Sen34-Sen54, une ARNt endonucléase d'épissage qui clive à la fois les régions 5' et 3' de l'intron. A l'issue de cette réaction, l'ARNt est coupé en deux : l'exon 5' possède une extrémité 2',3' phosphate cyclique et l'exon 3' une extrémité 5'-OH. La deuxième étape de l'épissage est catalysée par une ARNt ligase qui permet la formation d'une liaison covalente entre ces deux extrémités. Il y a dans un premier temps ouverture du cycle phosphate de l'exon 5' puis phosphorylation de l'extrémité 5'OH de l'exon 3'. Celle-ci est ensuite activée par le transfert d'une molécule AMP sur le 5'-phosphate. C'est sous cette forme activée que l'extrémité 5' de l'exon 3' réagit sur l'extrémité 3'OH de l'exon 5' pour former une liaison covalente entre les deux moitiés d'ARNt entraînant le relargage de l'AMP. La troisième enzyme impliquée dans cet épissage est une 2' phosphotransférase qui élimine le phosphate résiduel en position 2' (Abelson *et al*, 1998). Ce mécanisme d'épissage concerne les levures et les plantes. Chez les vertébrés et les archées, un complexe protéique prend en charge la ligature sans avoir besoin de l'enzyme 2' phosphotransférase (Popow *et al*, 2011).

Cette étape d'épissage se déroule dans le cytoplasme, à la surface extérieure des mitochondries (Yoshihisa *et al*, 2007).

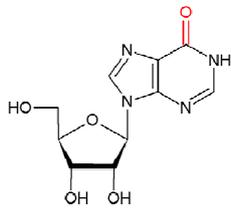
La maturation des ARNt passe également par la modification de certains nucléotides. Ceci met en jeu de nombreuses enzymes de modification qui interviennent tout au long du processus, de la transcription à l'amino-acylation.

5.1.3. Modifications des ARNt

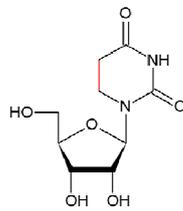
Le décodage précis de l'information génétique par les molécules d'ARNt est indispensable à la survie cellulaire. Afin d'accomplir cette tâche précisément, les ARNt doivent être modifiés. L'importance de ces modifications est mise en évidence par le fait que pour un génome donné, 1 à 10% des gènes codent pour des enzymes impliquées dans la modification des ARNt. Les nucléotides modifiés sont présents dans tous les types d'ARN et dans les trois domaines du vivant (figure 42). Toutes ces modifications sont répertoriées dans une banque de données : <http://mods.rna.albany.edu/>.



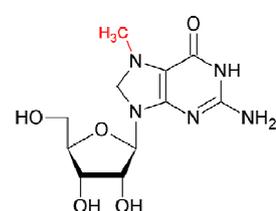
Pseudouridine (Ψ)



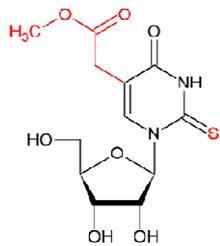
Inosine (I)



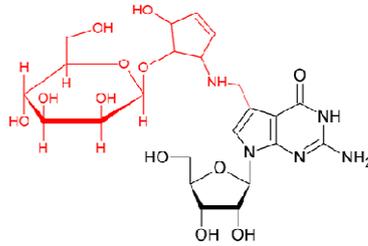
Dihydrouridine (D)



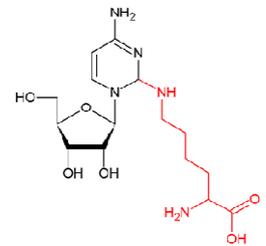
7-méthylguanosine (m⁷G)



**5-méthoxycarbonylméthyl-2-thiouridine
(mcm⁵s²U)**



**mannosyl-queuosine
(manQ)**



**2-lysidine
(k²C)**

Figure 43 : Exemples de bases modifiées

5.1.3.1. Les nucléotides modifiés des ARNt

Parmi les différents types d'ARN, les ARNt présentent le plus grand nombre et la plus grande diversité de modifications. En effet, 4 à 26% de leurs nucléotides sont modifiés et parmi les 109 modifications chimiques de ribonucléotides identifiées à ce jour, 93 concernent les ARNt. La distribution de ces modifications ainsi que leurs voies de biosynthèse ont été compilées dans une banque de données : <http://modomics.genesilico.pl/sequences/list/tRNA/>. La nature de ces modifications est très diverse mais elles peuvent cependant être classées en deux catégories selon le métabolisme impliqué lors de leur synthèse et leur fonction (Björk, 1995). Les modifications dites simples sont élaborées en une ou deux étapes. Il s'agit des méthylations de la base ou du ribose, d'isomérisations, de thiolations, de réductions ou de déaminations. Les nucléotides modifiés tels que la pseudouridine (Ψ), l'inosine (I), la dihydrouridine (D), la 7-méthylguanosine (m^7G) appartiennent à ce groupe (figure 43). Les modifications dites complexes sont constituées de modifications localisées sur un ou plusieurs atomes d'un nucléotide et leur synthèse implique plusieurs enzymes. C'est le cas, par exemple, de la 5-méthoxycarbonylméthyl-2-thiouridine (mcm^5s^2U), la mannosyl-queuosine (manQ), ou la lysidine (k^2C) (figure 43) (Motorin & Grosjean, 1998).

Environ deux tiers de ces diverses modifications impliquent l'addition d'un groupement méthyle (Cantara *et al*, 2011). La majorité de ces réactions ont pour cible un atome d'azote : en effet, les seules positions qui n'ont pas encore été identifiées comme méthylées, sont l'azote de la liaison glycosidique, et les positions N7 et N3 de l'adénosine. Cependant, ces méthylations concernent également le 2'OH du ribose ou le carbone 5 des pyrimidines et les positions C2 et C8 des adénosines (Motorin & Helm, 2011).

Les différentes bases modifiées sont présentes dans toutes les parties de l'ARNt, néanmoins toutes les positions ne sont pas visées dans les mêmes proportions. Les boucles T et D contiennent respectivement des résidus ribothymidine (T) et dihydrouridine (D), ce qui est à l'origine de leur dénomination. La boucle de l'anticodon est une région très modifiée, de plus, les positions 34 et 37 sont très souvent cibles de modifications complexes (Motorin & Helm, 2010).

5.1.3.2. Fonctions des modifications

La localisation des modifications dans la molécule d'ARNt est reliée à leur fonction. Elles peuvent être impliquées dans l'identification et la discrimination des ARNt, dans la fidélité de traduction, dans la maintenance du cadre de lecture et dans la stabilité des ARNt.

Malgré l'importance fonctionnelle de ces modifications et leur conservation au cours de l'évolution, très peu sont indispensables à la survie cellulaire. Chez la levure, parmi toutes les modifications recensées, seules deux sont essentielles : il s'agit de la transformation de l'adénosine A₃₄ en inosine I₃₄ et la méthylation de l'adénosine m¹A₅₈ (Anderson *et al*, 2000; Gerber & Keller, 1999). Néanmoins, la délétion de certains gènes codant pour des enzymes de modification entraîne un phénotype de défaut de croissance, c'est le cas de *TRM5* (m¹G₃₇), *TRM7* (Cm₃₂, Cm₃₄, Gm₃₄, ncm⁵Um₃₄), *SUA5-KAE1-BUD32* (ct⁶A₃₇), *PUS3* (Ψ₃₈, Ψ₃₉) et *TAN1* (ac⁴C₁₂) (Phizicky & Hopper, 2010). Par ailleurs, deux modifications peuvent être associées et un phénotype de défaut de croissance sera provoqué par l'absence de ces deux modifications, ceci sera particulièrement illustré dans le paragraphe 5.2. Enfin, l'absence de certaines modifications provoque des phénotypes remarquables dans des conditions spécifiques, cet aspect sera développé dans le paragraphe 5.3.

Afin d'assurer leur fonction principale de décodeur du code génétique, les ARNt doivent adopter une structure spécifique qui est reconnue par l'aa-RS, enzyme qui catalyse leur aminoacylation. Cette reconnaissance est cruciale car il s'agit d'un contrôle qualité essentiel avant l'entrée des ARNt dans le processus de traduction.

❖ Modifications & Structure des ARNt

Certains nucléotides modifiés participent collectivement à la stabilisation de la structure tridimensionnelle de l'ARNt. En effet, les interactions permettant le maintien de la structure en « L » se font principalement entre résidus modifiés des boucles D et T. De plus, certaines modifications jouent un rôle dans la fixation des ions Mg²⁺, dans la stabilisation thermique ou encore évitent la formation de repliement non fonctionnel (Motorin & Helm, 2010).

Le repliement correct du squelette phosphate chargé négativement nécessite la présence de cations comme le magnésium Mg²⁺. La fixation de ces ions est fortement dépendante de la modification des nucléotides. *In vitro*, à concentration physiologique de Mg²⁺, les ARNt non modifiés sont beaucoup moins stables que les ARNt modifiés.

Cependant cette différence peut être gommée en augmentant la concentration de Mg^{2+} (Hall *et al*, 1989). En effet, les nucléotides modifiés sont impliqués dans la coordination site-spécifique du Mg^{2+} , ce qui réduit la concentration de Mg^{2+} nécessaire au bon repliement des ARNt (Agris, 1996; Serebrov *et al*, 2001).

Même si la plupart des ARNt transcrits *in vitro*, c'est-à-dire non modifiés, se structurent en feuille de trèfle, ce n'est pas le cas pour l'ARNt^{Lys} mitochondrial humain. En l'absence de la modification m¹A en position 9, celui-ci adopte une structure en tige boucle non fonctionnelle (Helm *et al*, 1999).

Plusieurs modifications telles que ac⁴Cm, m¹Im, Ψ , Gm et m²₂Gm peuvent être impliquées dans la stabilisation thermique des ARNt. Les espèces hyperthermophiles augmentent le nombre de modifications de leurs ARNt lorsqu'elles se développent à des températures plus élevées (ac⁴Cm, m¹Im) (Noon *et al*, 2003). Chez *Thermus thermophilus*, la ribothymidine (T) localisée dans la boucle T de l'ARNt est ainsi substituée par une thioribothymidine (s²T). Cette modification confère à l'ARNt une grande stabilité à haute température (Horie *et al*, 1985).

❖ Modification et discrimination

La modification de certains résidus permet de discriminer un ARNt parmi d'autres. Cette discrimination peut intervenir lors de l'étape d'amino-acylation (cf. paragraphe 5.1.4.) mais également lors de la traduction. Par exemple, chez la levure, il est nécessaire de discriminer les ARNt^{Met} initiateurs des ARNt^{Met} élongateurs. Ces deux ARNt possèdent des séquences et des structures différentes mais sont amino-acylés par la même Met-RS. La discrimination se fait donc lors de la traduction : l'ARNt^{Met} initiateur interagit spécifiquement avec eIF2 et l'ARNt^{Met} élongateur avec eEF1 α . Ceci s'explique par la présence d'une modification spécifique de l'ARNt^{Met} initiateur située dans la tige-boucle T, la 2'-O-ribosyladénosine (phosphate) en position 64 (AR(p)₆₄). Ainsi modifié, cet ARNt ne peut interagir avec eEF1 α et est dédié à la reconnaissance des codons AUG initiateurs (Aström & Byström, 1994; Shin *et al*, 2011).

❖ Modification & décodage

Les nucléotides les plus modifiés sont situés aux positions 34 et 37, qui correspondent respectivement à la base « wobble » de l'anticodon et au résidu localisé juste en aval de ce triplet. Ces modifications jouent un rôle dans l'efficacité et la précision du décodage de l'ARNm par le ribosome.

Les modifications de la position 34 sont impliquées dans le décodage. Par exemple, la déamination de l'adénosine A₃₄ en inosine I₃₄ permet l'appariement de la base wobble avec U, C ou A. Cette modification permet d'accroître la capacité de décodage et l'absence de celle-ci entraîne des erreurs de décodage (Gerber & Keller, 1999).

Les modifications présentes sur l'uridine 34 et leurs conséquences seront particulièrement développées dans le paragraphe 5.3.

La position 37 des ARNt est occupée par une purine modifiée dans les trois domaines de la vie. Celle-ci joue un rôle important dans la maintenance du cadre de lecture en évitant son appariement avec une 4^e base de l'ARNm. Cependant, il existe naturellement des décalages programmés du cadre de lecture qui peuvent avoir lieu dans les deux directions +1/-1 (Atkins & Björk, 2009). Lorsque la base en position 37 est une guanine, celle-ci est fréquemment méthylée (m¹G₃₇) mais peut également être hypermodifiée en wybutosine (yW) et ses dérivés chez les archées (de Crécy-Lagard *et al*, 2010). Quand il s'agit d'une adénine, celle-ci peut subir diverses modifications complexes telles que ms²i⁶A, ct⁶A ou ms²hn⁶A (Cantara *et al*, 2011). La modification ct⁶A, catalysée par le complexe KEOPS est impliquée dans la lecture des codons ANN dont le codon initiateur AUG (Daugeron *et al*, 2011; El Yacoubi *et al*, 2012).

5.1.3.3. Les enzymes de modification

Etant donnée la diversité des modifications caractérisées dans les ARNt, les enzymes responsables de ces réactions sont tout aussi diverses. Une modification simple est souvent catalysée par une enzyme monomérique voire hétérodimérique alors qu'une modification complexe nécessite l'intervention de plusieurs polypeptides. Par exemple, la modification yW fait intervenir 5 protéines et la formation de la mcm⁵s²U34 requiert plus de 25 protéines (Phizicky & Hopper, 2010).

De nombreux points sur la spécificité de l'activité des enzymes de modification restent encore non résolus tels que la spécificité du type de substrat (ARNt/ARNr) ou la spécificité du nucléotide cible sur un même ARNt. A ce jour, la majorité des enzymes de modification des ARNt est caractérisée comme étant spécifiques des ARNt. Cependant, les Ψ synthétases, Pus1 et Pus7, peuvent agir à la fois sur les ARNt et sur le snRNA U2 (Massenet *et al*, 1999; Behm-Ansmant *et al*, 2003). De nombreuses enzymes de modification sont spécifiques d'une position dans un ARNt. Néanmoins, il existe certaines enzymes telles que Pus1, qui a pour cibles plusieurs positions : Ψ26-28, 34-36, 65 et 67 (Motorin *et al*, 1998).

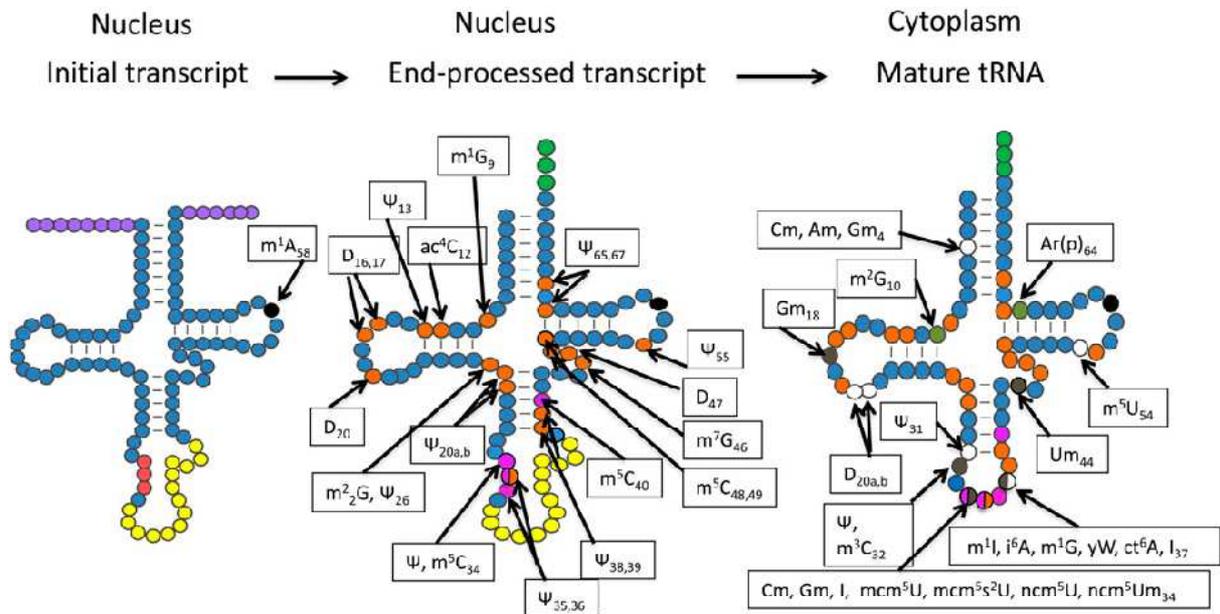


Figure 44 : Localisation cellulaire des modifications au cours de la maturation des ARNt (d'après Hopper, 2013).

Le code couleur de la figure 40 est conservé.

Certaines modifications ont lieu dans le noyau. Le cercle noir indique une modification qui a lieu sur le pré-ARNt initial. Les cercles magenta indiquent les modifications qui ont lieu uniquement en présence de l'intron. Les cercles orange indiquent les modifications qui ne requièrent pas la présence de l'intron mais qui ont lieu dans le noyau.

Certaines modifications ont lieu dans le cytoplasme. Les cercles marron indiquent celles qui ont lieu uniquement en absence de l'intron. Celles dont la spécificité de substrat est inconnue sont représentées par des cercles kaki.

La raison pour laquelle certaines enzymes sont spécifiques d'une position et d'autres non n'est pas encore élucidée aujourd'hui. Un autre aspect de la spécificité des enzymes de modification est la présence ou non de l'intron. Tous les cas sont possibles : une partie des modifications est réalisée avant l'épissage (m^5C34 , m^5C40 , $\Psi34$, $\Psi35$, $\Psi36$) alors que d'autres sont faites après l'épissage ($\Psi32$, i^6A37 , m^1G37) (figure 44). Par ailleurs, il existe plusieurs enzymes qui peuvent agir *in vitro* avant ou après l'épissage (Grosjean *et al*, 1997). La dernière interrogation concernant la spécificité des enzymes de modification est si l'action de certaines enzymes nécessite la présence antérieure d'autres modifications. Par exemple, la modification γW en position 37 de l'ARNt^{Phe} requiert la présence de la modification Gm_{34} (Guy *et al*, 2012). Par contre, la modification t^6A37 peut être réalisée *in vitro* en absence de toutes autres modifications (Perrochia *et al*, 2013).

5.1.3.4. Localisation cellulaire

Etant donné que la biosynthèse des ARNt se déroule à différents endroits dans la cellule et que les modifications sont réalisées tout du long, ceci implique une localisation particulière des enzymes de modification. Par exemple, les enzymes ayant pour cibles les transcrits initiaux ou les ARNt avec intron résident uniquement dans le noyau : c'est le cas de Trm6/61 et Trm4 (responsable de m^1A58 et m^5C34/m^5C40 respectivement) (Phizicky & Hopper, 2010; Anderson *et al*, 2000). D'autre part, la plupart des enzymes agissant uniquement après l'épissage de l'intron sont cytoplasmiques mais étonnamment certaines peuvent être cytoplasmiques et nucléaires (Mod5) ou paradoxalement uniquement nucléaires et mitochondriales (Trm5). Enfin les enzymes indépendantes de la présence ou non d'un intron se localisent pour certaines dans le noyau et pour d'autres dans le cytoplasme. Cette distribution cellulaire des enzymes de modification donne un ordre dans la voie de modification des ARNt. Cependant, à une exception près, aucune modification n'est nécessaire pour ordonner les modification suivantes (Hopper, 2013). La localisation des enzymes de modification est très variable et il est difficile d'établir des règles entre la maturation des ARNt et l'état de modification chimique des bases.

5.1.4. Amino-acylation des ARNt

L' amino-acylation des ARNt est une étape de grande importance dans tous les domaines de la vie. Elle assure en aval la fiabilité de la synthèse protéique en reliant l'acide aminé correspondant à séquence anticodon porté par l'ARNt. Les aa-RS, enzymes responsables de cette réaction, possèdent une grande variabilité structurale et chez les eucaryotes en particulier, une aa-RS est spécifique d'un des vingt acides aminés (Giegé & Lapointe, 2009).

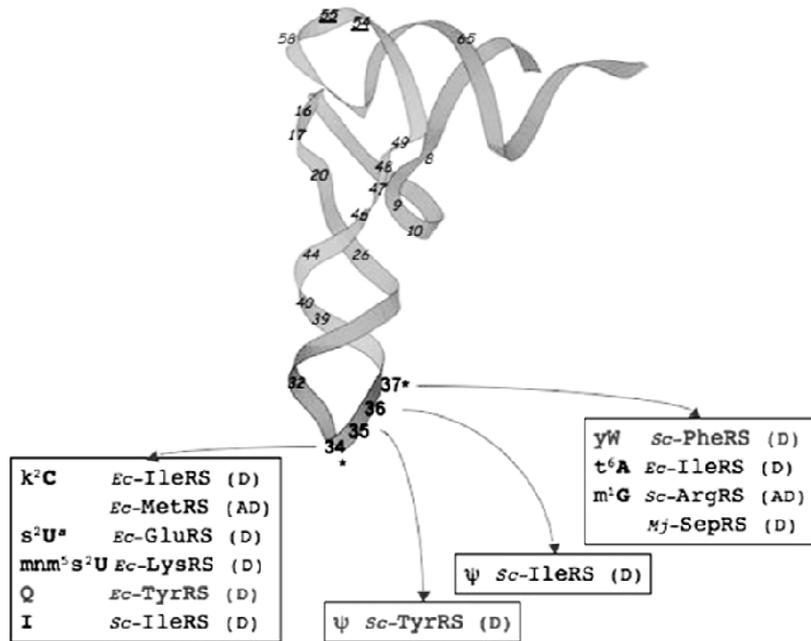


Figure 45 : Structure tridimensionnelle d'un ARNt présentant les nucléotides modifiés participant individuellement à l'identité de l'ARNt pour l'aa-RS (d'après Giegé & Lapointe, 2009).

(D) : Nucléotides modifiés caractérisés comme déterminants ; (AD) : Nucléotides modifiés caractérisés comme anti déterminants

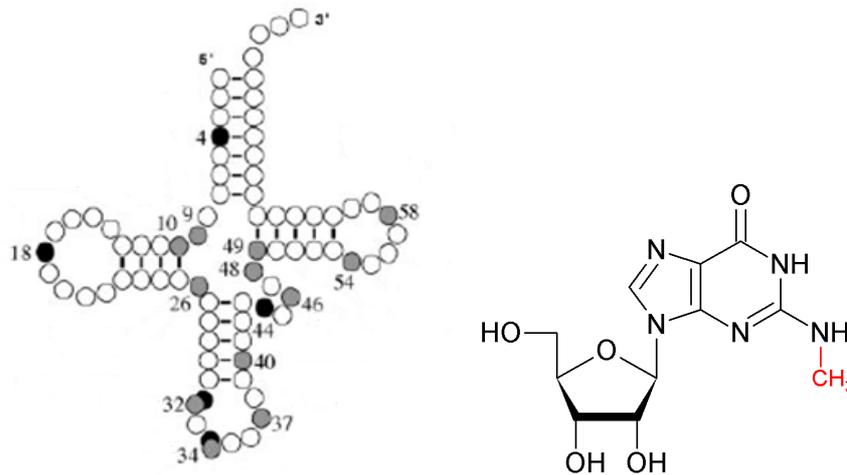


Figure 46 : Trm11-Trm112 modifie la guanosine 10 des ARNt en m²G (adapté d'Armengaud *et al*, 2004).

A gauche, structure en feuille de trèfle d'un ARNt ; A droite, représentation chimique de m²G.

Ces enzymes catalysent une réaction d'estérification entre la fonction acide carboxylique de l'acide aminé et le groupement hydroxyl en 2' ou 3' du ribose de l'A76 de l'ARNt (figure 6) (Sprinzl & Cramer, 1975). Cette réaction peut se faire à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Lund & Dahlberg, 1998)

Malgré le fait que la majorité des ARNt transcrits *in vitro* soient reconnus par les aa-RS et amino-acylés efficacement, les modifications des ARNt jouent un rôle important dans ce processus (Samuelsson *et al*, 1988). En effet, dix nucléosides modifiés ont été caractérisés comme déterminants de l'identité des ARNt vis-à-vis des aa-RS (figure 45). Ces modifications se situent sur la tige-boucle de l'anticodon et permettent une augmentation de l'efficacité de l'acétylation (Giegé & Lapointe, 2009; El Yacoubi *et al*, 2012). De plus, certains résidus modifiés jouent le rôle d'anti-déterminants ou détrompeurs comme par exemple la m¹G₃₇ de l'ARNt^{Asp}_{GUC} de levure qui permet d'éviter que celui-ci soit reconnu par l'Arg-RS.

Une fois l'étape d'acétylation accomplie, les ARNt peuvent être recrutés immédiatement par le ribosome pour la traduction ou bien stockés dans le noyau pour être ré-exportés plus tard en fonction de la disponibilité en nutriments (Hopper, 2013).

En plus de son rôle dans la terminaison de la traduction et dans la biogenèse des ribosomes, Trm112 intervient également dans la modification des ARNt en interagissant avec Trm11 et Trm9. Ces deux complexes feront l'objet des deux paragraphes suivants.

5.2. TRM11-TRM112 METHYLE LA GUANOSINE EN POSITION 10 DES ARNt

5.2.1. Formation de m²G₁₀

La méthylation du groupement amine exocyclique (N²) de la guanosine (m²G) a été principalement identifiée aux positions 10, 26 et 27 mais peut être également présente aux positions 6, 7, 9, et 18 des ARNt (Jühling *et al*, 2009).

Grâce aux criblages génétiques et aux analyses bioinformatiques, la protéine Trm11 a été identifiée comme étant responsable de la méthylation en position 10 (m²G₁₀) de certains ARNt (figure 46) (Armengaudet *et al*, 2004). Cette modification est présente chez les eucaryotes et chez les archées mais pas chez les bactéries.

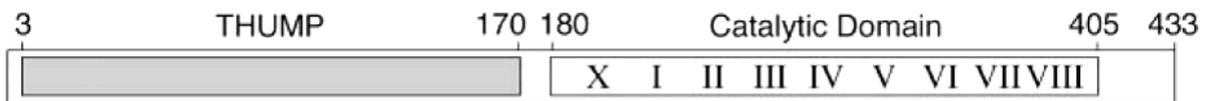


Figure 47 : Trm11 est composé de deux domaines (d'après Purushothaman *et al*, 2005).

Le nucléotide modifié est localisé à la base de la tige-boucle D. Chez les eucaryotes, Trm11 est en complexe avec Trm112 alors que chez les archées Trm11 agit seule et catalyse également la formation de la N²,N²-diméthylguanosine en position 10 (m²₂G₁₀). Chez la levure, la m²G₁₀ est présente sur 16 des 37 ARNt (Purushothaman *et al*, 2005).

5.2.2. Trm11 d'un point de vue structural

Les analyses bioinformatiques prédisent la présence de deux domaines pour Trm11 (figure 47). Le domaine caractéristique des MTases de classe I dépendantes de la SAM se situe en C-terminal et la partie N-terminale se replierait en un domaine de liaison à l'ARN dit « THUMP » (thio-uridine synthases, RNA MTases, and pseudo-uridine synthases). Un alignement de séquences des domaines MTases met en évidence la signature DPPY conservée et caractéristique, comme la signature NPPY de Mtq2, des MTases ayant pour cible un atome d'azote conjugué à un système plan. Le résidu aspartate de cette séquence est prédit pour coordonner le groupement amine à méthyler alors que le résidu tyrosine stabiliserait la base cible via un empilement des cycles aromatiques (Armengaud *et al*, 2004).

Chez les eucaryotes, Trm112 est nécessaire pour l'activité de Trm11. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation mettent en évidence l'interaction des deux protéines *in vivo* (Purushothaman *et al*, 2005; Towns & Begley, 2012).

Chez l'archée *Pyrococcus abyssi*, Trm11 n'est pas en complexe avec Trm112, elle a un poids moléculaire de 39 kDa et catalyse la formation de m²₂G₁₀. Cette double méthylation, observée uniquement chez les archées, se réalise en deux étapes avec la m²G comme intermédiaire (Armengaud *et al*, 2004).

5.2.3. Rôle de cette modification

Chez la levure, la délétion du gène *TRM11* n'a aucune conséquence sur la croissance. Par contre, la double délétion de *TRM1* et *TRM11* entraîne un défaut de croissance : le temps de génération en milieu riche passe de 90 min pour la souche sauvage à 140min pour la souche doublement délétée.

Trm1 est une MTase dépendante de la SAM qui catalyse la formation de la m²₂G en position 26 de nombreux ARNt chez les archées et chez les eucaryotes.

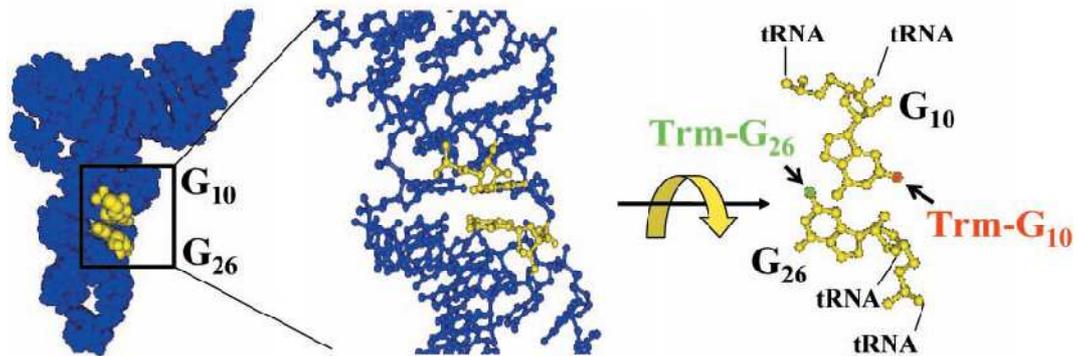


Figure 48 : Localisation des guanosines 10 et 26 sur la structure tridimensionnelle de l'ARNt de levure (d'après Armengaud *et al*, 2004).

En considérant la structure tridimensionnelle des ARNt, les guanosines 10 et 26 sont très proches et s'empilent (figure 48). Sachant que ces deux modifications sont rencontrées le plus souvent sur les mêmes molécules d'ARNt (Purushothaman *et al*, 2005; Urbonavicius *et al*, 2006), il pourrait s'agir d'un effet synergique des méthylations en G10 et G26 sur l'ARNt.

L'absence conjointe des modifications m^2G_{10} et m^2G_{26} entraîne la diminution de la méthylation de la guanosine34 de l'ARNt. Sachant que cette dernière modification, catalysée par l'enzyme Trm7, dépend fortement du repliement correct de l'ARNt substrat : les deux modifications en G10 et G26 seraient donc importantes pour ce bon repliement et participeraient à la stabilisation de leur structure tridimensionnelle (Purushothaman *et al*, 2005).

Par ailleurs, la présence chez les archées de la double méthylation ($m^2_2G_{10}$) pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de la structure des ARNt en empêchant un appariement de type Watson-Crick et en évitant ainsi certains repliement alternatifs. En effet, la m^2G_{10} peut s'apparier avec une cytidine ou une uridine alors que la $m^2_2G_{10}$ s'apparie uniquement avec une uridine. Par conséquent, la présence d'une uridine en position 25 est un des éléments discriminants pour l'action de Trm11 d'archées. La double méthylation chez les archées pourrait permettre d'éviter la formation de structures alternatives et non optimales de certains ARNt (Urbonavicius *et al*, 2006).

Enfin l'omniprésence et la conservation de la modification m^2G_{10} chez les archées et chez les eucaryotes traduisent son importance dans la structuration des ARNt.

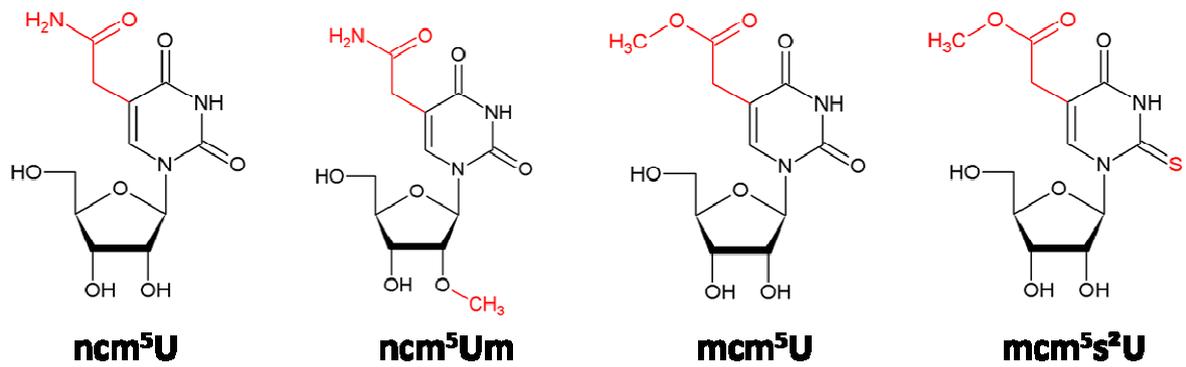


Figure 49 : Uridines modifiées de type xcm⁵U en position 34

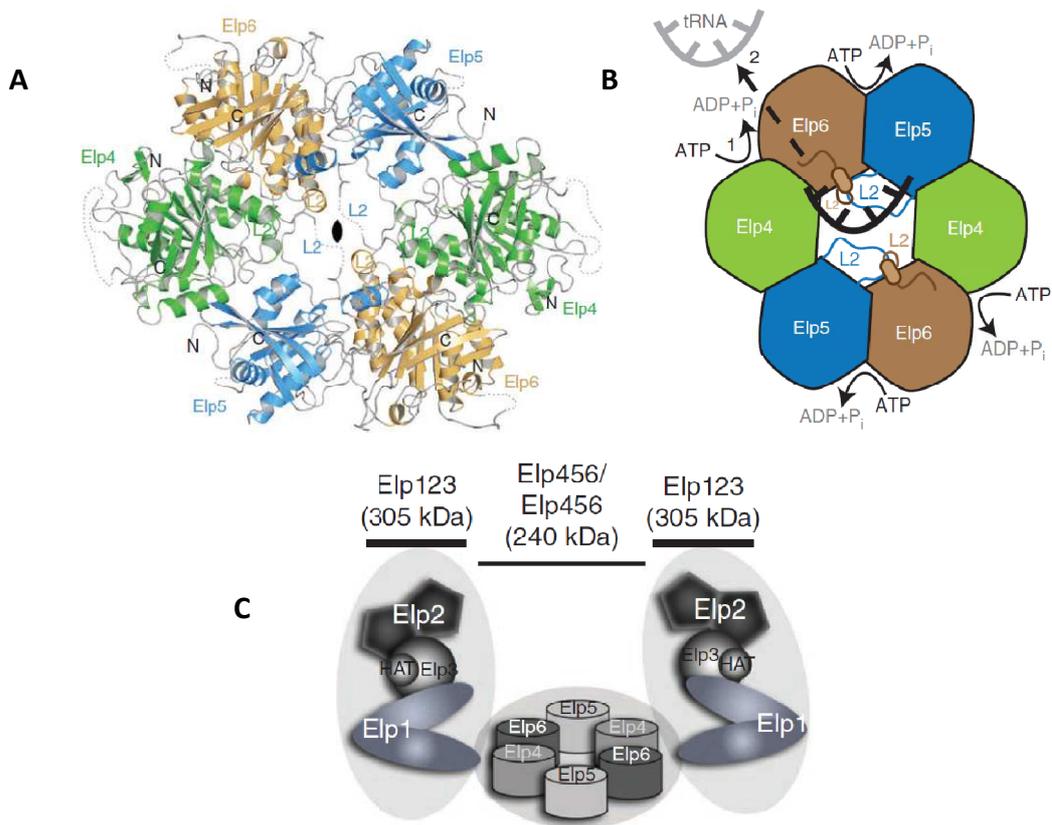


Figure 50 : Le complexe élongateur (d'après Glatt *et al*, 2012).

A : Structure cristallographique du sous-complexe Elp4-5-6.

B : Schématisation du mécanisme de liaison du sous complexe Elp4-5-6 avec l'ARNt.

C : Modèle du complexe élongateur.

5.3. TRM9-TRM112 MODIFIE L'URIDINE 34 DE CERTAINS ARNt

La position 34, base « wobble » de l'anticodon est la cible de nombreuses modifications. Chez la levure, 13 des 42 ARNt cytoplasmiques possèdent une uridine à cette position et 11 présentent une modification dérivée de la 5-carboxyméthyluridine (xcm⁵U) sur la partie uracile. Les différents dérivés identifiés sont la ncm⁵U, la ncm⁵Um, la mcm⁵U et la mcm⁵s²U (figure 49) (Johansson *et al*, 2008). Le complexe Trm9-Trm112 est impliqué dans la formation des deux dernières modifications.

5.3.1. La formation de la mcm⁵(s²)U₃₄

Chez *S. cerevisiae*, la modification complexe mcm⁵(s²)U₃₄ requiert la présence d'au moins 15 protéines dont la majorité prend part à l'ajout du groupement carboxyméthyle en position 5 de l'uracile (Huang *et al*, 2008).

La première étape de la réaction consiste en la formation de la cm⁵U et fait intervenir les produits de 13 gènes : *ELP1-6*, *KTI11-14*, *SIT4*, *SAP185* et *SAP190*. L'enzyme responsable de la catalyse est le complexe Elongateur qui se compose de 6 sous-unités (Elp1 à 6), chacune étant indispensable à l'activité et à l'intégrité du complexe (Frohloff *et al*, 2001; Huang *et al*, 2005). Des analyses de chromatographie d'exclusion de taille sur le complexe de levure ont permis d'estimer le poids moléculaire du complexe qui est d'environ 850 kDa. Ceci suggère que le complexe Elongateur est un dodécamère contenant deux copies de chaque sous unité (Glatt *et al*, 2012). Ce complexe se décompose en deux sous complexes : Elp1-2-3 constitue le complexe cœur et contient la sous-unité Elp3 qui possède l'activité catalytique acétyltransférase et Elp4-5-6 forme un anneau hétéro-hexamérique qui adopte un repliement de type RecA et possède une activité ATPase qui permet de réguler la liaison de l'ARNt au complexe Elongateur (figure 50A-B) (Glatt *et al*, 2012). Basé sur la symétrie de la structure cristallographique du sous-complexe Elp4-5-6, un modèle d'association des deux sous-complexes a été proposé, l'hexamère Elp4-5-6 ponterait sur sa périphérie deux sous-complexes Elp1-2-3 (figure 50C) (Glatt *et al*, 2012).

Les autres protéines impliquées semblent intervenir dans la régulation de l'activité du complexe Elongateur (Fichtner *et al*, 2002; Fichtner & Schaffrath, 2002; Huang *et al*, 2008).

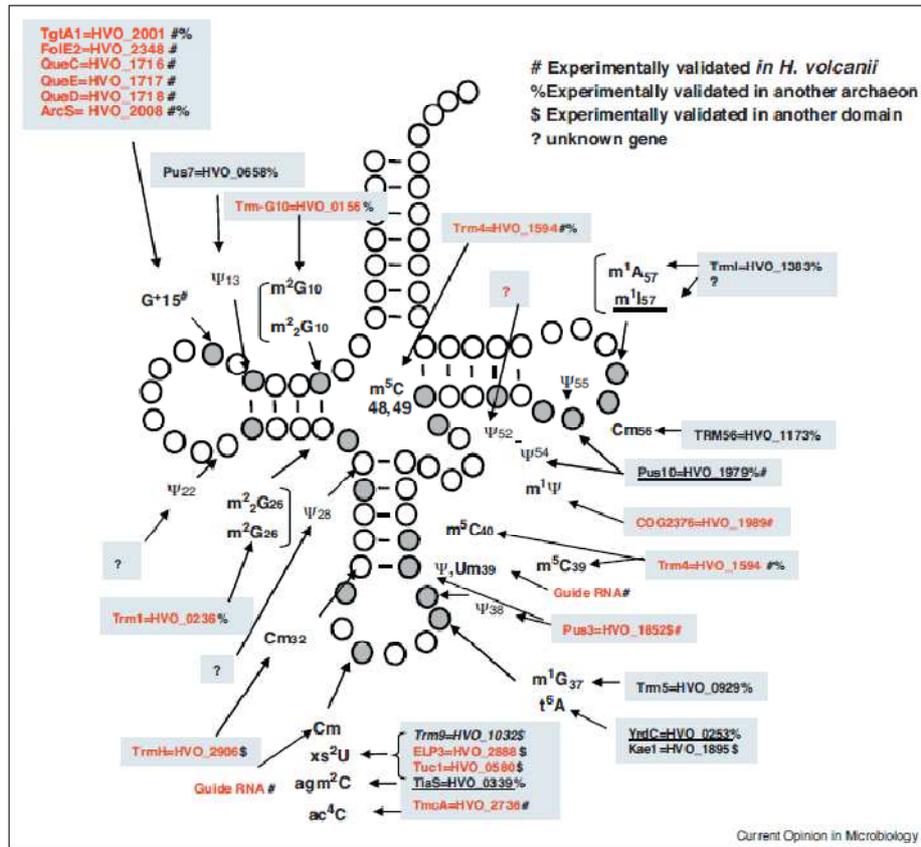


Figure 51 : Gènes de *Haloferox volcanii* proposés pour coder pour des enzymes de modification des ARNt (d'après Phillips & de Crécy-Lagard, 2011).

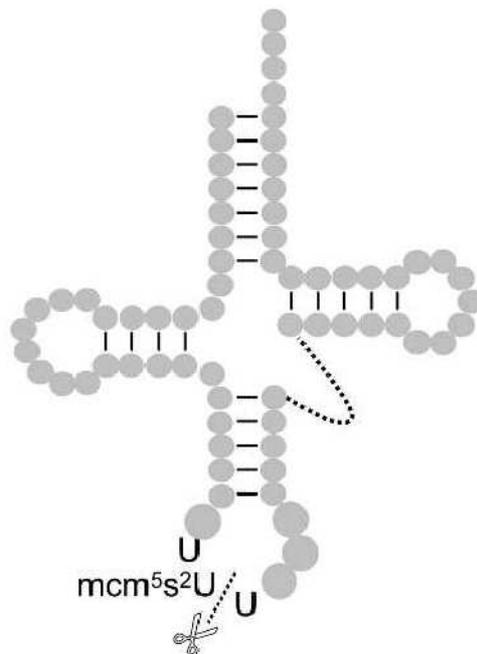


Figure 52 : La toxine zymocine sécrétée par *K. lactis* clive les ARNt possédant une mcm⁵s²U34 modifiée entre les positions 34 et 35 (d'après Lu *et al*, 2005).

La méthyl-estérification de la m^5U permet la formation de la mcm^5U , cette réaction est catalysée par le complexe Trm9-Trm112 et concerne 5 ARNt chez la levure : $ARNt^{Gln}_{mcm^5s^2UUG}$, $ARNt^{Lys}_{mcm^5s^2UUU}$, $ARNt^{Glu}_{mcm^5s^2UUC}$, $ARNt^{Arg}_{mcm^5UCU}$, $ARNt^{Gly}_{mcm^5UCC}$ (Kalhor & Clarke, 2003; Johansson *et al*, 2008).

La présence de la mcm^5U est requise pour une thiolation efficace (Leidel *et al*, 2009; Noma *et al*, 2009). La formation de la 2-thiouridine (s^2U) sur les ARNt cytosoliques eucaryotes dépend de la voie de synthèse Ncs6/Urm1. Celle-ci se compose d'au moins 6 protéines : une cystéine désulfurase (Nfs1), un complexe de modification (Ncs6/Ncs2), deux porteurs de sulfure (Urm1 et Tum1) et une enzyme activatrice de Urm1 (Urm4) (Nakai *et al*, 2007; Shigi, 2014).

Chez les archées, et particulièrement chez les espèces halophiles telles que *Haloferax volcanii*, l'uridine en position 34 possède également des modifications du type mcm^5s^2U . De plus, l'analyse des génomes a permis d'identifier des gènes pouvant coder pour les orthologues de Trm9 et Elp3 (figure 51) (Grosjean *et al*, 2008; Phillips & de Crécy-Lagard, 2011).

5.3.2. Un outil : la zymocine

De nombreux microorganismes produisent des molécules toxiques afin de prendre l'avantage sur d'autres microorganismes avec lesquels ils sont en compétition. La levure *Kluyveromyces lactis* sécrète une toxine hétérotrimérique, la zymocine, qui a pour cible d'autres levures telles que *S. cerevisiae*. Chez les levures sensibles, la zymocine entraîne l'arrêt irréversible en phase G1 du cycle cellulaire (Gunge *et al*, 1981; Schaffrath & Meinhardt, 2005). La zymocine se compose de trois sous-unités α , β , γ qui sont sécrétées dans le milieu extérieur. Les sous-unités α et β s'amarrent à la surface cellulaire des levures sensibles et facilitent le transfert de la sous-unité γ vers le cytoplasme (Schaffrath & Meinhardt, 2005). La cytotoxicité réside en la sous-unité γ , son expression intracellulaire mime l'action de la zymocine exogène. Il a été décrit deux classes de mutants résistants à la zymocine. Les mutants résistants de classe I ne peuvent pas lier et/ou assimiler la zymocine mais sont sensibles à l'expression endogène de toxine γ . Les mutants de classe II sont à la fois résistants à la zymocine exogène et à la toxine γ endogène (Butler *et al*, 1991). La toxine γ a pour cibles trois ARNt matures ($ARNt^{Gln}_{mcm^5s^2UUG}$, $ARNt^{Lys}_{mcm^5s^2UUU}$, $ARNt^{Glu}_{mcm^5s^2UUC}$) et catalyse le clivage en 3' de la $mcm^5s^2U_{34}$ (figure 52) (Lu *et al*, 2005). Par conséquent, la sensibilité à la zymocine s'explique par un blocage du processus de traduction et par un arrêt de la division cellulaire (Jablonowski & Schaffrath, 2007).

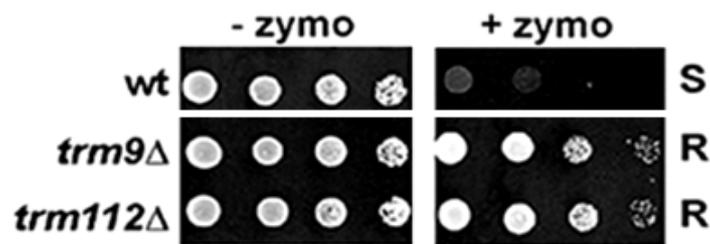


Figure 53 : La délétion des gènes TRM112 ou TRM9 chez *S. cerevisiae* entraîne un phénotype de résistance à la zymocine (d'après Studte *et al*, 2008).

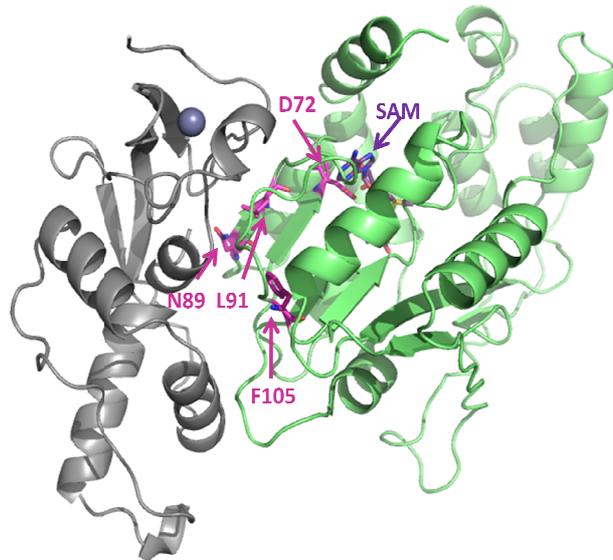


Figure 54 : Modèle généré *in silico* du complexe ScTrm9-Trm112 (d'après Liger *et al*, 2011).

Le modèle de ScTrm9 est coloré en vert. ScTrm112 dont la structure cristallographique est connue est en gris. La SAM a été modélisée en violet. Les résidus mutés pour l'étude sont en bâtonnets roses.

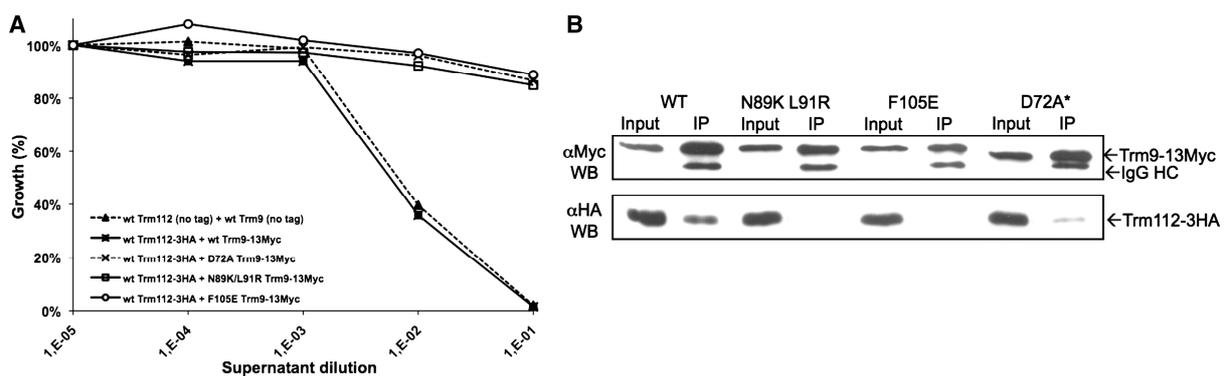


Figure 55 : Les mutants de ScTrm9 entraînant la résistance à la zymocine sont affectés dans l'interaction avec Trm112 (d'après Liger *et al*, 2011).

A : Analyse de l'effet dose de la zymocine sur des souches de *S. cerevisiae*.

B : Effet des mutations *in vivo* sur l'interaction avec Trm112. Analyse de co-immunoprécipitation par western blot.

Dans le cadre de l'étude du complexe Trm9-Trm112, la zymocine est un outil permettant d'analyser l'activité de la MTase *in vivo* chez *S. cerevisiae*. En effet, si Trm9-Trm112 est actif, les trois ARNt ciblés par la zymocine sont entièrement modifiés et efficacement clivés par la toxine γ , la traduction est alors bloquée et cela provoque un phénotype de sensibilité à la zymocine. Par contre, si Trm9-Trm112 est inactif, les ARNt ne sont plus que partiellement modifiés et ne sont alors plus substrats de la toxine γ , il n'y a donc pas de clivage des ARNt, ni de blocage de la traduction : ceci se traduit par un phénotype de résistance à la zymocine (figure 53) (Lu *et al*, 2005; Studte *et al*, 2008).

5.3.3. Le complexe Trm9-Trm112 d'un point de vue structural

Les études de purification de complexes protéiques de levure à grande échelle ont permis de mettre en évidence l'interaction de Trm9 avec Trm112 (Gavin *et al*, 2002). En plus de son interaction, Trm112 est nécessaire à l'activité de Trm9, MTase de classe I dépendante de la SAM (Mazauric *et al*, 2010). L'analyse de la structure cristallographique de Mtq2-Trm112 a permis de générer un modèle du complexe Trm9-Trm112 et d'étudier certains mutants chez *S. cerevisiae* en utilisant la zymocine (Liger *et al*, 2011). Ce modèle est basé sur l'hypothèse d'une interaction similaire de Trm112 avec ses différents partenaires (figure 54). D'après la superposition de la structure Mtq2-Trm112 et du modèle Trm9-Trm112, les souches de levure exprimant les mutants N89K/L91R et F105E de Trm9 ont été construites afin de valider l'hypothèse d'interaction. En effet, dans le modèle, les résidus 89, 91 et 105 sont situés à l'interface du complexe. Une autre souche mutante a également été étudiée, il s'agit du mutant Trm9D72A visant le résidu aspartate catalytique impliqué dans la liaison de la SAM. Ces trois souches mutantes présentent un phénotype de résistance à la zymocine, ce qui traduit une inactivation du complexe Trm9-Trm112 (figure 55A). Cependant, l'analyse des niveaux d'expression *in vivo* montre que les 3 complexes mutés s'expriment comme le complexe non muté. Afin d'analyser la capacité pour les mutants de Trm9 d'interagir avec Trm112, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées. Les mutants Trm9 N89K/L91R et Trm9 F105E n'interagissent plus avec Trm112 (figure 55B). Ceci confirme l'implication de ces résidus au niveau de l'interface avec Trm112 et renforce l'hypothèse d'une interaction similaire de Trm112 avec ses partenaires. Trm9D72A co-précipite avec Trm112 mais l'interaction entre les deux partenaires est plus faible que celle observée pour le complexe sauvage. Ceci suggère que la fixation de la SAM par Trm9 pourrait influencer l'interaction entre Trm9 et Trm112 (Liger *et al*, 2011).

5.3.4. Rôle de la modification

5.3.4.1. D'un point de vue moléculaire

Une uridine non modifiée en position 34 permet de reconnaître les quatre bases de l'ARN (U, C, A et G) alors que l'uridine 34 modifiée en $mcm^5(s^2)U$ ne s'apparie plus qu'avec A ou G (Yarian *et al*, 2002). Les modifications mcm^5 et ncm^5 de U34 améliorent le décodage des codons se terminant par G alors que mcm^5s^2U améliore la lecture des codons se terminant par A ou G (Johansson *et al*, 2008). Par conséquent, ces modifications jouent un rôle dans la traduction en modulant l'appariement codon-anticodon. Trm9 permettrait d'augmenter la spécificité de décodage de ces codons lors de la traduction (Begley *et al*, 2007).

5.3.4.2. Trm9 et les stress génotoxiques

Les souches de *S. cerevisiae* $\Delta trm9$ présentent peu ou pas de défaut de croissance à 30°C (Mazauric *et al*, 2010). Toutefois, à températures élevées, ces souches sont hypersensibles à la paromomycine, molécule inhibitrice de la traduction (Kalhor & Clarke, 2003). De plus, des criblages haut-débit sur des banques de souches de *S. cerevisiae* soumises à des agents alkylants ont mis en évidence des protéines participant aux réponses aux stress génotoxiques. Parmi celles-ci, Trm9 a été identifié comme participant à l'intensification de la réponse aux agents de dommage à l'ADN. En effet, comparée à une souche sauvage, une souche mutante $\Delta trm9$ est plus sensible au traitement au MéthylMéthane Sulphonate (MMS), à l'Hydroxyurée (HU) ou à l'irradiation aux rayons γ (Begley *et al*, 2002, 2004; Bennett *et al*, 2001).

5.3.4.3. Réparation ADN et RNR

❖ Les RNR

Les RiboNucléotides Réductases (RNR), sont des enzymes qui réduisent les ribonucléotides diphosphates (NDP) ADP, CDP, GDP, UDP, en désoxyribonucléotides diphosphates (dNDP). Ceux-ci sont ensuite phosphorylés afin de produire les dNTP correspondants. Cette réaction est essentielle pour la réplication de l'ADN mais également pour sa réparation (Elledge & Davis, 1990). Les RNR se composent de deux sous-unités dimériques. La grande sous-unité R1 contient le site catalytique et les sites effecteurs, la petite sous-unité R2 possède un site de liaison au fer III, elle génère et stabilise un radical tyrosyle impliqué dans l'initiation de la catalyse enzymatique (Eklund *et al*, 2001).

Etant donné l'importance de l'activité des RNR, une régulation fine de ces enzymes est cruciale afin de maintenir un niveau correct des dNTP, de minimiser ainsi le taux de mutations et d'éviter une instabilité du génome. Cette régulation se fait via de nombreux mécanismes, tels que le contrôle allostérique, l'expression des gènes, la séquestration des différentes sous-unités, la présence de protéines inhibitrices... Chez *S. cerevisiae*, R1 est majoritairement sous forme d'un homodimère formé par Rnr1 ou Rnr3 et R2 est un hétérodimère composé de Rnr2 et Rnr4. Dans des conditions normales de croissance, le niveau de Rnr1 varie au cours du cycle cellulaire il est plus important en fin de phase G1 et en phase S alors que le niveau de Rnr2-3-4 varie peu. La sous-unité R1 composée de Rnr1 est toujours cytoplasmique alors que R2 est nucléaire en phases G1 et G2/M puis devient cytoplasmique en phase S. Dans des conditions de stress génotoxiques tels qu'en présence de MMS ou de HU, le niveau de Rnr3 augmente, la sous-unité R1 reste cytoplasmique et R2 passe du noyau au cytoplasme comme ce qui est observé en phase S en absence de stress. Le stress génotoxique qui induit des dommages à l'ADN entraîne une réponse au stress provoquant une augmentation de la production des dNTP dans le cytoplasme de la levure ce qui permet d'envisager la réparation de l'ADN endommagé (Guarino *et al*, 2014; Yao *et al*, 2003).

❖ Implication de Trm9 dans la régulation des RNR

La méthylation catalysée par Trm9 améliore la lecture de codons spécifiques tels que AGA et des études *in silico* ont montré qu'un certain nombre de gènes contient un pourcentage important et significatif de codons AGA. Ainsi, il a été mis en évidence que Trm9 augmente spécifiquement la traduction d'au moins trois transcrits codant pour le facteur de traduction Yef3 et pour Rnr1 et Rnr3, et ceci sans affecter le niveau de transcription des gènes correspondants (Begley *et al*, 2007).

Le phénotype de sensibilité des souches mutantes $\Delta trm9$ en présence de stress génotoxique s'explique par l'implication de Trm9 dans la régulation des RNR. En effet, dans une souche $\Delta trm9$, le niveau de protéine Rnr1 est réduit tout au long du cycle cellulaire et particulièrement en phase S. De plus, dans ces souches après traitement par des agents endommageant l'ADN, la transition vers la phase S est retardée, ce qui s'explique par une diminution des niveaux de protéines Rnr1 et Rnr3 (Patil *et al*, 2012). Dans des conditions normales de croissance, Trm9 n'est pas indispensable à la viabilité cellulaire mais le devient dans des conditions de stress de par sa faculté à augmenter la traduction de Rnr1 et Rnr3 nécessaires à la réparation de l'ADN.

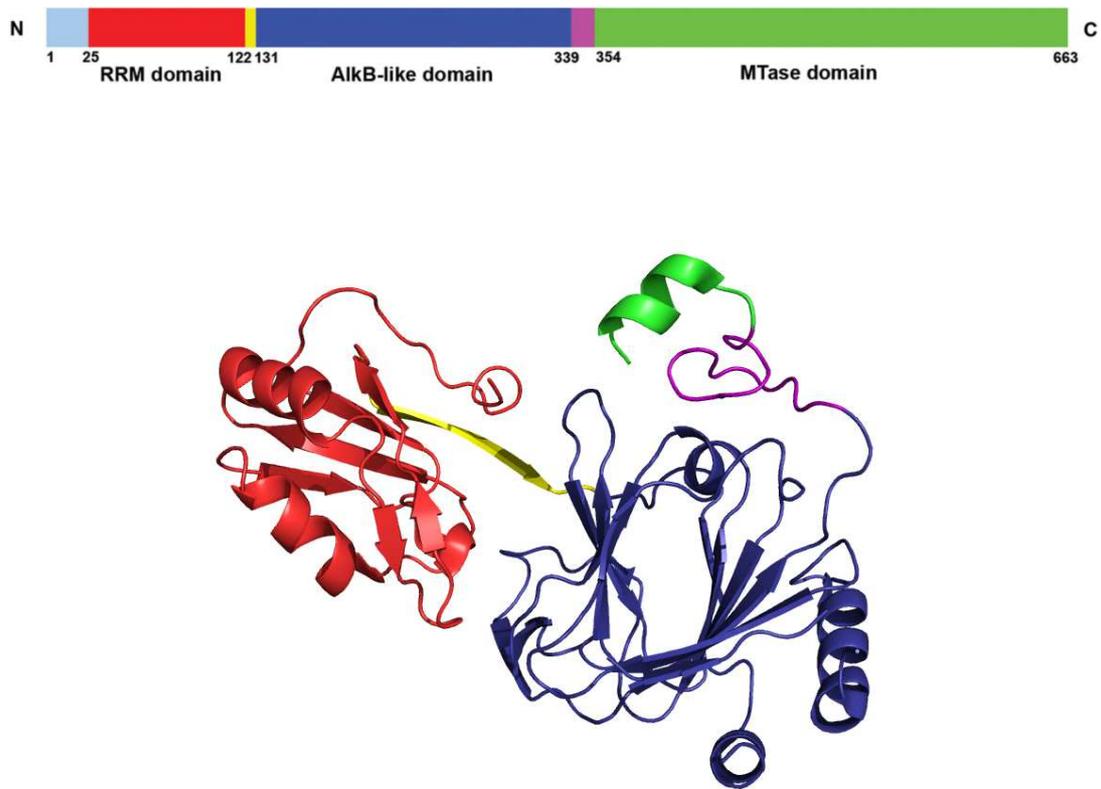


Figure 56 : ABH8 possède trois domaines distincts (adapté de Pastore *et al*, 2012).

La structure cristallographique des domaines RRM et AlkB-like est présentée avec les mêmes codes couleurs que sur le schéma (code pdb 3THP).

5.3.5. Deux orthologues humains impliqués dans plusieurs cancers

Chez l'homme, l'enzyme qui joue le rôle de Trm9 est la protéine ABH8, celle-ci forme un complexe fonctionnel avec l'orthologue humain de Trm112 (Songe-Moller *et al*, 2010). Structuralement, ABH8 se compose de trois domaines : un domaine MTase caractéristique des MTases de classe I dépendantes de la SAM, un domaine dioxygénase comprenant des sites de liaison au fer et au 2-oxoglutarate ainsi qu'un domaine de liaison à l'ARN (figure 56) (Songe-Moller *et al*, 2010; Pastore *et al*, 2012).

La déplétion d'ABH8 dans la cellule humaine diminue le niveau endogène de mcm⁵U et augmente sa sensibilité aux agents causant des dommages à l'ADN tels que le MMS ou la bléomycine. De plus, la présence de ces agents induit l'expression d'ABH8. Ces observations mettent en évidence l'implication de ABH8 et de la modification des ARNt dans les mécanismes de régulation de réponse à des dommages à l'ADN chez l'homme (Fu *et al*, 2010).

Par ailleurs, des analyses immuno-cytochimiques ont montré qu'ABH8 est très surexprimée dans de nombreux cancers chez l'homme dont celui de la vessie. Des études, utilisant des petits ARN interférents ont permis d'éteindre l'expression d'ABH8 dans des tumeurs urothéliales *in vivo*. Ceci a eu pour conséquence la suppression significative de l'invasion, de l'angiogenèse et de la croissance des cellules cancéreuses (Shimada *et al*, 2009).

Récemment, un nouvel orthologue de Trm9 de levure a été identifié chez l'Homme et chez la souris et présenterait un domaine MTase de classe I dépendante de la SAM. Des études ont montré que cet orthologue humain, hTRM9L, est un régulateur négatif de la croissance tumorale et que la transcription du gène codant pour hTRM9L est diminuée dans de nombreux cancers tels que les cancers du poumon, de la vessie, du col de l'utérus, du colon, et des testicules. L'expression de hTRM9L ainsi que son activité MTase entraînent une diminution importante de la croissance des cellules tumorales *in vivo*. Par ailleurs, l'expression de hTRM9L dans des cellules après traitement à la paromomycine entraîne une augmentation de mcm⁵U, ce qui relie hTRM9L à une possible activité de méthylation des ARNt. Enfin, les tumeurs n'exprimant pas hTRM9L sont hypersensibles aux antibiotiques de type aminoglycoside alors que les cellules exprimant hTRM9L y sont résistantes. L'absence de hTRM9L dans certaines tumeurs pourrait ainsi être exploitée pour cibler les cellules cancéreuses avec ce type d'antibiotiques (Begley *et al*, 2013).

Objectifs de la thèse

OBJECTIFS DE LA THESE

Le processus de la traduction fait intervenir de nombreux acteurs : ribosome, ARNm, ARNt et protéines. L'expression optimale et correcte des protéines nécessite entre autre une régulation très précise de ces acteurs. La traduction des ARNm en protéines se décompose en plusieurs étapes : initiation, élongation, terminaison de la traduction et recyclage du ribosome. Trm112 est une petite protéine qui interagit et est nécessaire à l'activation de quatre MTases : Mtq2, Bud23, Trm11 et Trm9. Les complexes binaires formés entre Trm112 et chacune des 4 MTases sont impliqués dans différentes étapes de la traduction :

- ❖ Le complexe Mtq2-Trm112 méthyle le facteur de terminaison de la traduction eRF1 sur la chaîne latérale de la glutamine du motif GGQ universellement conservé.
- ❖ Le complexe Bud23-Trm112 méthyle la guanosine en position 1575 de l'ARNr 18S. Ce complexe est nécessaire pour la maturation de l'ARNr 18S de la petite sous-unité du ribosome chez la levure mais aussi chez l'Homme.
- ❖ Le complexe Trm11-Trm112 méthyle la guanosine en position 10 de nombreux ARNt chez la levure et participerait ainsi à la stabilité des ARNt.
- ❖ Le complexe Trm9-Trm112 catalyse la méthylation de l'uridine en position 34 de la boucle anticodon de certains ARNt. Cette méthylation permet une fidélité de lecture de codons spécifiques particulièrement présents dans les gènes codant pour les protéines impliquées dans la réponse aux stress génotoxiques (*RNR1*, *RNR3*...).

Malgré leur faible identité de séquences, ces 4 MTases adopteraient le même repliement tridimensionnel et seraient en compétition pour interagir avec Trm112. Celle-ci semble donc être un acteur central impliqué dans les différentes étapes de la traduction.

A mon arrivée au laboratoire, la structure cristallographique du complexe Mtq2-Trm112 lié à la SAM avait été résolue, révélant la manière dont Trm112 interagit, active et stabilise Mtq2. En se basant sur la structure du complexe Mtq2-Trm112, le complexe Trm9-Trm112 avait été modélisé. L'étude de mutants de Trm9 prédits pour se situer à l'interface avec Trm112 avait renforcé l'hypothèse que Trm112 interagirait de manière similaire avec les quatre MTases et agirait en tant que plateforme d'activation.

Au départ, l'objectif de mon projet de thèse était d'étudier par des approches génétiques, structurales et biochimiques les complexes Trm9-Trm112 et Trm11-Trm112 et les complexes qu'ils forment avec leurs substrats, ainsi que de comparer les modes d'interactions entre Trm112 et ces 4 MTases partenaires.

A la vue des premiers résultats obtenus, la majeure partie de mon projet a finalement visé l'étude précise du complexe Trm9-Trm112 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc).

Le but de ce travail était de résoudre la structure tridimensionnelle du complexe et d'en cartographier le site actif à l'aide d'approches *in vitro* (tests enzymatiques, tests de liaison aux substrats) et *in vivo* (phénotype de résistance à la zymocine, co-immunoprécipitation). L'analyse de l'effet des différentes mutations avait pour but de discriminer les mutants catalytiques ou du site de fixation de la SAM et les mutants empêchant la formation du complexe Trm9-Trm112 et ainsi de proposer le rôle des résidus dans le mécanisme enzymatique.

La résolution de la structure cristallographique de Trm9-Trm112 de la levure *Yarrowia lipolytica* (Yl) m'a amené à comparer ce complexe à celui de Sc. YlTrm9 possède 59% d'identité de séquence avec ScTrm9 et dans le but d'étudier l'interaction de ScTrm112 avec YlTrm9 une analyse de complémentation a été réalisée *in vivo* chez Sc.

Par ailleurs, il a été montré que la souche de Sc délétée pour le gène *TRM9* présente un phénotype de croissance ralentie en présence de certaines drogues endommageant l'ADN. L'étude de Trm9-Trm112 visait également à évaluer les souches mutantes pour leur comportement vis-à-vis de ces drogues.

Une deuxième partie de mon travail de thèse s'est portée sur l'analyse de l'interaction de Trm112 avec ses partenaires qui partagent moins de 20% d'identité de séquence. Dans le but de comprendre le mécanisme d'action de Trm112 et la régulation de cette plateforme d'activation, deux aspects ont été étudiés au cours de ma thèse.

Dans ce contexte, l'analyse structurale et fonctionnelle du complexe Bud23-Trm112 a été mise en œuvre afin de comparer les modes d'interaction entre les différents complexes. L'étude fonctionnelle de ce complexe a été réalisée par nos collaborateurs (Valérie Heurgué-Hammard et Denis Lafontaine).

Enfin, la dernière partie de mon travail de thèse a consisté à étudier la présence de Trm112 chez les Archaea, ceci à travers une analyse biochimique du complexe Trm9-Trm112 d'*Haloferax volcanii* et une étude des souches de *Haloferax volcanii* délétées de certains gènes codant pour les possibles MTases du réseau d'interaction de Trm112.

Résultats & Discussion



Figure 57 : Alignement des séquences de ScTrm9 et YlTrm9.

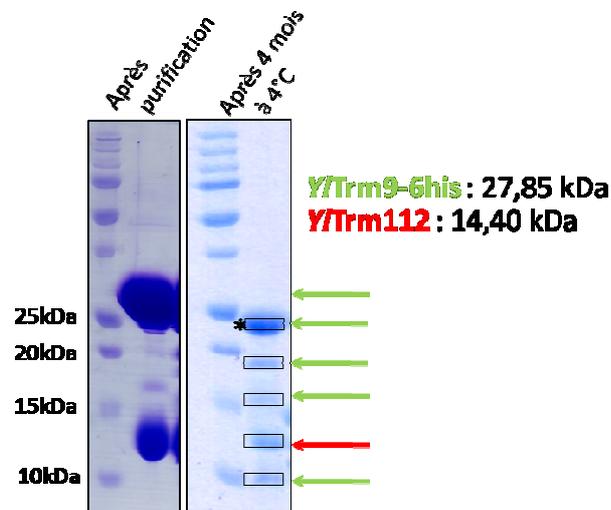


Figure 58 : Analyse SDS-PAGE de la dégradation du complexe YlTrm9-Trm112

Les bandes encadrées ont été analysées en spectrométrie de masse, les flèches vertes et rouges indiquent les bandes correspondant à YlTrm9 et à YlTrm112, respectivement. La bande majoritaire est marquée d'une étoile (*).

1^{re} partie : Etude structurale et fonctionnelle du complexe Trm9-Trm112 de levure

Chez les eucaryotes en général et chez la levure en particulier, le complexe Trm9-Trm112 possède une activité MTase et catalyse la modification de la $\text{cm}^5\text{U34}$ de certains ARNt en $\text{mcm}^5\text{U34}$. Afin de cartographier le site actif de ce complexe et d'analyser l'interaction entre Trm112 et Trm9, une partie de mon travail de thèse a consisté à résoudre la structure cristallographique de ce complexe. Parallèlement à cette étude structurale, la construction de souches de *Saccharomyces cerevisiae* a permis d'étudier différents mutants de Trm9 *in vivo*. Enfin, une analyse fonctionnelle de plusieurs complexes mutants de Trm9-Trm112 a été réalisée *in vitro*.

1. Vers la structure du complexe Trm9-Trm112 de *Yarrowia lipolytica*

Avant le début de ma thèse, les complexes Trm9-Trm112 de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*), de *Schizosaccharomyces pombe* (*Sp*), d'*Encephalitozoon cuniculi* (*Ec*) et de *Yarrowia lipolytica* (*Yl*) avaient été exprimés chez *E.coli* et purifiés. Cependant, les nombreux essais de cristallisation avaient été infructueux.

1.1. DEGRADATION DE *Yl*Trm9-Trm112 ET FORMES TRONQUEES

Le complexe Trm9-Trm112 de *Yl* présente un intérêt particulier car les protéines qui le composent ont des séquences plus courtes mais néanmoins proches des protéines du complexe de *Sc* (figure 57). En effet, *Sc*Trm9 possède 45 résidus de plus que *Yl*Trm9 mais ceux-ci sont essentiellement situés dans une région peu conservée de la protéine et prédite déstructurée. L'obtention de cristaux à partir du complexe de *Yl* devrait théoriquement être plus aisée du fait d'une structuration plus importante des protéines qui le composent. Cependant, les premiers cribles de cristallisation se sont également révélés infructueux.

1.1.1. Analyse de la protéolyse naturelle du complexe *Yl*Trm9-Trm112

A mon arrivée au laboratoire, j'ai tout d'abord analysé en SDS/PAGE la préparation purifiée du complexe *Yl*Trm9-Trm112 utilisée lors des premiers essais de cristallisation et stockée depuis plusieurs mois à 4°C (figure 58). Après stockage à 4°C, plusieurs bandes supplémentaires apparaissent sur le gel résultant vraisemblablement d'une dégradation du complexe.

```

1      MVVESVPSKE RFTATRPQDN EQQHVHEVYN QIASHFSNTR YKPWPIVEKF
51     LRDQKDHSVG VDIGCGNGKY MGVNNKVFIV GSDRSDELVK LAHDMPSRE
101    VVVCDAIDNA HPEGRFDFAI SIAVIHHFST PERRREAVRA ILNTLRPDGR
151    ALIYVWALEQ KTSRRGWHEG MDQDVMVPWV KKVDGVEEVV YRYYHLYREG
201    EITSDVEASG GKVLETGYEK DNWVWVAKRG DDWSHHHHHH
    
```

Figure 59 : Recouvrement de la séquence de YTrm9 par les peptides identifiés par spectrométrie de masse.

Résultat de l'analyse réalisée sur la bande majoritaire marquée d'une * dans la figure 58. Les peptides identifiés sont indiqués en rouge

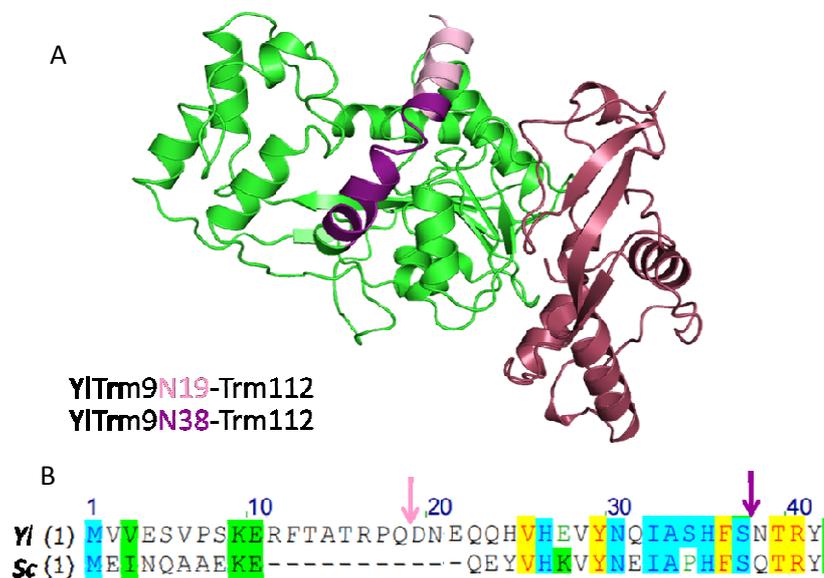


Figure 60 : Formes tronquées de YTrm9.

A : Modèle de ScTrm9-Trm112 généré à partir de la structure cristallographique du complexe EcMtg2-Trm112. ScTrm9 est en vert et ScTrm112 en pourpre, la partie N-terminale correspondant aux formes tronquées envisagées chez YI est en rose et violet.

B : Alignement de la partie N-terminale des séquences de YTrm9 et ScTrm9. Les flèches rose et violette indiquent les troncutures réalisées des 18 et 37 premiers résidus, respectivement.

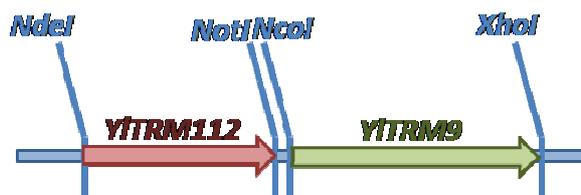


Figure 61 : Polycistron de 1142 pb composé des gènes codant pour YTrm112 et YTrm9.

Afin de déterminer le contenu protéique des nouvelles bandes, celles-ci ont été prélevées puis analysées par spectrométrie de masse. Les spectres de masse d'empreinte peptidique ont révélé une dégradation de YTrm9 dans sa partie N-terminale mais aucune dégradation pour YTrm112. L'analyse de la bande majoritaire de dégradation indique qu'aucun des 40 premiers résidus de YTrm9 n'est conservé dans le produit (figure 59). Cette région N-terminale est donc sensible à la protéolyse peut-être parce que flexible. Dans le but d'éliminer cette région supposée flexible qui pourrait empêcher la cristallisation du complexe, des formes tronquées de YTrm9 ont été générées.

1.1.2. Formes tronquées de YTrm9

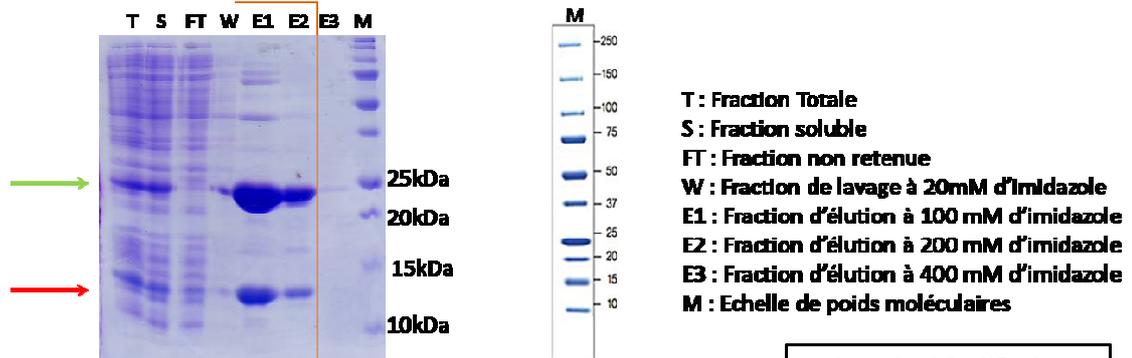
En se basant sur le modèle du complexe ScTrm9-Trm112 obtenu à partir de la structure cristallographique de EcMtq2-Trm112, la partie N-terminale de ScTrm9 se replierait en hélice α . Deux troncatures ont été envisagées : l'une éliminant les 18 premiers résidus et l'autre les 37 premiers. Les complexes correspondants obtenus par co-expression de ces variants tronqués de YTrm9 et de YTrm112 sont nommés YTrm9N19-Trm112 et YTrm9N38-Trm112 (figure 60).

1.2. EXPRESSION ET PURIFICATION DU COMPLEXE YTrm9N38-Trm112

Dans le but d'améliorer leur expression hétérologue chez *E.coli*, les séquences nucléotidiques codant pour YTrm9 entière et YTrm112 ont été optimisées puis clonées en opéron dans le vecteur pET21a (figure 61). De plus, une séquence nucléotidique codant pour une étiquette 6-Histidines a été rajoutée à l'extrémité 3' de YTRM9 pour produire une version étiquetée en C-terminal de YTrm9. Les amorces F-NcoIYTrm9N18, F-NcoIYTrm9N37 et R-XhoIYTrm9, décrites dans le tableau S6 de l'article, ont été utilisées afin d'amplifier à partir du plasmide construit plus haut les versions tronquées du gène YTRM9. Puis elles ont été clonées en remplacement du gène YTRM9 dans le polycistron.

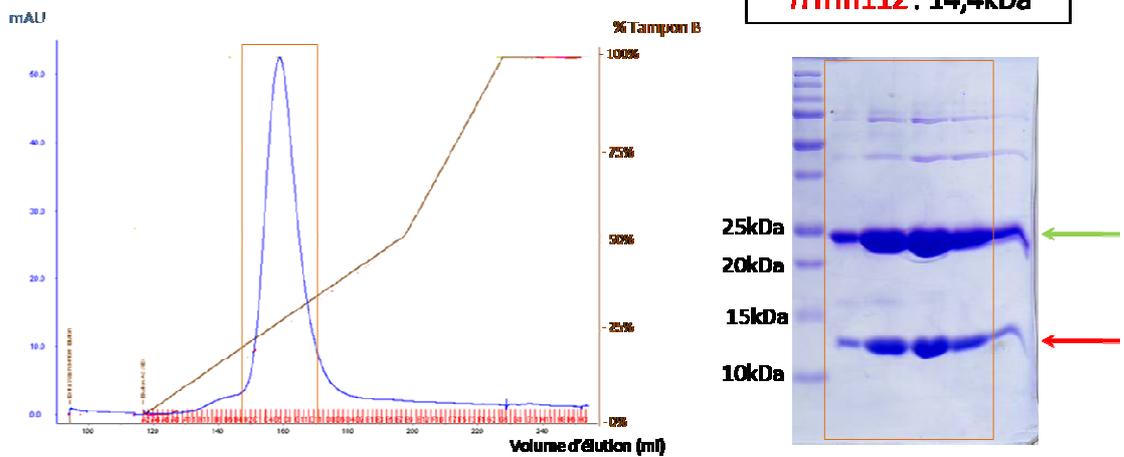
La protéine YTrm112 possède un site de fixation du zinc ; par conséquent, toutes les étapes depuis l'expression jusqu'à la cristallisation ont été réalisées en présence de 10 μ M de ZnCl₂. L'expression et la purification des complexes YTrm9N19-Trm112 et YTrm9N38-Trm112 ont été menées de manière identique et seuls les résultats obtenus pour YTrm9N38-Trm112 seront détaillés ci-après et illustrés dans la figure 62.

Purification d'affinité sur résine NINTA



Purification par chromatographie échangeuse d'anions

YTrm9N38 : 23,7kDa
YTrm112 : 14,4kDa



Purification par tamisage moléculaire

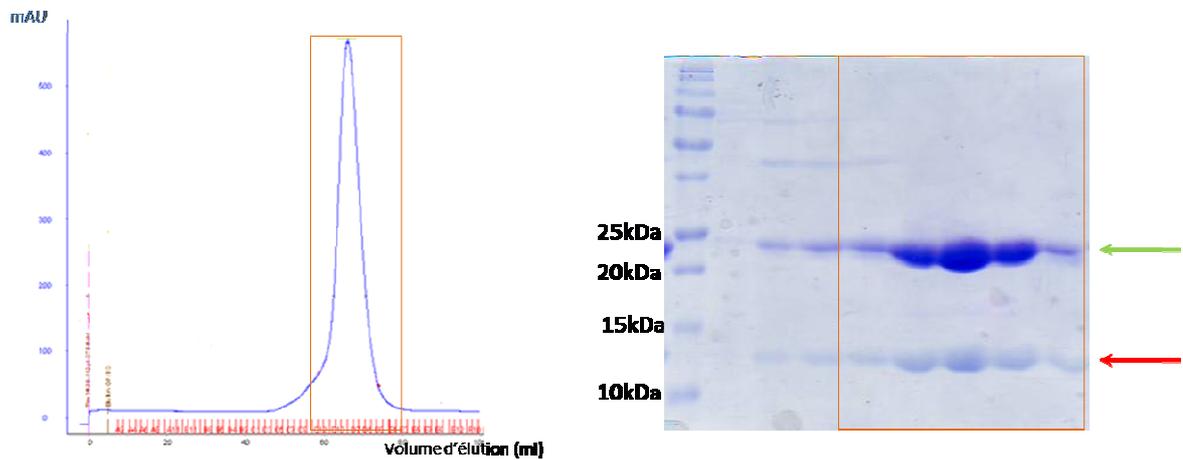


Figure 62 : Purification en 3 étapes du complexe YTrm9N38-Trm112.

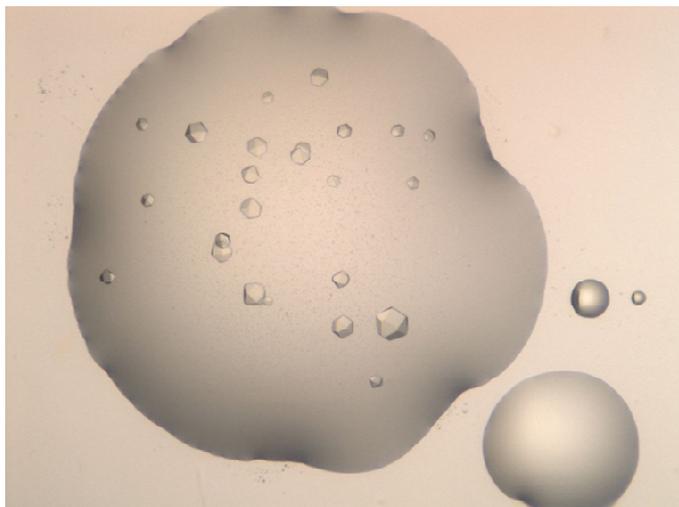
Les flèches vertes et rouges indiquent respectivement les protéines YTrm9N38 et YTrm112. Les rectangles orange encadrent les fractions sélectionnées à chaque étape de purification.

L'expression des complexes a été réalisée dans la souche BL21(DE3) Gold à 25 °C en milieu auto-inductible (Studier, 2005) supplémenté avec 10 µM de ZnCl₂ et 100 mg/L d'ampicilline pendant 20 heures. Après récolte des cellules par centrifugation, le culot est repris dans le tampon A (50 mM Tris-HCl pH7,5 ; 200 mM NaCl ; 5 mM β-mercaptoéthanol ; 10 µM ZnCl₂). Après sonication et clarification de l'extrait brut par centrifugation, la première étape de purification consiste en une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA en tirant profit de l'étiquette 6-Histidines portée par le variant Y/Trm9 exprimé. Les éluions en présence de 100mM (E1) et 200 mM (E2) d'imidazole permettent de décrocher la quasi-totalité du complexe (figure 62). Les fractions E1 et E2 sont alors rassemblées puis diluées dans le tampon A sans NaCl afin de réduire à 50 mM la concentration en NaCl. Cet échantillon est alors déposé sur une colonne HiTrap-MonoQ de 5mL. La purification par chromatographie échangeuse d'anions est envisagée car le point isoélectrique théorique du complexe Y/Trm9N38-Trm112 est de 5,5, ce complexe devrait donc être chargé négativement à pH7,5 et être retenu dans un premier temps par la matrice.

L'éluion est réalisée par un gradient linéaire de NaCl allant de 50 mM à 1,5 M. L'analyse des fractions collectées par SDS-PAGE montre que le pic d'absorption sur le chromatogramme correspond à l'éluion du complexe. Après cette étape, le degré de pureté n'est pas encore suffisant pour envisager la cristallogenèse. Les fractions d'éluion les plus riches en complexe sont rassemblées et appliquées sur une colonne de tamisage moléculaire Superdex 75 16/60. Cette dernière étape se déroule dans le tampon A et permet d'obtenir un complexe pur (figure 62). Ce protocole d'expression et de purification produit environ 15 mg du complexe Y/Trm9N38-Trm112 pur par litre de culture.

1.3. CRISTALLISATION DU COMPLEXE Y/Trm9N38-Trm112

A partir du complexe pur concentré jusqu'à 10 mg/mL, plusieurs essais de cristallogenèse ont été réalisés en utilisant les cribles commerciaux Classics, JCSG+ et PEGII, en jouant aussi sur la présence ou non de la SAM ou d'un analogue, la sinéfungine. 0,1 µL de solution du complexe est mélangé à un volume identique de solution de cristallisation, puis déposé en gouttes assises par le robot de micropipetage Cartesian Nanodrop.



Conditions :

Y/Trm9N38-Trm112 à 10mg/mL

Crible PEGII ; puits F1

20% Isopropanol

100 mM tri-sodium citrate

20% PEG4000

Figure 63 : Photographie des cristaux du complexe Y/Trm9N38-Trm112 après 5 jours à 19°C.

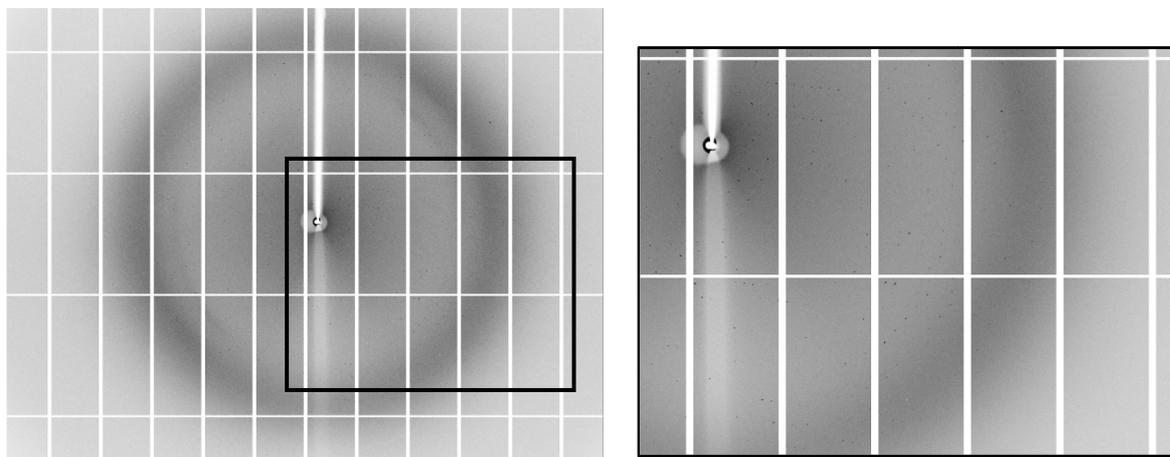


Figure 64 : cliché de diffraction à gauche et agrandissement à droite.

Après 3 jours à 19°C, des cristaux apparaissent dans la goutte du puits F1 (100 mM Tri-sodium citrate, 20% isopropanol, 20% PEG4000) du crible PEGII contenant le complexe γ Trm9N38-Trm112 seul (figure 63).

Ces cristaux ont été reproduits dans des gouttes suspendues réalisées manuellement en mélangeant 1 μ L de complexe avec le même volume de solution de cristallisation.

En vue d'essais de diffraction au synchrotron, plusieurs cristaux ont été pêchés à l'aide de boucles en nylon puis trempés successivement dans la solution de cristallisation supplémentée de 15 et 30% d'éthylène glycol avant d'être congelés dans l'azote liquide. L'éthylène glycol a un effet protecteur durant la congélation des cristaux qui évite la formation de glace cristalline pouvant altérer leur pouvoir diffractant.

1.4. RESOLUTION DE LA STRUCTURE DU COMPLEXE γ Trm9N38-Trm112

Le principe de la résolution de structures cristallographiques est basé sur le fait que les ondes diffractées correspondent à la transformée de Fourier de la densité électronique des molécules répétées dans la maille du cristal. Chaque réflexion est représentée par un facteur de structure F_{hkl} défini par une amplitude et une phase qui doivent être connues pour déterminer la carte de densité électronique qui permettra de reconstruire le modèle de la molécule.

1.4.1. Diffraction, collecte des jeux de données

Le pouvoir de diffraction des cristaux a été testé dans le faisceau de rayons X de la ligne PROXIMA 1 au Synchrotron SOLEIL. Les clichés de diffraction ont été collectés et enregistrés sur le détecteur PILATUS. Un exemple de cliché de diffraction obtenu est présenté en figure 64. Un jeu de données de diffraction est obtenu à partir d'un ensemble de clichés de diffraction enregistrés pendant la rotation du cristal testé. Les jeux de données collectés pour les différents cristaux testés contiennent 1000 clichés de diffraction, chaque mesure dure 0,2 seconde et l'amplitude de rotation est de 0,2°.

L'observation des clichés de diffraction a permis d'estimer grossièrement la résolution pour chaque cristal. Les cristaux testés ont diffracté les rayons X entre 3 et 6 Å.

Afin de résoudre le problème des phases en utilisant le signal anomal de l'atome de zinc lié à Trm112, 3 jeux de données sont collectés pour un même cristal (3Å) à 3 longueurs d'ondes différentes.

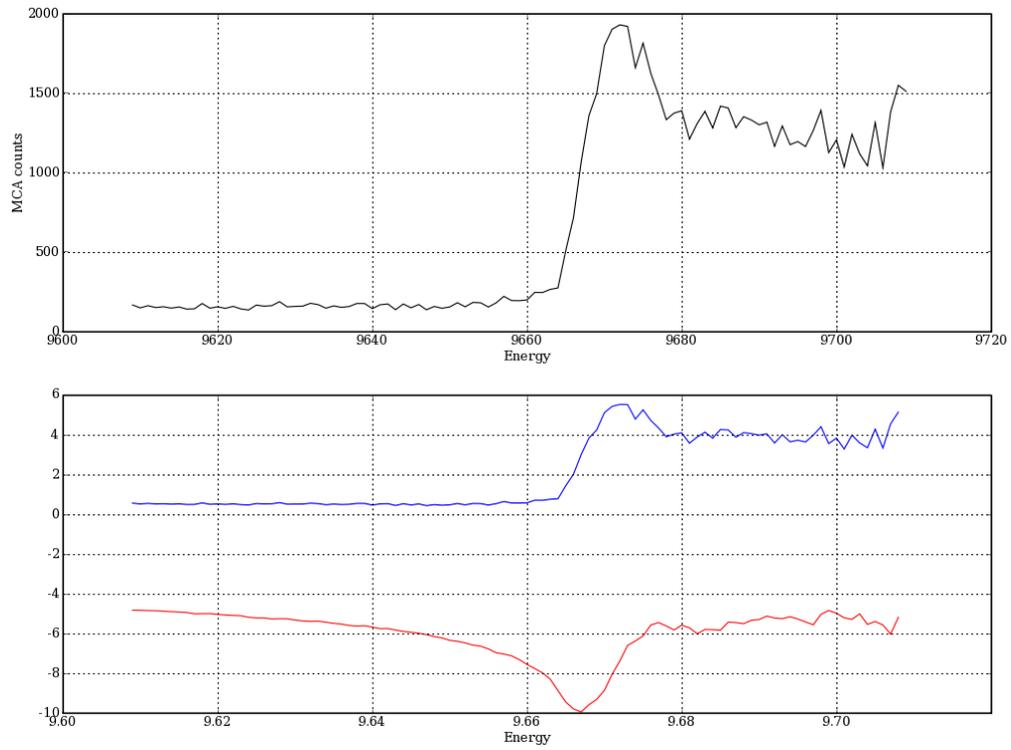


Figure 65 : Mesure de fluorescence au seuil du zinc.

Le choix de celles-ci a été réalisé après la mesure de fluorescence en fonction de l'énergie du faisceau de rayons X au seuil d'émission du zinc (figure 65). Cette mesure permet de déterminer les valeurs des longueurs d'ondes, des énergies et des facteurs de diffusion f' et f'' au niveau du « peak », de l'« inflexion » et de la « remote » (tableau 3).

Tableau 3 : Paramètres des différentes longueurs d'onde utilisées lors des collectes et de leurs facteurs de diffusion f' et f'' mesurés.

Collectes	Energie (keV)	λ (Å)	f'	f''
Maximum f'' (Peak)	9,672	1,2819	-7,4	5,5
Minimum f' (Inflexion)	9,667	1,2826	-10	3
Loin du seuil (remote)	9,722	1,2753	-6	4

1.4.2. Traitement des données

Le traitement des différents jeux de données se décompose en plusieurs étapes réalisées à l'aide du logiciel XDS. Seront détaillés ci-après, les traitements des 3 jeux de données menant à l'obtention des cartes de densité électronique.

❖ Détermination des paramètres de maille et du réseau de bravais

La maille est l'unité élémentaire définie par les nœuds du réseau de Bravais. C'est l'entité à partir de laquelle le motif cristallin peut être reconstitué par des opérations de translation. L'indexation des données correspond à la détermination des vecteurs \vec{a}^* , \vec{b}^* , \vec{c}^* et qui sont compatibles avec la position des taches des clichés de diffraction et permettant de déterminer le réseau direct. Les modules a , b , c et les angles α , β , γ de ces vecteurs représentent les paramètres de maille. L'intensité des faisceaux diffractés contient l'information sur le contenu de la maille cristalline qui définit le réseau direct. Le réseau réciproque, défini par la transformée de Fourier du réseau direct, caractérise l'onde diffractée. Les taches de diffractions présentes sur les clichés enregistrés, correspondent à l'intersection du réseau réciproque et de la sphère d'Ewald. Cette dernière est une sphère théorique définissant les extrémités des vecteurs d'ondes des faisceaux diffractés.

LATTICE- CHARACTER	BRAVAIS- LATTICE	QUALITY OF FIT	UNIT CELL CONSTANTS (ANGSTROEM & DEGREES)					
			a	b	c	alpha	beta	gamma
* 44	aP	0.0	152.7	152.8	152.8	109.5	109.4	109.4
* 25	mC	0.4	176.3	249.6	152.7	90.0	125.2	90.0
* 43	mI	0.9	176.3	249.6	152.9	90.0	125.3	90.0
* 14	mC	1.0	176.3	249.6	152.7	90.0	125.2	90.0
* 24	hR	1.1	249.6	249.6	152.7	90.0	89.9	120.0
* 17	mC	1.3	249.4	176.4	176.3	90.0	134.9	90.0
* 16	oF	1.7	176.5	249.4	249.5	90.0	90.0	90.0
* 4	hR	1.8	249.4	249.4	152.9	90.0	90.0	119.9
* 8	oI	2.2	176.3	176.4	176.5	90.0	90.0	90.0
* 5	cI	2.4	176.4	176.3	176.5	90.0	90.0	90.0
* 6	tI	2.4	176.5	176.4	176.3	90.0	90.0	90.0
* 7	tI	2.8	176.3	176.4	176.5	90.0	90.0	90.0
31	aP	166.3	152.7	152.8	152.9	70.5	70.5	109.4
10	mC	167.0	176.5	249.4	152.9	90.0	125.3	90.0
20	mC	167.5	176.5	249.5	152.8	90.0	125.3	90.0
3	cP	168.6	152.8	152.8	152.7	109.4	109.4	109.5
41	mC	249.4	292.5	152.8	152.7	109.4	121.4	80.0
37	mC	249.5	292.6	152.7	152.8	109.4	121.5	80.0

Figure 66 : Indexation des clichés de diffraction mesurés au maximum de f''.

En vert est surligné le réseau de Bravais choisi correspondant au système cristallin de plus haute symétrie (Bravais lattice) et présentant le score de pénalité (quality of fit) le moins élevé.

A chaque vecteur \vec{S} du réseau réciproque correspond une tache de diffraction repérée par le triplet h, k, l, dit de Miller :

$$\vec{S} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$$

Les paramètres h, k, l sont caractérisés par les équations de Laue :

$$\vec{a} \cdot \vec{S} = h ; \vec{b} \cdot \vec{S} = k ; \vec{c} \cdot \vec{S} = l \quad \text{où} \quad \vec{S} = \vec{s} - \vec{s}_0$$

\vec{s} et \vec{s}_0 représentent les vecteurs d'onde du faisceau diffusé et incident respectivement.

$(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$ symbolisent les vecteurs de base du réseau direct du cristal.

La détermination automatisée de la position des réflexions permet de retrouver la maille et le système cristallin.

A la suite de l'indexation des données, le programme XDS propose une liste des réseaux de Bravais possibles pour les réflexions mesurées. Chaque solution est assortie d'un score de pénalité proportionnel à la différence entre les paramètres de maille estimés et les contraintes géométriques des paramètres de maille d'un réseau de Bravais idéal donné. La solution correcte combine le système cristallin de plus haute symétrie et le score de pénalité le moins élevé (généralement inférieure à 20). Tous les cristaux testés appartiennent au réseau cristallin cubique (cI) qui est le système de plus haute symétrie. La figure 66 présente les résultats de l'indexation pour le jeu de données mesuré au maximum du signal de fluorescence à 3 Å de résolution. Pour un réseau cubique centré, deux groupes de Laue (groupe d'espace) sont possibles selon les symétries internes de la maille : I23 et I432. Dans un premier temps, le groupe de Laue considéré pour l'intégration est le I23 de moins haute symétrie.

❖ Intégration des données et mise à l'échelle

A partir du réseau de Bravais et des paramètres de maille du cristal, le logiciel XDS prédit et affine les positions des taches de diffraction. Les images sont indexées de manière à attribuer à chaque tache un triplet h, k, l. L'intégration des données comprend également la mesure de l'intensité de chaque tache, l'estimation du bruit de fond, l'affinement des paramètres de maille, des valeurs de mosaïcité, de la position du centre du faisceau et de la distance cristal détecteur.

Tableau 4 : Statistiques obtenues après le traitement des données des 3 jeux collectés sur le même cristal à des longueurs d'ondes différentes

Traitement des données	Peak	Inflexion	Remote
Résolution (Å)	50-3 (3-3.17)	50-3.25 (3.25-3.44)	50-3.7 (3.7-3.97)
Longueur d'onde(Å)	1.2819	1.2826	1.2753
Groupe d'espace	I432	I432	I432
Paramètres de maille	a= b=c= 176.4Å	a= b=c= 176.4Å	a= b=c= 176.2Å
Nombre total de réflexions	372381	329050	65430
Nombre total de réflexions uniques	17850	14026	9395
Rsym (%)	14.8 (67.7)	15.2 (63.6)	17.5 (58.9)
Complétude (%)	99.9 (99.7)	99.9 (99.7)	99.9 (100)
I/σ(I)	20.3 (5.1)	22.1 (6.2)	10.9(3.6)
Redondance	20.9	23.5	6.9

Les valeurs intégrées pour chaque image sont rassemblées et mises à l'échelle dans le but d'obtenir un jeu de données complet et homogène. La dégradation du cristal dans le flux de rayon X, la décroissance de l'intensité du faisceau synchrotron ou la forme du cristal peuvent engendrer des variations d'intensités. La mise à l'échelle permet de mettre au même niveau d'intensité les réflexions normalement identiques par symétrie.

Par ailleurs, la complétude du jeu de données est estimée en se basant sur deux paramètres :

- La symétrie dans le cristal : mis à part le réseau triclinique, chaque groupe d'espace présente un ou plusieurs axes de symétrie qui permettent de composer un jeu de données complet avec un nombre minimal d'images.
- La loi de Friedel : en absence de signal anomal, les réflexions (h, k, l) et (-h, -k, -l) sont équivalentes.

Dans le but d'utiliser le signal anomal du zinc pour déterminer la phase, un nombre maximal d'images est collecté, indexé et intégré, de plus dans ce cas, la loi de Friedel n'est pas vérifiée.

La qualité des différents jeux de données est estimée en comparant les intensités des réflexions équivalentes par la mesure du R_{sym} :

$$R_{sym}(I) = \frac{\sum_{hkl} \sum_{j=1}^{j=n_{hkl}} |\langle I_{hkl} \rangle - I_{hkl,j}|}{\sum_{hkl} \sum_{j=1}^{j=n_{hkl}} I_{hkl,j}} \quad ; \quad \langle I_{hkl} \rangle = \frac{1}{n_{hkl}} \sum_{j=1}^{j=n_{hkl}} I_{hkl,j}$$

Avec $\langle I_{hkl} \rangle$: intensité moyenne d'indice hkl calculée à partir des n_{hkl} mesures.

Un autre paramètre est également pris en compte pour juger de la qualité du jeu de données, il s'agit de l'estimation du ratio signal/bruit :

$$I/\sigma$$

Avec I , l'intensité et σ , l'écart type de l'intensité.

Chaque paramètre est vérifié après chaque cycle d'intégration et de mise à l'échelle. Lorsque les valeurs de R_{sym} et de mosaïcité ne varient plus, une dernière mise à l'échelle est effectuée en considérant le groupe de Laue de plus haute symétrie, c'est-à-dire I432. Les valeurs de R_{sym} obtenues indiquent que le groupe de Laue des cristaux est I432 (tableau 4).

Les valeurs des paramètres R_{sym} et I/σ permettent de définir la résolution maximale à laquelle le jeu de données analysé est exploitable. Pour des jeux de données de haute qualité, la limite de résolution a été estimée selon les critères suivants : valeurs de R_{sym} entre 50% et 60% et de I/σ autour de 2 dans la dernière tranche de résolution. Dans le cas du traitement des 3 jeux de données dont les statistiques sont présentées dans le tableau 4, les valeurs du R_{sym} sont un peu élevées. Cependant, ces jeux de données sont de qualité suffisante et sont exploitables pour la résolution de la structure.

❖ Groupe d'espace et extinctions systématiques

L'analyse des extinctions systématiques sur l'axe $(h, 0, 0)$ pour des valeurs de h multiple de 4 permet de discriminer entre les groupes d'espace énantiomorphes $I432$ et $I4_132$. Pour les 3 jeux de données traités, ces extinctions systématiques ne sont pas observables ce qui est une indication forte en faveur du groupe d'espace $I432$.

❖ Contenu de l'unité asymétrique et coefficient de Matthews

L'unité asymétrique d'un cristal peut contenir plusieurs molécules non reliées par des opérations de symétrie cristallographique. De plus, les cristaux de protéines contiennent une proportion de solvant qui est en moyenne de 50% mais qui peut varier de 30 à 80%. Le nombre de molécules dans l'unité asymétrique ainsi que le pourcentage de solvant sont estimés en utilisant le coefficient de Matthews (Matthews, 1968) :

$$V_m = \frac{V}{M \cdot Z}$$

V_m représente le volume massique, V le volume de l'unité asymétrique prenant en compte le volume de la maille et le nombre d'unités asymétriques dans une maille, M la masse moléculaire de la protéine et Z le nombre de molécules dans l'unité asymétrique.

Ce coefficient a été calculé pour le jeu de données mesuré au maximum de f'' en utilisant l'application « Matthews coefficient » de la suite de programme CCP4 (CCP4, 1994):

$V_m = 3,08 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, ce qui correspond à 56,4% de solvant pour un complexe de 38,1 kDa par unité asymétrique.

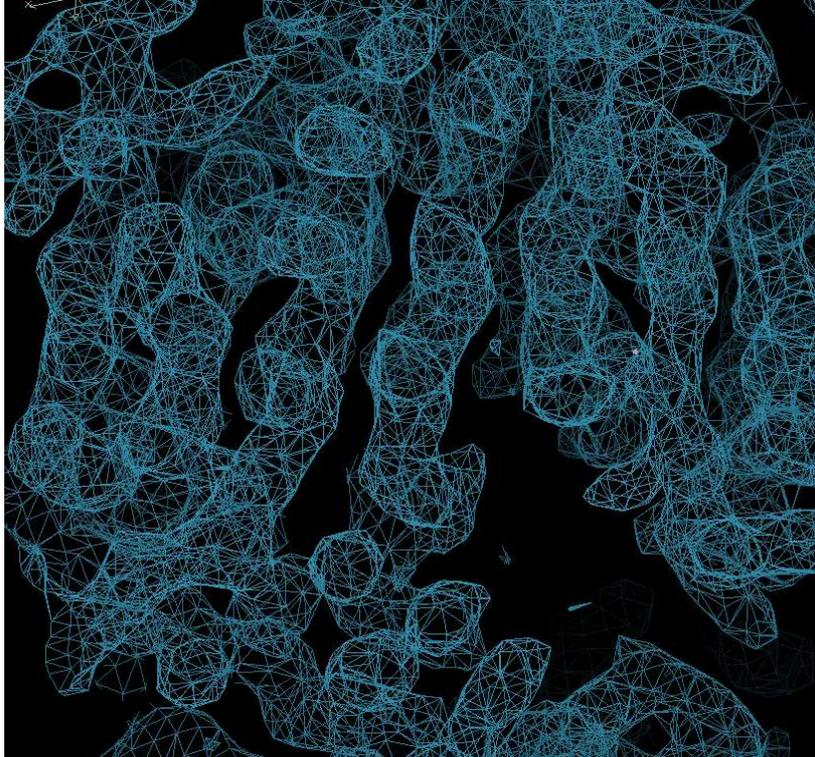


Figure 67 : Carte de densité électronique expérimentale du complexe Y/Trm9N38-Trm112
(Contour : 1σ).

1.4.3. Phasage et obtention des cartes de densité électronique

Il n'existe pas actuellement de méthodes expérimentales permettant de mesurer directement les phases des ondes diffractées les unes par rapport aux autres. Les détecteurs bidimensionnels ne sont sensibles qu'à l'intensité des faisceaux diffractés. Cependant, les informations sur les intensités et sur les phases sont indispensables pour construire l'image de la densité électronique par transformée de Fourier. Les trois techniques utilisées pour la détermination des phases en cristallographie biologique sont le remplacement isomorphe, la diffusion anormale et le remplacement moléculaire.

Dans le cas de la résolution du complexe Y/Trm9N38-Trm112, la présence d'un atome de zinc lié à Trm112 permet de déterminer les phases par MAD en utilisant le signal anormal du zinc.

Etant donné le coefficient de Matthews, l'unité asymétrique contient un seul atome de zinc. Les coordonnées fractionnaires du zinc dans l'unité asymétrique ont été déterminées à l'aide du programme SHELXD suite à l'analyse des cartes de Patterson calculées à partir des différences anormales et en utilisant le jeu de données enregistré au maximum de f' (Schneider & Sheldrick, 2002).

Le phasage a été réalisé grâce au programme SHARP (Bricogne *et al*, 2003) qui permet la résolution des phases. De plus, il réalise plusieurs cycles d'affinement des coordonnées atomiques x, y, z de l'atome de zinc, son occupation q et son facteur B qui caractérise le désordre statique et dynamique, ainsi que les valeurs de f' et f'' . Enfin, grâce à la spécification du pourcentage de solvant et du nombre de molécules dans l'unité asymétrique, SHARP discrimine dans la densité électronique, les zones de solvant des zones correspondant aux protéines (densité électronique plus élevée que celle correspondant au solvant). Il réalise alors un aplatissement de solvant en nivelant la densité électronique et calcule les nouvelles phases correspondantes.

Les cartes de densité électronique expérimentales sont alors calculées à partir des facteurs de structures et de la phase en utilisant le programme FFT pour « Fast Fourier Transform » de la suite CCP4 (figure 67). La carte de densité électronique expérimentale ainsi obtenue permet d'identifier des éléments de structures secondaires de type hélices α et brins β et est donc tout à fait interprétable.

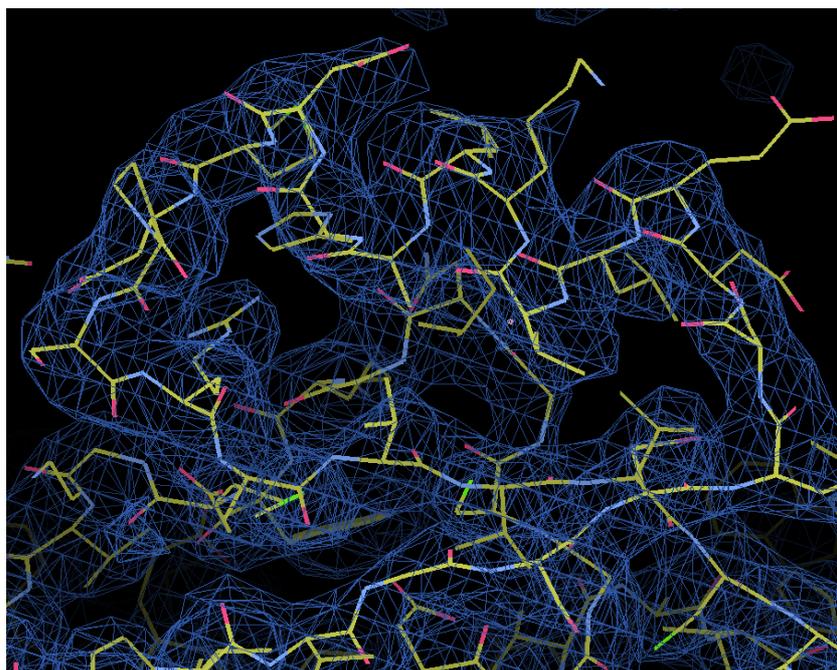


Figure 68 : Modèle de Y-Trm9N38-Trm112 reconstruit dans les cartes expérimentales.

Tableau 5 : Statistiques obtenues après le traitement des données à 2,5 Å de résolution.

Résolution (Å)	50-2.5 (2.5-2.65)
Longueur d'onde(Å)	0.9801
Groupe d'espace	I432
Paramètres de maille	a= b=c=176.2Å
Nombre total de réflexions	78802
Nombre total de réflexions uniques	16239
Rsym (%)	6.9(50.1)
Complétude (%)	97.9 (98.3)
I/σ(I)	14.2 (2.56)
Redondance	4.85

1.4.4. Construction du modèle dans les cartes expérimentales

Le modèle du complexe *Y*Trm9N38-Trm112 a été construit dans les cartes expérimentales à l'aide du logiciel COOT. Le modèle de *Y*Trm9N38 a été entièrement construit manuellement (figure 68). Par contre, le modèle de *Y*Trm112 a été reconstruit à partir du résultat de remplacement moléculaire de la structure cristallographique de *Sc*Trm112 (pdb : 2J6A) (Heurgue-Hamard *et al*, 2006). Ce remplacement moléculaire a été réalisé dans les cartes de densité expérimentale grâce au programme MolRep - Auto MR de la suite CCP4. Cette étape consiste à rechercher par des opérations de rotations et de translations le modèle *Sc*Trm112 dans les cartes et de positionner celui-ci dans la densité électronique. Le positionnement de ce modèle a facilité la reconstruction du modèle de *Y*Trm112.

1.4.5. Amélioration de la résolution

De nombreux essais de cristallisation du complexe *Y*Trm9N38-Trm112 avec la SAM, la SAH, la cm^5U ou la mcm^5U ont été réalisés. Les molécules cm^5U et mcm^5U ont été synthétisées chimiquement par l'équipe de Mélanie Ethève-Quelquejeu (LCBPT-Paris). Certains ont permis d'obtenir des cristaux dans des conditions identiques à celles décrites précédemment. Cependant, après une analyse des cristaux similaire à ci-dessus, aucune molécule n'a été détectée dans le site actif de l'enzyme. Néanmoins, un cristal obtenu en présence de mcm^5U et de SAH a diffracté jusqu'à 2,5 Å de résolution. Afin d'obtenir un jeu de meilleure qualité, 150 images ont été collectées avec une rotation du cristal de 0,2° entre chaque mesure de 0,5 seconde. Les résultats du traitement du jeu de données correspondant sont présentés dans le tableau 5. Les paramètres de maille et le groupe d'espace sont similaires à ceux obtenus précédemment. Pour l'intégration des données et la mise à l'échelle, la loi de Friedel a été considérée comme vraie car le signal anomal du zinc est faible à la longueur d'onde utilisée pour la collecte des données. Les valeurs du R_{sym} et du I/σ montrent que ce jeu de données est de meilleure qualité.

Tableau 6 : Statistiques d'affinement et de géométrie du modèle final de Y/Trm9N38-Trm112.

Résolution (Å)	2.5
R/R_{free} (%)	21.3/26.7
R.m.s.d. liaisons (Å)	0.009
R.m.s.d. angles (°)	1.30
Facteur B moyen (Å²)	49.5(Trm9)
	64.7(Trm112)
	50.9(H2O)
Diagramme de Ramachandran	
Régions favorables	87%
Régions permises	13%

1.4.6. Affinement

Le modèle du complexe Y/Trm9N38-Trm112 reconstruit dans les cartes à 3 Å de résolution est un modèle approximatif de la structure cristallographique. Les facteurs de structures calculés à partir de ce modèle sont plus ou moins en accord avec les facteurs de structures observés expérimentalement. L'alternance des cycles de reconstructions et d'affinements numériques a permis d'obtenir un modèle dont les facteurs de structure calculés convergent vers les facteurs de structure observés (tableau 6).

Pour rendre compte des différences entre le modèle et l'image de la densité électronique, c'est-à-dire entre les facteurs de structure calculés et observés, deux types de cartes de densité électronique sont calculées :

$$2F_{obs} - F_{calc} \text{ et } F_{obs} - F_{calc}$$

La carte $2F_{obs} - F_{calc}$ représente la densité électronique de la molécule à résoudre et $F_{obs} - F_{calc}$ est la carte de densité résiduelle qui met en évidence les différences entre la densité du modèle et celle observée.

La reconstruction a été réalisée en utilisant le logiciel COOT. Les premiers cycles d'affinement ont été faits avec le programme Refmac de la suite CCP4 puis avec le programme Phenix.refine, ce dernier ayant l'avantage de mieux respecter la stéréochimie du modèle. La qualité du modèle est évaluée via différents paramètres :

- les facteurs R et R_{free} mesurent l'accord entre les facteurs de structure observés et les facteurs de structure calculés :

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

Le facteur R_{free} est défini par la même équation que R mais sur 5 % des réflexions choisies aléatoirement et non incluses dans l'affinement. La validation du modèle passe par une convergence de ces deux facteurs dont les valeurs dépendent de la résolution.

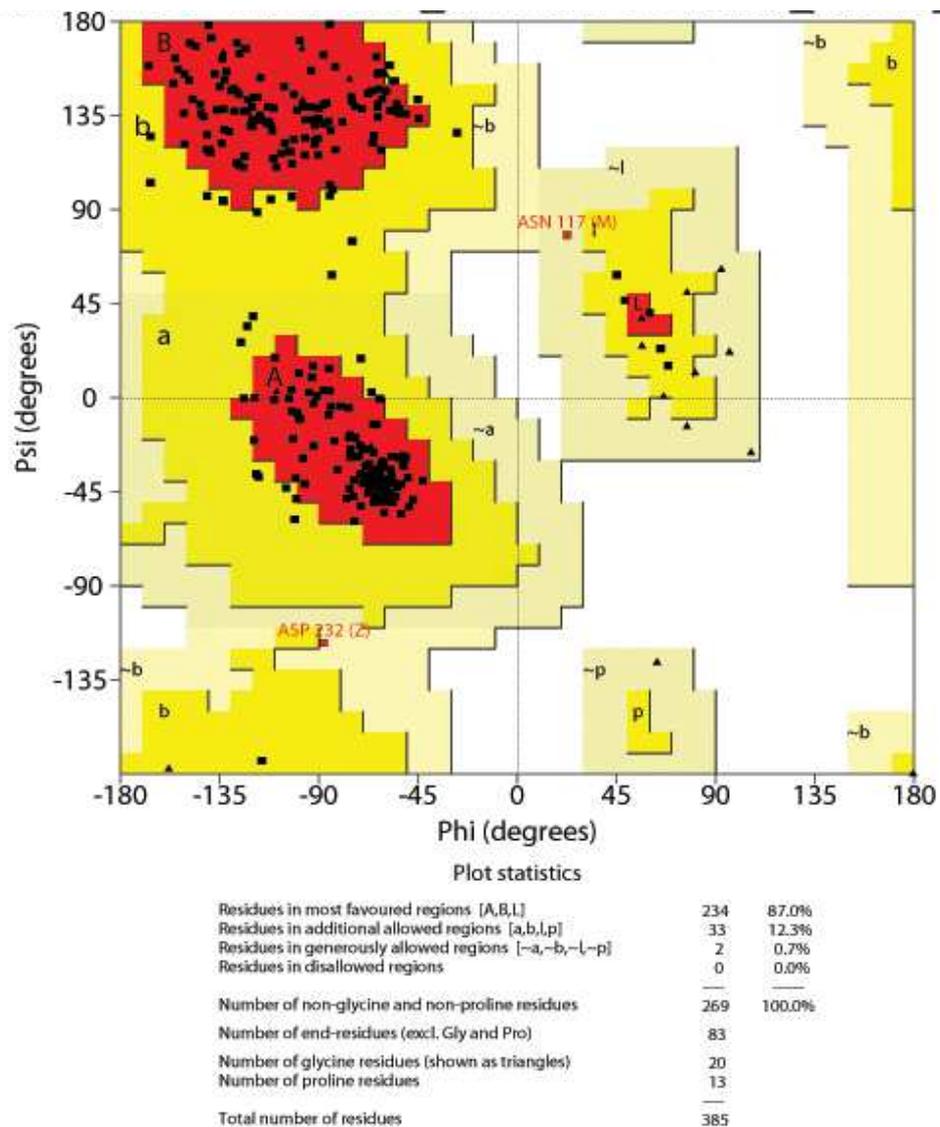


Figure 69 : Diagramme de Ramachandran calculé pour le modèle final Y/Trm9N38-Trm112.

A 2,5 Å de résolution, les valeurs indiquées dans le tableau 6 montrent que le modèle est correct.

- les déviations moyennes (rmsd) des longueurs et angles de liaisons entre atomes du modèle en estiment la qualité stéréochimique. Les valeurs de rmsd liaisons et rmsd angles présentées dans le tableau 6 traduisent une qualité stéréochimique en accord avec les valeurs canoniques.

- le diagramme de Ramachandran permet de juger de la qualité stéréochimique du modèle affiné. Les liaisons peptidiques ne peuvent adopter qu'un nombre limité de conformations. Pour chaque résidu, celles-ci sont caractérisées par les angles Φ et Ψ de la liaison peptidique et sont représentées sur le diagramme qui présente les régions favorables permises et celles non autorisées. Le modèle Y/Trm9N38-Trm112 a été analysé grâce au programme Procheck (figure 69), indiquant que la qualité du modèle final est très satisfaisante.

La présentation et l'analyse de la structure font l'objet de l'article présenté dans le paragraphe 3.

Résultats & Discussion - 1^{re} Partie

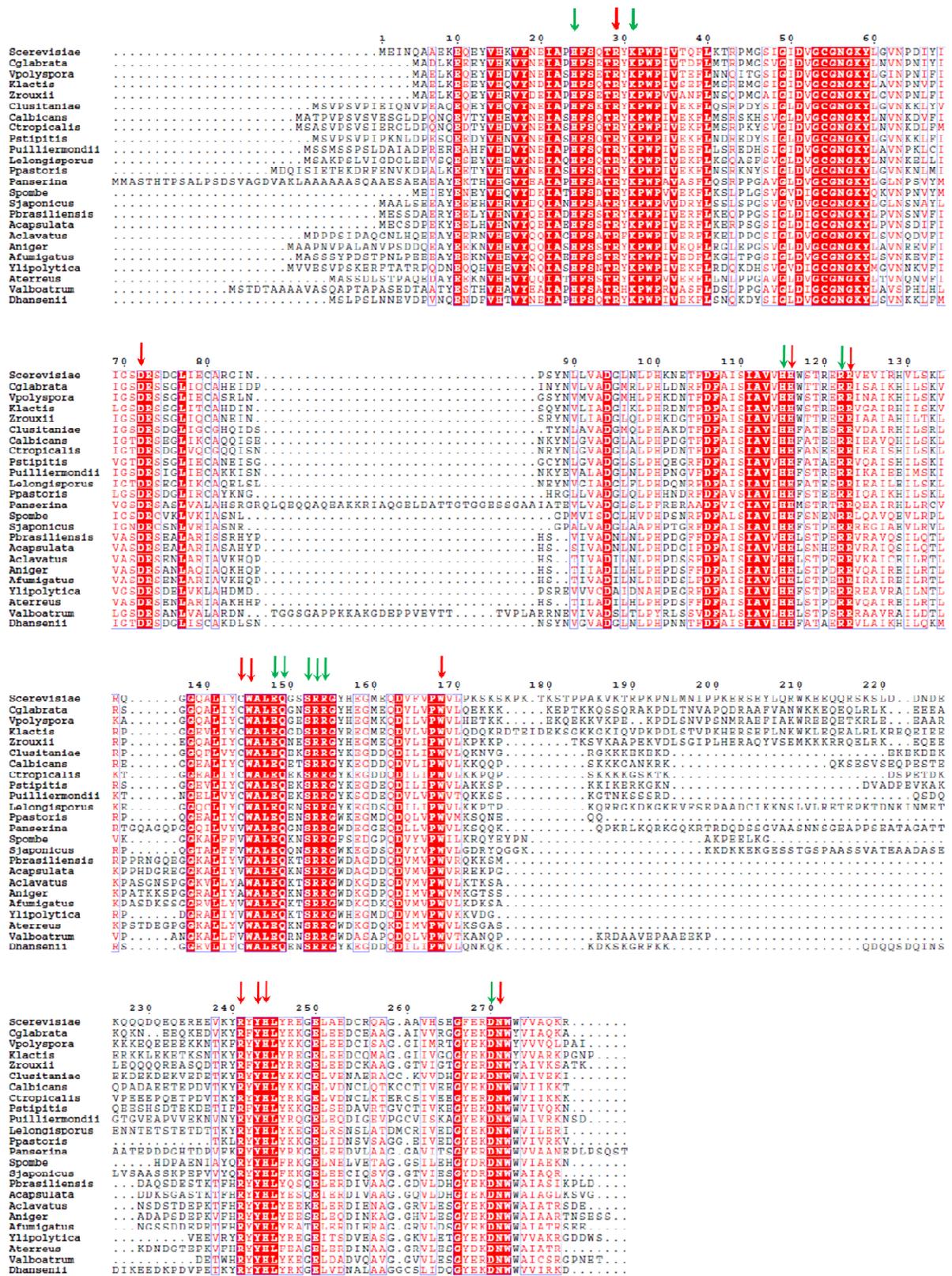


Figure 70 : Alignement de séquences de Trm9.

Les résidus cibles des mutations sont indiqués par les flèches rouges et vertes. Le code couleur correspond au phénotype de résistance (rouge) ou de sensibilité (vert) à la zymocine des souches mutées correspondantes.

2. Etude du complexe *in vivo* chez *Saccharomyces cerevisiae*

Une partie de mon travail de thèse a consisté à étudier le complexe ScTrm9-Trm112 *in vivo* en construisant des souches mutantes de *Sc*. Deux aspects particuliers ont été développés : la cartographie du site actif du complexe de *Sc* et la complémentation croisée de la délétion de *ScTRM9* par *YITRM9*.

2.1. CARTOGRAPHIE DU SITE ACTIF

2.1.1. Stratégie pour cibler les résidus du site actif de Trm9-Trm112

Avant mon arrivée au laboratoire et suite à la résolution de la structure cristallographique de EcMtg2-Trm112, un modèle du complexe ScTrm9-Trm112 avait été généré *in silico*. L'interface du complexe modélisé avait été validée par l'étude *in vivo* de l'effet de mutations touchant des résidus de ScTrm9 prédits essentiels pour l'interaction avec ScTrm112 (Liger *et al*, 2011).

Dans le but de cartographier le site actif du complexe, les résidus conservés et localisés d'après le modèle dans le site actif de Trm9-Trm112 ont été mutés en alanine (figure 70). La construction de souches de *Sc* contenant une version mutée du gène *TRM9* a permis d'étudier leur phénotype de résistance à la zymocine et donc de tester *in vivo* la fonctionnalité du complexe Trm9-Trm112. En effet, si la mutation considérée entraîne une inactivation du complexe Trm9-Trm112, les uridines 34 des ARNt cibles de Trm9-Trm112 ne sont plus complètement modifiées, la zymocine ne clive plus la boucle de l'anticodon et la souche mutée devient alors résistante à la zymocine alors que la souche sauvage de *Sc* y est sensible.

La stratégie adoptée a été de réaliser un premier criblage large en mutant une série de résidus en alanine et de réaliser plusieurs mutations simultanément pour les résidus ciblés situés à proximité dans la séquence. Le phénotype observé vis-à-vis de la zymocine dans un premier temps permet de trier les souches mutantes construites et de cibler les mutants résistants à analyser plus précisément, c'est-à-dire : R29A/K31A, H115A/H116A, R122A/R123A, C144Y/E148A (tableau 7).

Tableau 7 : Phénotypes de résistance à la zymocine pour la première série de souches mutantes.

Résidus mutés de Trm9	Résistance à la zymocine pour les souches mutantes
H24A/R29A/K31A	+
R29A/K31A	+
H24A/K31A	-
D72A	+
H115A/H116A	+
R122A/R123A	+
C144Y/E148A	+
E148A	-
S152A/R153A/R154A	-
R241A	+
H244A	+
D270A	-

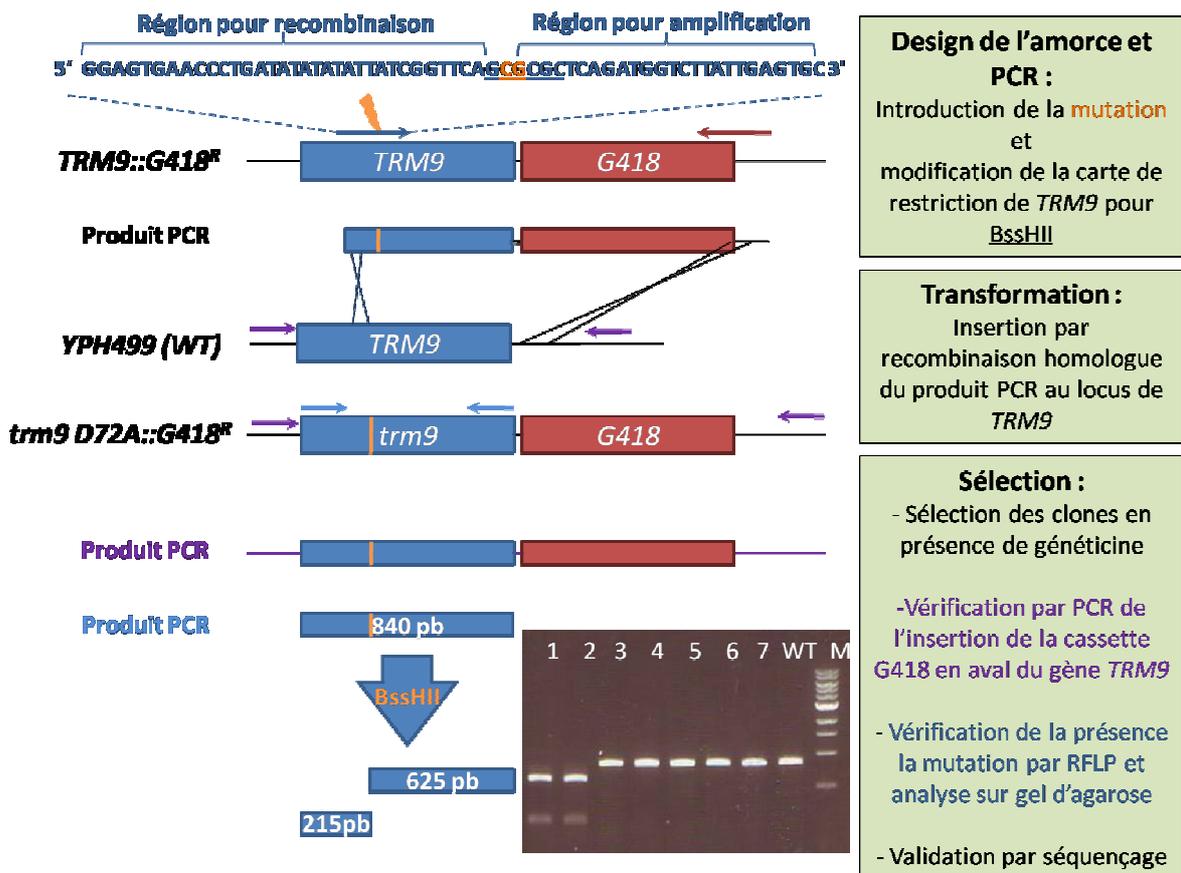


Figure 71 : Stratégie expérimentale pour l'introduction de mutation dans le gène *TRM9*.

Les flèches indiquent la position des amorces utilisées pour les amplifications PCR.

Sur le gel d'agarose en bas à droite : WT indique qu'il s'agit du gène sauvage. M est le marqueur de tailles et les numéros de 1 à 7 représentent les différents clones testés.

2.1.2. Construction de souches possédant une version mutée de *TRM9*

L'objectif lors de mon arrivée au laboratoire a été de construire les souches possédant les mutations uniques mentionnées plus haut pour réaliser un second criblage plus précis et ainsi discriminer les résidus importants pour l'activité de Trm9.

Toutes les constructions des souches mutées ont été réalisées selon la même stratégie basée sur la création d'une continuité physique entre la mutation considérée et un marqueur de sélection et sur la modification de la carte de restriction du gène par introduction de la mutation (Toulmay & Schneiter, 2006). De ce fait, la sélection des clones mutants se fait en quatre étapes : sélection sur milieu sélectif, localisation chromosomique du marqueur de sélection, analyse RFLP de *ScTRM9* des clones sélectionnés et enfin un séquençage pour confirmer l'intégrité du gène muté (figure 71). Les différentes étapes sont décrites ci-dessous avec l'exemple de la construction de la souche *YPH499 trm9D72A::G418^R*.

La première étape consiste à créer le lien entre le gène *TRM9* et le marqueur de sélection ici la cassette *G418^R*, ce qui consiste à construire la souche *YPH499 TRM9::G418^R*. La deuxième étape est de dessiner l'amorce sens de 60 nucléotides contenant la mutation à introduire et qui va entraîner une modification de la carte de restriction du gène *TRM9* (ajout ou disparition d'un site de restriction). Par exemple, l'amorce de la figure 71 diffère de la séquence sauvage de *TRM9* par les deux bases en orange. La modification de ces deux bases entraîne l'apparition d'un site unique de restriction *BssHII* dans *TRM9* (le site créé est souligné). Idéalement, la recombinaison homologue aura lieu dans la région en amont de la mutation. La région en 3' est indispensable à l'étape de PCR et doit être de longueur optimale.

L'amplification d'une partie du gène *TRM9* associé à la cassette contenant le gène de résistance à la généticine (*G418^R*) est réalisée en utilisant comme matrice de l'ADN génomique de la souche *YPH499 TRM9 :: G418^R* préalablement construite (figure 71). Ensuite, la souche sauvage *YPH499* est transformée par le produit PCR obtenu. Celui-ci s'insère spontanément dans le génome de la levure grâce à un événement de double recombinaison homologue dans les séquences proximales et distales. Après transformation, la sélection des clones est réalisée sur milieu riche en présence de généticine. A partir de l'ADN génomique extrait des clones sélectionnés, un crible PCR est effectué avec une paire d'amorces situées en amont et en aval du gène *TRM9*.

La taille du produit PCR permet de déterminer la présence ou non de la cassette au locus *TRM9*. Dans ce premier crible, la fréquence de l'événement recherché est d'environ 75%. L'étape suivante consiste à déceler la présence de la mutation désirée dans le gène *TRM9* par RFLP. En effet, la résistance à la généticine valide l'insertion du marqueur de sélection par double recombinaison homologue de part et d'autre de ce marqueur et le crible PCR permet de confirmer la localisation de ce marqueur à proximité de *TRM9* mais pas la présence formelle de la mutation dans le gène. En effet, la recombinaison homologue en amont du gène de résistance à la généticine a pu s'effectuer dans le gène *TRM9* soit en amont, soit en aval du site visé par la mutation (l'événement en amont étant celui permettant l'introduction de la mutation). Si l'événement de recombinaison a effectivement eu lieu en amont, la mutation sera bien introduite dans le gène et sa carte de restriction sera modifiée par rapport à celle du gène sauvage. Une analyse RFLP des clones permettra de visualiser la présence de la mutation désirée dans le gène. L'amplification PCR du gène *TRM9* et la digestion du produit PCR avec l'enzyme de restriction adéquate (*Bss*HII) permet de comparer les cartes de restriction du gène *TRM9* des différents clones sélectionnés à celle du gène sauvage. L'analyse sur gel d'agarose, présentée dans la figure 71, montre que les clones 1 et 2 présentent des profils de restriction différents de celui de la souche sauvage ; de plus, les fragments sont de la taille attendue, ce qui traduit la présence de la mutation. La validation de la séquence entière des gènes ainsi mutés est réalisée par séquençage. Pour information et selon les mutations, 10 à 20% des clones analysés par RFLP présentent la mutation attendue. Au total, la fréquence de l'évènement recherché est inférieure à 20%.

Les mutations suivantes ont été envisagées : R29A, K31A, H115A, H116A, R122A, R123A. De plus, lors de la construction des premières souches mutées, une mutation non désirée (C144Y) a été isolée conjointement à la mutation E148A. L'association de ces deux confère à la souche le phénotype de résistance à la zymocine alors que E148A seule ne le fait pas. Afin d'étudier la contribution de la cystéine 144 à l'activité Trm9, plusieurs mutations ont été considérées : C144A, C144S, C144Y.

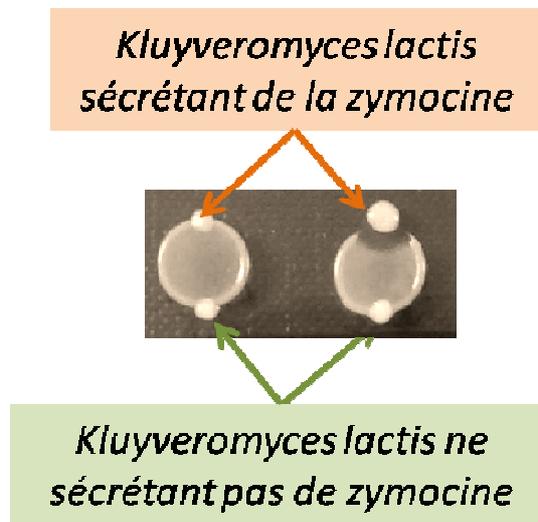


Figure 72 : Test d'éclipse pour la détermination du phénotype de résistance à la zymocine. La souche de gauche est résistante à la zymocine tandis que celle de droite est sensible.

Tableau 8 : Phénotypes de résistance à la zymocine pour la deuxième série souches mutantes.

Résidus mutés de Trm9	Résistance à la zymocine pour les souches mutantes
R29A	+
K31A	-
H115A	-
H116A	+
R122A	-
R123A	+
C144A	-
C144S	-
C144Y	+

Tableau 9 : Phénotypes de résistance à la zymocine pour la troisième série de souches mutantes.

Résidus mutés de Trm9	Résistance à la zymocine pour les souches mutantes
W145A	+
Q149A	-
W168A	+
Y243A	+
N271A	+

2.1.3. Phénotype de résistance à la zymocine des souches mutantes

Pour chaque souche mutante, le phénotype de résistance à la zymocine est déterminé par un test d'éclipse (figure 72). 5 µL d'une suspension de cellules à DO=0,5 à 600 nm sont déposés sur boîte de milieu riche. Une fois la goutte évaporée, deux dépôts sont réalisés à la périphérie du halo de cellules : l'un correspondant à une souche de *Kluyveromyces lactis* sécrétant de la zymocine dite « killer » et l'autre à une souche ne sécrétant pas de zymocine dite « non killer ». Après une incubation de 24 heures à 30°C, les souches mutantes sensibles à la zymocine présentent une éclipse autour de la souche killer alors que les souches mutantes résistantes à la zymocine n'en présentent pas.

Les résultats des phénotypes de résistance à la zymocine obtenus pour la deuxième série de souches mutantes sont présentés dans le tableau 8. Les mutations qui entraînent une inactivation de Trm9-Trm112 sont R29A, H116A, R123A et C144Y. Concernant C144, le phénotype des souches mutantes dépend de la nature de la chaîne latérale introduite : l'alanine et la sérine ne modifient pas le phénotype, la tyrosine provoque une modification de ce phénotype. La cystéine 144 ne semble pas indispensable à l'activité de la MTase, mais l'introduction d'un résidu volumineux tel qu'une tyrosine pourrait entraîner une inactivation de l'enzyme par un mécanisme à déterminer.

2.1.4. Nouveaux résidus cibles de mutations basés sur la structure cristallographique du complexe Y/Trm9N38-Trm112

En s'appuyant sur la structure cristallographique du complexe Y/Trm9N38-Trm112, de nouvelles souches mutantes ont été construites et leurs phénotypes vis-à-vis de la zymocine déterminés à l'aide du test d'éclipse. Ces expériences ont été réalisées par Dominique Liger, les résultats sont présentés dans le tableau 9. Pour gagner du temps, l'introduction de la mutation a été réalisée simultanément à la fusion d'une séquence codante pour une étiquette 13myc en C-terminal de Trm9 en vue des expériences de co-immunoprécipitation. Il est à noter que la présence de cette étiquette n'affecte en rien l'activité de la protéine.

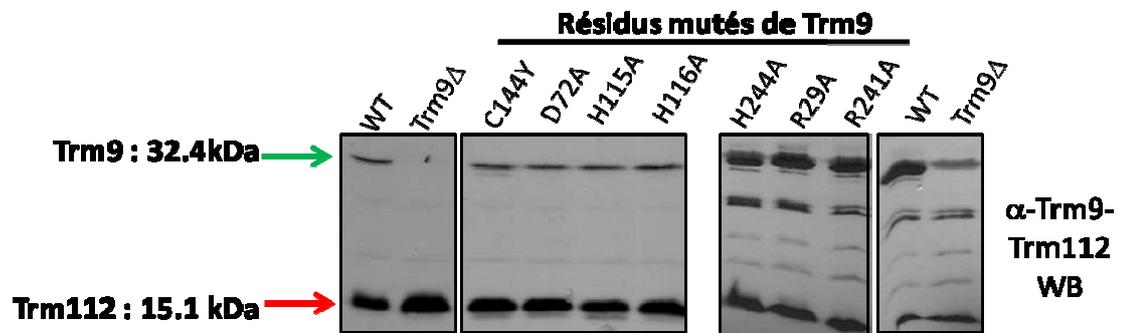


Figure 73 : Niveaux d'expression des complexes mutés *in vivo*.

La localisation des différents résidus mutés sur la structure cristallographique et les premiers résultats obtenus ont permis de sélectionner un nombre restreint de mutants pour des études *in vivo* et *in vitro* plus approfondies qui font l'objet de l'article du paragraphe 3. Les mutations sélectionnées pour l'article sont : R29A, D72A, H115A, H116A, W145A, Q149A, W168A, R241A, Y243A et N271A. Par ailleurs, les complexes comportant les mutations C144Y et H244A ont également été particulièrement étudiés mais ne sont pas décrits dans l'article.

2.1.5. Analyses approfondies des complexes mutés *in vivo* et *in vitro*

Le phénotype de résistance à la zymocine signifie que la mutation à l'origine du phénotype touche un résidu essentiel à l'activité de Trm9-Trm112. Plusieurs raisons peuvent expliquer la perte éventuelle d'activité de la MTase mutante : la mutation pourrait jouer sur la stabilité de l'enzyme ce qui se traduirait par un niveau d'expression des protéines diminué et/ou par une diminution voire perte de l'interaction entre Trm9 et Trm112 et/ou la mutation provoquerait une activité enzymatique diminuée.

❖ Niveaux d'expression *in vivo*

Les niveaux d'expression des complexes Trm9-Trm112 des souches mutantes ont été comparés à celui de la souche sauvage. Pour cela, 50µg de protéines de lysats clarifiés ont été analysées par Western Blot après SDS/PAGE en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre le complexe ScTrm9-Trm112 (figure 73). Tous les complexes mutés présentent des niveaux d'expression *in vivo* comparables à celui du complexe sauvage.

❖ Interaction Trm9-Trm112 *in vivo*

Etant donné que l'interaction entre Trm9 et Trm112 est essentielle à l'activité de méthylation, des essais de co-immunoprécipitation (co-IP) ont été menés afin de vérifier l'impact éventuel des mutations sur l'interaction entre les deux partenaires. Dans cette optique, dans chaque souche mutée construite lors de la première série, la cassette de résistance à la généticine a été remplacée par une cassette contenant une étiquette 13Myc et le marqueur d'auxotrophie *TRP1* selon la technique décrite par Longtine *et al*, 1998. Cet échange de cassette permet de fusionner à l'extrémité C-terminale de Trm9 une étiquette qui sera spécifiquement reconnue par des anticorps α -myc. De plus, le changement de marqueur de sélection associé à l'insertion de l'étiquette permet d'identifier les souches exprimant Trm9-13myc sur milieu dépourvu de tryptophane et de généticine.

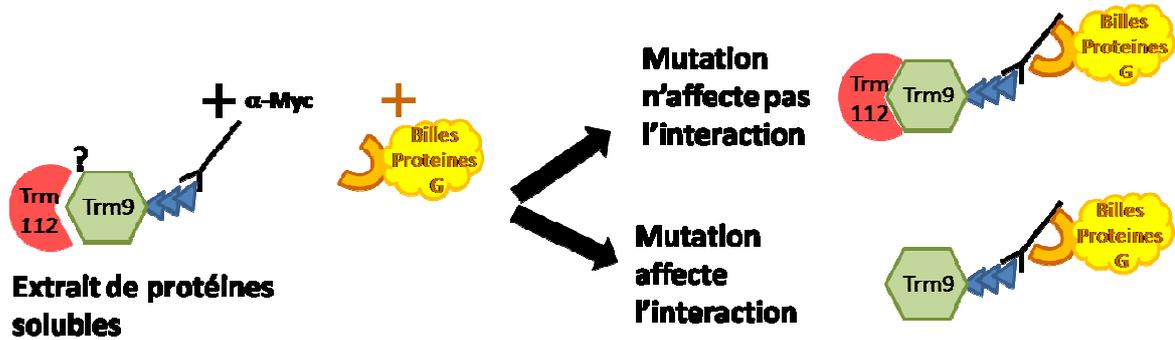


Figure 74 : Principe des expériences de co-immunoprécipitation.

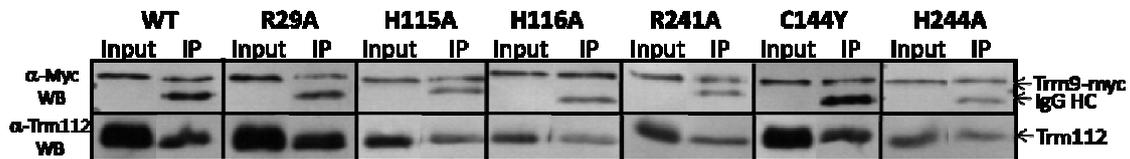
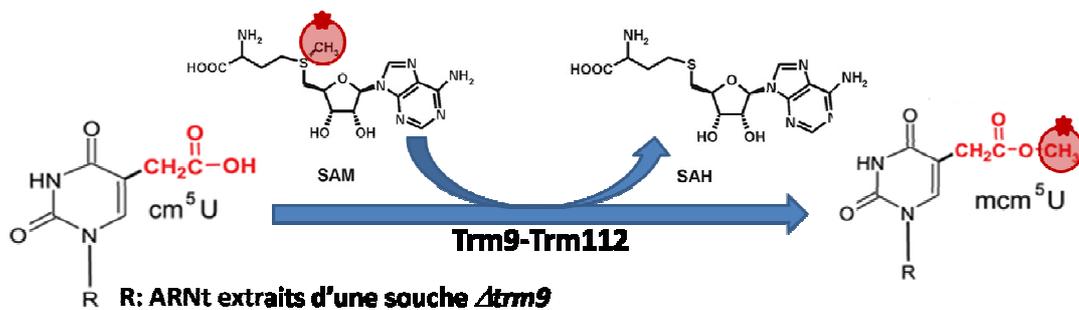


Figure 75 : Co-immunoprécipitation des complexes mutés Trm9-Trm112.

• **Réaction enzymatique:**



• **Tests enzymatiques in vitro et mesure:**

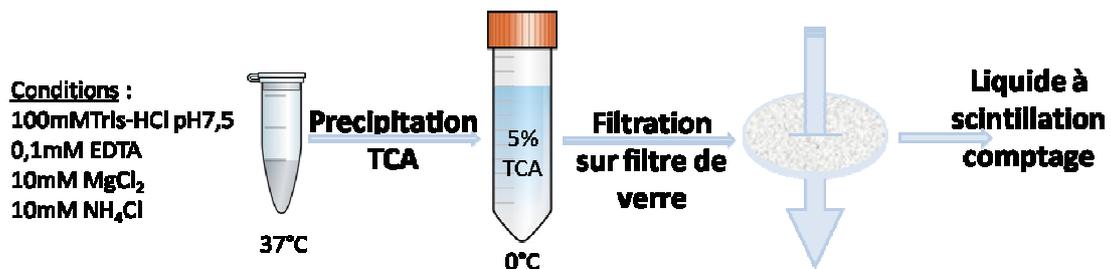


Figure 76 : Schématisation de la réaction enzymatique et de la mise en œuvre du test in vitro.

Le principe de la co-IP est illustré dans la figure 74. 500µg de protéines de lysat clarifié sont incubés en présence d'anticorps α -myc pour former un complexe immun avec Trm9-13Myc puis l'ajout de protéines G greffées à des billes de Sépharose permet d'associer le complexe immun à la phase solide. Après 4 lavages des billes dans des conditions natives, l'élution est réalisée dans des conditions dénaturantes. L'analyse de l'immunoprécipitation est effectuée par Western Blot en utilisant des anticorps primaires anti-myc et anti-ScTrm112. Les résultats sont présentés dans la figure 75 ainsi que dans la figure S2 - panel B de l'article. Il a été montré précédemment que la mutation D72A affectait partiellement l'interaction entre Trm9 et Trm112 (Liger *et al*, 2011). Néanmoins, ce n'est pas le cas des autres mutations ciblant les résidus du site actif.

❖ Tests enzymatiques *in vitro*

Afin de mesurer l'activité enzymatique des complexes mutés, ceux-ci ont été exprimés chez *E.coli*, purifiés puis leur activité enzymatique a été mesurée *in vitro*. Les ARNt extraits et purifiés à partir d'une souche de *Sc Δ trm9* et de la SAM marquée au tritium sur son méthyle ont été utilisés comme substrats pour l'essai enzymatique de Trm9 (figure 76). La réaction est réalisée à 37°C avec 75 pmol d'ARNt totaux, 500 pmol de SAM et 25 pmol de complexe dans 50 µL de tampon dont la composition est indiquée dans la figure 76. L'arrêt de la réaction après 1 heure, est effectué par précipitation au TCA. Dans ces conditions, la SAM reste soluble alors que les ARNt précipitent. Le passage du milieu réactionnel sur filtre de verre permet de retenir les molécules précipitées et d'estimer par comptage la radioactivité sur le filtre correspondant aux ARNt méthylés par la SAM durant l'essai. Les résultats obtenus font l'objet de l'article du paragraphe 3. Les complexes Trm9C144Y-Trm112 et Trm9H244A-Trm112 présentent respectivement 4±1% et 8±2% d'activité par rapport au complexe sauvage. Ces mutations affectent donc très fortement l'activité enzymatique du complexe. Il est à noter que la cystéine 144 de ScTrm9 correspond à une valine chez YTrm9. Etant donnée la représentation du site actif de Trm9 (figure 77), les chaînes latérales de C144 et H244 ne pointent pas vers le site actif. Par contre, elles sont proches de résidus importants pour l'activité enzymatique (W145 et Y243) dont les chaînes latérales pointent vers le site actif. Les mutations C144Y et H244A pourraient avoir un effet sur ces résidus à proximité provoquant une perte importante de l'activité enzymatique.

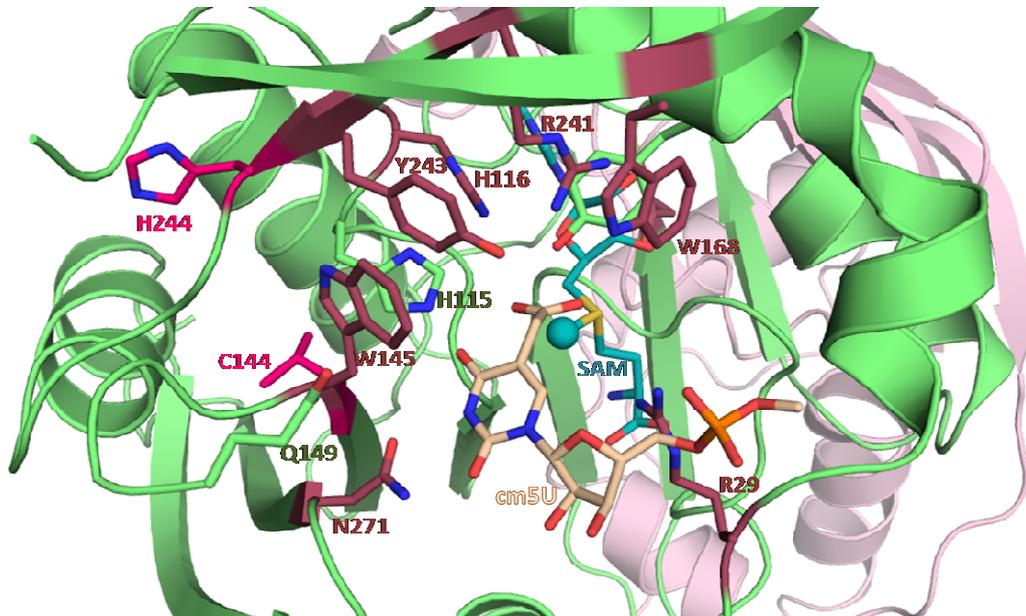


Figure 77 : Cartographie dans le site actif du modèle de Y-Trm9-Trm112-SAM-cm⁵U des résidus de Yl correspondant aux résidus cibles de mutation de Sc.

Trm9 est représenté en vert, Trm112 en rose, la SAM en bleu et la cm⁵U en beige.

Les résidus dont la mutation entraîne un phénotype de résistance à la zymocine sont en prune et magenta et ceux dont la mutation ne confère pas de phénotype de résistance à la zymocine sont en vert.

(1)	1	10	20	30	40	50	60	77
ARNt Arg E. coli (1)	GCAUC	CGUAGCUC	A GCUGGAUAGAGU	ACUCGGCTACGAA	CCGAGCGGU	CGGAGGUUCGA	AUCCUCCCGGAU	CACCA
ARNt Arg Sc (1)	GCUCG	CGUGGCUA	AUGGCAACGCGU	-CU-GACUCU	AAUCAGAAGA	AUG-GGUUCGA	CCCAUCGUGA	GUG---

Figure 78 : Alignement entre les ARNt^{Arg} d'*E.coli* (ACG) et de Sc (UCU).

❖ Fixation de la SAM

Dans le but de déterminer si la perte d'activité enzymatique est due à une perte de liaison de la SAM, des expériences de dialyse à l'équilibre ont été menées dans les conditions de tampon identiques à celles du test enzymatique. Celles-ci consistent à la mise en place d'un système contenant deux chambres séparées par une membrane de dialyse (seuil de coupure 3 kDa). Au début de l'expérience, une des chambres contient 100 μ M de SAM marquée au tritium et l'autre chambre 120 μ M de complexe Trm9-Trm112. Le système est mis en rotation et incubé 3 heures à 4°C. A l'issue de cette incubation, le système est à l'équilibre et la radioactivité présente dans chaque compartiment est alors quantifiée dans un compteur à scintillation. La radioactivité du compartiment sans protéine permet de quantifier la SAM libre à l'équilibre, la radioactivité du compartiment contenant le complexe reflète la SAM libre et la SAM liée. Connaissant la SAM totale utilisée lors de l'essai, on pourra déterminer SAM libre et SAM liée et comparer les quantités de SAM liée par les différents complexes Trm9-Trm112. Les résultats obtenus pour les différents complexes mutés sont décrits dans l'article du paragraphe 3. Pour les complexes contenant les mutations C144Y et H244A, la radioactivité se répartit de façon uniforme dans les deux compartiments. Par conséquent, ces complexes ne fixent pas la SAM contrairement aux complexes Trm9W145A-Trm112 et Trm9Y243A-Trm112. Les mutations C144Y et H244A pourraient agir sur la flexibilité de la structure de Trm9 et empêcher les changements conformationnels nécessaires à la fixation du cofacteur.

2.1.6. Etude de l'interaction Trm9-Trm112 /ARnt

Dans le but d'analyser l'interaction entre le complexe ScTrm9-Trm112 et l'ARnt, différentes approches ont été considérées.

❖ Tamisage moléculaire analytique

La première a consisté à comparer 3 tamisages moléculaires analytiques utilisant une même colonne Superdex 75 10/300 dans des conditions identiques (20 mM Tris pH7,5, 100 mMNaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, 10 μ M ZnCl₂ à 4°C). L'ARnt utilisé est l'ARnt^{Arg} d'*E.coli* qui était disponible au laboratoire et dont la séquence est alignée avec l'ARnt^{Arg} de *Sc* dans la figure 78.

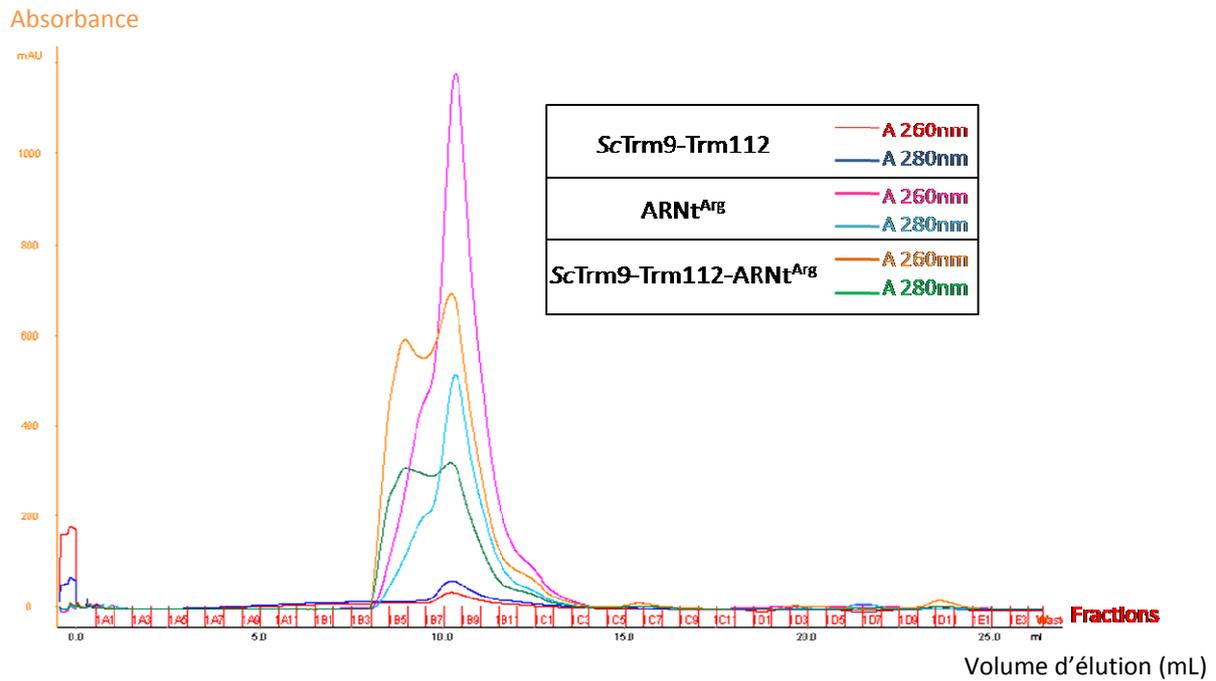


Figure 79 : Superposition des chromatogrammes obtenus au cours des analyses par tamisage moléculaire de l'interaction entre le complexe protéique et l'ARNt.

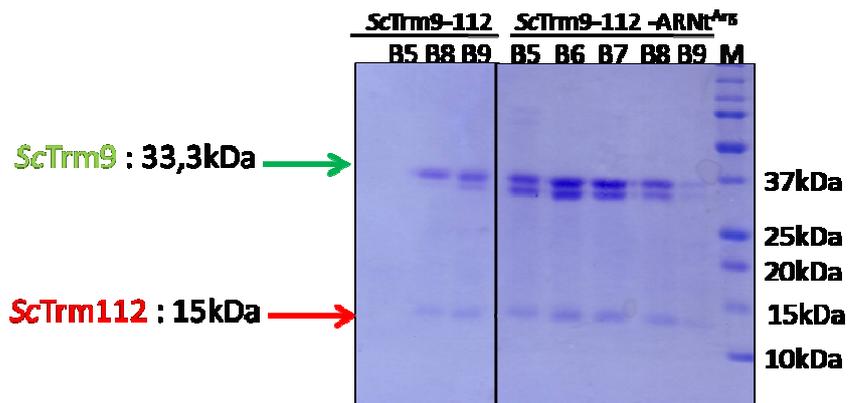


Figure 80 : Analyse SDS-PAGE des fractions issues des tamisages moléculaires.

M représente le marqueur de poids moléculaires, B5 à B9 sont les numéros des fractions d'élution analysées.

Les deux premiers tamisages ont été réalisés avec 3 nmol de complexe ScTrm9-Trm112 puis avec 3 nmol d'ARNt^{Arg} d'*E.coli*. Enfin 3 nmol de complexe protéique ont été mélangés avec 3 nmol d'ARNt^{Arg} d'*E.coli* avant d'être analysés par tamisage moléculaire. La mesure d'absorbance en continu en sortie de colonne a été effectuée à deux longueurs d'onde (260 et 280 nm) et les 3 enregistrements obtenus ont été superposés (figure 79).

L'ARNt a un pouvoir absorbant supérieur à celui du complexe protéique aux longueurs d'ondes d'analyse. Par ailleurs, il présente un volume d'élution identique à celui du complexe ScTrm9-Trm112 (fraction B8) alors que son poids moléculaire est deux fois inférieur. Le chromatogramme de sortie de colonne du mélange complexe-ARNt se présente sous forme d'un doublet de pics : le premier sommet correspond à la fraction B5 alors que le second correspond à la fraction B8.

L'analyse en SDS/PAGE menée en parallèle sur les fractions d'élution confirme les observations faites à partir des chromatogrammes (figure 80). Seul, le complexe protéique est élué principalement dans les fractions B8 et B9 alors qu'en présence de l'ARNt, le complexe est élué de B5 à B8. Ces résultats montrent que les propriétés de ScTrm9-Trm112 et de l'ARNt sont modifiées lorsque les deux sont préalablement mélangés. Une nouvelle espèce de poids moléculaire apparent plus élevé que les espèces isolées et contenant à la fois le complexe Trm9-Trm112 et l'ARNt apparaît. Ces résultats suggèrent que le complexe ScTrm9-Trm112 interagirait avec l'ARNt^{Arg} d'*E.coli*.

❖ Retards sur gel

Dans le but de déterminer la spécificité de l'interaction ScTrm9-Trm112/ARNt et de l'étudier de manière quantitative, des expériences de retards sur gels ont été réalisées. Cette technique est basée sur le retard de migration dans un gel natif d'une séquence nucléotidique complexée à une protéine par rapport à la séquence non complexée. Afin de pouvoir quantifier l'interaction possible entre les partenaires, l'ARNt^{Val} de *Sc* et un ARN de 45 nucléotides contrôle ont été transcrits *in vitro* en présence d'UTP marqué [α -³²P]. Ils ont ensuite été purifiés et enfin repliés par chauffage à 65°C et refroidissement à température ambiante dans les conditions suivantes : 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM β -mercaptoéthanol, 2,5 mM MgCl₂.

- **Séquences :**

ARN contrôle (gauche):

5' AGUCUCAAUAAAUCCAAGAAUUUCACCUCUGACAAUUGAAUACU 3'

ARNt Val de Sc (droite), l'anticodon est souligné :

5' GGUCCAAUGGUCCAGUGGUAAGACGUCCCUUACACGGCGAAGACCCGAGUUCGAACCUCGGUUGGAUCA 3'

- **Structures secondaires :**

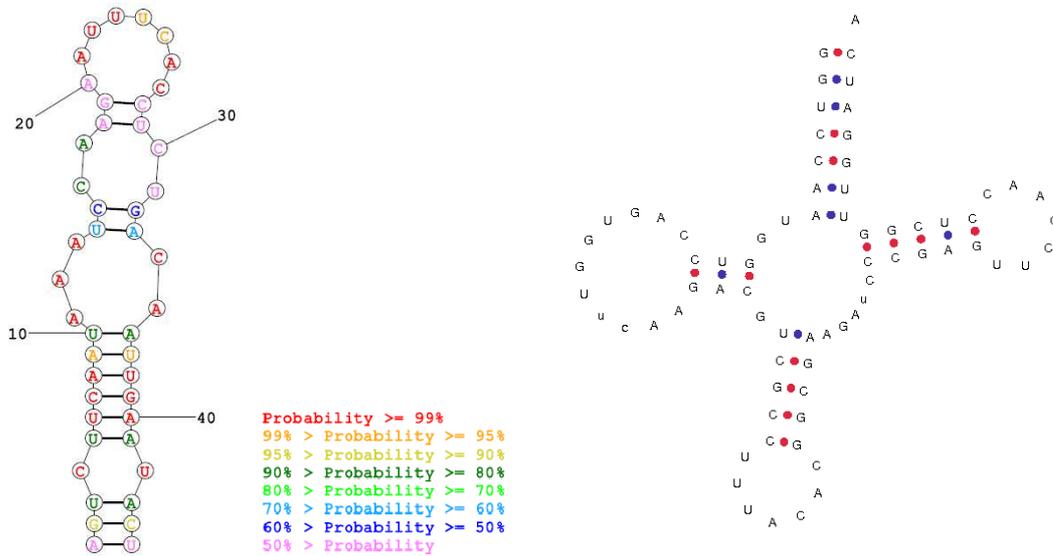


Figure 81 : Séquences et structures secondaires des ARN utilisés pour les expériences de retard sur gel.

La structure secondaire de l'ARN contrôle est une prédiction du serveur RNA Structure, les couleurs des bases sont représentatives de la probabilité de leur positionnement et appariement dans la structure.

La structure secondaire de l'ARNt^{Val} de Sc est donnée par le site <http://gtrnadb.ucsc.edu/>.

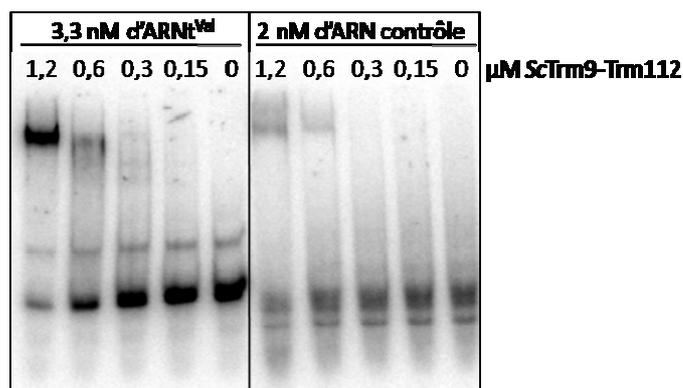


Figure 82 : Retards sur gel pour l'analyse de la spécificité de l'interaction ScTrm9-Trm112/ARNt.

Les séquences et les structures secondaires de ces deux ARN sont présentées dans la figure 81. Dans ces mêmes conditions, l'ARN marqué et le complexe ScTrm9-Trm112 à différentes concentrations sont mélangés. Après une incubation de 10 minutes dans la glace, les échantillons sont analysés sur gel natif d'acrylamide 6% contenant 2,5% de glycérol (figure 82). Un retard est observable pour une concentration de 0,6 μ M de complexe protéique à la fois pour l'ARNt^{Val} et pour l'ARN contrôle.

Ceci montre que l'interaction n'est pas spécifique à l'ARNt dans les conditions de l'expérience. En outre, étant donnée la prédiction de structure secondaire en forme de tige-boucle de l'ARN contrôle (figure 81), ceci pourrait expliquer que cet ARN interagisse avec ScTrm9-Trm112. Néanmoins, le manque de spécificité de l'interaction a compromis l'étude de l'impact des mutations sur l'interaction du complexe avec l'ARNt.

2.2. ETUDE DE COMPLEMENTATION

Etant donnée l'homologie de séquence de 59% entre *YTrm9* et *ScTrm9* et l'utilisation aisée de la zymocine pour tester l'activité Trm9-Trm112, une étude a été réalisée afin de déterminer si le gène *YITRM9* pouvait compléter chez *Sc* la délétion du gène *ScTRM9*. L'objectif était de déterminer si dans des conditions identiques *in vivo*, *YTrm9* pouvait interagir avec *ScTrm112* et d'estimer l'activité enzymatique éventuelle de *YTrm9* chez *Sc*.

2.2.1. Construction des souches pour l'étude de complémentation

Dans cette optique, la construction des souches a visé à remplacer le gène *ScTRM9* par le gène *YITRM9* en utilisant les caractéristiques du marqueur d'auxotrophie *URA3* selon les techniques adaptées de Storici *et al*, 2001 et Gray *et al*, 2004.

Le gène *URA3* présent sur le chromosome V chez *Sc* code pour la Orotidine 5'-phosphate décarboxylase (ODCase) qui catalyse une des réactions de la synthèse des ribonucléotides pyrimidines. L'inactivation de cette enzyme provoque un défaut de croissance de la souche en absence d'uracile ou d'uridine. La souche *YPH499* est *ura3⁻*, sa croissance nécessite donc la présence d'uracile dans le milieu de culture. L'insertion du gène *URA3* dans le génome de la souche *YPH499* restaure l'activité de l'ODCase et permet de sélectionner les souches ayant intégré le gène *URA3* sur milieu sans uracile.

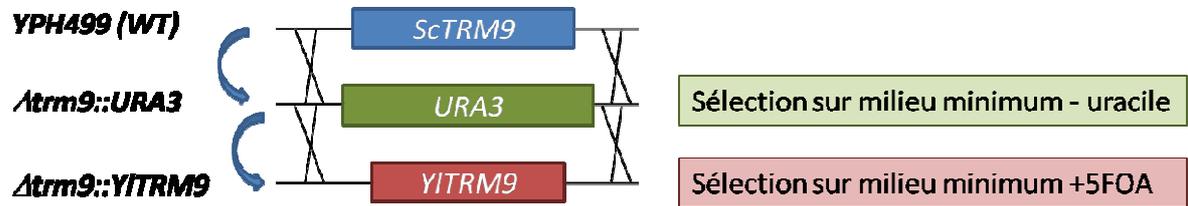


Figure 83 : Schématisation de la stratégie de construction des souches de complémentation.

Dans le cas de la construction de la souche $\Delta trm9::URA3$, la souche sauvage *YPH499* a été transformée avec le produit PCR de la cassette contenant le gène *URA3* flanqué des séquences homologues aux séquences immédiatement en amont et en aval du gène *ScTRM9*. La sélection sur milieu minimum sans uracile permet d'isoler des clones ayant intégré la copie sauvage du gène *URA3* (figure 83). L'intégration de la cassette par double recombinaison homologue peut se produire à deux endroits dans le génome de *Sc* : au locus *URA3* ou au locus *TRM9*. Un crible PCR sur l'ADN génomique des clones sélectionnés utilisant des amorces situées en amont et en aval du gène *ScTRM9* a permis de valider l'insertion de la cassette *URA3* à l'endroit désiré en se basant sur la modification de taille du fragment amplifié lors du crible PCR. On dispose alors de la souche *YPH499* $\Delta trm9::URA3$.

Par ailleurs, l'ODCase convertit une molécule inoffensive, l'acide 5-fluoroorotique (5FOA), en 5-fluorouracile qui est un composé toxique entraînant la mort cellulaire. En présence exogène de 5FOA, seules les souches déficientes en ODCase (*ura3⁻*) sont viables sur milieu minimum contenant de l'uracile. Il est donc possible de forcer une souche *URA3* à devenir *ura3⁻*. Afin de construire la souche $\Delta trm9::YITRM9$, la souche $\Delta trm9::URA3$ a été transformée avec le produit PCR du gène *YITRM9* flanquée des séquences homologues aux séquences immédiatement en amont et en aval du gène *ScTRM9*. Après transformation, les clones ont été sélectionnés sur milieu minimum complet en présence de 5FOA afin de maintenir en vie les cellules devenues *ura3⁻* après l'événement de double recombinaison souhaitée (figure 83). Une première vérification de l'insertion du gène *YITRM9* en remplacement du gène *ScTRM9* est réalisée par PCR de la même manière que précédemment. Cette analyse est rendue possible du fait que les gènes issus de *Yl* et de *Sc* sont de tailles différentes. Enfin, un séquençage des produits PCR permet de valider définitivement la construction de la souche $\Delta trm9::YITRM9$.

La fréquence des événements de recombinaison à l'endroit désiré est plus faible que celle observée lors des constructions des souches précédemment décrites (15%). Ceci peut s'expliquer par le fait que la cassette *URA3* peut aussi s'insérer à son locus d'origine et ainsi défavoriser la délétion d'intérêt.

La construction d'une souche $\Delta trm112::YITRM112$ n'a pas été réalisable du fait que la délétion du gène *ScTRM112* entraîne un défaut de croissance sévère qui rend très difficile la sélection des clones en présence de 5FOA. Le gène *YITRM112* a donc été cloné dans un plasmide pESC-URA en aval d'un promoteur inductible au galactose afin d'exprimer *YITrm112* chez *Sc*. Les différentes souches ont alors été transformées avec le plasmide qui est maintenu dans la cellule par pression de sélection sur milieu minimum dépourvu d'uracile.

2.2.2. Test de résistance à la zymocine par effet dose

Dans le but d'évaluer la complémentation de *ScTRM9* par *YITRM9*, des tests de résistance à la zymocine ont été réalisés. Cependant, il n'était pas possible de mettre en place facilement le test d'éclipse car l'analyse pour certaines souches devait se dérouler en absence d'uracile, conditions non favorables à la croissance des souches de *Kluyveromyces lactis*(*Kl*). Par conséquent, des tests zymocine par effet dose ont été mis en place. Les souches « killer » et « non killer » de *Kl* sont mises en culture en milieu riche avec du galactose comme source de carbone. Les surnageants de ces cultures représentent respectivement la source de zymocine et le contrôle négatif. Ceux-ci sont dilués de 10^{-1} à 10^{-4} dans un milieu synthétique minimum avec ou sans uracile et avec du galactose comme source de carbone. Chaque série de dilutions est inoculée avec la souche à tester afin d'avoir une absorbance à 600 nm de 0,1 au début de l'expérience. Après 20 heures à 30°C, la différence de densité optique à 600nm entre les dilutions 10^{-4} et 10^{-1} permet de comparer chaque souche vis-à-vis de leur sensibilité à la zymocine.

Cette mise en œuvre a permis de détecter des phénotypes intermédiaires et de les quantifier de façon relative. En effet, les souches $\Delta trm9 ::YITRM9 + pYITRM112/pScTRM112$ présentent 50% de sensibilité à la zymocine. Les résultats de cette expérience font l'objet de l'article du paragraphe 3.

3. MANUSCRIT SOUMIS A PNAS POUR PUBLICATION LE 10 JUILLET 2014

Structural and functional insights into the Trm9-Trm112 tRNA modifying enzyme, a potential target for cancer therapy.

Juliette Létoquart, Vonny Caroline, Alexey Aleksandrov, Noureddine Lazar, Herman van Tilbeurgh, Dominique Liger* and Marc Graille*

* Contribution équivalente

Structural and functional insights into the Trm9-Trm112 tRNA modifying enzyme, a potential target for cancer therapy.

Juliette L toquart^{1,2}, Vonny Caroline¹, Alexey Aleksandrov¹, Nouredine Lazar², Herman van Tilbeurgh², Dominique Liger^{2,*} and Marc Graille^{1,2,*}

¹ Laboratoire de Biochimie, CNRS, UMR 7654, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau Cedex, France

² Institut de Biochimie et Biophysique Mol culaire et Cellulaire (IBBMC), CNRS UMR8619, Universit  Paris Sud F-91405 Orsay Cedex, France

Corresponding authors:

Dominique Liger. Tel: +33 (0)169157968. Email: dominique.liger@u-psud.fr

Marc Graille. Tel: +33 (0)169334890. Email: marc.graille@polytechnique.edu

Classification: BIOLOGICAL SCIENCES - Biochemistry

Keywords: tRNA modifying enzyme, methyltransferase, S-adenosyl-L-methionine, translation.

Running title: Structure of Trm9-Trm112 tRNA methyltransferase

Abstract

Protein synthesis is a finely tuned process allowing the cell to adapt throughout the cell cycle or upon exposure to environmental cues. The activity of factors involved in translation is subject to regulation by post-transcriptional or post-translational modifications with methylation being one of the most prominent. The Trm112 protein, which acts as an activating platform of four methyltransferases modifying rRNA (Bud23), tRNA (Trm9 and Trm11) and translation termination factor (Mtg2), perfectly illustrates the importance of methylation in protein synthesis. Here, we describe the crystal structure as well as *in vitro* and *in vivo* functional studies of the Trm9-Trm112 complex. This complex catalyzes the addition of a methyl group to 5-carboxymethyl-uridine (cm⁵U) at the wobble position of tRNA anticodon loop to generate 5-methoxycarbonylmethyl-U (mcm⁵U) and hence promotes translational fidelity. Trm9 has been implicated in cell death protection by enhancing the translation of DNA damage response key proteins, which genes are enriched in codons decoded by tRNAs modified by Trm9-Trm112. In human, two Trm9 orthologues exist (ABH8 and hTrm9L) and appear as potential targets for anti-cancer drugs. Indeed, ABH8 absence significantly diminishes growth of bladder cancers, while depletion of hTrm9L renders tumor cells sensitive to paromomycin and gentamycin, two antibiotics known to induce translational errors. We also compare the known crystal structures of various Trm112-methyltransferase complexes, highlighting the structural plasticity allowing Trm112 to interact through a very similar mode with its methyltransferase partners, although those share less than 20% sequence identity.

Significance statement

For correct function, the translation components are subjected to post-transcriptional and post-translational modifications (PTM). This is particularly the case for tRNAs, which are heavily modified so as to improve their stability as well as the efficiency and accuracy of translation. Here, we describe the structural and functional analysis of the Trm9-Trm112 methyltransferase that modifies some tRNAs in their anticodon loop. This enzyme is involved in response to genotoxic stress and its two human orthologues are implicated in human cancers, thereby representing potent targets for the development of future anti-cancer drugs. We also unravel the molecular mechanisms allowing Trm112 to interact with and activate four methyltransferases adopting the same fold but displaying less than 20% sequence identity.

/body

Introduction

The tRNAs play a central role in translation by decoding the genetic information embedded in mRNA into protein. They bring the amino acid corresponding to the codon present in the ribosomal A-site to the ribosomal peptidyl transferase center (PTC) during the elongation step of the translation process. They undergo several post-transcriptional maturation steps essential for their function. In particular, around 100 nucleoside modifications have been described for tRNAs (1). Some of these modifications are involved in correct folding and stabilization of the tRNA tertiary structure (2, 3), while others occur within the anticodon loop or in its vicinity and then ensure efficient and accurate decoding (4). Positions 34 (also known as wobble) and 37 from the tRNA anticodon loop are frequently modified, ensuring translational fidelity but also the recognition of several codons by a single tRNA molecule. In *Saccharomyces cerevisiae*, 13 out of 42 tRNAs have a uridine at position 34 (U34) and 11 of those are modified on the uracil moiety into 5-carboxymethyluridine derivatives (xcm⁵U; (5)). Among these modifications, 5-methoxycarbonylmethyl-(2-thio)uridine (mcm⁵U and mcm⁵s²U) were shown to enhance accurate and efficient translation and codon pairing (5-7). In *S. cerevisiae*, the synthesis of mcm⁵U34 is very complex and requires at least 15 proteins. Most of these proteins are involved in the first step of the reaction, *i.e.* addition of a carboxymethyl group at position 5 of the uracil to form cm⁵U (8). The enzyme catalyzing this reaction is the Elongator complex composed by six subunits (Elp1-6) (7, 9)). This complex consists of two sub-complexes: a core complex Elp1-2-3 where Elp3 is the catalytic subunit endowed with acetyltransferase activity and an Elp4-5-6 complex, which is a hexameric ATPase regulating tRNA dissociation from the Elongator complex (10). The other factors (Kti11-14, Sit4, Sap185 and Sap190) seem to be involved in the regulation of the Elongator complex (8, 11). The last step in the biosynthesis pathway of this modification is the methylation of cm⁵U to form mcm⁵U, which requires the Trm9 methyltransferase (MTase) (12). This protein belongs to the class I S-adenosyl methionine (SAM)-dependent MTase family and is active as a complex with Trm112 (13, 14). The deletion of the gene encoding any of these 15 proteins results in zymocin resistance phenotype (8, 13). Indeed, zymocin, a toxin secreted by *Kluyveromyces lactis*, exclusively cleaves the tRNA anticodon loop containing mcm⁵s²U34, thereby inhibiting translation and leading to yeast death.

Trm112 is a small zinc binding protein that in addition to Trm9 interacts with and activates 3 other MTases: Trm11, Bud23 and Mtd2. These four Trm112-MTase complexes are involved in processes related to protein synthesis. Similarly to Trm9-Trm112, the Trm11-Trm112

complex methylates many tRNAs in yeast at guanosine 10 to form 2-methylguanosine (m^2G_{10}) and hence is involved in translational elongation (15, 16). The Mtq2-Trm112 complex methylates translation termination factor eRF1 on the amide group of the glutamine side chain from the universally conserved GGQ motif, which enters into the PTC and triggers the release of newly synthesized proteins (17, 18). The Bud23-Trm112 complex is implicated in the synthesis of the small ribosomal subunit by catalyzing the N^7 -methylation of guanosine 1575 of 18S rRNA ((19-22), and the accompanying paper). Finally, Trm112 is important for synthesis of the large ribosomal subunit by a still unclear mechanism (21). The Trm9-catalyzed tRNA modification enhances decoding of AGA, CAA, GAA and, to a lesser extent, AGG codons. Hence, it favors the translation of transcripts specifically enriched in these codons such as those coding for the DNA damage response key proteins Rnr1 and Rnr3 (6, 23). In *S. cerevisiae*, the deletion of the *TRM9* gene results in increased sensitivity of the cell to DNA alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) and in delayed G1 to S phase transition after MMS treatment. Furthermore, hypomodification of tRNAs due to Trm9 inactivation results in translational infidelity and triggers the activation of protein stress response pathways (24). This most probably explains the observed depressed level of Rnr1 protein in *trm9Δ* yeast cells (6, 23). Altogether, this indicates a connection between tRNA modification, regulation of translation in response to stress and DNA damage response.

The Trm9-Trm112 complex is highly conserved in eukaryotes and two Trm9 orthologues exist in human: ABH8 and hTrm9L (25-27). Similarly to yeast Trm9-Trm112, the human ABH8-TRM112 complex converts cm^5U into mcm^5U (26, 27). In insects, worms and human, ABH8 proteins are bifunctional enzymes also encompassing an AlkB-like domain responsible for the hydroxylation of mcm^5U into (S)-5-methoxycarbonylhydroxymethyl-uridine ((S)-mchm 5U ; (28, 29)). Compared to ABH8, hTrm9L is made of only the MTase domain (25, 27). The ABH8 protein is highly expressed in a variety of human cancer cells including bladder cancer. Furthermore, ABH8 silencing induces apoptosis of urothelial carcinoma cells thereby suppressing tumor growth, angiogenesis and metastasis (30). On the opposite, hTrm9L has been described as a negative regulator of tumor growth (25). Interestingly, ABH8 silencing renders cells sensitive to MMS and to the anti-cancer drug bleomycin, while the loss of the gene encoding hTRM9L renders tumor cells sensitive to paromomycin and gentamycin, two antibiotics known to induce translational errors (25). Hence, human hTrm9L and ABH8 proteins represent potent targets for the development of new anti-cancer drugs.

Here, we describe the crystal structure of the Trm9-Trm112 complex from *Yarrowia lipolytica* as well as *in vivo* and *in vitro* functional studies aimed at analyzing the mechanism

of action of this protein. From the comparison of the various known crystal structures of Trm112-MTase complexes, we also unravel the molecular plasticity allowing Trm112 to interact with its various MTase partners, which share less than 20% sequence identity.

Materials and methods

Detailed experimental procedures are available as supplementary information.

Enzymatic assay

The methyltransferase assay was performed in a final volume of 50 μ L containing 100 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM NH_4Cl , 0.1 mg/mL Bovine Serum Albumin, 10 μ M [3H]SAM (0.87 Ci/mmol, Perkin Elmer) and 1.5 μ M of total tRNAs. Reaction was initiated by adding either 1.5 or 25 pmol of Trm9-Trm112 complex to the mixture. The samples were incubated at 37°C and aliquots were withdrawn at different time points. The reaction was stopped by precipitation with cold trichloroacetic acid (5%), followed by filtration on Whatman GF/C filters. The [3H] incorporation was measured using a Beckman Coulter LS6500 scintillation counter. For the pH dependence enzymatic assays, Tris-HCl buffer was replaced by MES (pH5 to 6.5) or MOPS (pH7 -7.5) buffers. The initial velocities (V_i) were calculated using the equation $C_{tRNA} = V_i*(1-\exp(-nt))/n$ where C_{tRNA} is the concentration of methylated tRNA, t the time in minutes, V_i the initial enzyme cycling velocity, and n the relaxation rate constant of V_i by fitting the experimental spots with the software ORIGIN according to Cao et al (31).

Results and Discussion

Structure of the *Y*Trm9-Trm112 complex.

The crystal structure of the *Y. lipolytica* complex formed by Trm112 and a truncated form of Trm9 (hereafter named *Y*Trm9N38) has been determined to 2.5Å resolution (Table S1, see SI for details). *Y*Trm9N38 adopts the typical fold of the class I SAM-dependent MTases composed of a central seven stranded β -sheet surrounded by two α -helices on each side (Fig.1A and Fig.S1). A twisted two-stranded antiparallel β -sheet (strands βA and βB) is inserted between strand $\beta 5$ and helix αE and forms a lid positioned on top of the C-terminal extremity of the central β -sheet. *Y*Trm112 is formed by a zinc binding domain made of two α -helices ($\alpha 1-2$) and a four-stranded antiparallel β -sheet as well as a helical domain of 3 α -helices ($\alpha 3$ to $\alpha 5$).

Trm9 binds mainly to Trm112 zinc-binding domain via a parallel β -zipper interaction formed by Trm9 strand $\beta 3$ and Trm112 strand $\beta 4$, which results in the formation of an extended eleven-stranded β -sheet (Fig.1B-C). Complex formation engages an interface area of 1160 Å^2 involving 20 and 21 residues from Trm112 and Trm9, respectively (Fig.S1). At the center of this interface, hydrophobic residues (M1, F8, V9, F43, M47, I119, P120 and F122) from

Trm112 contact hydrophobic side chains from Trm9 (V59, F78, V102, A110, P112 and F116), thereby shielding this Trm9 region from exposure to solvent (Fig.1B-C). This explains the need to express Trm112 with Trm9 in *E. coli* to obtain soluble and active Trm9 (13). This hydrophobic core is surrounded by several electrostatic interactions (see Table S2 for details). Among these, the β -zipper interaction is realized by two hydrogen bonds engaging main chain atoms from Trm9 V103 as well as P120 and F122 from Trm112 (Fig.1B). Other hydrogen bonds are formed by E100 from Trm9 with K2 and T5 from Trm112, by R115 from Trm9 with N7 and the carbonyl group of R50 from Trm112 and by A110 and E113 from Trm9 with Q10 from Trm112 (Fig.1B-C). Finally, a salt bridge is formed between Trm9 D117 and Trm112 R50. Among the Trm9 residues engaged in complex formation, E100, V102 and F116 from *Y*Trm9 correspond to N89, L91 and F105 from *Sc*Trm9, which substitutions by Lys, Arg and Glu, respectively, were previously shown to disrupt and inactivate the *Sc*Trm9-Trm112 complex (18). It is noteworthy that the truncation of residues 263 to 279 from *Sc*Trm9 resulted in loss of interaction with Trm112 (14). The corresponding residues from *Y*Trm9 (residues 214-234) constitute strands β 6 and β 7 and are not directly involved in Trm112 interaction. Hence, the loss of interaction with Trm112 most probably results from incorrect folding of this Trm9 truncated form.

Active site mapping

As we could not solve the structure of the Trm9-Trm112 complex bound to SAM, we have generated a model of the *Y*Trm9-Trm112-SAM complex, in which residues 20 to 45 from *Y*Trm9 fold as two α -helices (Fig. 1A; See SI for details). Mapping of the sequence conservation at the surface of this model reveals a patch of highly conserved residues centered on the SAM methyl group (Fig.1D). Several residues from this patch (H24, R29, K31, H115, H116, W145, Q149, W168, R241, Y243, D270 and N271; for clarity, *Sc*Trm9 numbering will be used in this paragraph as functional analysis were performed in *S. cerevisiae*, see Tables 1 and S3 for correspondence between *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica* numbering) or from other Trm9 regions (R122 and E148) were mutated into alanine to test their role in *S. cerevisiae* Trm9 activity. As a control, we have also considered the D72A catalytic mutant deficient in SAM binding (18). Mutations were introduced into the chromosomal copy of *S. cerevisiae* *TRM9* gene and the activity of these mutants was first tested *in vivo* using the zymocin assay. Eight mutants (R29A, D72A, H116A, W145A, W168A, R241A, Y243A and N271A) were resistant to zymocin indicating that they are inactive for tRNA modification (Table 1 and Fig.S2A). These mutants as well as two zymocin sensitive mutants (H115A and Q149A)

affecting residues directly oriented towards the putative active site were selected for further functional analyses. We have verified *in vivo* that the loss of activity of these mutants was not due to protein instability (Fig.S2B, compare input fraction for all mutants with WT enzyme) or disruption of Trm9-Trm112 complex (Fig.S2B), indicating further that these mutations might directly impact the enzymatic activity of the complex. All these complexes were expressed in *E. coli* and exhibited the same purification profile as the wild-type complex strongly suggesting that they are properly folded. We tested the enzymatic activity of these mutants *in vitro* using ³H-SAM and total tRNAs purified from *trm9Δ* strain as substrates. The D72A, W145A, W168A, and N271A mutants were totally inactive while the H116A, R241A and Y243A mutants exhibited 15-20% residual methylation activity compared to the *Sc*Trm9-Trm112 WT enzyme (Table 1). The specific activity of three mutants exhibiting a decreased but still appreciable enzymatic activity in this assay (R29A, H115A, and Q149A) was further investigated (Table 1). This revealed that the R29A mutant exhibits a 300-fold decrease in specific activity compared to WT while the H115A and Q149A mutants are only 80 and 20 times less active respectively. As the R29A mutant is zymocin resistant while H115A and Q149A mutants are not, this further indicates that the zymocin resistance phenotype *in vivo* can discriminate mutants with a decrease ranging from 80 to 300-fold in specific enzymatic activity. We next verified that the inactivation of these mutants did not result from defect in SAM binding using equilibrium dialysis (Table 1). As expected, the D72A mutant is inactive due to its complete loss of SAM binding capacity. The other mutants were still able to bind SAM although to different extent compared to WT complex. For these mutants, we do not observe any correlation between enzyme specific activity and SAM binding measurements, indicating that the decrease/loss of enzyme activity cannot be attributed to its reduced ability to bind SAM. Altogether, these results strongly suggest that the R29A, H116A, W145A, W168A, R241A, Y243A, N271A and to a lesser extend H115A and Q149A *Sc*Trm9 mutants affect enzyme activity due to the direct involvement of these residues in catalysis or in binding of tRNA substrate.

Substrate binding and catalytic mechanism

Our site-directed mutagenesis strategy on strictly conserved residues surrounding the SAM methyl group in the *Yl*Trm9N38-Trm112 crystal structure has led to the identification of several Trm9 residues crucial for formation of *mcm*⁵U34 in some tRNAs (Fig.1E). The Trm9-Trm112 complex catalyzes the O-methylation of the carboxylic function of the carboxymethyl group of *cm*⁵U34. Due to the nucleophilic property of oxygen atoms, it is

generally assumed that the methyl transfer reaction occurs through a direct $\text{S}_{\text{N}}2$ mechanism with the nucleophilic attack of the substrate (cm^5U) on the electrophilic SAM methyl group to form the methyl ester product (mcm^5U) and SAH (32). Although this transfer is considered to be direct, it requires the suitable positioning of both substrates for the nucleophilic attack of the carboxylate on the SAM methyl.

The comparison of previously described structures of MTases methylating carboxylic acids (*i.e.* TYW4 MTase, which is involved in the synthesis of wybutosine in Phe-tRNA (33), glutamate MTase CheR (34) and human LCMT-1, which modify the C-terminal leucine from PP2A (35)) shows that two structurally conserved residues, an Arg and a Tyr (respectively R73 and Y203 in human LCMT-1), point towards the SAM methyl group and are ideally positioned to orient the substrate carboxylic group through electrostatic interactions (Fig.S3A). In our structure, the strictly conserved *Y*Trm9 H127, corresponding to *Sc*Trm9 H116, which is very important for enzymatic activity, structurally matches with Y203 from LCMT-1 (Fig.S3B). The H127 side chain forms a hydrogen bond with Y193 (Y242 in *Sc*Trm9) carbonyl group from strand βB through its $\text{N}\delta 1$ atom whereas its $\text{N}\epsilon 2$ atom forms a hydrogen bond with a water molecule. This water molecule, also coordinated by H126 (*Sc*Trm9 H115), is 2.75Å away from the SAM methyl group and is very likely to occupy the position of one of the oxygen atoms from the cm^5U carboxylic group. In our structure, no basic residue exactly matches structurally with R73 from LCMT-1. However, our mutagenesis analysis has revealed that *Sc*Trm9 R29, which is located in the Trm9 region corresponding to LCMT-1 fragment encompassing R73 (Fig.S3B), is important for activity. We then propose that *Sc*Trm9 R29 could play the same role as R73 from LCMT-1. In *Y*Trm9, R40, corresponding to *Sc*Trm9 R29, is engaged in crystal packing and is oriented in an opposite direction relative to the active site. However, in our model of the *Y*Trm9 structure bound to SAM, we have oriented R40 towards the SAM methyl group. Its side chain could interact with the cm^5U carboxyl group and contribute to its correct positioning for methyl transfer (Fig.S3B). Both R40 and H127 residues in *Y*Trm9 would then be ideally positioned to participate in the catalysis and might play the same role as the R/Y dyad in TYW4, CheR and LCMT-1 active sites, *i.e.* positioning the substrate carboxylate group (cm^5U in the case of Trm9-Trm112) for the nucleophilic attack onto SAM methyl group.

From our hypothesis on the role of H127 in cm^5U positioning and if one considers that the cm^5U carboxylic group is mostly deprotonated at physiological pH, it is noteworthy that the catalytic activity of Trm9 should be dependent on the ability of H127 $\text{N}\epsilon 2$ to make a hydrogen bond with the carboxyl of cm^5U . As H127 $\text{N}\delta 1$ also acts as a hydrogen bond donor

to the Y193 carbonyl group, it implies that H127 N ϵ 2 atom should be protonated for efficient binding of cm⁵U. We have therefore tested the effect of pH on the *Sc*Trm9 catalyzed methylation reaction between pH 5 and pH 7.5 (Fig.1F). This reveals a narrow bell-shaped curve centered on pH 6.5 consistent with the involvement of a His side chain in the activity. If we assume that the pK_a of this imidazole is 6.5, it would also mean that a balanced ratio between imidazolium and imidazole species is critical for the activity. We then propose a reaction mechanism for *Sc*Trm9 where the R29/H116 pair participates in catalysis by orienting the cm⁵U carboxylate group for attack by the electrophilic SAM methyl group. To be more precise concerning the His of the R/H pair, its N ϵ 2 would get protonated prior to form a hydrogen bond with the carboxyl of the cm⁵U substrate. After the methyl transfer from SAM onto cm⁵U, the deprotonation of N ϵ 2 would facilitate the release of the reaction product mcm⁵U. On the contrary, N δ 1 would remain constantly protonated and be engaged in a stable interaction with Y243 main chain carbonyl.

Furthermore, we have manually docked a cm⁵U nucleotide into the *Yl*Trm9-Trm112 active site using constraints derived from the functional analyses of our mutants and also from the above discussed cm⁵U carboxyl group positioning (Fig.1E). In this model, N222 side chain (N271 in *Sc*Trm9) is ideally positioned to form bidentate hydrogen bonds with the O2 and N3 atoms from U34. Similarly, H126 (H115) could form a hydrogen bond with the O4 atom from U34. Altogether, these two conserved residues should be responsible for the specificity of Trm9 for uridine nucleotide at position 34. In addition, a slight reorientation of W156 side chain (W145) into the Trm9 active site would allow it to stack onto the U34 pyrimidine ring. R192 (R241) and Y29 (Y18, not mutated in this study) side chains are also within hydrogen bond distances from the cm⁵U carboxylic group. Finally, the W179 indole ring (W168 in *Sc*Trm9) is solvent-exposed and could stack against the ring of a nucleotide adjacent to U34. Last but not least, in this model, the U34 3' and 5' extremities are oriented outwards the active site and hence, this model is consistent with the binding of a tRNA molecule. Altogether, this model supports a role of these conserved residues in tRNA binding and proper orientation of the cm⁵U34 substrate into the active site. Unfortunately, for technical reasons, we could not determine affinity constants between these mutants and a cm⁵U-containing tRNA substrate. Unambiguous understanding of the role of these residues in Trm9 enzymatic activity will require further studies.

Comparison with other Trm112-MTase complexes

Trm112 interacts with and activates four MTases that adopt (Trm9, Mtq2 and Bud23) or are predicted to adopt (Trm11) the same fold. To date, we have determined the crystal structures of complexes between Trm112 and three MTase partners (Mtq2, Trm9 and Bud23; (18); this study and the accompanying paper (Létoquart et al)). Interestingly, all these 3 MTases interact in a very similar manner with Trm112 as illustrated by the superimposition of the *Yl*Trm9-Trm112 complex onto *Sc*Bud23-Trm112 (rmsd value of 2.1 Å) and *Ec*Mtq2-Trm112 complexes (rmsd value of 3 Å; Fig.2A-B). As expected from phylogenetic distance between these organisms, the Mtq2-Trm112 complex from the *E. cuniculi* parasite is the most divergent among the three complexes, and the two complexes formed by fungal proteins share more similarities. This comparison clearly indicates that the previously proposed competition between these MTases to interact with Trm112 is not due to slightly overlapping binding sites but due to MTases binding exactly the same region of Trm112. Although these structures are derived from complexes originating from different organisms, this offers the unique opportunity to compare their binding modes and to understand the molecular mechanisms allowing Trm112 to interact with four structurally similar MTases sharing less than 20% sequence identity within the same organism. We therefore generated a structure-based sequence alignment of these three Trm112-MTase complexes. If we only focus on the MTase proteins, we can extend this alignment by including the sequences of *Sc*Mtq2, *Sc*Trm9 and *Sc*Trm11 (Fig.2A). From this alignment, we assume that *Sc*Mtq2 and *Sc*Trm9 residues that align with *Ec*Mtq2 and *Yl*Trm9 residues involved in interaction with *Ec*Trm112 and *Yl*Trm112, respectively, are also engaged in the interaction with *Sc*Trm112. As previous studies have shown that over-expression of *Sc*Trm9 decreases the amount of *Sc*Trm11 immunoprecipitated with *Sc*Trm112 (14), we also assume that Trm11 and Trm112 interact the same way, although no structure of this complex is available yet. Hence, we consider that *Sc*Trm11 residues aligning with interface residues from the other MTases are engaged in the interaction with *Sc*Trm112 (Fig.2A).

The structural comparison between these Trm112-MTase complexes as well as the structure-based alignment of the MTase proteins allow us to identify several common features, which could explain the ability of Trm112 to interact with its four MTase partners. First, a β -zipper interaction is formed between strand β 4 from Trm112 and strand β 3 from the various MTases (Fig.2B). Such interaction mode implies formation of a hydrogen bond network between main chain atoms from both partners and hence is less altered by side chain variations at these positions of the four MTases. Second, Trm112 shields from the solvent a hydrophobic zone

on these three MTases. Although the side chains corresponding to this hydrophobic core in the four MTases from *S. cerevisiae* exhibit some degree of variation (Fig.2C), the hydrophobic character of this core is conserved thereby explaining Trm112 solubilizing effect on these MTases (stabilizing for Trm11). Finally, three electrostatic hot spots are conserved between fungal *ScBud23*-Trm112 and *YlTrm9*-Trm112 crystal structures. The first one involves E100 from *YlTrm9* (N89 from *ScTrm9*) that forms hydrogen bonds with K2 and T5 residues from *YlTrm112* (Table.S2; Fig.2D). *YlTrm9* E100 structurally matches with D94 from *ScBud23*, which is also engaged in hydrogen bonds with K2 and T5 residues from *ScTrm112*. In *ScMtg2* and *ScTrm11*, the corresponding residues are E101 and D268, respectively. Hence, in *S. cerevisiae*, the side chains found at this position of the four MTases have a similar size and possess a carbonyl group that can be engaged in hydrogen bonds with K2 and T5 from *ScTrm112*. This is supported by our earlier observation that the substitution of N89 by Lys in *ScTrm9* (in combination with L91R mutation) prevents complex formation and therefore inactivates Trm9 (18). The second structurally conserved hot spot is a salt bridge formed between *YlTrm9* D117 with *YlTrm112* R50 and between *ScBud23* D112 with *ScTrm112* R53 (Fig.2E). An Asp residue is conserved at this position in all MTases interacting with *ScTrm112* (Fig.2A) and we propose that a salt bridge between this Asp and *ScTrm112* R53 occurs in all these Trm112-Mtase complexes. We previously observed that although such interaction did not exist in the structure of the *EcMtg2*-Trm112 complex due to discrepancy in the Trm112 central domain containing this Arg residue, the *ScTrm112* R53E mutation strongly reduced the solubility and the stability of *ScMtg2* and resulted in complete loss of enzyme activity (18). The third hot spot consists in three hydrogen bonds formed by *YlTrm9* R115 side chain with N7 main chain and side chain carbonyl groups and R50 carbonyl group from *YlTrm112* (Fig.2E). In our structural alignment, a basic residue is not conserved at the position corresponding to *YlTrm9* R115 (T104 in *ScTrm9*, Q115 in *ScMtg2*, V284 in *ScTrm11* or S110 in *ScBud23*). However, the guanidinium group from *ScBud23* R107 occupies exactly the same position as the guanidinium group from *YlTrm9* R115 and forms the same hydrogen bonds network with the N7 (also N7 in *YlTrm112*) main chain and side chain carbonyl groups and the carbonyl group from *ScTrm112* R53 (R50 in *YlTrm9*). In our alignment, the residues corresponding to *ScBud23* R107 are K101 in *ScTrm9*, R280 in *ScTrm11* and R112 in *ScMtg2*, indicating that this interaction network can exist in all these *ScTrm112*-MTase complexes. Hence, these three crystal structures of Trm112-MTase complexes help us to understand in detail the structural plasticity that allows the small

Trm112 protein to interact through the same mechanism with four MTases adopting the same fold but sharing less than 20% sequence identity.

To go deeper into the understanding of Trm112 ability to interact with various MTases, we have tested whether *YlTrm9*, which shares 59% sequence identity with *ScTrm9*, could functionally complement for the deletion of *TRM9* gene in *S. cerevisiae* and therefore could form a hybrid complex with *ScTrm112*. First, we have performed enzymatic assays with the purified full-length *YlTrm9*-*Trm112* complex and tRNAs purified from *trm9Δ S. cerevisiae* strain as substrates. Although thirty times less active than the *Sc* complex *in vitro* (Table.S3), the *Yl* complex is indeed able to methylate cm^5U containing tRNAs from *S. cerevisiae* with a specific activity that should be associated with zymocin sensitivity phenotype *in vivo* (compare its specific activity and zymocin sensitivity phenotype with those of *ScTrm9* H115A mutant, Tables 1 and S3). A weakened interaction between *YlTrm9*-*Trm112* complex and *Sc*tRNA might explain the reduced enzymatic activity. Next, we have used an *in vivo* complementation approach in *S. cerevisiae* to characterize the biological activity of full length *YlTrm9*. Following the replacement of genomic *ScTRM9* gene by *YlTRM9* gene (under the control of the *ScTRM9* natural promoter), the plasmid-driven expression of *YlTrm112* renders the strain partially sensitive to zymocin, indicating that an active *YlTrm9*-*YlTrm112* complex can assemble and methylates *Sc*tRNAs *in vivo* (Fig.2F). In the absence of ectopic *YlTrm112* (*i.e.* in the presence of the sole endogenous *ScTrm112*), the strain is more resistant to zymocin indicating a defect in *YlTrm9* activity. As *YlTrm9* is proved to be efficiently expressed and active in *S. cerevisiae*, the latter phenotype observed could account for the lack of interaction between *YlTrm9* and *ScTrm112*. To test whether the likely competition between *YlTrm9* and *Sc* natural partners (*Bud23*, *Mtq2* and *Trm11*) for *ScTrm112* could be responsible for this phenotype, we considered the potential effect of increasing *ScTrm112* expression level on cell phenotype towards zymocin. Plasmid-driven expression of *ScTrm112* resulted in zymocin sensitivity level comparable to the one previously obtained with *YlTrm112* (Fig.2F). This indicates that *ScTrm112* (50% sequence identity with *YlTrm112*) is able to activate *YlTrm9* *in vivo* to a similar extent as *YlTrm112*. This most likely occurs through a direct interaction between *ScTrm112* and *YlTrm9* (59% and 79% sequence identity and similarity with *ScTrm9*). It should be noted that this chimeric *Yl-Sc* complex is probably less stable than the corresponding complex formed by proteins from the same organism as it is necessary to increase expression level of *ScTrm112* to enhance zymocin sensitivity. This is further supported by preliminary co-IP experiments showing that no *YlTrm9/ScTrm112* interaction

could be characterized using a routine protocol suitable for measuring *ScTrm9/ScTrm112* interaction.

Altogether, these results show that MTase-Trm112 binding mode is compatible with the formation of chimeric complexes between proteins from different organisms as illustrated by the ability of *ScTrm112* to activate *YlTrm9*, which shares 60% sequence identity with *ScTrm9*. This is further supported by the ability of ABH8 (and hTrm9L) and WBSCR22 human genes to partially complement the deletion of *TRM9* and *BUD23* genes in *S. cerevisiae*, respectively (20, 25).

Conclusion

The structure of the Trm9-Trm112 complex, which is involved in human diseases, combined with functional studies has allowed the mapping of its active site and enabled us to propose a model of the catalytic mechanism and binding mode of the cm⁵U moiety of the tRNA substrate. In addition, the detailed comparison of this structure to those of *ScBud23-Trm112* (accompanying paper) and of *EcMtq2-Trm112* complexes highlights that during evolution, sequences of all these proteins within the same organism have evolved in a concerted manner so as to maintain the Trm112 ability to interact with its MTase partners that share less than 20% sequence identity. Finally, as human orthologs of Trm9 are involved in cancer, the *YlTrm9-Trm112* structure can be a useful tool to rationalize the design of molecules with the goal to develop specific inhibitors, *i.e.* potential anti-cancer drugs.

Acknowledgements.

We are indebted to M. Argentini and D. Cornu for mass spectrometry analysis (SICaps, IMAGIF Platform, Gif/Yvette, France), to Dr V. Heurgué-Hamard for her help with MTase assay and for sharing with us plasmids and antibodies directed against *S. cerevisiae* Trm9-Trm112 complex. We thank Dr B. Séraphin and C. Faux, T. Johnson (NIMR, Mill Hill, London) and Dr K. Breunig and Dr R. Schaffrath for sharing reagents with us. We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities. This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS) including a specific support by the ATIP-AVENIR program [to M.G.], the European Union Sixth Framework program “3D-Repertoire” [LSHG-CT-2005-512028], the University Paris-Sud and Ecole Polytechnique. J.L. holds a PhD fellowship from the French Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

References.

1. Cantara WA, *et al.* (2011) The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue):D195-201.
2. Hopper AK & Phizicky EM (2003) tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev* 17(2):162-180.
3. Motorin Y & Helm M (2010) tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry* 49(24):4934-4944.
4. Johansson MJO & Bystrom AS (2005) Transfer RNA modifications and modifying enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing*, ed Grosjean H (Springer-Verlag, Heidelberg), pp 87-119.
5. Johansson MJ, Esberg A, Huang B, Bjork GR, & Bystrom AS (2008) Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Mol Cell Biol* 28(10):3301-3312.
6. Begley U, *et al.* (2007) Trm9-catalyzed tRNA modifications link translation to the DNA damage response. *Mol Cell* 28(5):860-870.
7. Huang B, Johansson MJ, & Bystrom AS (2005) An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA* 11(4):424-436.
8. Huang B, Lu J, & Bystrom AS (2008) A genome-wide screen identifies genes required for formation of the wobble nucleoside 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 14(10):2183-2194.
9. Frohloff F, Fichtner L, Jablonowski D, Breunig KD, & Schaffrath R (2001) *Saccharomyces cerevisiae* Elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Embo J* 20(8):1993-2003.
10. Glatt S, *et al.* (2012) The Elongator subcomplex Elp456 is a hexameric RecA-like ATPase. *Nat Struct Mol Biol* 19(3):314-320.
11. Fichtner L & Schaffrath R (2002) KTI11 and KTI13, *Saccharomyces cerevisiae* genes controlling sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol Microbiol* 44(3):865-875.
12. Kalhor HR & Clarke S (2003) Novel methyltransferase for modified uridine residues at the wobble position of tRNA. *Mol Cell Biol* 23(24):9283-9292.
13. Mazaurec MH, Dirick L, Purushothaman SK, Bjork GR, & Lapeyre B (2010) Trm112p is a 15-kDa zinc finger protein essential for the activity of two tRNA and one protein methyltransferases in yeast. *J Biol Chem* 285(24):18505-18515.
14. Studte P, *et al.* (2008) tRNA and protein methylase complexes mediate zymocin toxicity in yeast. *Mol Microbiol* 69(5):1266-1277.
15. Okada K, Muneyoshi Y, Endo Y, & Hori H (2009) Production of yeast (m2G10) methyltransferase (Trm11 and Trm112 complex) in a wheat germ cell-free translation system. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* (53):303-304.
16. Purushothaman SK, Bujnicki JM, Grosjean H, & Lapeyre B (2005) Trm11p and Trm112p are both required for the formation of 2-methylguanosine at position 10 in yeast tRNA. *Mol Cell Biol* 25(11):4359-4370.
17. Heurgue-Hamard V, *et al.* (2006) The zinc finger protein Ynr046w is plurifunctional and a component of the eRF1 methyltransferase in yeast. *J Biol Chem* 281(47):36140-36148.
18. Liger D, *et al.* (2011) Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 'hub' protein. *Nucleic Acids Res* 39(14):6249-6259.
19. Figaro S, *et al.* (2012) Trm112 is required for Bud23-mediated methylation of the 18S rRNA at position G1575. *Mol Cell Biol* 32(12):2254-2267.

20. Ounap K, Kasper L, Kurg A, & Kurg R (2013) The human WBSCR22 protein is involved in the biogenesis of the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *PLoS One* 8(9):e75686.
21. Sardana R & Johnson AW (2012) The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits. *Mol Biol Cell* 23(21):4313-4322.
22. White J, *et al.* (2008) Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. *Mol Cell Biol* 28(10):3151-3161.
23. Patil A, *et al.* (2012) Increased tRNA modification and gene-specific codon usage regulate cell cycle progression during the DNA damage response. *Cell Cycle* 11(19):3656-3665.
24. Patil A, *et al.* (2012) Translational infidelity-induced protein stress results from a deficiency in Trm9-catalyzed tRNA modifications. *RNA Biol* 9(7):990-1001.
25. Begley U, *et al.* (2013) A human tRNA methyltransferase 9-like protein prevents tumour growth by regulating LIN9 and HIF1-alpha. *EMBO Mol Med* 5(3):366-383.
26. Fu D, *et al.* (2010) Human AlkB homolog ABH8 Is a tRNA methyltransferase required for wobble uridine modification and DNA damage survival. *Mol Cell Biol* 30(10):2449-2459.
27. Songe-Moller L, *et al.* (2010) Mammalian ALKBH8 possesses tRNA methyltransferase activity required for the biogenesis of multiple wobble uridine modifications implicated in translational decoding. *Mol Cell Biol* 30(7):1814-1827.
28. Fu Y, *et al.* (2010) The AlkB domain of mammalian ABH8 catalyzes hydroxylation of 5-methoxycarbonylmethyluridine at the wobble position of tRNA. *Angew Chem Int Ed Engl* 49(47):8885-8888.
29. van den Born E, *et al.* (2011) ALKBH8-mediated formation of a novel diastereomeric pair of wobble nucleosides in mammalian tRNA. *Nat Commun* 2:172.
30. Shimada K, *et al.* (2009) A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression. *Cancer Res* 69(7):3157-3164.
31. Cao W & De La Cruz EM (2013) Quantitative full time course analysis of nonlinear enzyme cycling kinetics. *Sci Rep* 3:2658.
32. Schubert HL, Blumenthal RM, & Cheng X (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem Sci* 28(6):329-335.
33. Suzuki Y, Noma A, Suzuki T, Ishitani R, & Nureki O (2009) Structural basis of tRNA modification with CO₂ fixation and methylation by wybutosine synthesizing enzyme TYW4. *Nucleic Acids Res* 37(9):2910-2925.
34. Djordjevic S & Stock AM (1997) Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine. *Structure* 5(4):545-558.
35. Stanevich V, *et al.* (2011) The structural basis for tight control of PP2A methylation and function by LCMT-1. *Mol Cell* 41(3):331-342.
36. Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, & Ben-Tal N (2010) ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W529-533.

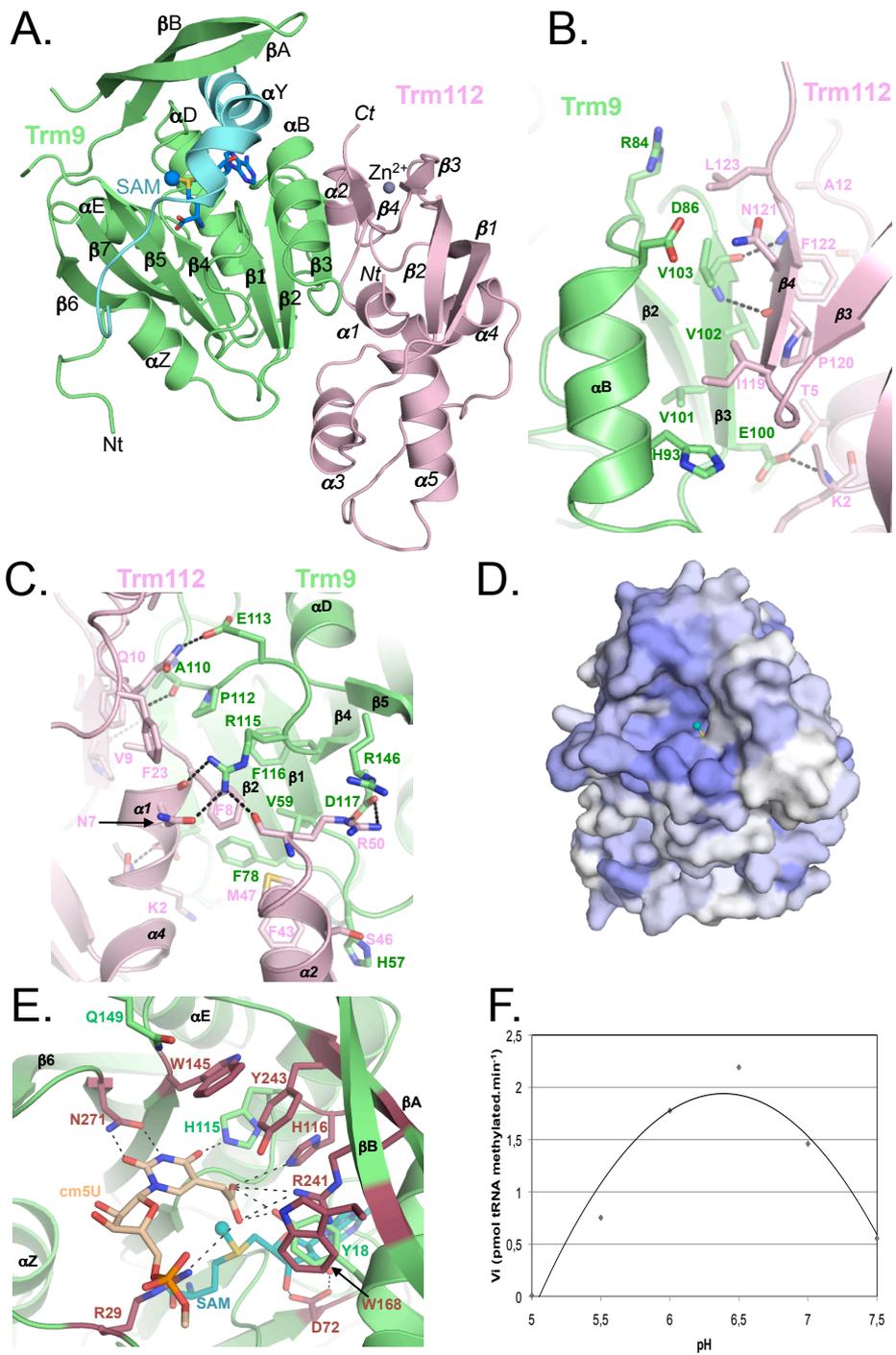
Figure legends:

Figure 1: Structure of the Y/Trm9-Trm112 complex.

- A. Ribbon representation of the *Y*Trm9N38-Trm112 complex. The modeled *Y*Trm9 fragment encompassing residues 20 to 39 (helix α Y) is shown in blue. The modeled SAM molecule is shown in sticks. *Y*Trm112 secondary structure elements are labeled in italics.
- B-C. Detailed views of the residues involved in *Y*Trm9N38-Trm112 interface. Hydrogen bonds and salt bridges are shown by black dotted lines.
- D. Mapping of the sequence conservation score at the surface of the *Y*Trm9-Trm112 model. Coloring is from grey (low conservation) to blue (highly conserved). The conservation score was calculated using the CONSURF server (36).
- E. Detailed representation of the *Y*Trm9 active site. Side chains from residues which substitution by Ala strongly (brown) or only weakly (green) affect enzymatic activity are shown as sticks. For clarity, *Sc*Trm9 numbering is used. A manually docked cm^5U nucleotide is shown as beige sticks and potential hydrogen bonds that it could form with Trm9 active site residues are depicted by dashed black lines. The modeled SAM molecule is shown as blue sticks and the methyl group to be transferred is shown as a sphere.
- F. pH dependence of *Sc*Trm9-Trm112 enzymatic activity.

Figure 2: Structural comparison of Trm112-MTase complexes

- A. Structure-based sequence alignment of MTases interacting with Trm112. Only regions of these MTases that interact with Trm112 are shown. Residues directly contacting Trm112 in the X-ray structures of the complexes are in white on a black background. Residues from *Sc*Trm9, *Sc*Trm11 and *Sc*Mtq2, matching with interface residues from *Y*Trm9 and *Ec*Mtq2, are shown in black on a yellow background. *Y*Trm9 secondary structure elements are depicted below the alignment. Stars below the alignment indicate residues strictly conserved in all 4 *Sc*MTases considered. Residues highlighted in panels C to E are boxed in red.
- B. Superimposition of the structures of the *Y*Trm9-Trm112, *Sc*Bud23-Trm112 and *Ec*Mtq2-Trm112 complexes.
- C-E. Detailed comparison of the hydrophobic core (C) and electrostatic hot spots (D & E) involved in *Y*Trm9-Trm112 and *Sc*Bud23-Trm112 complexes. Same color code as panel B.
- F. Effect of ectopic plasmid-driven expression of *Y*Trm112 (+p*Y*Trm112) and *Sc*Trm112 (+p*Sc*Trm112) proteins on the susceptibility to zymocin of *S. cerevisiae* expressing either *Sc*Trm9 (dark grey) or *Y*Trm9 (light grey) WT protein from the unique genomic copy of the corresponding gene under the control of *Sc**TRM9* natural promoter.



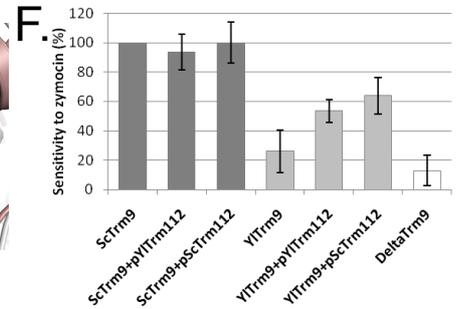
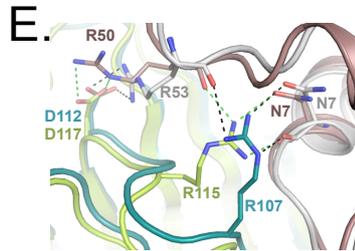
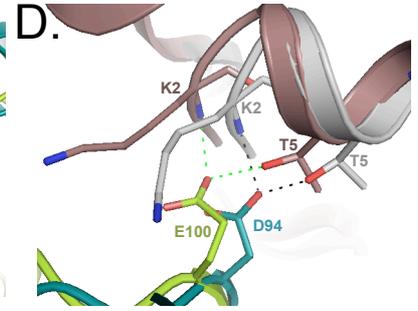
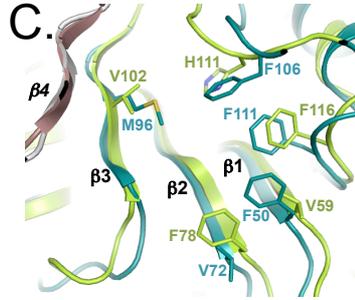
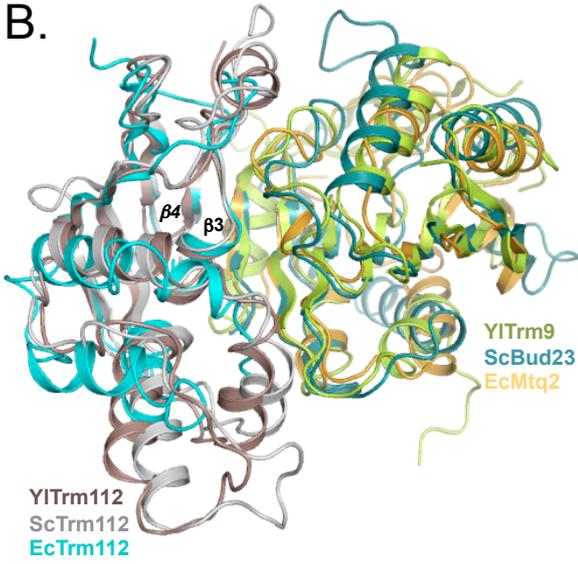
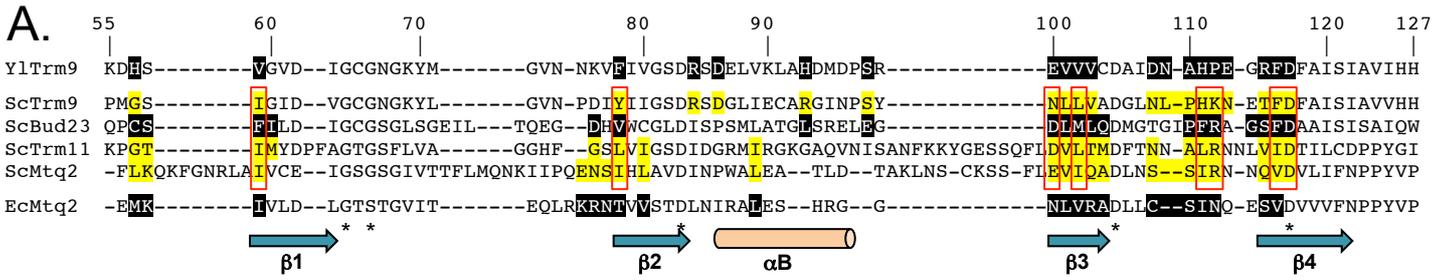


Table1: Functional and enzymatic analyses of Trm9 mutants

ScTrm9 mutants (<i>Y. lipolytica</i> numbering)	Zymocin sensitivity	Enzymatic activity relative to the WT (%)^a	Specific activity (fmol of tRNA methylated/min/pmol of enzyme)^b	SAM binding relative to WT (%)
WT	+	100	1560±394	100
R29A (<i>R40</i>)	-	33±2	5±1	93±21
D72A (<i>D83</i>)	-	0	ND	0
H115A (<i>H126</i>)	+	78±5	20±6	143±18
H116A (<i>H127</i>)	-	15±2	ND	51±5
W145A (<i>W156</i>)	-	0	ND	85±12
Q149A (<i>Q160</i>)	+	93±13	83±7	98±18
W168A (<i>W179</i>)	-	0	ND	46±16
R241A (<i>R192</i>)	-	14±4	ND	173±11
Y243A (<i>Y194</i>)	-	21±3	ND	126±11
N271A (<i>N222</i>)	-	0	ND	67±18

^a 8.1 pmol of tRNA methylated by 25 pmol of enzyme in 1 hour at 37°C is considered as 100%

^b Specific activity calculated from initial velocity – The kinetics were performed with 1.5 pmol of WT complex and with 25 pmol of ScTrm9-Trm112 mutants.

ND: Not Determined

Supplementary files

**Structural and functional insights into the Trm9-Trm112 tRNA modifying enzyme,
a potential target for cancer therapy.**

**Juliette L toquart^{1,2}, Vonny Caroline¹, Alexey Aleksandrov¹, Nouredine Lazar², Herman
van Tilbeurgh², Dominique Liger^{2,*} and Marc Graille^{1,2,*}**

¹ Laboratoire de Biochimie, CNRS, UMR 7654, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau Cedex,
France

² Institut de Biochimie et Biophysique Mol culaire et Cellulaire (IBBMC), CNRS UMR8619,
Universit  Paris Sud F-91405 Orsay Cedex, France

Corresponding authors:

Dominique Liger. Tel: +33 (0)169157968. Email: dominique.liger@u-psud.fr

Marc Graille. Tel: +33 (0)169334890. Email: marc.graille@polytechnique.edu

Materials and methods.

Yeast strains, media and growth conditions

Saccharomyces cerevisiae strain YPH499 (Agilent technologies) was used as the wild type host for all yeast gene manipulations. *Kluyveromyces lactis* AWJ137 and NK40 strains were used in zymocin killer assay (1).

Cultures were performed at 30°C in standard rich medium YEPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) or selective minimal media (SD) with 2% dextrose or galactose. Yeast was transformed by the lithium acetate method as previously described (2). For selection, YEPD was supplemented with geneticin (200 µg/mL) and SD minus uracil or tryptophan was prepared.

Yeast strains construction

For clone selection, three steps were systematically considered: growth on a selective media, PCR screening and DNA sequencing. For point mutation strain selection, the presence of the mutation was also investigated by restriction fragment length polymorphism prior to DNA sequencing.

Trm9 point mutant strains were generated using genomic DNA from strain YDL201 (YPH499 *TRM9::kanMX6*) as DNA template and the suitable Ftrm9/R1-trm9 set of primers for initial cassette amplification (3) and the technique already described (4) (Tables S4-5).

Clones expressing wild type or mutant Trm9-13Myc were obtained from transformation of the appropriate strain (encoding wild type or mutant Trm9) with PCR product amplified from pFA6a-13Myc-TRP1 plasmid as a template using F2-Trm9/R1-trm9 primer set (3).

The $\Delta trm9::URA3$ strain was obtained by transforming wild type strain with PCR product amplified from plasmid pESC-URA (Agilent Technologies) using F1-URA-trm9/R1-URA-trm9 primer set. Clones expressing *YTrm9* or *YTrm9N38* were obtained from a 5-FOA selection after transformation of $\Delta trm9::URA3$ strain with PCR product amplified from *Yarrowia lipolytica* genomic DNA as a template using respectively Ftrm9::YLTRM9 or Ftrm9::YLTRM9N38 / Rtrm9::YITRM9 primer sets (Table S5).

Zymocin killer assay

Filtered-sterile supernatants from overnight culture of *K. lactis* AWJ137 and NK40 were used as source of zymocin and as a control, respectively. Serial dilutions of the supernatants (from 10⁻¹ to 10⁻⁴) were prepared in fresh selective SD media with galactose as carbon source. 5mL sample of each dilution was inoculated at A_{600nm} of 0.1 with yeast strain to be tested. Cultures were incubated for 20 hours at 30°C. Growth inhibition was calculated from the ratio between the OD_{600nm} read for the 10⁻¹ and 10⁻⁴ dilutions. The 100% sensitivity to zymocin was obtained from the wild type strain.

Cloning expression and purification

A DNA sequence optimized for heterologous expression in *E. coli* was designed to encode *YlTrm112* (UniprotKB entry: Q6C4P5) and *YlTrm9* with a C-terminus 6His-tag (UniprotKB entry: Q6C999). This fragment was obtained by *de novo* gene synthesis (GenScript Corporation, Piscataway, NJ, USA) and was further subcloned into pET21-a between *NdeI* and *XhoI* sites. Two truncated forms of *YlTrm9* (*YlTrm9N19* and *YlTrm9N38* encompassing residues 19-324 and 38-324, respectively) were cloned in the same operon (Tables S6-7). These complexes were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) Gold (Novagen) in 800 mL autoinducing media (5) containing 10 μ M ZnCl₂ and 100 μ g/mL ampicillin, 5 hours at 37°C and 15 hours at 15°C.

Genes encoding wild type *ScTrm9* and *ScTrm112* were amplified from *S. cerevisiae* S288C genomic DNA and cloned into a modified pET28a and a pACYCDUET-1 plasmids, respectively (Tables S6-7). Genes encoding *ScTrm9* mutants were amplified from the genomic DNA isolated from YPH499 mutated strains and then cloned into pET21-a vector using *NdeI* and *NotI* restriction sites and introducing a C-terminal His₆ tag (Tables S6-7). The expression of the *ScTrm9*-*Trm112* complexes was done in *E. coli* BL21(DE3)Gold strain (Novagen) co-transformed with the two vectors and cultured in 1 L of 2YT medium containing 10 μ M ZnCl₂, 25 μ g/mL chloramphenicol and 100 μ g/mL ampicillin. Cultures were done at 37°C until OD₆₀₀ reached 0.5-0.6, they were then shifted to 20°C and protein production was induced overnight with IPTG (final concentration of 1mM).

Bacteria were harvested and resuspended in 30ml buffer A (20mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 5mM β -mercaptoethanol, 10 μ M ZnCl₂) and stored at -20°C. Cells were lysed by sonication and the soluble fraction was cleared by centrifugation (15,000g for 30 min at 4°C). All His₆ tagged complexes were purified by Ni-NTA chromatography (QIAGEN Inc.), followed by an ion-exchange chromatography (5 mL Heparin column for *Sc* complexes and *Yl* full length complex and 5mL MonoQ column for the *Yl* truncated forms (GE Healthcare)). The last purification step was performed on a Superdex 75 16/60 size-exclusion chromatography column (GE Healthcare) in buffer A.

Crystallization and structure solution

Crystals were grown after 3-4 days at 19°C from a mixture of *YlTrm9N38*-*Trm112* complex (10 mg/mL) with an equal volume of the crystallization solution containing 100mM tri-sodium citrate, 20% polyethylene glycol 4000 (PEG4K), 20% 2-propanol. Crystals were cryoprotected by transfer into the crystallization solution supplemented with 15 then 30% v/v ethylene glycol and then flash-frozen in liquid nitrogen. The datasets were collected on Proxima-1 beam line (SOLEIL, St Aubin,

France). The structure was solved by Zn-MAD (Multiple Anomalous Dispersion) using datasets collected at three wavelengths corresponding to inflexion, peak and remote of Zn-edge (see Table S1 for statistics). Data were processed with XDS (6) and scaled using XSCALE. The space group was I432 ($a=b=c=176.2\text{\AA}$) with one heterodimer per asymmetric unit, corresponding to a solvent content of 56.4%. As expected from the presence of one Trm112 protein in the asymmetric unit, one Zn atom could be located by the HYSS submodule of the PHENIX package in the 50-3Å resolution range (7, 8). Refinement of the Zn atom coordinates, phasing and density modification were performed with SHARP program using the 50-3Å resolution range (9). The *Sc*Trm112 crystal structure (10) was positioned into the experimental density maps by molecular replacement using the MOLREP program (11) and then modified to match with the *Y*Trm112 sequence. The Trm9 model was built into these maps using the COOT molecular modeling program (12). Iterative cycles of manual model rebuilding using COOT followed by refinement with PHENIX led to an almost complete model, which was then completed and refined using a higher resolution dataset (2.5 Å) to yield the final model (final R and R_{free} values of 19.9% and 24.2%, respectively). The statistics for data collection and refinement are summarized in Table S1. The final model contains residues 1 to 124 from Trm112, residues 39 to 160 and 172 to 233 from Trm9, a zinc atom and 91 water molecules. Due to the absence of electron density, the following regions are absent from the final model: residues 125-130 from Trm112 and 38, 161-171, 234 and the His₆ tag from Trm9. The atomic coordinates and structure factors have been deposited into the Brookhaven Protein Data Bank under accession numbers (4QTM).

tRNA purification

Total tRNAs were purified from *S. cerevisiae* Δtrm9 and Δelp1 strains (Δelp1 strain is a kind gift from Dr B. Seraphin, IGBMC, France). Yeast cells were grown in YEPD medium at 30°C until cell density reached 1 to 2×10^7 cells/mL. Cells were washed with water and harvested. The pellet was resuspended in one pellet volume of 0.9% NaCl then 2 volumes of phenol were added. The mixture was incubated on a rotating wheel for 30 minutes at room temperature. One volume of chloroform was added and the mixture was shaken for 15 minutes and then centrifuged for 20 minutes at 13000 rpm at 4°C. Aqueous phase was precipitated by 2.5 volumes of ethanol and 0.1 volume of 20% potassium acetate and washed with cold ethanol 95%. In order to remove bound amino acids, the precipitate was resuspended in 1.5mL of 2 M Tris-HCl pH 8 (for 10 g of cells) and incubated for 90 minutes at 37°C. After ethanol precipitation, the pellet was resuspended in 3.4 mL of 2 M lithium acetate, 0.1 M potassium acetate pH 5 (for 10 g of cells) to remove ribosomal RNAs as described previously (13). The mix was shaken for 20 minutes at 4°C and centrifuged at 8000g for 20 minutes

at 4°C. The pellet was extracted a second time with 1.7 mL of 2 M lithium acetate, 0.1 M potassium acetate pH 5. The pool of supernatants was dialyzed against 10 μ M magnesium acetate during 2.5 hours. The tRNAs were resuspended in 1 mM Tris pH 7.5, 10 mM magnesium acetate following ethanol precipitation.

Equilibrium dialysis

The equilibrium dialysis set up consists of two chambers separated by a 3 kDa-cut off dialysis membrane. The experiment was performed in the methylation buffer. Initially, the ligand chamber contains 100 μ M [3 H]SAM (0.87 Ci/mmol, Perkin Elmer) and the protein chamber 120 μ M of Trm9-Trm112 complex. After 3 hours rotation at 4°C, the SAM content of chambers is determined using a Beckman Coulter LS6500 scintillation counter.

Co-IP and western blot

The preparation of the soluble protein extracts and the co-immunoprecipitation assays were performed as previously described (2). Probing was performed using either mouse 9E10 anti-myc (Santa Cruz Biotechnology) or polyclonal rabbit anti-*Sc*Trm112 antibodies (Agrobio) as primary antibody (1/5,000 dilution). Sheep anti-mouse or sheep anti-rabbit HRP-conjugated IgG were used as secondary antibody (1/5000, GE Healthcare).

Generation of *Y*Trm9N20-Trm112 model

Residues 20 to 39 from *Y*Trm9, which are missing in the crystal structure of *Y*Trm9N38-Trm112 complex were modeled by superimposing the crystal structure of Rpa2492, the closest structural *Y*Trm9 homologue, (PDB code: 3E23) onto our structure. The SAM substrate and backbone atoms from residues 8 to 27 (corresponding to residues 20 to 39 from *Y*Trm9) were retained from the crystal structure 3E23. Missing side chains were placed using the SCWRL4 software (14). The cm^5U residue was docked manually into the *Y*Trm9 active site using constraints issued from the functional analysis of the various Trm9 mutants and by positioning the carboxyl group of cm^5U at a distance compatible with methyl transfer from SAM. Finally, as the loop containing R40 (corresponding to *Sc*Trm9 R39) is one residue shorter in *Y*Trm9 than the corresponding region from Rpa2492, which was used as a template to build this fragment, we applied a restraint with a force constant of 1000 kcal/mol/ \AA^2 between the carboxyl group of cm^5U and guanidinium group of R40 to position the side chain of this latter group towards the binding pocket. The atoms present in the crystal structure of *Y*Trm9 were restrained to the experimental crystallographic position with a force constant of 5 kcal/mol/ \AA^2 . The CHARMM27 force field was used (15, 16). The complex was

subsequently minimized in the CHARMM software (17) using the Powell algorithm and 10,000 steps of minimization.

Results.

Overall structure

To determine its crystal structure, we expressed in *Escherichia coli* and purified the Trm9-Trm112 complex from different organisms (*S. cerevisiae* (Sc), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Encephalitozoon cuniculi* (Ec) and *Y. lipolytica* (Yl)). Unfortunately, no crystals could be obtained from these complexes formed by full-length proteins. Analyses of these purified complexes stored at 4°C for several weeks by SDS-PAGE followed by mass spectrometry peptide mass fingerprint revealed degradation of the N-terminal extremity from YlTrm9. Therefore, two truncated YlTrm9 forms lacking residues 1-18 or 1-37 (hereafter named YlTrm9N19 and YlTrm9N38, respectively) were cloned, co-expressed with YlTrm112 and purified. Diffracting crystals were obtained for the YlTrm9N38-Trm112 complex and its structure was solved by the MAD method using the anomalous signal of the zinc atom bound to Trm112. The final model was refined to 2.5 Å and yielded R and R_{free} values of 19.9% and 24.2%, respectively (see Table S1 for details on crystallographic statistics).

In the YlTrm9N38-Trm112, the YlTrm112 structure is very similar to the crystal structures of ScTrm112 either in its free form or bound to Bud23 (rmsd of 1.21-1.38 Å; 49% sequence identity; (10); L etoquart et al; accompanying paper). The only major difference between YlTrm112 and free ScTrm112 results from a rearrangement of the C-terminal extremity from YlTrm112 (corresponding to residues F122 to L124). A similar rearrangement of this Trm112 region is also observed in the Mtq2-Trm112 and Bud23-Trm112 complexes and is required to avoid a steric clash between this Trm112 fragment and its MTase partner ((2); L etoquart et al; accompanying paper).

Model of the YlTrm9-Trm112-SAM complex

Despite extensive efforts, we could not obtain crystals of the YlTrm9N38-Trm112 complex bound to SAM or SAH. This was not due to decreased affinity of this truncated Trm9 protein for SAM as the YlTrm9N38-Trm112 complex binds SAM with the same affinity as the full-length complex (K_d of 27-34 μM as determined by ITC; Fig.S4A-B). We have then modeled a SAM molecule by superimposing onto YlTrm9 structure our SAM-bound structure of the ScBud23-Trm112 complex (rmsd of 2 Å over 134 Cα atoms; 19% sequence identity; L etoquart et al; accompanying paper). We have further observed that upon SAM binding, ScBud23 N-terminal region folds as an α-helix that

lies onto SAM. In addition, a similar α -helix is present in the structure of RPA2492 from *Rhodopseudomonas palustris*, the protein sharing the highest structural similarity with Trm9 (rmsd of 1.9Å over 200 C α atoms; 17% sequence identity; PDB code: 3E23). Finally, secondary structure predictions for the N-terminal region from Trm9 proteins strongly suggest that this region has indeed a high propensity to fold as an α -helix. Thus, we have generated a model of the *Y*Trm9-Trm112 complex bound to SAM, in which residues 20 to 45 from *Y*Trm9 fold as two α -helices (Fig. 1A). In this model, the side chains from *Y*Trm9 Y29 and F36 (*Sc*Trm9 Y18 and F25) match with RPA2492 Y17 and Y24, and are located onto SAM.

Table S1: Data collection and refinement statistics

	MAD			
Data collection	Peak	Inflexion	Remote	High resolution
Resolution (Å)	50-3 (3-3.15)	50-3.3 (3.3-3.5)	50-3.7 (3.7-3.97)	50-2.5 (2.5-2.65)
Wavelength (Å)	1.2819	1.2826	1.2753	0.9801
Space group	I432			I432
Unit cell parameters	a=b=c=176.4Å			a=b=c=176.2Å
Total number of reflections	397409	313980	65867	78802
Total number of unique reflections	16881	13348	9460	16239
Rsym (%) ^a	14.2 (61.7)	15.1 (53.6)	16.3(56.2)	6.9(50.1)
Completeness (%)	100 (100)	79 (100)	56 (99.9)	97.9 (98.3)
I/σ(I)	22.2 (6.2)	22.8 (7.7)	12.9 (4.1)	14.2 (2.6)
Redundancy	23.5	23.5	7	4.8
Refinement				
Resolution (Å)				2.5
R/R _{free} (%) ^b				19.9/24.2
R.m.s.d. bonds (Å)				0.009
R.m.s.d. angles (°)				1.193
Mean B factor (Å ²) prot/water				49.5(Trm9) 64.7(Trm112) 50.9(H ₂ O)
Ramachandran plot				
Most favored				87%
Allowed				13%

^a $R_{\text{sym}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_{hi} - \langle I_h \rangle|}{\sum_h \sum_i I_{hi}}$, where I_{hi} is the i^{th} observation of the reflection h , while $\langle I_h \rangle$ is the mean intensity of reflection h .

^b $R_{\text{factor}} = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$. R_{free} was calculated with a small fraction (5%) of randomly selected reflections.

Table S2: Details of the electrostatic interactions involved in *Y*Trm9N38-Trm112 and *Sc*Bud23-Trm112 interactions.

<i>Y</i> Trm9	<i>Y</i> Trm112	<i>Sc</i> Bud23	<i>Sc</i> Trm112
<i>Hydrogen bonds</i>		<i>Hydrogen bonds</i>	
		Cys48 O	Asn49 Nδ2
Glu100 Oε1	Lys2 N	Asp94 Oδ2	Lys2 N
Glu100 Oε1	Thr5 Oy1	Asp94 Oδ2	Thr5 Oy1
Val103 N	Pro120 O	Leu97 N	Pro126 O
Val103 O	Phe122 N	Leu97 O	Leu128 N
		Arg107 N	Phe8 O
Arg115 Nη2	Asn7 Oδ1	Arg107 Nη2	Asn7 Oδ1
Arg115 Nη1	Asn7 O	Arg107 Nε	Asn7 O
Arg115 Nη2	Arg50 O	Arg107 Nη2	Arg53 O
		Ser110 O	Arg53 Nη1
Ala110 O	Gln10 N	Pro105 O	Lys10 N
Glu113 Oε2	Gln10 Nε2		
		Glu92 O	Lys2 Nζ
<i>Salt bridges</i>		<i>Salt bridges</i>	
		Arg139	Asp17
Asp117	Arg50	Asp112	Arg53

Interactions formed between structurally matching residues from both complexes are shown on the same line.

Table S3: Functional and enzymatic analysis of Trm9 mutants

Trm9 mutants (<i>Y. lipolytica</i> numbering)		Zymocin sensitivity	Relative activity to the WT (%) ^a	Specific activity (fmol of tRNA methylated/min/pmol of enzyme) ^b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WT	+	100	1560±394
	H24A (<i>H35</i>)	+	ND	ND
	K31A (<i>K42</i>)	+	ND	ND
	R122A (<i>R133</i>)	+	ND	ND
	E148A (<i>E159</i>)	+	ND	ND
	D270A (<i>D221</i>)	+	ND	ND
<i>Yarrowia lipolytica</i>	WT	±	101±6	53±8

^a 8.1pmol of tRNA methylated by 25 pmol of enzyme in 1 hour at 37°C is considered as 100%.

^b Specific activity calculated from initial velocity. The kinetics were performed with 1.5 pmol of WT enzyme and with 25 pmol of mutated enzymes and for *Y. lipolytica* complexes
ND: Not Determined

Table S4: Yeast strains

Strains	Genotype	Source
<i>Kluyveromyces lactis</i>		
AWJ137	α <i>leu2 trp1</i> [k1+k2+]	K. Breunig (University of Halle, Germany)
NK40	α <i>ade1 ade2 leu2</i> [k2+]	R. Schaffrath (University of Leicester, UK)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
YPH499	MATa <i>ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-Δ63 his1-Δ200 leu2-Δ1</i>	Agilent Technologies
YDL201	YPH499 <i>TRM9::kanMX6</i>	This study
YDL202	YPH499 <i>TRM9(D72A)::kanMX6</i>	This study
YDL203	YPH499 <i>TRM9(N89K/L91R)::kanMX6</i>	This study
YDL204	YPH499 <i>TRM9(F105E)::kanMX6</i>	This study
yMG42	YPH499 <i>TRM9(H115A)::kanMX6</i>	This study
yMG43	YPH499 <i>TRM9(H116A)::kanMX6</i>	This study
yMG44	YPH499 <i>TRM9(R29A)::kanMX6</i>	This study
YDL205	YPH499 <i>TRM9(R241A)::kanMX6</i>	This study
YDL301	YPH499 <i>TRM9(W145A)13myc::kanMX6 TRM112- 3HA::TRP1</i>	This study
YDL302	YPH499 <i>TRM9(Q149A)13myc::kanMX6 TRM112- 3HA::TRP1</i>	This study
YDL303	YPH499 <i>TRM9(W168A)13myc::kanMX6 TRM112- 3HA::TRP1</i>	This study
YDL304	YPH499 <i>TRM9(Y243A)13myc::kanMX6 TRM112- 3HA::TRP1</i>	This study
YDL305	YPH499 <i>TRM9(N271A)13myc::kanMX6 TRM112- 3HA::TRP1</i>	This study
yMG45	YPH499 Δ <i>trm9::URA3</i>	This study
yMG46	YPH499 Δ <i>trm9::kanMX6</i>	This study
yMG47	YPH499 Δ <i>trm9::YITRM9</i>	This study
yMG48	YPH499 Δ <i>trm9::YITRM9DN37</i>	This study
yMG5	YPH499 + empty pESC-URA	This study

yMG41	yMG46 + empty pESC-URA	<i>This study</i>
yMG6	yMG47 + empty pESC-URA	<i>This study</i>
yMG15	YPH499 + pMG571	<i>This study</i>
yMG40	yMG46 + pMG571	<i>This study</i>
yMG1	yMG47 + pMG571	<i>This study</i>
yMG37	YPH499 + pU-FSc112	<i>This study</i>
yMG38	yMG46 + pU-FSc112	<i>This study</i>
yMG39	yMG47 + pU-FSc112	<i>This study</i>
yMG24	YPH499 <i>TRM9(H115A)</i> -11Myc:: <i>TRP1</i>	<i>This study</i>
yMG25	YPH499 <i>TRM9(H116A)</i> -13Myc:: <i>TRP1</i>	<i>This study</i>
yMG23	YPH499 <i>TRM9(R29A)</i> -13Myc:: <i>TRP1</i>	<i>This study</i>
yMG29	YPH499 <i>TRM9(R241A)</i> -11Myc:: <i>TRP1</i>	<i>This study</i>
BSY2534	BMA64 MATa ade 2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1Δ ura3-1 can1-100 Δelp1::KanR	<i>From C. Faux and B. Séraphin</i>

Table S5: Primers for yeast constructions

Oligonucleotide	Sequence
F2 Trm9 (13myctagging)	5'CTTCGAGCGCGACAATTGGTGGGTGGTGGCCCAAGAGA CGGATCCCCGGGTAAATTA 3'
F2-YITrm9(13myctagging) oMG220	5'TAATTGGTGGGTGGTAGCCAAGAGAGGTGACGATTGGAGT CGGATCCCCGGGTAAATTA 3'
F3 Trm9	5'CTTCGAGCGCGACAATTGGTGGGTGGTGGCCCAAGAGA TGAGGCGCGCCACTTCTAAA 3'
Ftrm9D72A	5'GGAGTGAACCTGATATATATATTATCGGTTCA <u>GCG</u> GCT CAGATGGTCTTATTGAGTGC 3'
Ftrm9N89K+L91R	5'GCCAGAGGAATAAACCCATCGTATA <u>AAATTA</u> <u>CGG</u> GTGGCA GACGGGCTGAACCTACCACAC 3'
Ftrm9F105E	5'CTGAACTTACCACACAAAAACGAAACA <u>GAA</u> GACTTCGCCA TCTCAATTGCTGTAGTGCAT3'
Ftrm9 R29A	5'GTGTATAATGAGATAGCTCCGCATTTCTCGCAA <u>ACTGCAT</u> ATAAGCCATGGCCCATAGTG 3'
Ftrm9 R241A	5'GATCAAGAACAGGAAAGAGAAGAGGTAAAATAC <u>GCGTAC</u> TATCACTTATACCGAGAGGGC 3'
Ftrm9 H115A	5'AACATTTGACTTCGCCATCTCAATTGCTGTAGT <u>GGCTCACT</u>

	GGTCTACAAGGGAGAGACG 3'
Ftrm9 H116A	5' AACATTTGACTTCGCCATCTCAATTGCTGTAGTGCAT <u>GCGT</u> GGTCTACAAGGGAGAGACG 3'
oMG197 (Ftrm9 W145A)	5' AAGCTACGTCAGGGCGGACAAGCATTAAATATATTGTGCGG CTCTAGAACA GGGCAGCTCC 3'
oMG199 (Ftrm9 Q149A)	5' GCGGACAAGCATTAAATATATTGTTGGGCTCTAGAAG <u>C</u>CGG CAGCTCCCGT AGAGGTTACC 3'
oMG198 (Ftrm9 W168A)	5' TACCATGAAGGTATGGAGCAAGATGTCTTTGTCCCC <u>G</u>CGG TTCTCCCAA GAGTAAATCC 3'
oMG200 (Trm9 N271A)	5' GGCCTGCCGTTTCATAGTGAGGGCTTCGAGCGCGAC <u>G</u>CTT GGTGGGTGGTGGCCAGAAG 3'
oMG201 (Trm9 Y243A)	5' ATCAAGAACAGGAAAGAGAAGAGGTAAAATACCGgTAC <u>G</u> <u>C</u>T CACTTATACCGAGAGGGCG 3'
R1-trm9	5' CCTGCTGCTACAAAATACACTGTCTACCTATATATCACCTG AATTCGAGCTCGTTTAAAC3'
Nucleotides corresponding to introduced mutations are underlined and in bold	
F1-URA-trm9 (deletion)	5' AGGTCTCGAAGAGCCAAGAAATAAAAAGGTTAAGAACCAA CTAACTATGCGGCATCAGAGC 3'
R1-URA-trm9 (deletion)	5' CCTGCTGCTACAAAATACACTGTCTACCTATATATCACCTC CTGATGCGGTATTTTCTCC 3'
F1-URA-trm112 (deletion)	5' TCTCTTCGGCTCTACACATCATATTACTAGCCTAGTCAACT AACTATGCGGCATCAGAGC 3'
R1-URA-trm112 (deletion)	5' TTTTCGTCTT GCGTGCCACACACAGAGATCTCGCTTGAT CCTGATGCGGTATTTTCTCC 3'
Ftrm9::YLTRM9	5' AGGTCTCGAA GAGCCAAGAAATAAAAAGGTT AAGAACCAACATGGTGGTTCGAATCGGTGCC 3'
Ftrm9::YLTRM9DN38	5' AGGTCTCGAA GAGCCAAGAA ATAAAAGGTT AAGAACCAACATG AACACGCGAT ACAAGCCGTG 3'
Rtrm9::YLTRM9	5' CCTGCTGCTACAAAATACACTGTCTACCTATATATCACCTT CAACTCCAATCGTCACCTC 3'
F1Trm9 (deletion)	5' AGGTCTCGAAGAGCCAAGAAATAAAAAGGTTAAGAACCAA CCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3'

Table S6: Primers for plasmid constructions

Oligonucleotide	Sequence
oMG5- F-BamH1-Trm112Y1 (pESC-URA cloning)	5'GGGGGATCCATGAAATTCCTGACCTCAAACCTTCG 3'
oMG6-R-NheI-Trm112Y1 (pESC-URA cloning)	5' GGGGCTAGCTTAGGCAGCCAGGTGCGGGCGGC 3'
F-NcoIYITrm9N18	5'GGGCCATGGATAATGAACAGCAGCACGTCC 3'
F-NcoIYITrm9N37	5'GGGCCATGGCAAATACCCGCTATAAACCGTGG 3'
R-XhoIYITrm9	5'GGGCTCGAGTCAATGGTGATGGTGATGGTG 3'
F-NdeITrm9	5'GCGCATATGGAGATAAACCAAGCGGCTGA 3'
R-NotITrm9his	5'CTAGCGGCCGCTCAGTGATGGTGATGGTGATGTCTCTTC TGGGCC 3'
oMG196 (N271A Reverse)	5'ACCCACCAAG <u>CG</u> TCGCGCTCGAAGCCCTCA 3'
oMG195 (N271A Forward)	5' GAGCGCGAC <u>GCT</u> TTGGTGGGTGGTGGCCAG 3'
oMG194 (Y243A Reverse)	5' TATAAGTGAG <u>GCG</u> TATCGGTATTTTACCTCT 3'
oMG193 (Y243A Forward)	5' TACCGATAC <u>GCT</u> CACTTATACCGAGAGGGC 3'
oMG192 (W168A Reverse)	5' GGAAGAACC <u>GCG</u> GGGGACAAAGACATCTTGC 3'
oMG191 (W168A Forward)	5' TTTGTCCCC <u>GCG</u> GTTCTTCCCAAGAGTAAA 3'
oMG190 (Q149A Reverse)	5' GAGCTGCCC <u>GCT</u> TCTAGAGCCCAACAATAT 3'
oMG189 (Q149A Forward)	5' GCTCTAGAAG <u>GCG</u> GGGCAGCTCCCGTAGAGGT 3'
oMG188 (W145A Reverse)	5' TCTAGAGCC <u>GCA</u> CAATATATTAATGCTTGT 3'
oMG187 (W145A Forward)	5' ATATATTGT <u>GCG</u> GCTCTAGAACAGGGCAGC 3'

Nucleotides corresponding to introduced mutations are underlined and in bold

Table S7: plasmids

Plasmid name	Background	Gene cloned
pMG546	pET21a	<i>YITRM112-TRM9-His₆</i>
pMG547	pET21a	<i>YITRM112-TRM9N19-His₆</i>
pMG548	pET21a	<i>YITRM112-TRM9N38-His₆</i>
pMG513	pACYCDUET-1	<i>ScTRM112</i>
pMG540	pET28a	<i>ScTRM9</i>
pMG576	pET21a	<i>ScTRM9-His₆</i> R241A mutant
pMG577	pET21a	<i>ScTRM9-His₆</i> R29A mutant
pMG579	pET21a	<i>ScTRM9-His₆</i> D72A mutant
pMG580	pET21a	<i>ScTRM9-His₆</i> H115A mutant
pMG581	pET21a	<i>ScTRM9-His₆</i> H116A mutant
pMG625	pET28a	<i>ScTRM9-His₆</i> W145A mutant
pMG626	pET28a	<i>ScTRM9-His₆</i> Q149A mutant
pMG627	pET28a	<i>ScTRM9-His₆</i> W168A mutant
pMG628	pET28a	<i>ScTRM9-His₆</i> Y243A mutant
pMG629	pET28a	<i>ScTRM9-His₆</i> N271A mutant
pMG571	pESC-URA	<i>YITRM112</i> under P _{GAL1} control
pU-FSc112	pESC-URA	<i>FLAG-ScTRM112</i> under P _{GAL10} control

Legends to supplementary figures.

Figure S1: Trm112 sequence alignment.

A. Sequence alignments of Trm9 orthologs from *Y. lipolytica* (*YlTrm9*), *Homo sapiens* (ABH8) and *S. cerevisiae* (*ScTrm9*). Strictly conserved residues are in white on a black background. Partially conserved amino acids are boxed. Secondary structure elements assigned from the *YlTrm9N38* crystal structure are indicated above the alignment. Black stars indicate residues involved in complex formation. Filled or open circles below the alignment indicate residues, which mutation into Ala results in zymocin resistance or sensitivity, respectively. For clarity, both *YlTrm9* and *ScTrm9* numbering are indicated. Two regions corresponding to fragments present only in *ScTrm9* or ABH8 have been omitted. This figure was generated using the ESPript server (18).

B. Sequence alignments of Trm112 orthologs from *Y. lipolytica*, *Homo sapiens* and *S. cerevisiae*. Strictly conserved residues are in white on a black background. Partially conserved amino acids are boxed. Secondary structure elements assigned from the *YlTrm112* crystal structure are indicated above the alignment. Black stars indicate residues involved in complex formation. This figure was generated using the ESPript server (18).

Figure S2 Functional analyses of *S. cerevisiae* Trm9 mutant strains.

A. Analyses of the zymocin phenotype of these strains by eclipse assay. Each *S. cerevisiae* mutated strain was subjected to killer eclipse assay with the *Kluyveromyces lactis* AWJ137 killer strain (top) and the *Kluyveromyces lactis* NK40 non-killer strain (as a control, bottom). The presence or absence of an eclipse around the killer strain shows the sensitivity or resistance of the mutated strain to zymocin toxin, respectively. Resistant and sensitive strains are labeled in red and green, respectively.

B. Effect of Trm9 mutations on *ScTrm9/ScTrm112 in vivo* interaction. Soluble protein extracts (Input: 1/50th of total proteins, *i.e.* 10 µg) and immunoprecipitates (IP: 1/10th of immunoprecipitated material) were subjected to 15% SDS–PAGE analysis and immunoblotted using mouse anti-Myc (Trm9-13Myc) or rabbit anti-Trm112 as primary antibodies and sheep anti-mouse or sheep anti-rabbit HRP-conjugated IgG as secondary antibodies, respectively. Note that for the anti-myc probing, the lower bands observed in some of the input lanes result from Trm9-myc protein degradation whereas the band observed in the IP lanes comes from mouse primary antibody heavy chain cross-reacting with anti-mouse secondary antibody.

Figure S3: Comparison of structures of SAM-dependent MTases modifying carboxylic functions.

A. The SAM analog used to trap the C subunit of human PP2A (cyan) in LCMT-1 active site is shown in yellow sticks. For clarity, only R73 and Y203 from LCMT-1 are labeled.

B. Superimposition of LCMT-1 (pink) bound to PP2A (cyan) onto our model of *YlTrm9*-Trm112 (orange). *YlTrm9* numbering is used.

Figure S4: Truncation of *YlTrm9* N-terminal residues does not affect SAM binding to the *YlTrm9*-Trm112 complex.

The *YlTrm9*-Trm112 full-length (A) and *YlTrm9N38*-Trm112 (B) complexes at 100µM were titrated by 20 successive injections of 2µL SAM (1.2mM) at 20°C. The stoichiometry (N), affinity

constant (K), ΔH and ΔS values obtained with the ORIGIN program using a one binding site model are indicated in the inset. K_d values were calculated using the $K_d=1/K$ relationship.

References.

1. Wolf K, Breunig K, & Barth G (2003) Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology : practical protocols (Springer, Berlin ; New York) pp xxvi, 494 p.
2. Liger D, *et al.* (2011) Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 'hub' protein. *Nucleic Acids Res* 39(14):6249-6259.
3. Longtine MS, *et al.* (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(10):953-961.
4. Toulmay A & Schneiter R (2006) A two-step method for the introduction of single or multiple defined point mutations into the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23(11):825-831.
5. Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41(1):207-234.
6. Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26:795-800.
7. Adams PD, *et al.* (2002) PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58(Pt 11):1948-1954.
8. Schneider TR & Sheldrick GM (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58(Pt 10 Pt 2):1772-1779.
9. Bricogne G, Vonrhein C, Flensburg C, Schiltz M, & Paciorek W (2003) Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59(Pt 11):2023-2030.
10. Heurgue-Hamard V, *et al.* (2006) The zinc finger protein Ynr046w is plurifunctional and a component of the eRF1 methyltransferase in yeast. *J Biol Chem* 281(47):36140-36148.
11. Vagin A & Teplyakov A (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* 30:1022-1025.
12. Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2126-2132.
13. Avital S & Elson D (1969) A convenient procedure for preparing transfer ribonucleic acid from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 179(2):297-307.
14. Krivov GG, Shapovalov MV, & Dunbrack RL, Jr. (2009) Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. *Proteins* 77(4):778-795.
15. Foloppe N & MacKerell JAD (2000) All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *Journal of Computational Chemistry* 21(2):86-104.
16. MacKerell AD, *et al.* (1998) All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins, \ddagger . *The Journal of Physical Chemistry B* 102(18):3586-3616.
17. Brooks BR, *et al.* (2009) CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 30(10):1545-1614.
18. Gouet P, Robert X, & Courcelle E (2003) ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 31(13):3320-3323.

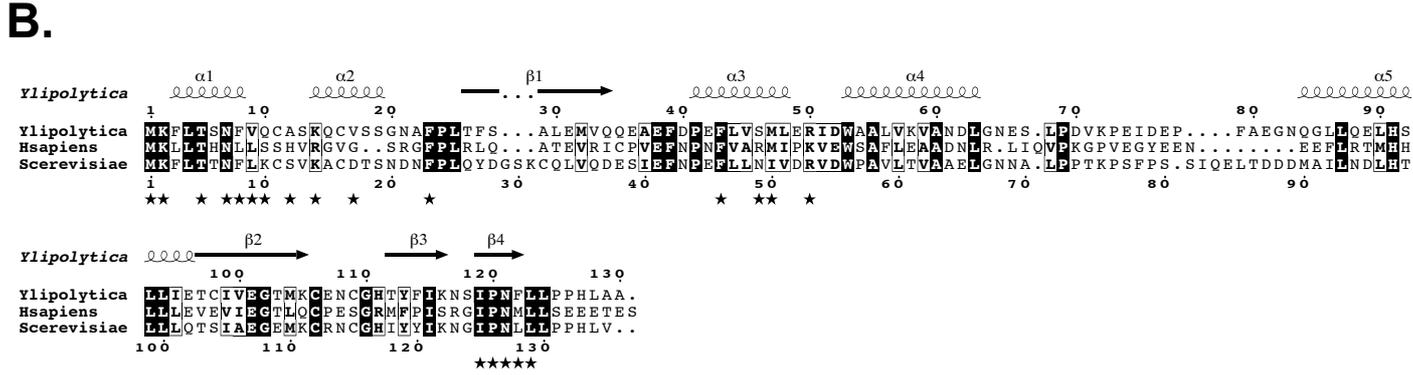
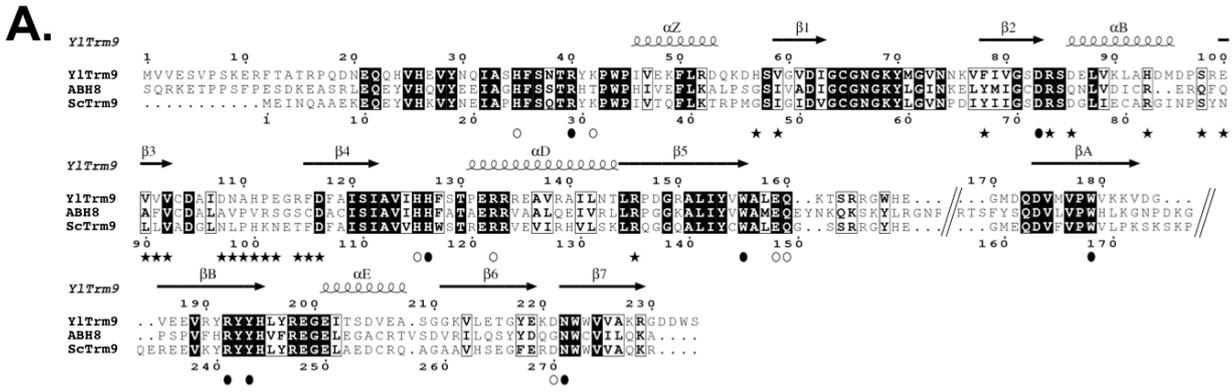
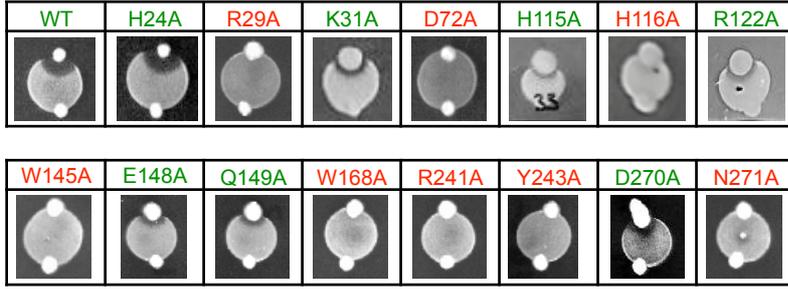


Figure S1

A.



B.

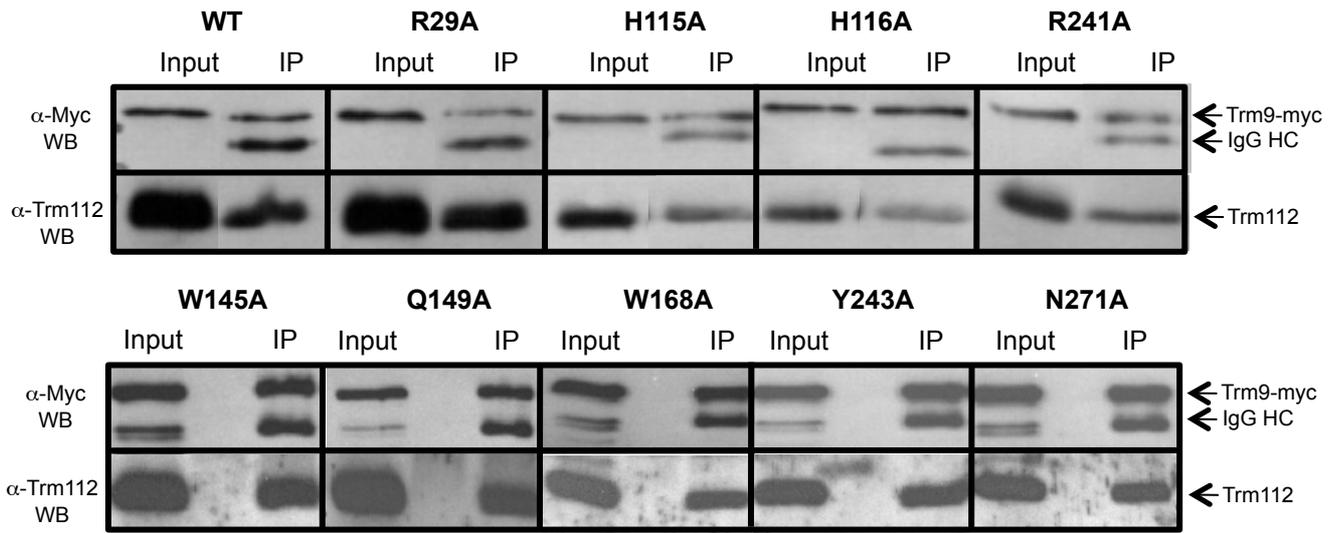


Figure S2

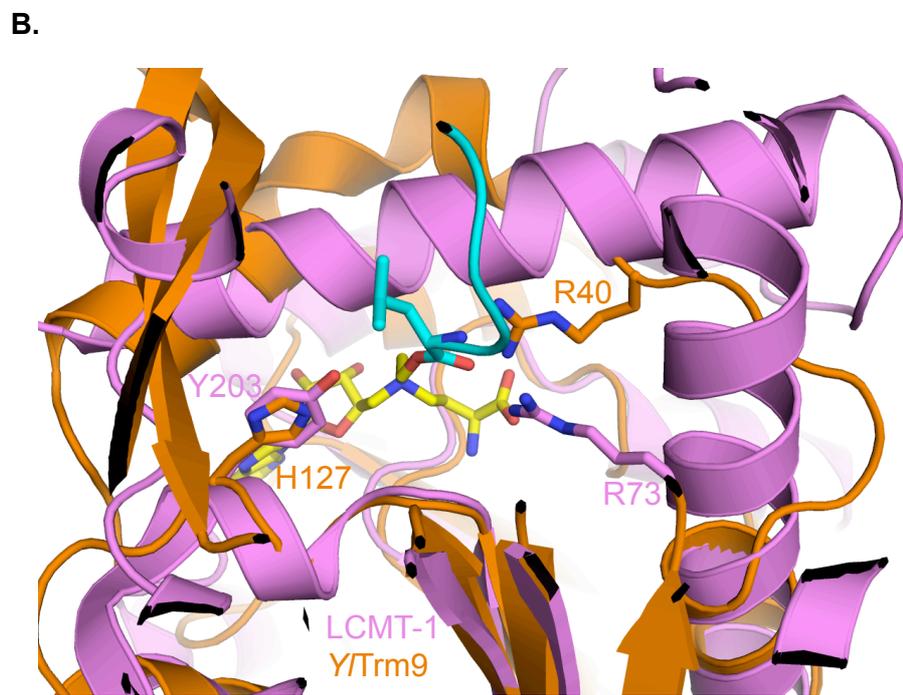
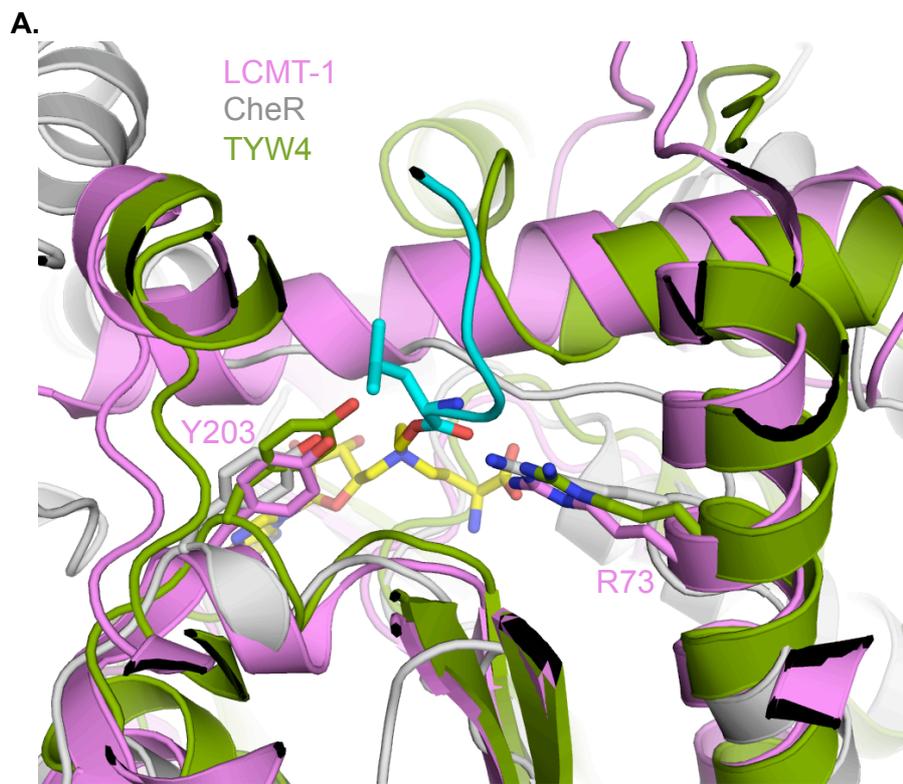
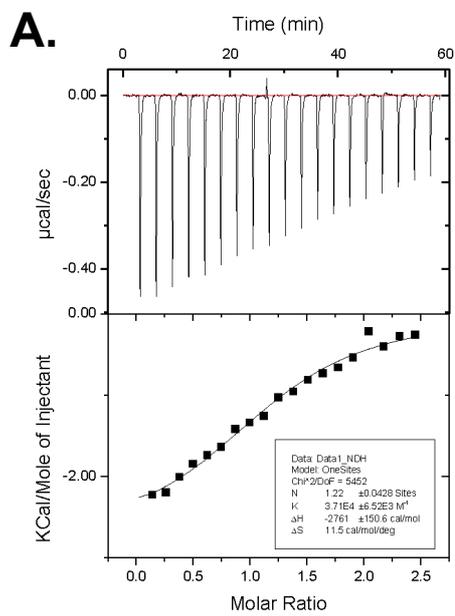
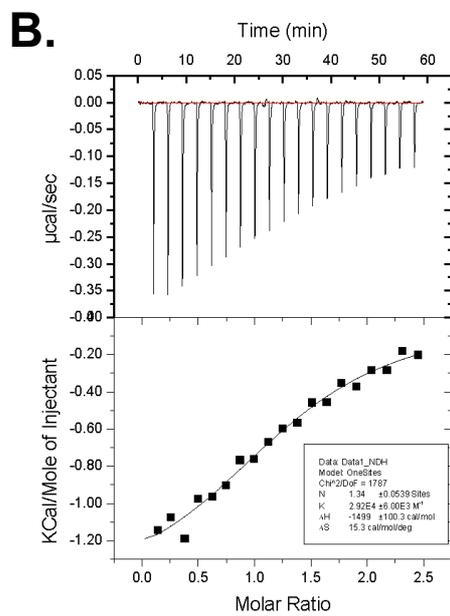


Figure S3



$K_d = 27\mu\text{M}$



$K_d = 34\mu\text{M}$

Figure S4

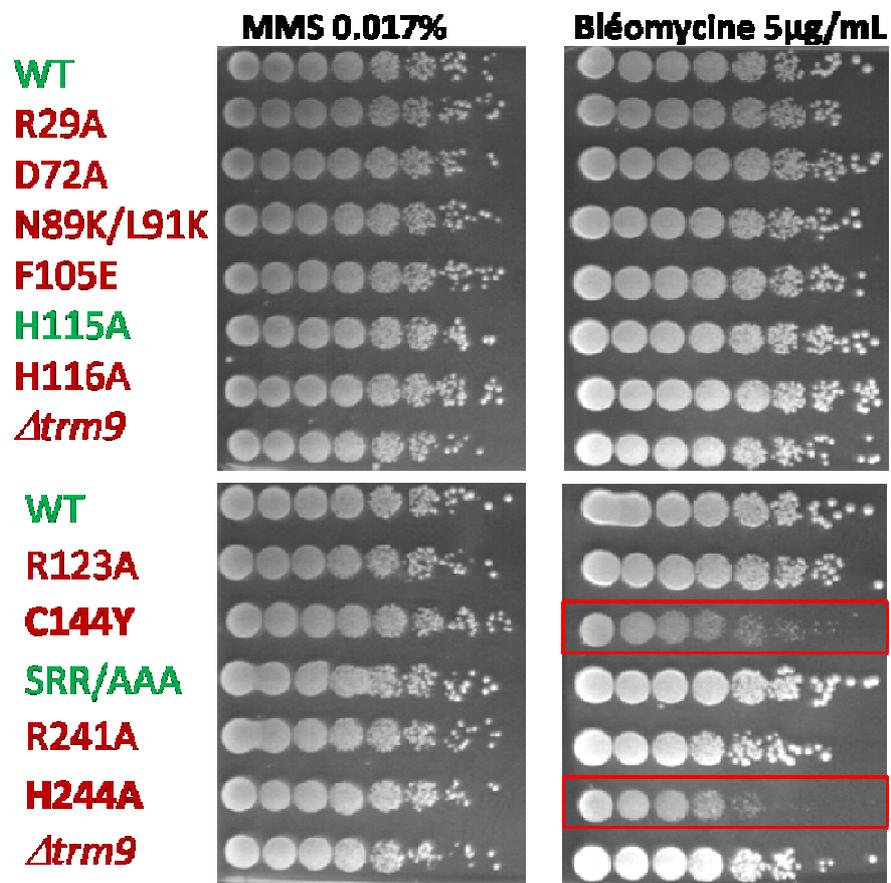


Figure 84 : Effet des drogues sur le phénotype de croissance des souches mutantes.

Les mutations des résidus de Trm9 sont indiquées à gauche. WT représente la souche sauvage. Le code couleur correspond aux résultats des tests zymocine. Les souches ne présentant pas de phénotype de résistance à la zymocine sont en vert, et celles présentant un phénotype de résistance à la zymocine sont en rouge.

4. EFFET DES DROGUES ET STRESS GENOTOXIQUES

La délétion du gène *TRM9* dans une souche de *Sc* provoque un défaut de croissance en présence de certaines drogues telles que le MMS, la bléomycine et l'hydroxyurée (Kalhor & Clarke, 2003; Begley *et al*, 2007).

4.1. EFFET DU MMS ET DE LA BLEOMYCINE SUR LA CROISSANCE

L'effet du MMS et de la bléomycine sur la croissance de certaines souches mutantes a été analysé (figure 84). Aucun phénotype de défaut de croissance n'est observé en présence de MMS même pour la souche $\Delta trm9$. Par contre, en présence de bléomycine, les souches possédant les versions mutées C144Y et H244A de Trm9 présentent un léger défaut de croissance, ce qui n'est pas le cas pour la souche $\Delta trm9$. Les études précédentes *in vivo* ont montré que le niveau d'expression de ces complexes mutés était comparable à celui du complexe non muté. Les expériences de co-IP ont indiqué que ces mutations n'affectaient pas l'interaction entre les deux partenaires du complexe. Par contre, l'analyse de la fixation de la SAM *in vitro* a montré que ces complexes présentaient un défaut sévère de fixation du cofacteur. Enfin, d'après la structure cristallographique, ces résidus sont localisés dans des régions qui pourraient être impliquées dans la fixation de l'ARNt. Ces mutations pourraient entraîner des changements conformationnels qui empêcheraient la fixation de la SAM et qui auraient un impact sur la fixation des ARNt. En effet, il pourrait y avoir une séquestration des ARNt ce qui provoquerait un ralentissement de la synthèse des protéines de réponses aux stress génotoxiques, ce qui se traduirait par un défaut de croissance en présence d'un agent endommageant l'ADN tel que la bléomycine. Cette dernière hypothèse pourrait être renforcée par l'étude de l'effet de la bléomycine sur la croissance des souches mutantes *trm9W145A* et *trm9Y243A* ces deux résidus étant positionnés à proximité des deux résidus C144 et H244.

4.2. MMS vs BLEOMYCINE & MECANISMES DE REPARATION IMPLIQUES

Les phénotypes de défaut de croissance sont observés uniquement en présence de bléomycine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le MMS et la bléomycine n'endommagent pas l'ADN de façon similaire et que les mécanismes de réparation mis en œuvre diffèrent.

La bléomycine cause des coupures simple et double brin (Chen & Stubbe, 2005) et les mécanismes de réparation impliqués sont la réparation par recombinaison homologue (HRR) et la réparation par liaison des extrémités non homologues (NHEJ) (López-Camarillo *et al*, 2009; Jin & Robertson, 2013). Des ADN polymérase et des dNTP sont nécessaires dans les deux types de réparation.

Le MMS endommage principalement l'ADN en le méthylant (Lundin *et al*, 2005). Les mécanismes de réparation impliqués sont la réparation par excision de la base (BER) et la déméthylation par des MTases spécifiques transférant le groupement méthyle sur une cystéine du site actif (López-Camarillo *et al*, 2009; Jin & Robertson, 2013). Le mécanisme de la BER comprend l'intervention de l'ADN polymérase et donc nécessite la présence de dNTP. Par contre, la déméthylation ne fait intervenir que la MTase spécifique, par exemple la O⁶méthylguanine MTase. La prédominance de ce type de réparation dans les conditions de l'étude des phénotypes de croissance pourrait expliquer les résultats observés. En augmentant la quantité de MMS, le mécanisme de la BER pourrait être davantage sollicité, les RNR étant indispensables à ce type de réparation, ceci pourrait alors provoquer un phénotype de défaut de croissance pour une souche *Δtrm9*.

4.3. PERSPECTIVES : NIVEAU D'EXPRESSION DE Rnr3

Afin de compléter l'étude de l'influence des mutations sur la réponse aux stress génotoxiques, des anticorps anti Rnr3 ont été testés pour évaluer le niveau d'expression de la protéine par western blot dans les différentes souches mutantes en présence et en absence de stress génotoxiques. Cependant, les protéines Rnr3 et Rnr1 possédant 80 % d'identité de séquences, les anticorps n'étaient pas spécifiques de Rnr3. Pour pallier cette réaction croisée, une souche exprimant Rnr3 étiquetée a été construite. Le croisement de cette souche avec les différentes souches mutantes permettra d'étudier les conséquences des différentes mutations sur le niveau d'expression de Rnr3 et ainsi de corrélérer les résultats de l'étude du complexe ScTrm9-Trm112 avec le rôle physiologique induit par la modification mcm⁵U34.

2^e partie : Trm112 chez *Haloferax volcanii*

Le processus de la traduction chez les archées possède de nombreuses similitudes avec celui observé chez les eucaryotes. L'analyse des génomes d'archées halophiles telles que *Haloferax volcanii* ou *Halobacterium salinarum* a permis d'identifier les gènes codant pour les orthologues putatifs de Trm112, Trm9, Trm11 et Mtq2 (Grosjean *et al*, 2008; Phillips & de Crécy-Lagard, 2011). Une partie de mon travail de thèse a consisté à étudier Trm112 chez l'organisme modèle *Haloferax volcanii* (*Hvo*). Dans un premier temps, la formation du complexe *Hvo*Trm9-Trm112 a été mise en évidence *in vitro* et son activité enzymatique a été mesurée. Dans un second temps, des études *in vivo* chez *Hvo* ont été réalisées en collaboration avec Roxane Lestini (LOB-Palaiseau).

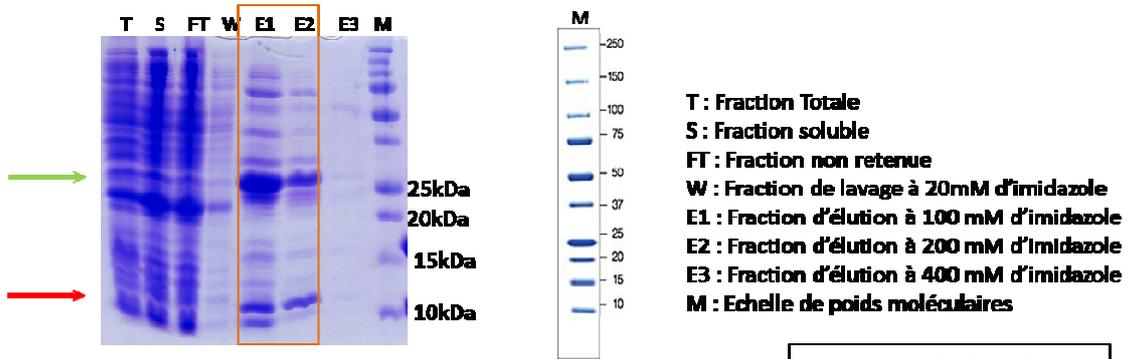
1. *Haloferax volcanii* : un organisme modèle

Haloferax volcanii est une archée halophile modérée dont les conditions optimales de croissance sont une concentration en sel de 2,2M et une température de 45°C. Cet organisme a été découvert dans la mer morte en 1975. Son génome a été séquencé en 2004 et se compose d'un chromosome de 2,85 Mb et de 4 plasmides (Hartman *et al*, 2010). Les informations sur son génome sont disponibles sur le site www.halolex.mpg.de. *Haloferax volcanii* a la caractéristique comme plusieurs archées d'être polyploïde. Depuis quelques années, de nombreuses techniques de génétique ont été développées et *Haloferax volcanii* se présente aujourd'hui comme un organisme archée modèle qui possède un véritable potentiel en terme de manipulations génétiques (Allers & Mevarech, 2005). Les outils utilisés lors de la construction des souches sont basés sur le même principe que ceux appliqués à la construction de souches de *S. cerevisiae* (cf. 1^{re} partie des Résultats & Discussion).

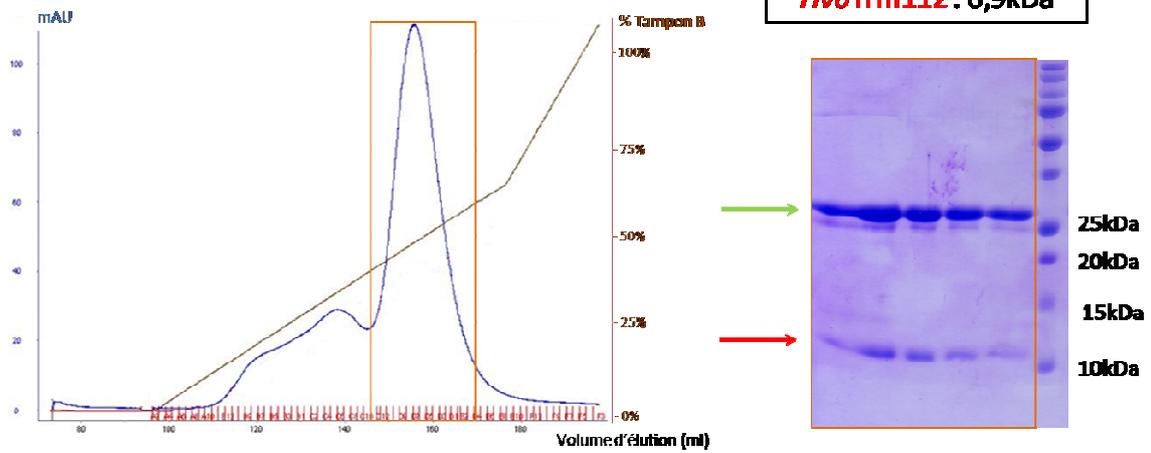
2. Etude du complexe *Hvo*Trm9-Trm112 *in vitro*

Suite aux premiers essais infructueux de cristallisation des complexes Trm9-Trm112 eucaryotes, l'intérêt s'est porté sur le complexe de *Haloferax volcanii*. En effet, les protéines d'archées halophiles ont des séquences plus courtes, sont thermostables et présentent généralement des structures plus compactes (figure 85), caractéristiques pouvant favoriser la cristallisation. Par ailleurs, cette étude présentait un autre intérêt car l'existence du complexe Trm9-Trm112 chez *Hvo* n'a pas encore été démontrée à ce jour.

Purification d'affinité sur résine NiNTA



Purification par chromatographie échangeuse d'anions



Purification par tamisage moléculaire

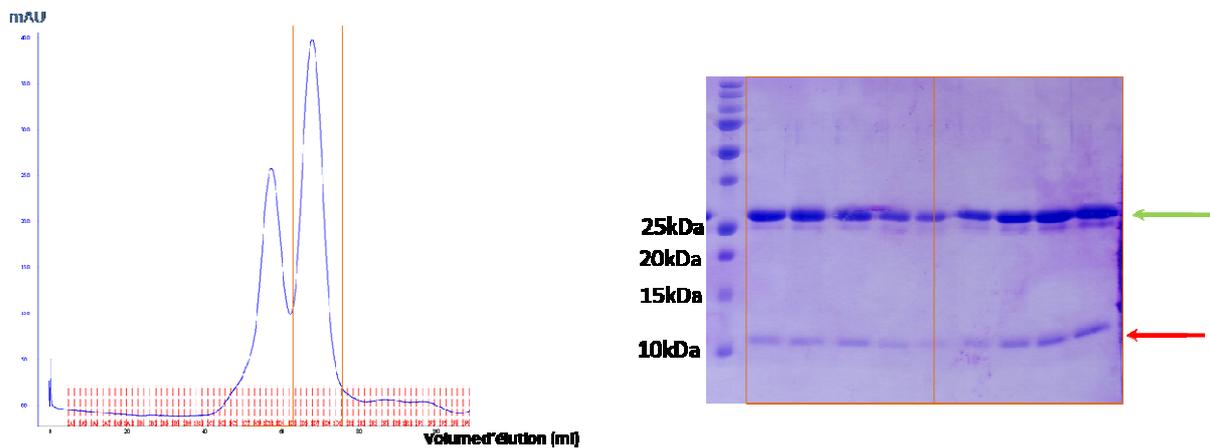


Figure 86 : Purification en 3 étapes du complexe *HvoTrm9-Trm112*.

2.1. Expression du complexe *HvoTrm9-Trm112*

Dans le but de co-exprimer les protéines *HvoTrm9* et *HvoTrm112* chez *E.coli*, les séquences nucléotidiques codant pour les deux protéines ont été clonées respectivement dans les vecteurs pET28 et pET21a (tableau 10). De plus, une séquence nucléotidique codant pour une étiquette 6-Histidines a été rajoutée à l'extrémité 3' de *HvoTRM9* pour produire une version étiquetée en C-terminal de *HvoTrm9*. Les amorces décrites dans le tableau 10, ont été utilisées afin d'amplifier les gènes d'intérêt à partir d'ADN génomique de la souche H26 de *Hvo* (Bitan-Banin *et al*, 2003).

Tableau 10 : Clonage des gènes *HvoTRM112* et *HvoTRM9* dans les vecteurs pET21a et pET28.

Les sites de restrictions sont indiqués en couleur et la séquence codante pour l'étiquette 6 histidines est en orange.

Gène	Vecteur	Résistance	Sites de clonage	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti-sens (5'-3')
<i>HvoTRM112</i>	pET21a	Ampicilline	NdeI- NotI	GGGCATATGAAAGA ATCCCTGATGGA	TTTGGGCGCGCTCAGTCGTC TCGCATGTCCGGCG
<i>HvoTRM9</i>	pET28	Kanamycine	NcoI- NotI	GGGCCATGGACGGA GACGAACCCCG	TTTGGGCGCGCTCAATGGT GATGGTGATGGTGGCAGCC GGCGACGACGGCGT

La protéine Trm112 possède un site de fixation du zinc ; par conséquent, toutes les étapes, depuis l'expression jusqu'à la cristallisation, ont été réalisées en présence de 10 μM de ZnCl_2 . L'expression des complexes a été effectuée dans la souche BL21(DE3) Gold Codon+ à 25 °C pendant 20 heures en milieu auto-inductible (Studier, 2005)supplémenté avec 10 μM de ZnCl_2 , 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine. Après récolte des cellules par centrifugation, le culot est repris dans le tampon A (50 mM Tris-HCl pH7,5 ; 500 mM NaCl ; 5 mM β -mercaptoéthanol ; 10 μM ZnCl_2). Après sonication et clarification de l'extrait brut par centrifugation, la première étape de purification consiste en une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA en tirant profit de l'étiquette 6-Histidines portée par *HvoTrm9*. Les éluions en présence de 100 mM (E1) et 200 mM (E2) d'imidazole permettent de décrocher la quasi-totalité du complexe (figure 86). Cette première analyse montre que le complexe se forme *in vivo* chez *E. coli* et est stable lors de son extraction et sa purification.

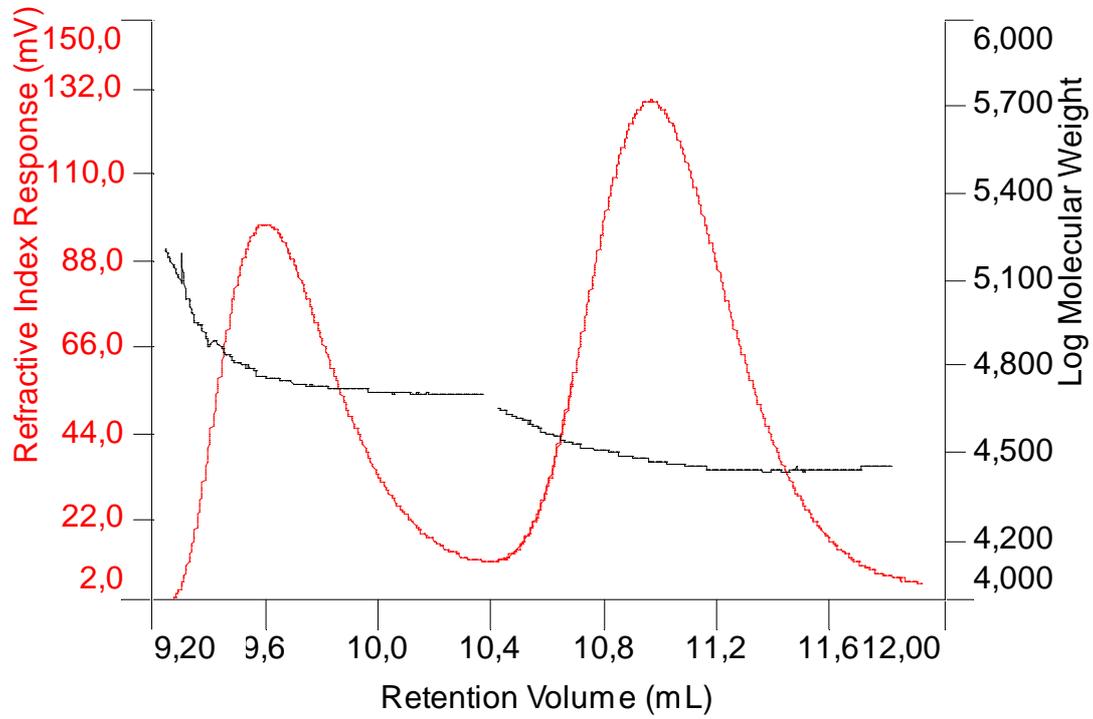


Figure 87 : Analyse par SEC-MALLS du complexe *HvoTrm9-Trm112*.

Les fractions E1 et E2 sont ensuite rassemblées puis diluées dans le tampon A sans NaCl afin de réduire à 50 mM la concentration en NaCl. Cet échantillon est alors déposé sur une colonne HiTrap-MonoQ de 5mL. La purification par chromatographie échangeuse d'anions est envisagée car le point isoélectrique théorique du complexe *HvoTrm9-Trm112* est de 4,3. Ce complexe devrait donc être chargé négativement à pH7,5 et être retenu dans un premier temps par la matrice. L'élution est réalisée par un gradient linéaire de NaCl allant de 50 mM à 1,5 M. L'analyse des fractions collectées par SDS-PAGE montre que le pic majoritaire d'absorption sur le chromatogramme correspond à l'élution du complexe.

Enfin, les fractions d'élution les plus riches en complexe sont rassemblées et appliquées sur une colonne de tamisage moléculaire Superdex 75 16/60. Le chromatogramme présente deux pics et l'analyse SDS/PAGE montre que ceux-ci se composent du complexe *HvoTrm9-Trm112* pur. Cette observation peut traduire un équilibre entre deux états d'oligomérisation, hétérotétramère vs hétérodimère (figure 86). Afin de déterminer précisément le poids moléculaire des deux objets, les fractions correspondant à chaque pic sont soumises à des expériences de SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatography - Multi Angle Laser Light Scattering) dans les conditions du tampon A.

2.2. Analyse de l'état d'oligomérisation par SEC-MALLS

Cette technique se compose de deux étapes. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) permet la séparation des objets en fonction de leur taille puis le détecteur multi-angulaire à diffusion de la lumière (MALLS) permet la détermination des masses molaires associées aux analytes au cours de la séparation.

Les résultats obtenus pour les deux pics collectés en sortie de Superdex sont identiques et seule l'analyse du premier pic est présentée dans la figure 87. Celle-ci confirme la présence de deux objets présentant des poids moléculaires de 60,4 kDa (1^{er} pic) et de 30,3 kDa (2nd pic). *HvoTrm9* et *HvoTrm112* ayant des poids moléculaires respectifs de 24,4 kDa et 6,9 kDa, le 1^{er} pic correspondrait donc à l'élution d'un hétérotétramère composé de deux complexes *HvoTrm9-Trm112* et le 2nd pic à l'hétérodimère composé d'un seul complexe *HvoTrm9-Trm112*.

Dans ces conditions de tampon, il y aurait donc un équilibre entre ces deux états d'oligomérisation.

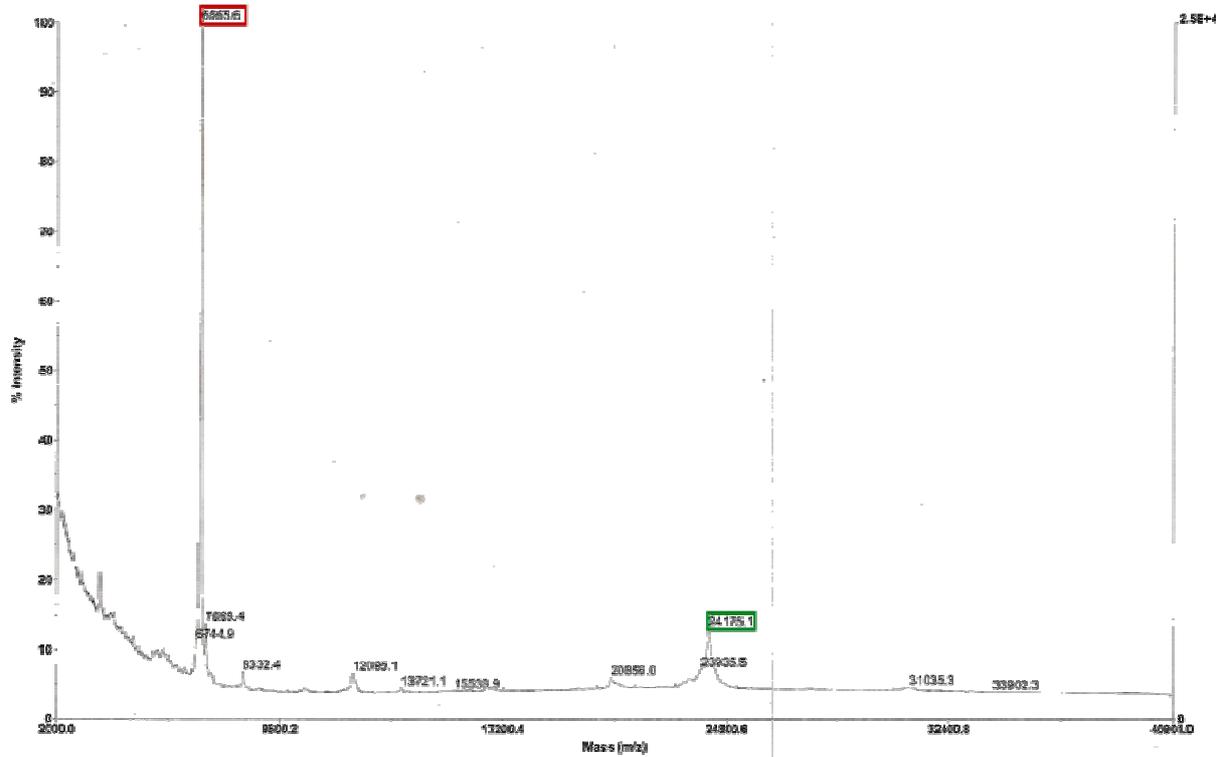


Figure 88 : Analyse de l'échantillon contenant le complexe *HvoTrm9*-*Trm112* par spectrométrie de masse.

Le poids moléculaire correspondant à *HvoTrm112* est encadré en rouge et celui correspondant à *HvoTrm9* est encadré en vert.

2.3. Confirmation de la composition du complexe par spectrométrie de masse

Parallèlement à l'analyse SEC-MALLS, l'échantillon purifié a été analysé en spectrométrie de masse en utilisant un instrument de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of flight). Cette analyse permet de déterminer précisément le poids moléculaire des composants de l'échantillon (figure 88). Les deux composants majoritaires présentent un poids moléculaire de 6,8656 kDa et de 24,1751 kDa, ce qui correspond exactement aux poids moléculaires respectifs de *HvoTrm112* (6,858 kDa) et *HvoTrm9* (24,170 kDa).

Cette analyse confirme donc l'existence du complexe *HvoTrm9-Trm112 in vitro*.

2.4. Activité enzymatique de *HvoTrm9-Trm112*

Afin d'évaluer l'activité enzymatique du complexe, celle-ci a été mesurée *in vitro*. Les ARNt extraits et purifiés à partir d'une souche de *Sc Δ trm9* et de la SAM marquée au tritium sur son méthyl ont été utilisés comme substrats pour l'essai enzymatique. La réaction est réalisée à 45°C avec 75 pmol d'ARNt totaux, 500 pmol de SAM et 25 pmol de complexe dans 50 μ L de tampon de méthylation (100 mM Tris-HCl pH7,5, 0,1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10 mM NH₄Cl, 2 M KCl). L'arrêt de la réaction après 1 heure est effectué par précipitation au TCA. La suite de l'expérience est identique à celles décrites dans la 1^{re} partie des Résultats & Discussion. La présence de 2M de KCl dans la réaction est indispensable à l'activité enzymatique. En effet, aucune activité n'a pu être mesurée en présence de 300 mM de KCl.

Dans ces conditions, le complexe *HvoTrm9-Trm112* purifié présente 50 \pm 2% d'activité par rapport au complexe *ScTrm9-Trm112*. Ceci prouve que ce complexe se forme chez *E. coli*, est stable et capable de modifier les ARNt de *Sc in vitro*. La différence d'activité par rapport au complexe de *Sc* pourrait être due à une spécificité plus faible pour les ARNt de *Sc* et/ou à des conditions de réaction non optimales pour le complexe *Hvo*. Par ailleurs, des tests enzymatiques ont été réalisés dans les mêmes conditions avec les ARNt totaux extraits et purifiés d'une souche d'*Haloferax volcanii* Δ *trm9* mais aucune activité MTase n'a été mesurée. Ces résultats sont discutés dans la partie Conclusion, Discussion & Perspectives.

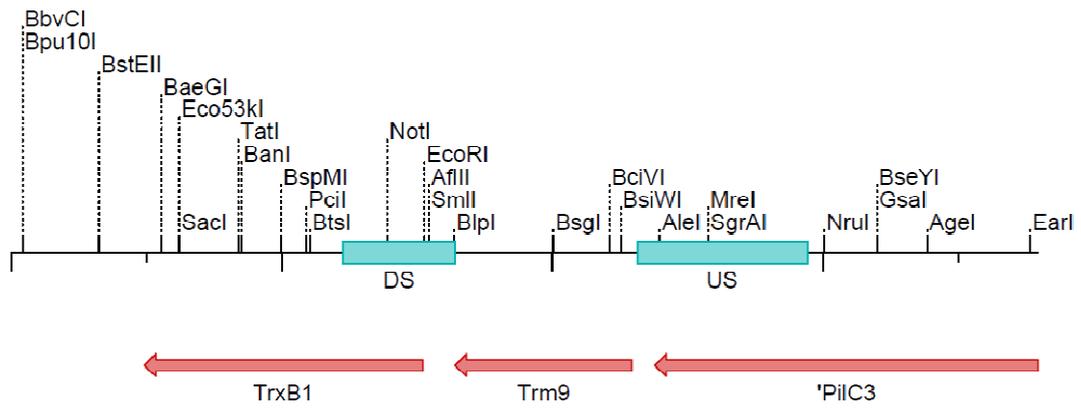


Figure 89 : Région du gène codant pour *Trm9* (*Hvo_1032*).

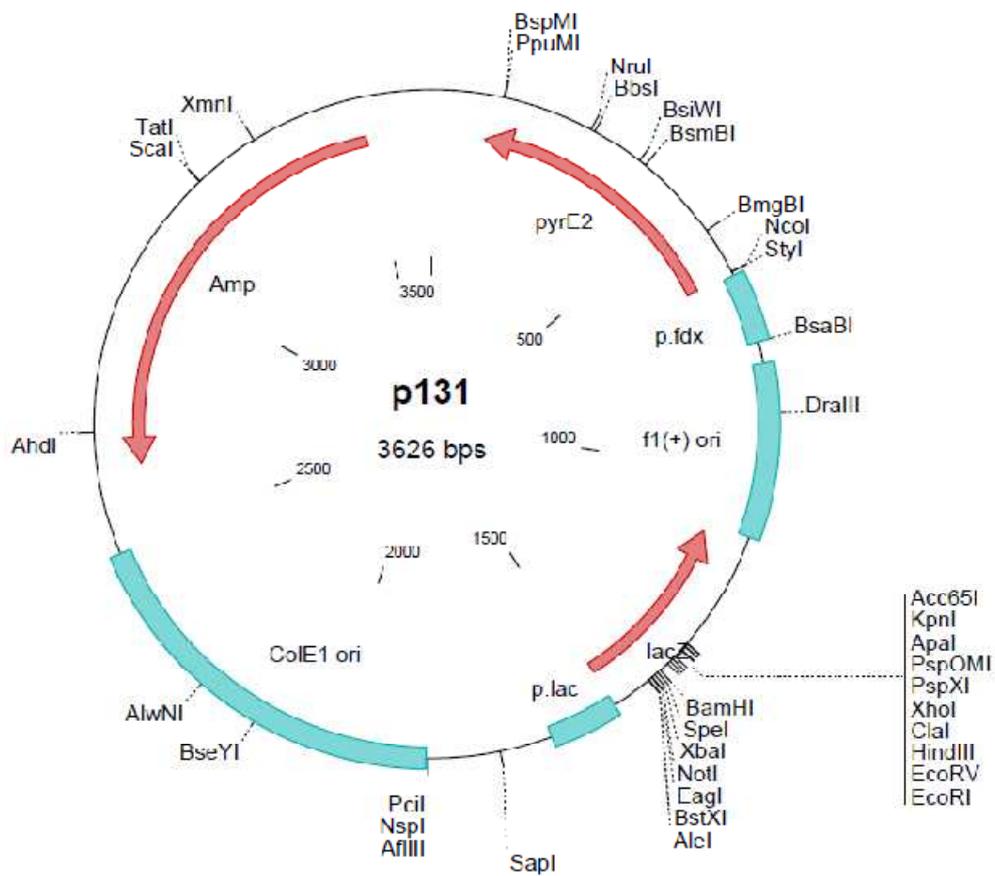


Figure 90 : Carte du plasmide pTA131.

3. Etudes *in vivo* chez *Haloferax volcanii*

Ces premiers résultats sur l'existence du complexe *Hvo*Trm9-Trm112 *in vitro* ont mené à l'étude de la plateforme d'interaction Trm112. Les expériences réalisées *in vivo* chez *Haloferax volcanii* ont été effectuées au sein du Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) à l'école polytechnique en étroite collaboration avec Roxane Lestini.

3.1. Construction des souches

Afin d'étudier le rôle de Trm112 chez *Hvo*, trois souches délétées ont été construites selon la technique de pop-in pop-out (figure 92) : $\Delta trm9$, $\Delta trm112$ et $\Delta mtq2$. La souche d'*Hvo* utilisée est H26, cette souche ne possède plus le plasmide endogène pHV2 et elle est délétée pour le gène *pyrE2*, équivalent de *URA3* chez *S. cerevisiae*. La composition des milieux de culture, des solutions, ainsi que les génotypes des souches et les séquences des oligonucléotides sont détaillés dans la partie Matériel et Méthodes. L'exemple de la construction de la souche H26 $\Delta trm9$ sera principalement détaillé ci-après.

3.1.1. Construction des plasmides

La première étape consiste à identifier la région du gène à déléter et à vérifier si cette délétion n'affectera pas l'expression des gènes en amont et en aval. Le gène codant pour Trm9 est *Hvo_1032* et se situe sur le chromosome d'*Hvo* entre les gènes *PilC3* et *TrxB1* (figure 89). Deux régions en amont (US) et en aval (DS) d'au moins 400 pb sont définies afin d'être clonées dans le plasmide pTA131 (figure 90). Ce plasmide ne possède pas d'origine de répllication pour *Hvo*, le but étant de l'insérer dans le chromosome. Par ailleurs, il possède le marqueur de sélection *pyrE2* indispensable pour l'application du pop-in pop-out chez *Hvo*, une origine de répllication pour le clonage chez *E. coli* (ColE1 ori), un marqueur de sélection pour *E. coli* (Amp), ainsi qu'un site multiple de clonage. La séquence en amont est clonée entre les sites XbaI et BamHI et la séquence en aval entre les sites BamHI et XhoI. Ce qui mène au plasmide présenté dans la figure 91. La préparation des plasmides est réalisée après transformation dans une souche d'*E. coli* XL1-Blue *dam*⁻. L'adénine méthylase codée par le gène *DAM* modifie l'ADN au niveau des séquences GATC. Par conséquent, les plasmides extraits de cette souche ne seront pas méthylés, ils ne seront donc pas reconnus comme ADN étranger lors de la transformation dans *Hvo* et seront ainsi protégés de l'action des enzymes de restriction de *Hvo*.

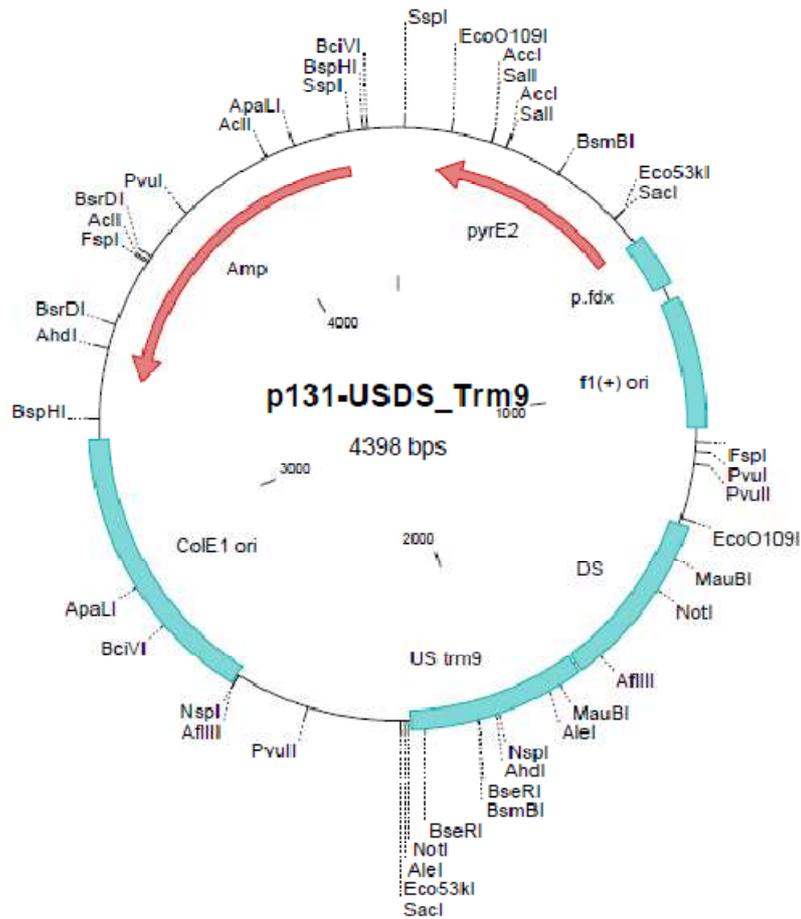


Figure 91 : Carte du plasmide p131-USDS-Trm9.

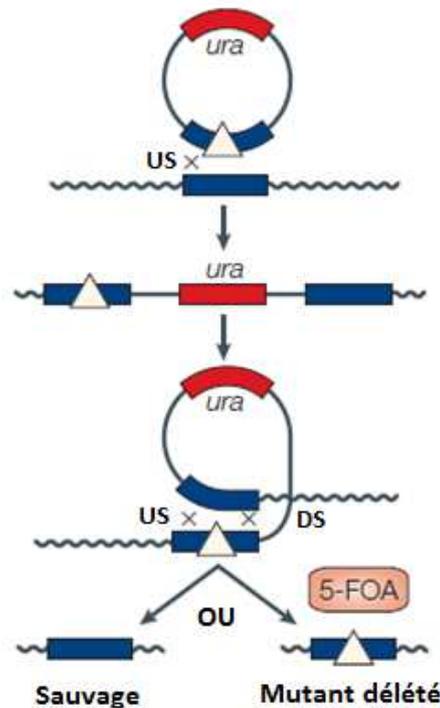


Figure 92 : Schématisation de la technique de pop-in pop-out (adapté d'Allers & Mevarech, 2005).

3.1.2. Pop-in pop-out

La veille de la transformation, la souche *H26ΔpyrE2* est mise en culture en milieu riche composé de 2,46M NaCl. Après une nuit à 45°C, l'absorbance à 600nm est comprise entre 1 et 1,5, les cellules sont récoltées puis reprises dans une solution permettant la formation de sphéroplastes (diminution de la salinité à 1M NaCl et présence d'EDTA). 2 µg de plasmides sont utilisés pour transformer les cellules issues de 10 mL de culture. La perméabilité de la membrane des sphéroplastes est augmentée en présence de polyéthylène glycol, ce qui permet à l'ADN plasmidique de pénétrer dans la cellule. Après régénération dans un milieu riche adapté, les cellules sont récoltées, diluées puis étalées sur milieu Casa (milieu minimum synthétique) solide sans uracile. Les cellules étalées sont ensuite incubées à 45°C pendant 8 jours.

Le pop-in, c'est-à-dire la première recombinaison qui entraîne l'insertion du plasmide dans le génome, a lieu immédiatement après transformation (figure 92). L'absence d'uracile dans le milieu gélosé permet de sélectionner les souches ayant intégré le plasmide possédant le gène *pyrE2*. Le nombre de colonies obtenues sur milieu Casa - uracile est indiqué dans le tableau 11.

Tableau 11 : Résultats du pop-in

Souches à obtenir	Nombre de colonies issues de la suspension non diluée	Nombre de colonies issues de la suspension diluée au 1/10 ^e
<i>H26 ΔTrm9</i>	22	6
<i>H26 ΔTrm112</i>	6	0
<i>H26 ΔMtq2</i>	108	16

Les différentes transformations semblent avoir fonctionné, de plus le nombre de colonies concorde avec la dilution.

Afin de réaliser l'étape de pop-out, deux colonies par souche sont sélectionnées puis isolées sur milieu Casa. Une colonie de chaque isolat est mise en culture liquide en milieu riche à 45°C pendant 15h, puis deux séries de dilution au 1/500^e sont réalisées chaque 24h, ce qui permet aux recombinaisons d'avoir lieu. La culture finale est diluée au 1/10^e, 1/100^e et 1/1000^e et les dilutions sont étalées sur milieu Casa en présence de 5FOA. La sélection est identique à celle décrite chez *S. cerevisiae* dans la 1^{re} partie des résultats, seuls les clones dépourvus du gène *pyrE2* pourront se développer en présence de 5FOA.

Tableau 12 : Résultats du pop-out

Souches à obtenir		Dilution 1/100 ^e				Dilution 1/1000 ^e			
		J7	J17	J30	Total	J7	J17	J30	Total
<i>H26 ΔTrm9</i>	1	0	+254	+11	265	27	+10	+6	43
	2	486	+8	+31	525	53	+30	+9	92
<i>H26 ΔTrm112</i>	1	5	+136	+39	180	4	+78	+38	120
	2	23	+44	+6	73	0	+1	+5	6
<i>H26 ΔMtq2</i>	1	136	+22	+5	163	52	+38	+8	98
	2	52	+62	+0	114	0	+1	+0	1

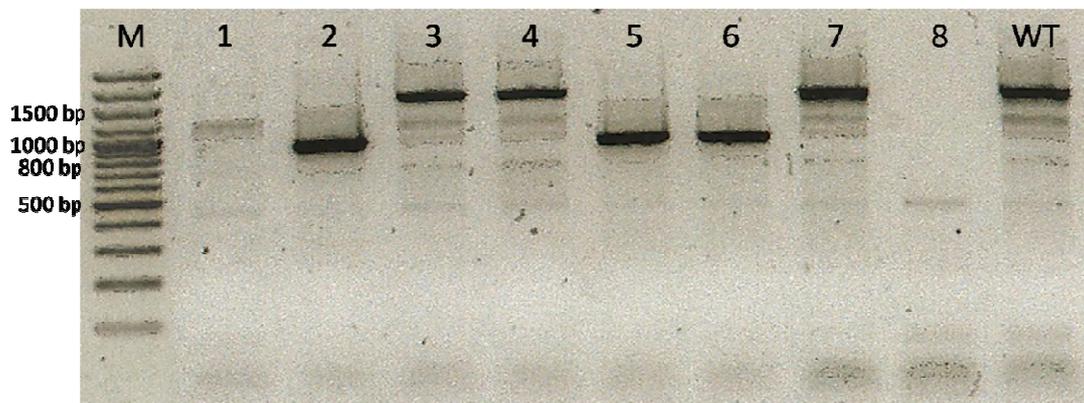


Figure 93 : Analyse sur gel d'agarose 1% les produits PCR issus du criblage pour la souche *H26 Δtrm9*.

M : Marqueur de tailles ; Colonne 1 à 8 : Produits PCR réalisées sur des colonies à cribler ; WT, Produit PCR réalisée sur la souche sauvage H26.

L'apparition des colonies est suivie après 7, 17 et 30 jours à 45°C. Les résultats obtenus à la suite de l'étape de pop-out sont présentés dans le tableau 12.

Pour une même construction, d'un clone à l'autre, les résultats ne sont pas toujours homogènes, mais pour la plupart, le nombre total de colonies est cohérent avec la dilution.

Parmi ces clones, il existe deux populations : les clones mutants délétés du gène cible et les clones révertants sauvages (figure 92). En effet, La recombinaison lors du pop-out peut avoir lieu soit dans la région US ou DS. Dans le cas illustré dans la figure 92, la recombinaison lors du pop-in ayant eu lieu en US, les clones sauvages seront obtenus lorsque la recombinaison du pop-out se fait en US et les clones mutants lorsqu'elle a lieu en DS. Un criblage est par conséquent nécessaire pour discriminer ces deux populations.

3.1.3. Criblage

Dans le cas où la délétion n'affecte pas la viabilité de la cellule, on attend en théorie 50% de clones sauvages et 50% de mutants. En effet, la probabilité que le 2^e évènement de recombinaison ait lieu dans l'une ou l'autre des régions d'homologie de même taille, est identique.

Le criblage des clones a été réalisé par PCR sur colonie en utilisant des amorces situées aux extrémités des régions US et DS. La taille des produits PCR obtenus dépendra du phénotype sauvage ou délété du clone testé. Pour le criblage de la délétion du gène codant pour Trm9, le produit PCR sera de 840 pb (US+DS = 420+420) s'il s'agit d'une souche mutante alors qu'il sera de 1494 pb (US+Hvo_1032+DS = 420+654+420) pour la souche sauvage. Le résultat du criblage de 8 clones apparus dans les 7 jours après le pop-out est présenté dans la figure 93. Les produits PCR 2, 5 et 6 présentent une taille d'environ 800 pb ; les clones 2, 5 et 6 sont donc délétés du gène codant pour Trm9. Par contre, les clones 3, 4 et 7 sont sauvages. Il semble que la PCR n'ait pas fonctionné sur les colonies 1 et 8. Pour la construction $\Delta trm9$, la fréquence d'obtention du mutant est donc de 50%. Il semblerait donc que cette délétion n'affecte pas la viabilité de la cellule.

Pour ce qui est du criblage des souches $\Delta trm112$ et $\Delta mtq2$, les colonies présentant les délétions sont apparues entre le 7^e et le 17^e jour et la fréquence de l'évènement de recombinaison est de 10%. Il serait donc possible que ces délétions affectent la viabilité de la cellule.

Tableau 13: Résultats de suivis de croissance pour la 1^{re} et la 2^e expérience

Souches	Temps de génération (min)	
	1 ^{re} expérience	2 ^e expérience
<i>H26</i>	77	139
<i>H26 Δtrm9</i>	87	139
<i>H26 Δmtq2</i>	139	231
<i>H26 Δtrm112</i>	347	173

3.2. Analyse de la croissance

Les trois souches $\Delta trm9$, $\Delta trm112$ et $\Delta mtq2$ ainsi que la souche sauvage H26 sont mises en culture en milieu riche liquide à 45°C pour un suivi de croissance afin de déterminer le temps de génération de chacune des souches. Deux expériences sont menées de manière indépendante, le paramètre pris en compte au cours du suivi de croissance et pour le calcul du temps de génération est le CFU (Colony Forming Unit) par mL (tableau 13).

La souche sauvage présente un temps de génération compris entre 1h30 et 2h dans les conditions de culture du laboratoire. Malgré la variabilité des résultats obtenus d'une expérience à l'autre, il ressort que la délétion du gène codant pour Trm9 n'a que peu ou pas d'effet sur la croissance de la souche alors que les délétions des gènes codant Mtq2 et Trm112 augmentent sensiblement le temps de génération des souches considérées. Basé sur ces résultats, le classement des souches en fonction du temps de génération serait : $WT \leq \Delta trm9 < \Delta mtq2 \leq \Delta trm112$.

Ces phénotypes observés chez *Hvo* sont comparables à ceux observés chez *S. cerevisiae*, ce qui renforce l'hypothèse de la présence et d'un fonctionnement identique de la plateforme d'activation de Trm112 chez *Hvo*.

4. Conclusions et perspectives

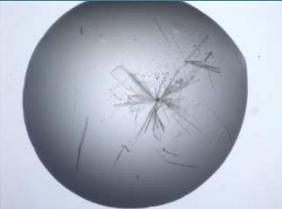
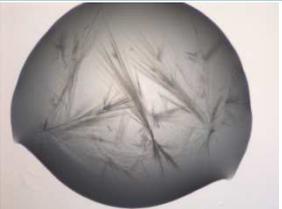
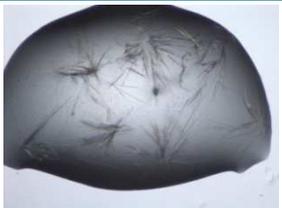
Les premiers résultats obtenus *in vitro* sur le complexe *Hvo*Trm9-Trm112 ainsi que les analyses de croissance *in vivo* chez *Hvo* laissent à penser que *Hvo*Trm112 jouerait un rôle similaire à celui observé chez les eucaryotes. Cependant l'orthologue de Bud23 n'a pas encore été identifié et les interactions avec Mtq2 et Trm11 restent à être mises en évidence.

Par ailleurs, les analyses *in vivo* pourront être approfondies par une analyse comparative des modifications chimiques des *Hvo*ARNt extraits d'une souche sauvage et d'une souche $\Delta trm9$. Cette analyse pourrait permettre d'expliquer l'absence d'activité MTase du complexe Trm9-Trm112 sur les ARNt de *Hvo in vitro* et pourrait fournir des informations sur le rôle précis de Trm9.

De plus, l'activité de Mtq2 pourrait être analysée en mettant en évidence par western blot la méthylation du motif GGQ à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre le peptide méthylé de aRF1 ou alors par spectrométrie de masse.

Des expériences d'expression chez *E. coli* du complexe *HvoTrm11-Trm112* ont été menées au cours de ma thèse, toutefois, les niveaux d'expression de protéines solubles étaient trop faibles pour poursuivre l'analyse. En outre, des études de l'orthologue de *Trm11* chez l'archée *Pyrococcus Abyssii* ont montré que cette enzyme était active seule (Urbonavicius *et al*, 2006). Néanmoins, l'orthologue de *Trm112* n'a pas été mis en évidence chez cet organisme.

Tableau 14 : Résultats de cristallogenèse du complexe ScBud23C202-Trm112.

Crible	puits	Concentration en complexe	Photographies après 8 jours à 19°C	Solution de cristallisation	
Classics	A5	21mg/mL		Polyéthylène glycol 4,000 2-Propanol HEPES pH7.5	20.00 %w/v 10.00 %v/v 0,1 M
		14mg/mL			
		7mg/mL			
	H12	14mg/mL		MES pH6 Polyéthylène glycol 20,000	0.10 M 12 %w/v
JCSG+	A2	21mg/mL		tri-Sodium citrate pH6 Polyéthylène glycol 3,000	0.10 M 20.00 %w/v
PEGI	H1	21mg/mL		Potassium Sodium tartrate Polyéthylène glycol 3,350	0,2 M 20 %w/v
	C11	7mg/mL		MES pH6 Polyéthylène glycol 10,000	0,1 M 20 %w/v
	C12	7mg/mL		MES pH6 Polyéthylène glycol 20,000	0,1 M 15 %w/v

3^e partie : Etude structurale du complexe Bud23-Trm112 de levure

Le complexe Bud23-Trm112 méthyle la guanosine en position 1575 de l'ARNr 18S de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) et sa présence au niveau du processome de la petite sous-unité du ribosome est indispensable pour les clivages précoces du pré-ARNr. L'étude de ce complexe a été réalisée en collaboration avec Valérie Heurgué-Hamard (IBPC-Paris) et Denis Lafontaine (ULB-Bruxelles). Dans ce projet, mon travail a consisté à résoudre la structure du complexe de Sc, d'en réaliser l'analyse et de proposer des résidus cibles à muter pour l'analyse fonctionnelle effectuée par les collaborateurs.

1. Vers la structure du complexe Bud23-Trm112+/-SAM

Dans le but de résoudre la structure du complexe de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), l'équipe de Valérie Heurgué-Hamard avait effectué des tests d'expression de ScTrm112 avec différentes formes tronquées de ScBud23 (275 acides aminés). La partie C-terminale de Bud23 est prédite pour être déstructurée et une délétion des 73 derniers résidus a permis l'expression d'un complexe soluble nommé ScBud23C202-Trm112.

1.1. CRISTALLISATION DU COMPLEXE ScBud23C202-Trm112

Après une purification en 3 étapes similaires à celles mises en place pour la purification de complexe Y/Trm9N38-Trm112, des essais de cristallogénèse ont été menés en utilisant les cribles commerciaux Classics, JCSG+, PEGI et PEGII (Qiagen) en testant 3 concentrations en complexe (7, 14 et 21 mg/mL). Plusieurs conditions ont permis d'obtenir des cristaux en forme d'aiguilles ou de baguettes qui apparaissent après 3 jours à 19°C puis grossissent (tableau 14). Les cristaux en forme de baguettes obtenus dans le puits A5 du crible Classics avec 7 mg/mL de complexe ont été reproduits manuellement. Des gouttes suspendues ont été réalisées en mélangeant 1µL de complexe et 1µL de solution de cristallisation contenant 100mM HEPES pH7,5, 10% isopropanol et 20% PEG 4K. Douze des cristaux ainsi obtenus ont été transférés successivement dans une solution de cristallisation contenant 15 puis 30% du cryoprotectant éthylène glycol et enfin congelés dans l'azote liquide en vue des expériences de diffraction des rayons X.

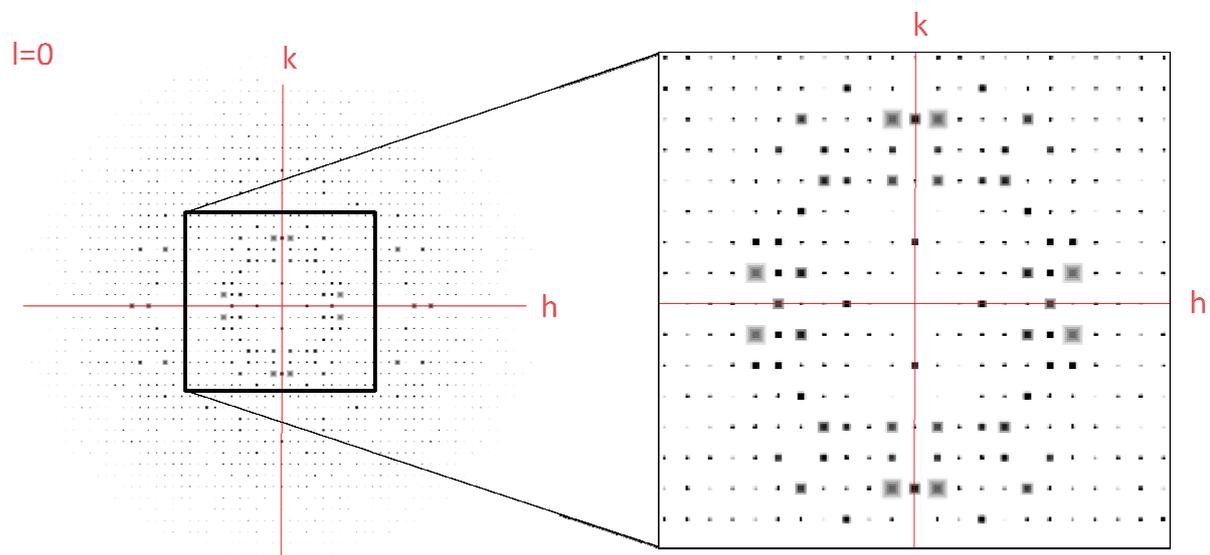


Figure 94 : Représentation des extinctions systématiques selon l'axe $(0,k,0)$ observées dans le plan $(h,k,0)$ avec le programme hklview et agrandissement.

1.2. RESOLUTION DE LA STRUCTURE DE ScBud23C202-Trm112 à 2 Å

Le principe et la mise en œuvre des expériences pour la résolution de la structure de ScBud23C202-Trm112 sont identiques à ceux décrits pour la résolution de la structure du complexe Y/Trm9N38-Trm112.

1.2.1. Résolution de la structure à 2,4 Å

Les cristaux testés sur la ligne PROXIMA 1 du synchrotron SOLEIL ont diffracté les rayons X entre 2 et 4 Å de résolution. Dans le but de résoudre le problème des phases, le signal anomal de l'atome de zinc lié à Trm112 a été utilisé et 3 jeux de données ont été collectés pour un même cristal (2,4 Å) à trois longueurs d'ondes différentes. A partir de la mesure de fluorescence en fonction de l'énergie du faisceau, les valeurs des longueurs d'ondes, et des facteurs de diffusion f'' et f' ont été déterminés (tableau 15).

Tableau 15 : Paramètres des différentes longueurs d'ondes utilisées lors des collectes et de leurs facteurs de diffusion f' et f'' mesurés

Collectes	Energie (keV)	λ (Å)	f'	f''
Maximum f'' (Peak)	9,669	1,2823	-9,29	8,26
Minimum f' (Inflexion)	9,665	1,2828	-11,97	3,81
Loin du seuil (remote)	9,719	1,2757	-5	4

Un jeu de données a été collecté à chaque longueur d'onde indiquée ci-dessus. Chaque jeu se compose de 4400 images, chaque cliché correspondant à une mesure de 0,2 seconde avec une amplitude de rotation de 0.2° entre chaque cliché.

A la suite de l'indexation des données avec le programme XDS, le réseau de Bravais déterminé est le réseau cristallin monoclinique primitif (mP). Deux groupes d'espace énantiomorphes sont possibles : P2 et P2₁. L'intégration des données et la mise à l'échelle sont dans un premier temps réalisées en considérant le groupe d'espace P2. Il est alors possible d'analyser les extinctions systématiques sur l'axe (0, k, 0). Dans notre cas, la présence d'extinctions systématiques le long de l'axe (0, k, 0) avec k impair, indique que le groupe d'espace est P2₁ (figure 94).

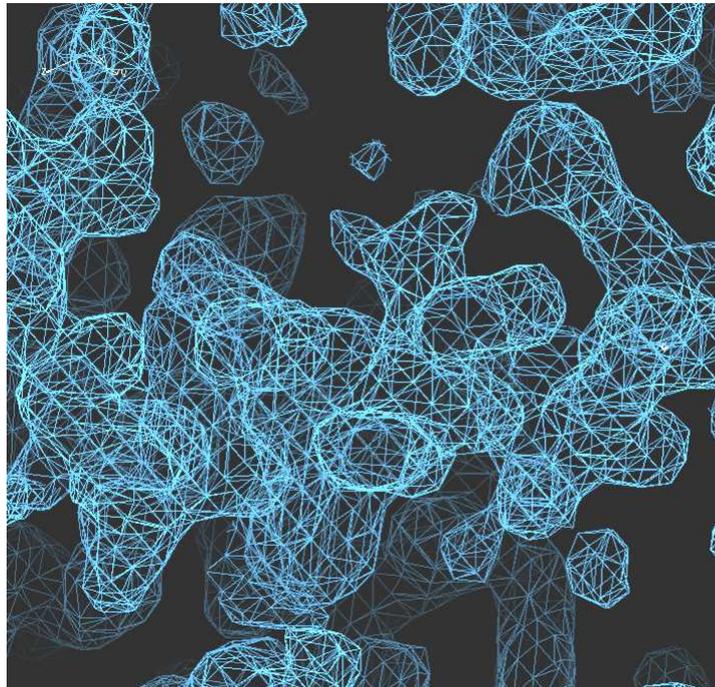


Figure 95 : Carte de densité électronique expérimentale du complexe ScBud23C202-Trm112
(Contour : 1σ).

Les statistiques issues du traitement des trois jeux de données sont présentées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Statistiques obtenues après le traitement des données des 3 jeux collectés sur le même cristal à des longueurs d'ondes différentes.

Traitement des données	Peak	Inflexion	Remote
Résolution (Å)	50-2,40 (2,40-2,54)	50-2,77 (2,77-2,93)	50-2,58 (2,58-2,77)
Longueur d'onde(Å)	1,2822	1,2828	1,2757
Groupe d'espace	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Paramètres de maille	a=74,8 b=54,1 c=83,8Å α=90 β=95,3 γ=90°	a=75,2 b=54,2 c=83,9Å α=90 β=95,3 γ=90°	a=74,9 b=54,2 c=83,9Å α=90 β=95,3 γ=90°
Nombre total de réflexions	102656	69146	82578
Nombre total de réflexions uniques	49420	32485	39776
Rsym (%)	4,8 (34,2)	6,2 (50,0)	6,0 (34,8)
Complétude (%)	95,4 (89,8)	96,2 (92,6)	95,4 (91,4)
I/σ(I)	12,6 (2,3)	12 (1,9)	12,5(2,9)
Redondance	2,1	2,1	2,1

Les valeurs de R_{sym} et de I/σ montrent que les données sont de qualité satisfaisante et sont exploitables pour poursuivre la résolution de structure.

Le coefficient de Matthews a été calculé pour ce jeu de données. Il est de $V_m = 2,22 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, ceci correspond à 46,6% de solvant et suggère fortement la présence de 2 complexes dont 2 atomes de zinc dans l'unité asymétrique.

Les coordonnées fractionnaires des deux atomes de zinc dans l'unité asymétrique ont été déterminées par le programme SHELXD (Schneider & Sheldrick, 2002). La résolution des phases a été réalisée à l'aide du programme SHARP (Bricogne *et al*, 2003).

Les cartes de densité électronique expérimentales à 2,4 Å ont été calculées à partir des facteurs de structure et de la phase en utilisant le programme FFT de la suite CCP4 (CCP4, 1994). La carte de densité électronique expérimentale ainsi obtenue permet d'identifier des éléments de structures secondaires de type hélices α et brins β et est donc tout à fait interprétable (figure 95).

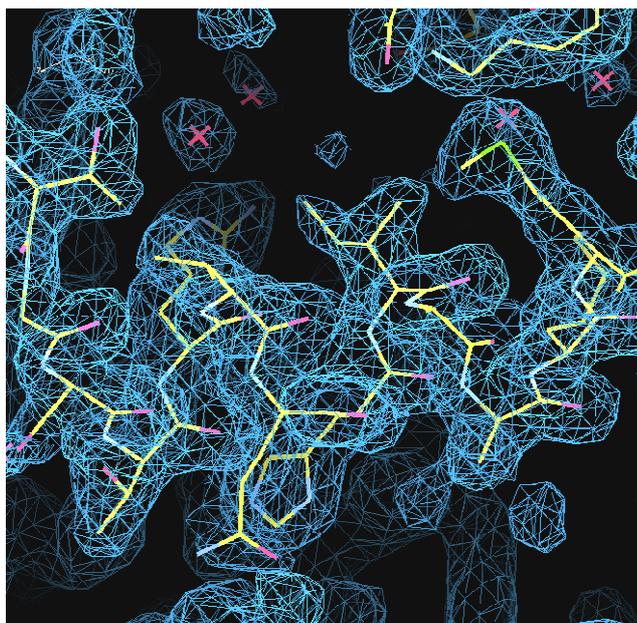


Figure 96 : Modèle de ScBud23C202-Trm112 reconstruit dans les cartes expérimentales.

Tableau 17 : Statistiques obtenues après le traitement des données à 2 Å de résolution.

Résolution (Å)	50-2 (2-2.12)
Longueur d'onde(Å)	0.9801
Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille	a= 74.4 b=53.9 c=83,8Å α=90 β=95.3 γ=90°
Nombre total de réflexions	183252
Nombre total de réflexions uniques	44594
Rsym (%)	4.5 (56.4)
Complétude (%)	96.5 (99.2)
I/σ(I)	18.3 (2.4)
Redondance	4.1

Tableau 18 : Statistiques d'affinement et de géométrie du modèle final de ScBud23C202-Trm112 à 2 Å.

Résolution (Å)	2 - 37
R/R_{free} (%)	19.1/24.2
R.m.s.d. liaisons (Å)	0.008
R.m.s.d. angles (°)	1.044
Facteur B moyen (Å²)	46.7(Bud23) 47.3(Trm112) 46.6(H ₂ O)
Diagramme de Ramachandran	
Régions favorables	95.4%
Régions permises	4.6%

Le modèle du complexe ScBud23C202-Trm112 a été construit dans les cartes expérimentales à l'aide du logiciel COOT (figure 96). Le modèle de ScTrm112 en complexe avec ScBud23 a été positionné par remplacement moléculaire à partir de la structure cristallographique de ScTrm112 seul (pdb : 2J6A) (Heurgue-Hamard *et al*, 2006). Le modèle de ScBud23 a été reconstruit à partir du résultat de remplacement moléculaire de la structure cristallographique de YTrm9N38 résolue précédemment. Ces remplacements moléculaires ont été réalisés dans les cartes de densité expérimentales à l'aide du programme MolRep- Auto MR de la suite CCP4. Une fois la reconstruction d'un modèle du complexe ScBud23C202-Trm112 réalisée, celui-ci a servi de base pour reconstruire le second modèle de l'unité asymétrique.

1.2.2. Amélioration de la résolution à 2 Å et affinement

Parmi les cristaux testés, un cristal a diffracté les rayons X jusqu'à 2 Å de résolution. 3000 images ont été collectées dans les mêmes conditions que précédemment. 2200 images ont été sélectionnées afin de composer un jeu de données complet de haute qualité. Les résultats du traitement de données sont présentés dans le tableau 17. La structure finale a été obtenue par l'accomplissement d'une série de cycles d'affinement et reconstruction en utilisant les programmes Phenix.refine et COOT. Les résultats de l'affinement et de géométrie du modèle final à 2 Å de résolution sont présentés dans le tableau 18 et indiquent que la qualité du modèle est très satisfaisante.

1.3. RESOLUTION DE LA STRUCTURE DE ScBud23C202-Trm112-SAM à 2,2Å

Dans le but d'obtenir la structure du complexe avec la SAM, des expériences de co-cristallisation et de trempage ont été menées.

Les essais de co-cristallisation ont été réalisés en mélangeant manuellement 1µL d'une solution de complexe pur décongelé à 5 et 10 mg/mL contenant de la SAM en excès molaire 10x, avec 1µL de la solution de cristallisation (100mM HEPES pH7,5, 10% isopropanol et 20% PEG 4K). Après 3 jours à 20°C, des cristaux en forme de baguettes sont apparus dans les gouttes suspendues. Une dizaine de cristaux ainsi obtenus ont été transférés successivement dans la solution de cristallisation contenant 2 mM de SAM, 15% et 30% d'éthylène glycol avant d'être congelés dans l'azote liquide.

Tableau 19 : Statistiques obtenues après le traitement des données à 2,2 Å de résolution.

Résolution (Å)	50-2.2 (2.2-2.33)
Longueur d'onde(Å)	0.9801
Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille	a= 75.5 b=53.7 c=85.2Å α=90 β=94.5 γ=90°
Nombre total de réflexions	146142
Nombre total de réflexions uniques	34612
Rsym (%)	5.7(54.2)
Complétude (%)	94.7 (98.9)
I/σ(I)	16.2 (2.6)
Redondance	4.2

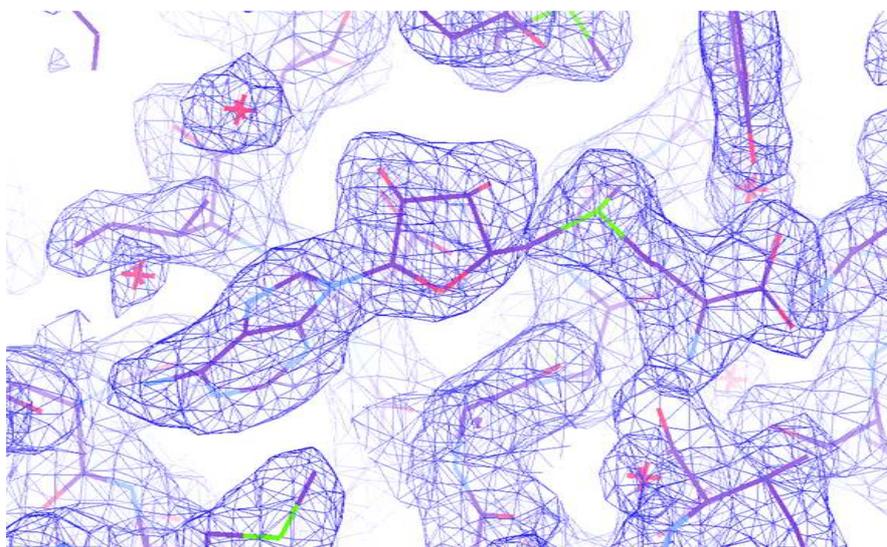


Figure 97 : Modèle de la SAM reconstruit dans les cartes de densité.

Tableau 20 : Statistiques d'affinement et de géométrie du modèle final de ScBud23C202-Trm112-SAM à 2,2 Å.

Résolution (Å)	2.2- 38.3
R/R_{free} (%)	17.8/22.9
R.m.s.d. liaisons (Å)	0.008
R.m.s.d. angles (°)	1.11
Facteur B moyen (Å²)	46.2 (Bud23) 45.6 (Trm112) 43.0 (H ₂ O)
Diagramme de Ramachandran	
Régions favorables	94%
Régions permises	6%

Parallèlement, des cristaux du complexe seul ont été incubés (« soaking ») dans 20 μ L de solution de cristallisation contenant 2mM de SAM pendant une heure. Ils ont ensuite été congelés dans les mêmes conditions que ceux obtenus par co-cristallisation.

Le pouvoir de diffraction de ces cristaux a été testé dans le faisceau de rayons X de la ligne PROXIMA 1 au Synchrotron SOLEIL. Ces cristaux ont diffracté les rayons X entre 5 et 2,2 Å. Pour les cristaux présentant un pouvoir de diffraction supérieur à 3 Å, 1200 images ont été collectées avec une amplitude de 0,2° entre chaque cliché issu d'une mesure de 0,2 secondes.

Des jeux de données collectés à partir des cristaux de co-cristallisation ou de trempage ont été traités de la même manière que décrit précédemment. Les statistiques obtenues pour le jeu de données offrant la meilleure résolution (2,2 Å de résolution) sont présentées dans le tableau 19. Le groupe d'espace et les paramètres de maille sont similaires à ceux obtenus en absence de la SAM.

Le modèle du complexe ScBud23C202-Trm112 à 2 Å de résolution a été utilisé pour l'étape de remplacement moléculaire réalisée avec le programme Molrep de la suite CCP4. Un premier cycle d'affinement a été effectué avec Refmac. L'observation des cartes $2 F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ et $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ pour tous les jeux de données analysés montre la présence de plusieurs zones de densité électronique supplémentaires autour du site actif de Bud23. Celles-ci correspondent à une molécule de SAM dans le site actif de chacune des deux molécules de Bud23 présentes dans l'unité asymétrique ainsi qu'à une hélice α reposant sur la SAM et qui correspond aux résidus N-terminaux de Bud23 non définis dans la carte de densité électronique de la structure obtenue en absence de SAM (figure 97).

La reconstruction et l'affinement du modèle ScBud23C202-Trm112-SAM ont été menés à l'aide des logiciels COOT et Phenix.refine à partir du jeu de données du cristal présentant la meilleure résolution (2,2 Å). Les statistiques d'affinement et de géométrie du modèle final de ScBud23C202-Trm112-SAM sont présentées dans le tableau 20.

L'analyse de cette étude structurale figure dans l'article ci-après.

2. MANUSCRIT SOUMIS A PNAS POUR PUBLICATION LE 10 JUILLET 2014

**Structural and functional studies of Bud23-Trm112
reveal 18S rRNA N7-G1575 methylation occurs on
late 40S precursor ribosomes.**

Juliette Létouart*, Emeline Huvelle*, Ludivine Wacheul*, Gabrielle Bourgeois,
Christiane Zorbas, Marc Graille, Valérie Heurgué-Hamard and Denis Lafontaine

* Contribution équivalente

Structural and functional studies of Bud23-Trm112 reveal 18S rRNA N⁷-G1575 methylation occurs on late 40S precursor ribosomes

Létoquart, J.^{1,*} ; Huvelle, E.^{2,*} ; Wacheul, L.^{3,*} ; Bourgeois, G.¹ ; Zorbas, C.³ ; Graille, M.¹ ; Heurgué-Hamard, V.² ; Lafontaine D.L.J.³

¹ Laboratoire de Biochimie, CNRS, UMR 7654, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau Cedex, France

² CNRS, FRE 3630, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IBPC, 13 rue Pierre et Marie Curie, Paris, F-75005, France

³ Fonds de la Recherche Scientifique (F.R.S.-FNRS), Université Libre de Bruxelles and Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI), Académie Wallonie-Bruxelles, Charleroi-Gosselies, Belgium

* These authors contributed equally.

Corresponding authors:

Marc Graille. Tel: +33-0-169334890. Email: marc.graille@polytechnique.edu

Valerie Heurgue-Hamard. Tel: +33-1-58415145. Email: valerie.heurgue@ibpc.fr

Denis L.J. Lafontaine. Tel: +32-2-650-9771. Email: denis.lafontaine@ulb.ac.be

Classification: BIOLOGICAL SCIENCES - Biochemistry

Keywords: rRNA modifying enzyme, methyltransferase, S-adenosyl-L-methionine, translation, ribosome synthesis.

Running title: Structure of Bud23-Trm112 rRNA methyltransferase

ABSTRACT

Eukaryotic small ribosomal subunit carries only four ribosomal (r) RNA methylated bases, all close to important functional sites. *N*⁷-methylguanosine (m⁷G) introduced at position 1575 on 18S rRNA by Bud23-Trm112 is at a ridge forming a steric block between P- and E-site tRNAs. Here, we report atomic resolution structures of Bud23-Trm112 in the apo and S-adenosyl-L-methionine (SAM)-bound forms. Bud23 and Trm112 interact through formation of a β -zipper involving main chain atoms, burying an important hydrophobic surface and stabilizing the complex. Structures revealed the coactivator Trm112 undergoes an induced fit to accommodate its methyltransferase (MTase) partner. We report important structural similarity between the active sites of Bud23 and *Coffea canephora* xanthosine MTase, leading us to propose and validate experimentally a model for G1575 coordination. We identify Bud23 residues important for Bud23-Trm112 complex formation and recruitment to pre-ribosomes. We report that while Bud23-Trm112 binds precursor ribosomes at an early nucleolar stage, m⁷G methylation occurs at a late step of small subunit biogenesis, implying specifically delayed catalytic activation. Finally, we show Bud23-Trm112 interacts directly with the box C/D snoRNA U3-associated DEAH RNA helicase Dhr1 supposedly involved in central pseudoknot formation. This suggests Bud23-Trm112 might also contribute to controlling formation of this irreversible and dramatic structural reorganization essential for overall folding of small subunit rRNA. Our study brings important novel elements to understand key molecular aspects of human ribosomopathy syndromes associated with WBSCR22 (human Bud23) malfunction.

SIGNIFICANCE STATEMENT

Ribosomes are essential cellular nanomachines responsible for all protein synthesis *in vivo*. Efficient and faithful ribosome biogenesis requires a *plethora* of assembly factors whose precise role and timing of action remains to be established. Here, we determined the crystal structure of Bud23-Trm112, which is required for efficient pre-rRNA processing steps leading to 18S rRNA synthesis and methylates 18S rRNA at position G1575. For the first time, we identified where on Bud23-Trm112 the contacts with precursor ribosomes occur. We further report the essential helicase Dhr1 interacts directly with Bud23-Trm112, proposing a concerted action of these proteins in ribosome assembly. Finally, we reveal the methyl transferase activity of Bud23-Trm112 and its requirement for pre-rRNA processing are disconnected in time.

INTRODUCTION

In living cells, all proteins are synthesized by ribosomes, consisting of four rRNAs and 80 ribosomal proteins in eukaryotes. The synthesis of these nanomachines is a complex multi-step process involving at least 200 assembly factors and dozens of small nucleolar RNAs (snoRNAs) (1). Ribosome assembly factors ensure in a stepwise and dynamic process, efficient pre-rRNA processing and modification, the ordered assembly of 40S and 60S subunits and their export to the cytoplasm. Methylation is a predominant post-transcriptional modification in rRNA occurring either on riboses or bases. Ribose methylation is essentially performed by box C/D snoRNA guided enzymes (2), while base methylations are specifically catalyzed by protein-only methyltransferases, which are highly conserved from yeast to metazoans (3-5). Base methylation is thought to contribute to expanding the structural repertoire of RNA, promoting base stacking through increased hydrophobicity or altering steric hindrance. rRNA base MTases use S-adenosyl-L-methionine (SAM) as a methyl donor and most have been shown or predicted to belong to class I containing the characteristic Rossmann-like fold domain (6).

In *S. cerevisiae*, the large subunit rRNA (25S) carries six inventoried base methylations and, quite remarkably, all enzymes involved have only been identified over the last two years (Rrp8, Bmt2, Rcm1, Nop2, Bmt5 and Bmt6) (7-10). The MTase activity of Rrp8 (responsible for m¹A645) and Nop2 (m⁵C2870) is important for optimal growth on rich medium, while loss of Rcm1, Bmt2, Bmt5 or Bmt6 does not impair significantly cell growth (7, 10). It is often difficult to dissect the precise involvements of these base methylations in ribosome biogenesis and translation because these processes are intimately connected. The small subunit 18S rRNA contains four base methylations: m¹Ψ1191 catalyzed by Nep1 (Emg1; (11), the two adjacent bases m₂⁶A1781m₂⁶A1782 catalyzed by Dim1 (3), and m⁷G1575 by Bud23-Trm112 (4). In contrast with the majority of 25S base methylations, the deletion of these MTases is lethal (Nep1, Dim1) or drastically affects cell growth (Bud23). However, the analysis of specific mutants revealed that the protein itself is essential but not its enzymatic activity. These methylations, however, all cluster in functionally relevant and highly conserved areas of the ribosome suggesting important roles.

Bud23 methylates 18S rRNA at position N⁷ of the highly conserved residue G1575 (yeast numbering), which in bacteria (G1338) has been shown to be important for efficient tRNA binding to the P-site (4). We demonstrated Bud23 is enzymatically active as a heterodimer, in complex with Trm112 (12). Trm112 is a small zinc finger protein, which interacts with and

activates three other class I MTases also related to translation, namely, Mtu2 methylating the translation termination factor eRF1 and Trm9 and Trm11, both modifying tRNAs (13-15, see companion paper). Trm112 is required for Bud23 metabolic stability and therefore for Bud23-mediated methylation of 18S rRNA and efficient small subunit synthesis. Bud23-Trm112 binds early nucleolar pre-ribosomes and could act at the time of A₂ cleavage (12). Genetic interactions suggested Bud23 might be involved in SSU-processome disassembly (16), corresponding to nascent pre-40S ribosomes that have undergone initial U3-dependent pre-rRNA cleavages. More recently, Bud23 was reported to interact physically and functionally with the DEAH-box helicase Dhr1 (17), also required for processing at cleavage site A₂ and with predicted role in central pseudoknot formation (18). The role of Bud23 in 40S maturation and G1575 methylation is conserved in eukaryotes (19, 20). In human, the Bud23 orthologue WBSCR22 (also known as MERM1) forms a complex with TRM112 (20) and is connected to liquid cancers and metastasis (21). Silencing WBSCR22 results in specific increased lethality of myeloma cells, thereby identifying it as potential therapeutic target (22). Furthermore, *WBSCR22* is one of the genes deleted in William-Beuren syndrome (23). Finally, plant Bud23 (RID2) is involved in cell dedifferentiation and wounding (19).

An excess of 200 ribosome assembly factors have been identified in budding yeast, their precise role in biogenesis largely remaining to be elucidated. Here, we combined structural and functional approaches to characterize the 18S rRNA MTase Bud23-Trm112. We report essential features of methylation catalysis, including most importantly an experimentally validated model for guanosine substrate coordination in Bud23 catalytic pocket and the requirement for a Trm112 coactivator induced fit to achieve complex formation and stabilization. We further report Bud23-Trm112 interacts directly with the U3 snoRNA-associated helicase Dhr1, forming *in vitro* a trimeric complex, an observation that offers novel important insights into the involvement of Bud23-Trm112 in small subunit biogenesis. Finally, we provide a methylation “timetable”, demonstrating m⁷G occurs at a late stage of subunit assembly while Bud23-Trm112 is recruited to pre-ribosomes at an early nucleolar step, implying specifically delayed catalytic activation.

MATERIALS AND METHODS

Detailed experimental procedures are available as Supplementary information.

Cloning, production and purification of Dhr1 [58-270] domain

The plasmid pVH481 (Table S1) encoding full length *S. cerevisiae* DHR1 gene was used as template to amplify the DNA region encoding Dhr1 [58-270] domain with primers oMG205 and oMG206 (Table S2). The PCR amplicon was digested by BglIII and XhoI (Fermentas) and cloned into pGEX-6P-1 (BamHI-XhoI) to yield plasmid pMG679.

The GST-Dhr1 [58-270] protein was expressed at 37°C during 3 hours following induction by 0.5 mM IPTG using transformed *E. coli* BL21(DE3) Gold strain cultured in 1 L of 2xYT medium. Cells were harvested and resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl. The protein was purified on a Glutathione sepharose 4B resin (GE Healthcare) and eluted using the same buffer supplemented with 20 mM reduced glutathione. GST was cleaved from the Dhr1 [58-270] domain by overnight incubation with GST-3C protease (100 µg/L of culture) under dialysis against 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol to remove glutathione. Cleaved GST, uncleaved GST-Dhr1 and GST-3C protease were removed by incubating the eluate with Glutathione sepharose 4B resin. The Dhr1 [58-270] protein present in the unbound fraction was further purified by ion-exchange chromatography on a Hitrap SP HP 5 mL (GE Healthcare) column followed by size-exclusion chromatography on a Superdex 75 16/60 column (GE Healthcare) pre-equilibrated with 20 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl.

Reconstitution of Dhr1-Bud23-Trm112 ternary complex

The complex was reconstituted by mixing Bud23-Trm112 with 1.5 molar excess of Dhr1 [58-270] in 20 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 µM ZnCl₂, 5 mM β-mercaptoethanol. The ternary complex was injected on Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrated with the same buffer.

RESULTS & DISCUSSION

An induced fit in Trm112 is necessary to accommodate the methyltransferase Bud23

The crystal structure of the complex between Trm112 and Bud23 MTase domain (residues 1 to 202) from *S. cerevisiae* (referred hereafter as Bud23-Trm112) was determined in absence and presence of S-adenosyl-L-methionine (SAM) cofactor at 2 Å and 2.2 Å resolution, respectively (Table S3). The structures of the apo and SAM-bound forms of the complex are very similar (rmsd value of 0.2 Å). The Bud23 MTase domain adopts a typical class I SAM-dependent MTase fold composed of a central seven-stranded β -sheet flanked by four α -helices on one side (α Y, α Z, α A and α B) and two on the other (α D and α E) (Fig. 1A & S1A). SAM binds Bud23 in a canonical manner compared to class I SAM-dependent MTases, *i.e.* at the C-terminal extremity of the central seven-stranded β -sheet (see supplementary information). Upon SAM binding, residues I12 to H20 and A126 to N131 from Bud23 become ordered (Fig. 1B). The N-terminal residues fold as an extended loop (residues 12 to 15) followed by helix α Y (residues 16 to 24) and lie onto the SAM cofactor. Finally, W122 side chain, adopting two alternate conformations in the apo structure, is locked in a single conformation upon SAM binding (Fig. 1B).

Trm112 is composed of a zinc-binding domain formed by the N and C-terminal extremities of the protein and consisting of an α -helix (α 1) packed against a four-stranded antiparallel β -sheet, as well as a central helical domain (helices α 2 to α 4; Fig. 1A & S1B). The structures of Trm112 alone or in the complex are very similar (rmsd value of 0.9 Å; ref. 13). However, a slight rigid body rotation of the Trm112 central domain relative to the zinc-binding domain is observed to accommodate Bud23 in the Trm112-Bud23 complex, compared to the structure of the Trm112 protein alone. Another important difference is observed for Trm112 residues 128-136, which drastically rearrange in the complex upon rotation of the peptide bond connecting N127 to L128 so as to avoid steric clashes with Bud23. A similar rearrangement was previously described for the corresponding region from *E. cuniculi* Trm112 in the complex with Mtq2 (*EcMtq2-Trm112*, ref. 24) and is observed in the crystal structure of *Y. lipolytica* Trm9-Trm112 complex (*YlTrm9-Trm112*; L etoquart *et al.*, see companion manuscript). Hence, we conclude Trm112 undergoes a conserved “induced fit” to accommodate its MTase partners.

Formation of Bud23-Trm112 complex is required for efficient 18S rRNA maturation

In the Bud23-Trm112 complex, both proteins interact mainly via formation of a parallel β -zipper between Bud23 strand β 3 and Trm112 strand β 4 to form a remarkable continuous eleven-stranded β -sheet (Fig. 1A and C). Complex formation involves a large surface area of 1230 \AA^2 formed by 19 and 24 residues from Bud23 and Trm112, respectively. The interface is characterized by the presence of a central large hydrophobic core composed by residues F50, V72, L87, L95, M96, L97, P105 and F106 from Bud23 and M1, F8, L9, I40, F46, I50, I125, P126, L128 and L129 from Trm112 (Fig. 1C-D & Fig. S1A-B). The hydrophobic core at the interface is shielded from the solvent upon complex formation, explaining the stabilizing effect of Trm112 on Bud23 in *S. cerevisiae* cells and its requirement to obtain soluble Bud23 in *E. coli* (12). The hydrophobic interface is surrounded by polar residues involved in the formation of 12 hydrogen bonds and 2 salt bridges (Table S4). Two hydrogen bonds are formed between the main chain atoms from residues located in Bud23 strand β 3 (L97) and Trm112 strand β 4 (P126 and L128) and hence contribute to the formation of the β -zipper interaction (Fig. 1C). Among the other polar contacts, two Bud23 residues (D94 and R107) are engaged in five hydrogen bonds with K2, T5, N7 and R53 residues from Trm112 (Fig. 1C-D). Finally, two salt bridges are involved in the interaction (D112 and R139 from Bud23 with R53 and D17 from Trm112, respectively; Fig. 1D; Table S4).

To validate the functional importance of Bud23-Trm112 complex formation in ribosome biogenesis, we mutated three Bud23 residues involved in the interface with Trm112: D94, M96 and D112 (Fig. 1C-D). Altogether, five substitutions were introduced at these positions (Table 1). As Bud23 cannot be expressed as a soluble protein alone (12), we could not test the ability of these mutants to interact with Trm112 using classical *in vitro* approaches. We reasoned that as deletion of *TRM112* strongly affects Bud23 stability *in vivo* (12), Bud23 mutants unable to interact with Trm112 should demonstrate decreased stability in yeast cells. The M96A mutant exhibited a modest decrease in protein level and was not associated with any particular phenotype suggesting that this Bud23 mutant still interacts with Trm112 (Table 1 and Fig. S2B). The remaining mutants (D94A, D112A and the charge inversion mutants D94R and D112R) resulted in strongly impaired Bud23 stability, which correlates with a slow growth defect, similarly to the *bud23* Δ strain (Table 1 and Fig. S2A-B; (4)). Next, we analyzed the G1575 methylation level in these four mutants. Quite surprisingly, considering the high instability of these Bud23 mutants, only one substitution (D112R) affected

methylation (Table 1 and Fig. S2C). This indicates that low residual levels of the D94A, D94R and D112A Bud23 mutants are sufficient to efficiently modify 18S rRNA and suggests that these three mutants are still able to interact with Trm112, most likely in a transient manner. This also implies an effective recycling of the MTase complex towards nascent pre-ribosomes. Regarding the D112R mutant, we postulate that as D112 forms a salt bridge with R53 from Trm112 (Fig. 1D), its replacement by the positively charged Arginine, induces repulsion between both proteins and completely precludes complex formation thereby totally inhibiting 18S rRNA methylation.

Finally, we analyzed the effect of these four mutants on ribosome biogenesis (Table 1 and Fig. S3). As expected from their low protein abundance, three mutants (D94R, D112A and D112R) exhibited reduced 18S rRNA production. More surprisingly, the unstable D94A mutant did not demonstrate any obvious 18S rRNA production defects, suggesting that it is less affected than the three others. It is noteworthy that substitutions at position D94 affect less protein function than equivalent substitutions at position D112 and that charge inversion mutants display the strongest 18S rRNA maturation defects, suggesting that Ala mutants retain more Trm112 binding activity than Arg mutants. This is correlated with a recent report showing that Bud23 D94G mutant retains binding for Trm112 while D112G does not (17).

G1575 is coordinated by a network of conserved Bud23 residues

Mapping sequence conservation at the surface of Bud23-Trm112 revealed a highly conserved positively charged area surrounding the cavity where the methyl group donor lies (Fig. S4A-C). To understand how Bud23 selects and N^7 G methylates 18S rRNA at position 1575, we searched the *Protein Data Bank* (PDB) for proteins sharing strong structural similarity with Bud23 MTase domain using DALI (25). This identified more than 900 crystal structures of MTases with Z-scores ranging from 20 to 10. Among these, few catalyze N^7 methylation on a purine ring, including *E. coli* ArmA and RmtB (26), *E. cuniculi* mRNA cap guanine N^7 -MTase (27) and *Coffea canephora* xanthosine MTase (XMT; rmsd value with Bud23 of 3 Å over 171 C α atoms, 16% sequence identity; (28) and Supplemental information).

Superimposing the XMT-xanthosine complex onto Bud23 allowed for the first time to propose a robust model for 18S rRNA G1575 coordination into the active site of Bud23 (Fig. 2A-B). This provided important insights into catalysis mode and methylation timing during ribosome biogenesis. First, many of the XMT residues involved in xanthosine binding are strikingly conserved or replaced by residues with similar properties in Bud23 (Fig. 2A). Indeed, Y22, Q32, Q121 and W122 from Bud23 match respectively with Y18, N25, Q161

and W162 from XMT. Second, no steric clashes are observed between xanthosine purine ring and Bud23 residues. Third, superimposition of the purine ring from GMP onto the xanthosine purine ring reveals that the carbonyl group from the GMP ring could form a direct hydrogen bond with Q121 side chain and a water-mediated hydrogen bond with W122 side chain while its purine ring would stack onto Y159 from Bud23 (Fig. 2B). In this model, the N^7 atom from GMP is only 2.6 Å away from the SAM methyl group and ideally positioned for methyl transfer by the in-line S_N2 -type reaction catalyzed by most class I SAM-dependent MTases. Finally, rotation of the ribose moiety relative to the purine ring to orient 5' and 3' groups from the GMP ribose towards the solvent and in a position allowing to accommodate the rRNA that surrounds G1575, brings the ribose 2'-OH within hydrogen bond distance from Y159 hydroxyl group and from a water molecule present in our crystal structure. This later could mediate hydrogen bonds between 2'-OH and S118 and Q32 side chains (Fig. 2B). In this model, the conserved K21 and R27 from helices αY and αZ are perfectly oriented to interact with the 18S rRNA phosphate backbone, suggesting a possible role for these residues in recruiting Bud23-Trm112 to pre-ribosomes (see below). Furthermore, all residues from Bud23 surrounding GMP in our model are strictly or highly conserved in Bud23 proteins from different species (Fig. S1A).

To validate our model, we mutated several strongly conserved Bud23 residues (E18, K21/R27, Y22, I31, S118, W122 and Y159) lining the proposed GMP binding site and analyzed the effect of these mutations on RNA methylation, growth and rRNA production. As we previously showed that Bud23-Trm112 is recruited to nucleolar 90S pre-ribosomes (the first intermediate detected, containing the 35S primary transcript) and that it escorts pre-40S precursors into the cytoplasm (12), we established the distribution of Bud23 and Trm112 on velocity gradient to assess the impact of selected mutations on the recruitment dynamics of the Bud23-Trm112 complex to pre-ribosomes (Figs 2C-D and S4D). As control to inactivate Bud23 MTase function, we mutated the strictly conserved D77 residue, which forms hydrogen bonds with the SAM ribose 2' and 3' hydroxyl groups (Fig. 1B), into Ala (D77A), as previously done for other MTases (5, 24). Five mutants were stably expressed in yeast (Y22A, E18A, K21E/R27E, W122A and Y159A) and, with the exception of E18A, all were enzymatically inactive *in vivo* while retaining SAM binding activity *in vitro* (Table 1, Fig. S2B-C). Yeast cells expressing these five mutations had normal doubling time and rRNA production (Table 1, Fig. S2A). Similarly to WT Bud23, the Y22A, W122A and Y159A mutants predominantly colocalized with pre-90S ribosomes (fractions 10-12) with limited amounts in the lighter fractions (fractions 1 to 6; Fig. 2C-D & Fig. S4D). Importantly,

Trm112 comigrated partially with pre-90S-bound Bud23, indicating that the MTase is integrated within pre-ribosomes as a heterodimeric Bud23-Trm112 complex. Trm112 was also abundantly detected in lighter fractions, consistent with the observations that it is involved in other complexes, smaller in size, involved in tRNA (with Trm9 and Trm11) and translation factor (with Mtq2) modifications. In cells expressing the K21E/R27E mutation, most of Bud23, and concomitantly Trm112, were detected in lighter fractions of the gradient (peak centred around fraction 7) supporting a role for these positively charged residues in the interaction with the 18S rRNA phosphate backbone. This is consistent with the observed methylation inhibition (Table 1) and, as predicted above, indicates deficient pre-ribosome recruitment.

The four other mutants (I31W, D77A, S118E and S118R) showed a decrease in protein level (from two to five fold) accompanied by loss of SAM binding and loss of enzymatic activity (Fig. S2B-C, Table 1). D77A was neither affected for growth nor for rRNA synthesis, confirming that Bud23 MTase activity is fully dispensable for 18S rRNA production while the presence of the protein is required. This is similar to what was reported with other small ribosomal subunit base MTases (3-5). As I31 and S118 lost their ability to interact directly with SAM, we propose that these substitutions induce protein misfolding. In agreement, I31W and S118E are defective for growth and protein stability. S118R is quite stable, does not affect growth and showed an increased level of association with large pre-90S ribosomes compared to wild-type protein (Fig. 2C-D, Fig. S2A-B). Again, Trm112 distribution strikingly followed Bud23 and the protein was clearly enriched in heavier fractions. We speculate the higher stability of S118R compared to S118E results from increased affinity for pre-90S by contributing a positively charged side chain contacting rRNA phosphate backbone. This leads to extended retention time of Bud23/Trm112 on nucleolar pre-ribosomes. As S118R mutant behaves as the SAM binding deficient D77A mutant (Table 1; Fig 2C-D), this further suggests that SAM binding to Bud23-Trm112 influences its affinity for the pre-ribosome, but does not interfere with correct 18S rRNA maturation.

Bud23-Trm112 and the DEAH-box helicase Dhr1 form a ternary complex

The DEAH-box RNA helicase Dhr1 and Bud23-Trm112 are part of the same pre-ribosomes (12). Further, a Dhr1 domain spanning residues [195-252] interacts with Bud23 in a two-hybrid assay (17). We expressed and purified a recombinant Dhr1 fragment consisting of residues 58 to 270 and analyzed its ability to interact directly with Bud23-Trm112 *in vitro*.

Size-exclusion chromatography experiments demonstrated that Dhr1 [58-270] interacts stably with Bud23-Trm112, forming a heterotrimeric complex (Fig. 3A). Since our Bud23 construct expands from residues 1 to 202, this further indicates residues 203 to 275 are dispensable for interaction with Trm112 and Dhr1. The helicase Dhr1 interacts tightly with the box C/D snoRNA U3 (18), which associates through Watson-Crick base-pairing with pre-rRNAs regulating the timing of central pseudoknot formation. The central pseudoknot is a long-range interaction occurring between residues located >1.1 kb apart on 18S rRNA, its formation is essential for overall folding of small subunit rRNA. In maturing subunits, sequences base-paired in the pseudoknot are sequestered by interactions with U3. Dhr1 was suggested to trigger U3 displacement, a prerequisite to central pseudoknot formation (18).

Based on their physical proximity, we were interested to know whether Dhr1 might be involved in structural rearrangements within pre-ribosomes that might contribute to efficient recruitment of Bud23-Trm112. We therefore established the distribution of Bud23-Trm112 on velocity gradients in presence and absence of the helicase (Fig. 3B). We used a strain in which the endogenous promoter of *DHR1* was replaced directly on the chromosome by a methionine-regulated expression cassette (*pMET*). In this strain (*pMET::dhr1*), the expression of *DHR1* is rapidly “switched off” upon addition of methionine to the growth medium leading to previously described pre-rRNA processing inhibition at sites A₁ and A₂ and accumulation of aberrant 22S RNA (Fig 3B and ref. 18). In *pMET::dhr1*, markedly reduced amounts of Bud23-Trm112 comigrated with large nucleolar pre-90S ribosomes (Fig. 3B). A shift to lighter fractions was particularly evident upon addition of methionine for 2 hours but was also seen under permissive conditions, indicating that even in absence methionine the expression of *DHR1* was affected owing to promoter replacement. The altered distribution of Bud23-Trm112 observed in *pMET::dhr1* is similar to that observed with mutation K21E/R27E lying in the proposed interaction surface with pre-ribosomes, leading us to conclude Dhr1 contributes to efficient recruitment of Bud23-Trm112 to pre-ribosomes.

m⁷G1575 is a late maturation event occurring on 3'-extended 18S rRNA precursors

The superimposition of Trm112-Bud23-GMP model onto residue G1575 in the crystal structure of the *S. cerevisiae* 80S ribosome (29) revealed large steric clashes between Bud23 and ribosomal components (Fig. 4A), suggesting that methylation occurs on precursors rather than on mature 18S rRNA. To test this prediction, we established the timing of methylation by differential primer extension using oligonucleotides specific to 18S rRNA sequences

(primer “a”) or internal transcribed spacer 1 (ITS1)-containing precursors (primer “b”) (Fig. 4B).

The m^7G1575 methylation was readily detected from primer “a” and as expected was lost in *bud23* Δ and *trm112* Δ cells (Fig. 4C). The $m_2^6A1781m_2^6A1782$ modification located at the 3’ end of 18S rRNA in helix 45 and introduced by Dim1 at the level of 20S pre-rRNA was easily mapped from primer “b” (Fig. 4C and ref. 3). It was detected in cells lacking Bud23 or Trm112, demonstrating that Dim1 dimethylation is not dependent upon prior m^7G1575 modification by Bud23-Trm112 (Fig. 4C). Technically, the m^7G modification cannot be detected from primer “b” on 20S pre-rRNA because the Dim1-dependent dimethylation at A1781 and A1782 are blocking the reverse transcriptase before it reaches G1575 (Fig. 4D, lanes 1 and 4). However, in cells expressing the catalytically deficient allele *dim1-Y131G* as their sole source of Dim1, m^7G1575 became detectable by primer extension from oligonucleotide “b” (Fig. 4D, lanes 2 and 3). This demonstrates that m^7G is not dependent on prior dimethylation by Dim1. Further, since we did not detect m^7G on 35S, 33S and 32S pre-rRNA intermediates, which are also selected by primer “b” and are naturally non-dimethylated 20S precursors (3), we conclude that m^7G occurs at the level of 20S pre-rRNA. In conclusion, Bud23-Trm112 and Dim1 are both active at the level of 20S pre-rRNA and they operate independently of each other.

CONCLUSIONS

In this work, we presented crystal structures of yeast Bud23-Trm112 complexes in the apo and SAM-bound forms, revealing essential aspects of methylation catalysis, coactivation by Trm112 and ribosomal substrate recognition. We showed Trm112 undergoes an evolutionarily conserved induced fit to accommodate its MTase partners. We confirmed our earlier prediction that Bud23 associates with Trm112 through formation of a β -zipper involving hydrogen bonds between main chain atoms and masking a large destabilizing hydrophobic surface on Bud23 (12). Together with the structures of Mtq2-Trm112 and Trm9-Trm112 complexes (24), the Bud23-Trm112 structure highlights the extraordinary structural plasticity allowing Trm112 to interact with four MTases harbouring less than 20% overall sequence identity (see companion paper by Letoquart *et al.* for further discussion). Indeed, Bud23, Mtq2, Trm9, and most likely Trm11, use the same region of their class I SAM-dependent MTase fold and strikingly similar type of interactions to bind to the same region of their activator Trm112.

In addition, we identify residues important for Bud23-Trm112 complex formation, SAM binding, methyl transfer and association with pre-ribosomes. We modelled the catalytic pocket of Bud23, concluding it coordinates its substrate in a fashion similar to *Coffea canephora* xanthosine MTase, with the guanosine aligned for methyl transfer according to an in-line S_N2-type catalysis, typical of class I MTases.

When does m⁷G1575 takes place? Bud23 binds pre-ribosomes at an early nucleolar stage (12), we nonetheless showed modification is specifically delayed, occurring at a late step in ribosome biogenesis, corresponding to 20S pre-rRNA formation and implying specific catalytic activation. What triggers this specific MTase activation is not currently understood. We discussed above substrate accessibility issues within Bud23-Trm112 catalytic cavity. Presumably, subunit biogenesis has to achieve a specific maturation stage inasmuch substrate folding becomes compatible with RNA modification. We report Bud23-Trm112 interacts directly with the DEAH-box helicase Dhr1 forming a trimeric complex *in vitro* and requiring its intervention for efficient recruitment to pre-ribosomes. Dhr1 was suggested to regulate timing of central pseudoknot formation (18), a dramatic irreversible structural reorganization absolutely essential for overall folding of small subunit RNA. Whether Bud23-Trm112 contributes to efficient central pseudoknot formation is the subject of ongoing research.

Bud23-Trm112 displays striking structural similarity with *E. coli* RlmA^I, which catalyzes N¹-guanine base methylation on 23S rRNA (Fig. S5). RlmA^I is composed of a N-terminal zinc-binding domain juxtaposed to a class I MTase domain. It is interesting that in Bud23-Trm112, the zinc-binding domain from Trm112 precisely occupies in *trans*- the position of a similar domain present in *cis*- in RlmA^I, with the zinc atom similarly located in both structures (Fig S5). As the zinc-binding domain of RlmA^I was proposed to interact with 23S rRNA (31), we suggest Trm112 might contribute to rRNA binding. The observation that Trm112 systematically comigrated with pre-ribosome-associated Bud23 is compatible with this possibility (Fig. 2C-D and 3B; ref. 12).

The function of the 18S rRNA m⁷G1575 methylation in ribosome biogenesis and translation is not yet fully understood. Deletion of *BUD23* confers hypersensitivity to paromomycin and a cold-sensitive growth defect (Fig. S6). However, methylation *per se* is not required for optimal growth as cells expressing catalytically defective *bud23* alleles exhibit normal growth properties (Table 1; ref. 4). We believe it is very unlikely that cells evolved and conserved such a sophisticated modification mechanism, involving formation of the Bud23-Trm112 heterodimeric holoenzyme and delayed modification, if m⁷G1575 were not conferring any advantages to ribosome biogenesis or function. On the small subunit, m⁷G is precisely located

at a ridge forming a steric block between P- and E-site tRNAs, compatible with a possible function in translation. For comparison, Dim1 is essential for cell survival because it is required for early nucleolar pre-rRNA processing steps indispensable for 18S rRNA synthesis while the $m_2^6A1781m_2^6A1782$ dimethylation is not essential for growth, and cells expressing a catalytically deficient methylation allele of *DIMI* are perfectly viable (32). However, yeast cells expressing non-dimethylated ribosomes are hypersensitive to aminoglycoside antibiotics and impaired for *in vitro* translation of specific mRNAs (32), indicating that the modification plays a significant role in translation.

Finally, WBSCR22, the human Bud23 orthologue, is highly expressed in invasive breast cancers and integrity of its SAM binding motif is required to confer metastatic properties to otherwise nonmetastatic cells (21). Furthermore, silencing of WBSCR22 results in specific increased lethality of myeloma cells, identifying it as potential target for cancer therapeutics (22). By reporting absolutely essential observations on Bud23-Trm112 catalysis and substrate interaction, this work contributes decisive novel elements to the molecular characterization of human disease symptoms associated with ribosome biogenesis dysfunction provoked by WBSCR22 malfunction.

Acknowledgements

MG acknowledges financial support from the CNRS ATIP-AVENIR program, the CNRS and Ecole Polytechnique. We thank SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities. JL holds a PhD fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and Université Paris-Saclay (France). Research in the laboratory of DLJL is supported by the FRS/F.N.R.S, the European Regional Development Funds (ERDF), the Région Wallonne (DGO6) and ULB. DLJL is affiliated with the Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI). CZ was the recipient of a "Fonds de la Recherche dans l'industrie et l'Agriculture" (FRIA) fellowship. Work of VHH was supported by the CNRS and by the "Initiative d'Excellence" program from the French State (Grant "DYNAMO", ANR-11-LABX-0011).

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Crystal structures of *S. cerevisiae* Bud23-Trm112 MTase complexes

A. Ribbon representation of the complex between Trm112 (green) and Bud23 (blue). The zinc atom bound to Trm112 is depicted as a dark grey sphere and the side chains from the cysteine residues coordinating this zinc atom are shown as sticks. The SAM cofactor bound to Bud23 is shown as sticks with carbon atoms shown in light grey. The SAM methyl group (CH₃) transferred during the methylation reaction is shown as a grey sphere. Secondary structure elements from Trm112 are shown in italics. Bud23 secondary structure elements are annotated according to the nomenclature proposed by Martin and McMillan (34).

B. Conformational Bud23 changes induced by SAM binding. The structure of Bud23 bound to SAM (orange) is superimposed onto Bud23 apo structure (blue). Residues involved in SAM binding, undergoing conformational changes upon SAM binding or being ordered upon SAM binding are shown as sticks.

C-D. Detailed views of the interface between Trm112 and Bud23. Residues involved in the interaction are shown as sticks. Electrostatic interactions (hydrogen bonds and salt bridges) are depicted by black dashed lines. Color code as in panel A.

Figure 2. Bud23 catalytic pocket and interaction of Bud23-Trm112 with pre-ribosomes

A. Superimposition of Bud23 (blue) onto the structure of *C. canephora* xanthosine MTase (purple; ref. 28) bound to xanthosine (green sticks, annotated Xant) and comparison of their active sites. The SAM cofactor bound to Bud23 is shown as sticks with carbon atoms shown in light grey. The SAM methyl group (CH₃) transferred during the methylation reaction is shown as a grey sphere. Residues important from xanthosine MTase active site and equivalent residues from Bud23 are shown as sticks.

B. Model of a GMP molecule (yellow) bound to Bud23 active site. Model based on superimposition shown in A and generated by superimposing the guanine ring from GMP onto xanthosine. Conserved residues from Bud23 active site that could be involved in GMP binding are shown as sticks and hydrogen bonds that these residues could form with GMP are depicted by black dashed lines. The distance between the SAM methyl group (grey sphere) and the guanine N⁷ atom (blue sphere) is 2.6Å and is indicated by a red dashed line. Residues mutated in this study are underlined. Water molecules are depicted by red spheres.

C. Distribution of Bud23-Trm112 on velocity gradients. Total extracts from strains indicated were resolved on 10-50% sucrose gradients, total protein extracted from each fractions collected and analyzed by Western-blotting with antibodies specific to Bud23 and Trm112.

D. Quantification of panels shown in C. Signals captured with BioRad chemidoc MP imaging system. X axis, fraction 1-24; Y axis, % of signal intensity for indicated protein in each fraction.

Figure 3. Bud23-Trm112 complex interacts directly with Dhr1

A. Left, superposition of three different gel filtration elution profiles: Bud23-Trm112 complex alone (OD signal at 280nm, black dotted line), Dhr1[58-270] alone (OD signal at 220nm, grey dashed line) and the Bud23-Trm112-Dhr1[58-270] ternary complex after *in vitro* reconstitution (addition of Dhr1 to Bud23-Trm112, OD signal at 280nm, black solid line). Black solid line: the minor peak observed (volume 15-16 mL) corresponds to the excess of Dhr1 [58-270] used to reconstitute the ternary complex. Right, analysis of the content of the major elution peak observed for each experiment on a 15% SDS-PAGE. MW: Molecular Weight marker.

B. The distribution of Bud23-Trm112 on velocity gradients is affected upon alteration of Dhr1 expression. Left, sucrose gradient analysis (see Fig. 2) of total extracts from *pMET::dhr1* cells grown in absence or presence of methionine (met). Right, depletion of Dhr1 leads to pre-rRNA processing inhibition at sites A₁ and A₂ with concomitant accumulation of aberrant 22S RNA. Total RNA extracted from *pMET::dhr1* cells grown in the absence or presence of met for time points indicated was analyzed by Northern-blotting with a probe specific to ITS1 (oligo b, see Fig. 4B). Inset, drop assay (1x and 10x dilution) on synthetic medium containing or not methionine. Cells were grown for 3 d at 30°C.

Figure 4. m⁷G methylation is a late maturation event occurring on 3'-extended 18S rRNA precursor

A. Yeast mature 40S ribosomal subunit (PDB codes: 3U5B and 3U5C) with G1575 highlighted in red; ribosomal proteins in grey; 18S rRNA in orange. Inset, superimposition of Bud23-Trm112-GMP model (blue) on G1575 (yellow sticks) in 40S reveals important steric clashes.

B. 18S rRNA synthesis pathway showing pre-rRNA intermediates (35S, 33S, 32S and 20S), cleavage sites (A₁, A₂, A₃ and D) and oligonucleotides a and b.

C-D. Differential primer extension mapping of m⁷G1575 and m⁶₂A1781m⁶₂A1782.

Total RNA extracted from strains indicated was processed for primer extension analysis with oligonucleotides a or b. Lanes 1-2 and 3-4 in panel D are showing two independent biological replicates. Structural stops (*) indicate gel loading was even.

C. Dim1 dimethylation at A1781/A1782 does not require Bud23-Trm112.

D. The naturally undimethylated 35S, 33S and 32S detected with oligo b are not modified at m⁷G1575 (lanes 1 and 4) indicating Bud23-Trm112 modifies at the level of 20S. In cells lacking functional Dim1, m⁷G takes place indicating Bud23 methylation at G1575 does not require Dim1 catalytic activity (lanes 2-3).

REFERENCES

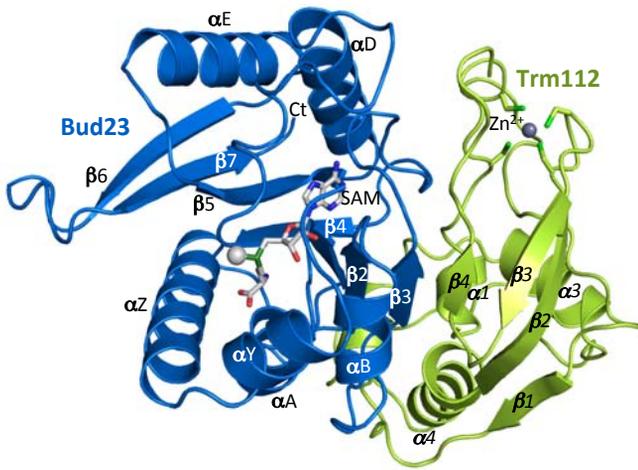
1. Woolford JL, Jr. & Baserga SJ (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195(3):643-681.
2. Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, & Kiss T (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85(7):1077-1088.
3. Lafontaine D, Vandenhoute J, & Tollervey D (1995) The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev* 9(20):2470-2481.
4. White J, *et al.* (2008) Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. *Mol Cell Biol* 28(10):3151-3161.
5. Leulliot N, Bohnsack MT, Graille M, Tollervey D, & Van Tilbeurgh H (2008) The yeast ribosome synthesis factor Emg1 is a novel member of the superfamily of alpha/beta knot fold methyltransferases. *Nucleic Acids Research* 36(2):629-639.
6. Schubert HL, Blumenthal RM, & Cheng X (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem Sci* 28(6):329-335.
7. Peifer C, *et al.* (2013) Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m1A 645 base modification of 25S rRNA. *Nucleic Acids Research* 41(2):1151-1163.
8. Sharma S, Watzinger P, Kotter P, & Entian KD (2013) Identification of a novel methyltransferase, Bmt2, responsible for the N-1-methyl-adenosine base modification of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 41(10):5428-5443.
9. Sharma S, *et al.* (2014) Identification of novel methyltransferases, Bmt5 and Bmt6, responsible for the m3U methylations of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 42(5):3246-3260.
10. Sharma S, Yang J, Watzinger P, Kotter P, & Entian KD (2013) Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. *Nucleic Acids Research* 41(19):9062-9076.
11. Meyer B, *et al.* (2011) The Bowen-Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1) has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of Psi1191 in yeast 18S rRNA. *Nucleic Acids Research* 39(4):1526-1537.
12. Figaro S, *et al.* (2012) Trm112 is required for Bud23-mediated methylation of the 18S rRNA at position G1575. *Mol Cell Biol* 32(12):2254-2267.

13. Heurgue-Hamard V, *et al.* (2006) The zinc finger protein Ynr046w is plurifunctional and a component of the eRF1 methyltransferase in yeast. *J Biol Chem* 281(47):36140-36148.
14. Mazauric MH, Dirick L, Purushothaman SK, Bjork GR, & Lapeyre B (2010) Trm112p is a 15-kDa zinc finger protein essential for the activity of two tRNA and one protein methyltransferases in yeast. *J Biol Chem* 285(24):18505-18515.
15. Purushothaman SK, Bujnicki JM, Grosjean H, & Lapeyre B (2005) Trm11p and Trm112p are both required for the formation of 2-methylguanosine at position 10 in yeast tRNA. *Mol Cell Biol* 25(11):4359-4370.
16. Sardana R, White JP, & Johnson AW (2013) The rRNA methyltransferase Bud23 shows functional interaction with components of the SSU processome and RNase MRP. *RNA J.* 19(6):828-840.
17. Sardana R, Zhu J, Gill M, & Johnson AW (2014) Physical and Functional Interaction between the Methyltransferase Bud23 and the Essential DEAH-Box RNA Helicase Ecm16. *Mol Cell Biol* 34(12):2208-2220.
18. Colley A, Beggs JD, Tollervey D, & Lafontaine DL (2000) Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. *Mol Cell Biol* 20(19):7238-7246.
19. Ohbayashi I, Konishi M, Ebine K, & Sugiyama M (2011) Genetic identification of Arabidopsis RID2 as an essential factor involved in pre-rRNA processing. *The Plant journal* 67(1):49-60.
20. Ounap K, Kasper L, Kurg A, & Kurg R (2013) The human WBSCR22 protein is involved in the biogenesis of the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *PloS one* 8(9):e75686.
21. Nakazawa Y, Arai H, & Fujita N (2011) The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis. *Cancer Res* 71(3):1146-1155.
22. Tiedemann RE, *et al.* (2012) Identification of molecular vulnerabilities in human multiple myeloma cells by RNA interference lethality screening of the druggable genome. *Cancer Res* 72(3):757-768.
23. Doll A & Grzeschik KH (2001) Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 95(1-2):20-27.

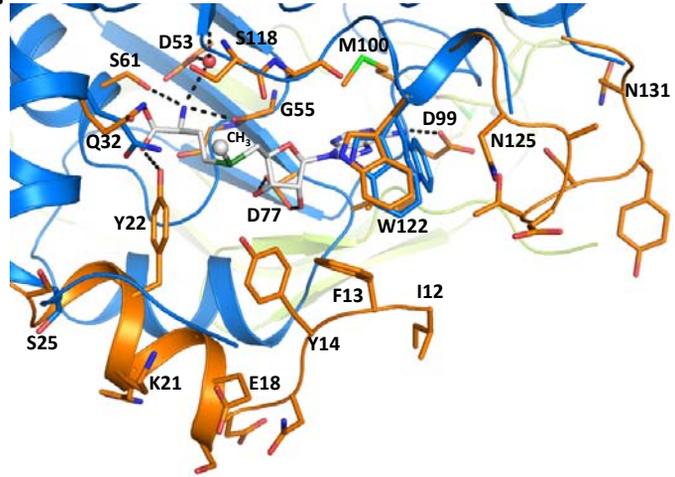
24. Liger D, *et al.* (2011) Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 'hub' protein. *Nucleic Acids Research* 39(14):6249-6259.
25. Holm L & Rosenstrom P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W545-549.
26. Schmitt E, Galimand M, Panvert M, Courvalin P, & Mechulam Y (2009) Structural bases for 16 S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases. *J Mol Biol* 388(3):570-582.
27. Fabrega C, Hausmann S, Shen V, Shuman S, & Lima CD (2004) Structure and mechanism of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase. *Mol Cell* 13(1):77-89.
28. McCarthy AA & McCarthy JG (2007) The structure of two N-methyltransferases from the caffeine biosynthetic pathway. *Plant Physiol* 144(2):879-889.
29. Ben-Shem A, *et al.* (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334(6062):1524-1529.
30. Thomas SR, Keller CA, Szyk A, Cannon JR, & Laronde-Leblanc NA (2010) Structural insight into the functional mechanism of Nep1/Emg1 N1-specific pseudouridine methyltransferase in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Research* 39(6):2445-2457.
31. Das K, *et al.* (2004) Crystal structure of RlmAI: implications for understanding the 23S rRNA G745/G748-methylation at the macrolide antibiotic-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(12):4041-4046.
32. Lafontaine DL, Preiss T, & Tollervey D (1998) Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Mol Cell Biol* 18(4):2360-2370.
33. Ghaemmaghami S, *et al.* (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425(6959):737-741.
34. Martin JL & McMillan FM (2002) SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol* 12(6):783-793.

Figure 1

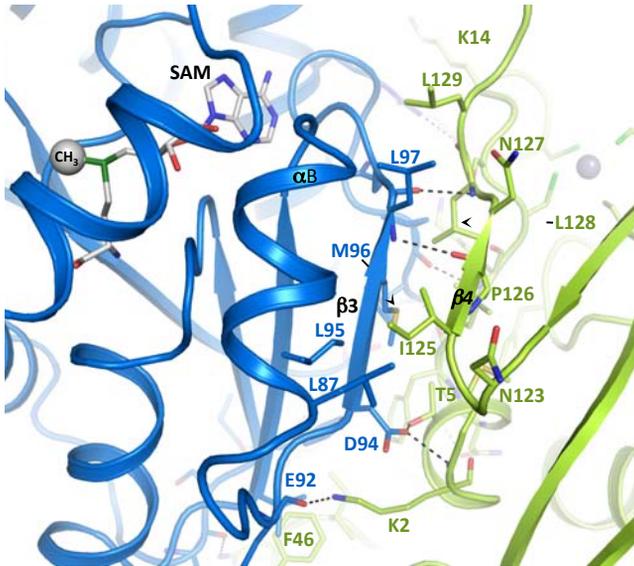
A.



B.



C.



D.

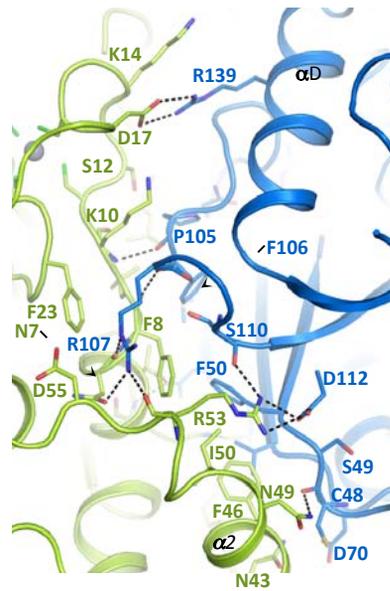


Figure 2

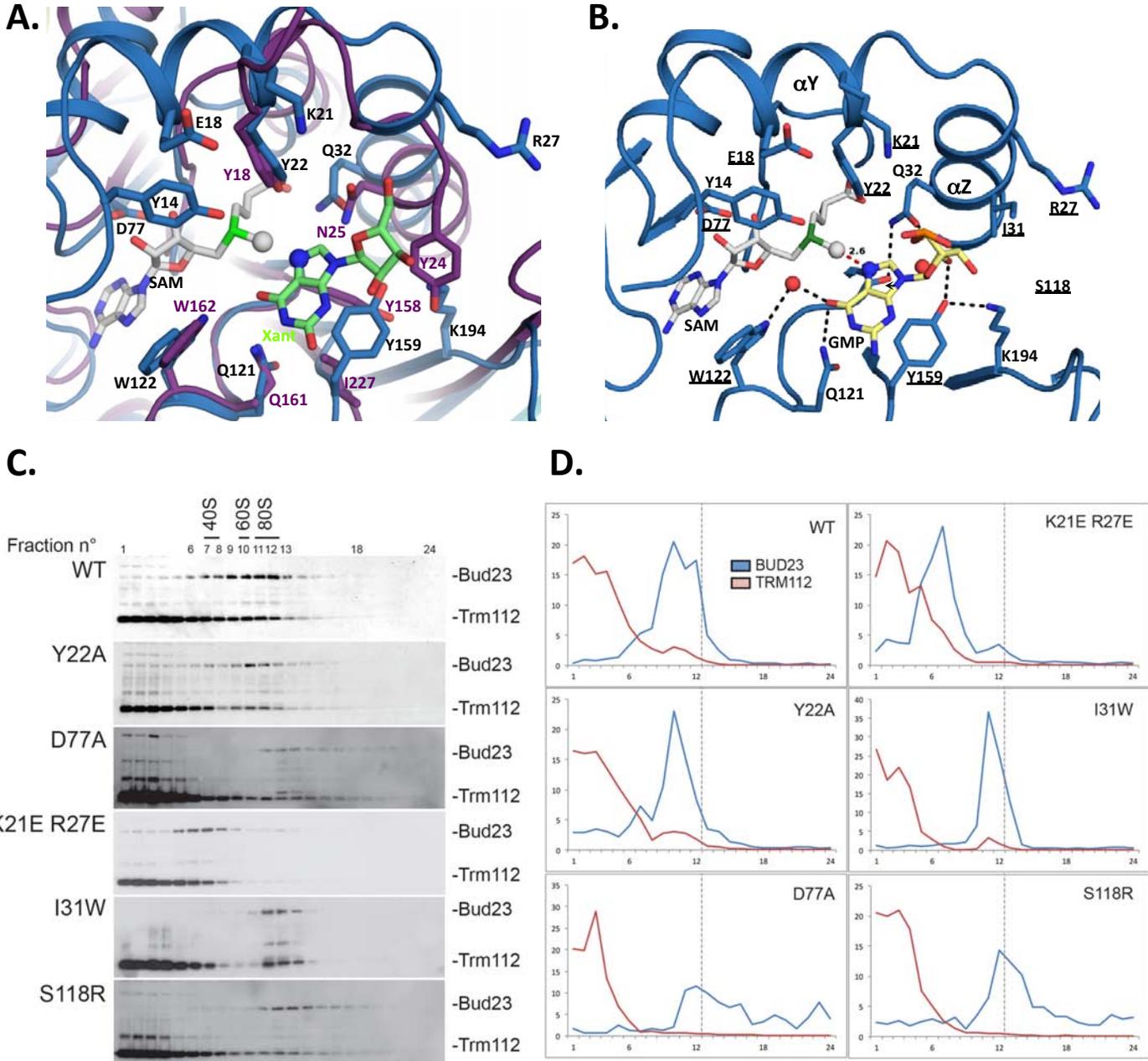
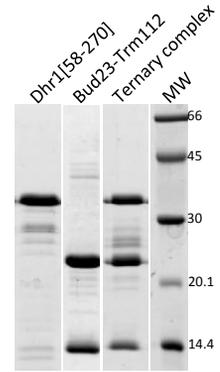
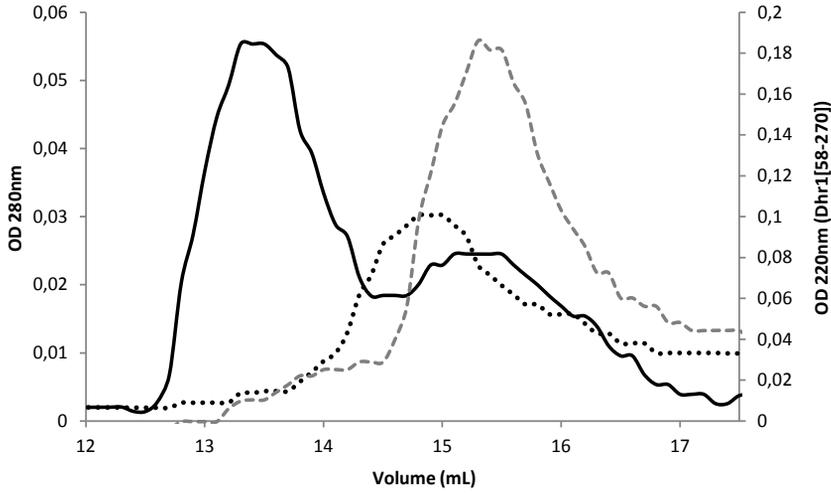


Figure 3

A.



B.

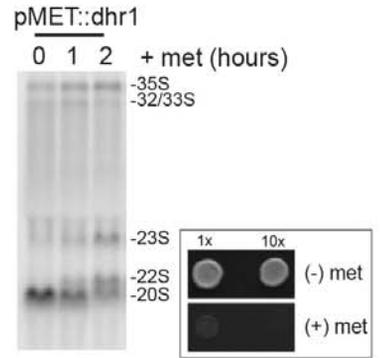
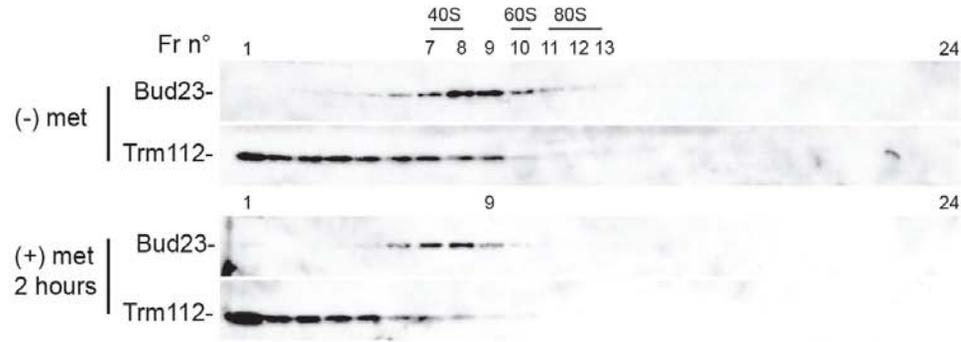
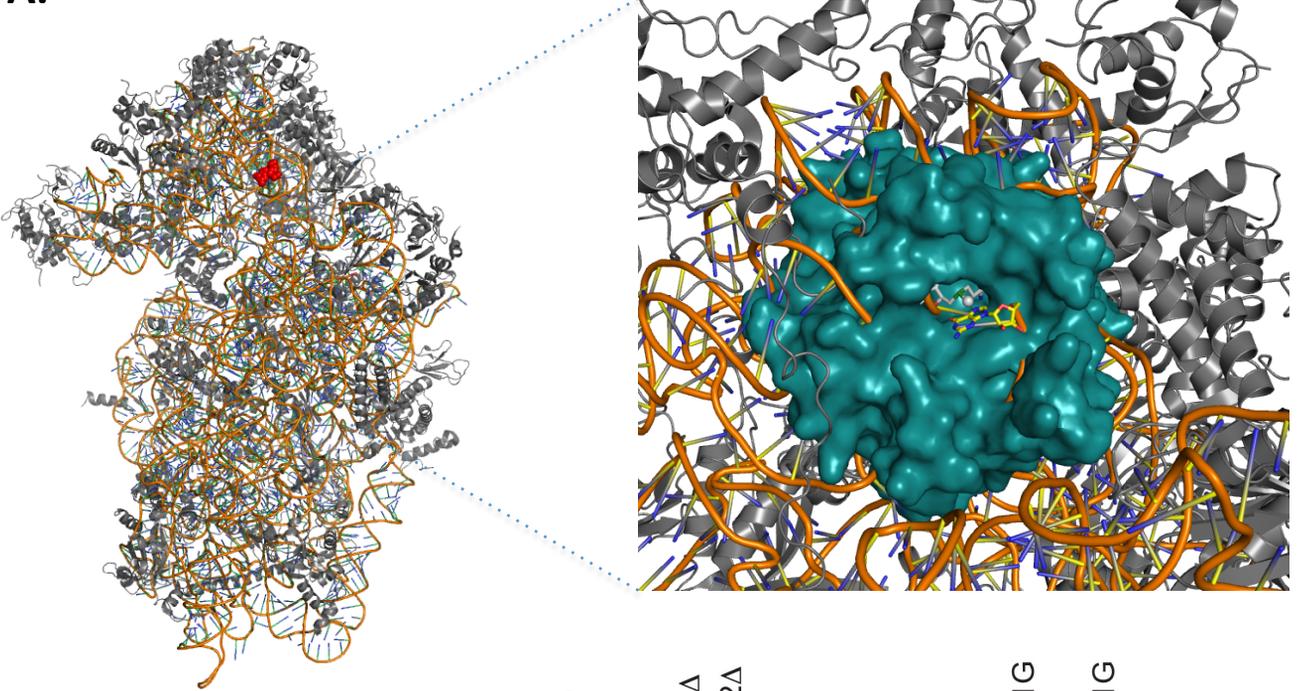
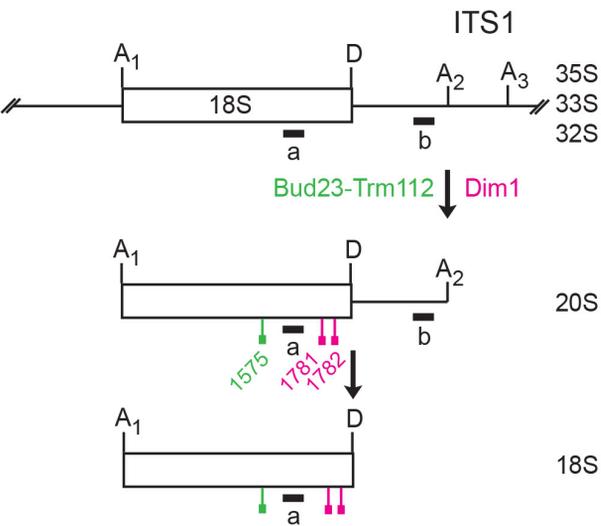


Figure 4

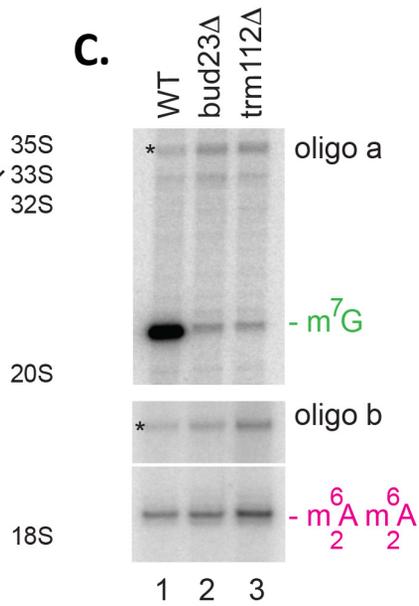
A.



B.



C.



D.

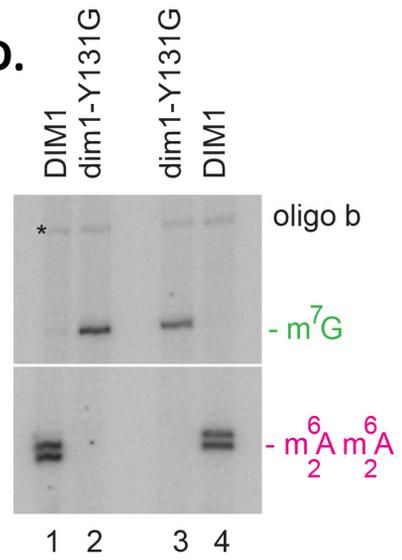


Table 1.

	Growth (DT, min.)	m ⁷ G	SAM binding	Protein level (Bud23/PGK1)	Ratio 25S/18S
WT	132	Unaffected	100%	1.0	1.0
<i>bud23Δ</i>	186	Lost	n.d.	0.0	2.3
D94A	204	Unaffected	n.d.	< 0.1	1.1
D94R	257	Unaffected	n.d.	< 0.1	3.3
M96A	134	Unaffected	n.d.	0.6	1.0
D112A	263	Unaffected	n.d.	< 0.1	1.8
D112R	273	Lost	n.d.	< 0.1	3.7
D77A	127	Lost	25% residual	0.6	1.1
E18A	133	Unaffected	n.d.	1.1	0.9
Y22A	124	Lost	Unaffected	1.0	1.1
K21E/R27E	138	Lost	Unaffected	0.8	1.2
I31W	212	Lost	25% residual	0.3	1.1
S118R	136	Lost	Lost	0.5	1.1
S118E	254	Lost	Lost	0.2	1.0
W122A	125	Lost	Unaffected	0.9	1.0
Y159A	124	Lost	50% residual	1.0	1.0

DT: doubling time.

n.d.: not determined.

SUPPORTING INFORMATION

Structural and functional studies of Bud23-Trm112 reveal 18S rRNA *N*⁷-G1575 methylation occurs on late 40S precursor ribosomes

Létoquart, J.^{1,*} ; Huvelle, E.^{2,*} ; Wacheul, L.^{3,*} ; Bourgeois, G.¹ ; Zorbas, C.³ ; Graille, M.¹ ; Heurgué-Hamard, V.² ; Lafontaine D.L.J.³

¹ Laboratoire de Biochimie, CNRS, UMR 7654, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau Cedex, France

² CNRS, FRE 3630, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IBPC, 13 rue Pierre et Marie Curie, Paris, F-75005, France

³ Fonds de la Recherche Scientifique (F.R.S.-FNRS), Université Libre de Bruxelles and Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI), Académie Wallonie-Bruxelles, Charleroi-Gosselies, Belgium

* These authors contributed equally.

Corresponding authors:

Marc Graille. Tel: +33-0-169334890. Email: marc.graille@polytechnique.edu

Valerie Heurgue-Hamard. Tel: +33-1-58415145. Email: valerie.heurgue@ibpc.fr

Denis L.J. Lafontaine. Tel : +32-2-650-9771. Email: denis.lafontaine@ulb.ac.be

Classification: BIOLOGICAL SCIENCES - Biochemistry

Keywords: rRNA modifying enzyme, methyltransferase, S-adenosyl-L-methionine, translation, ribosome synthesis.

Running title: Structure of Bud23-Trm112 rRNA methyltransferase

Supplementary material and methods

Bacterial and yeast strains

E. coli DH5 α was used for DNA amplification and cloning purposes. *E. coli* BL21-Gold (DE3) was used to express wild type or mutated ScBud23[1-202]-His₆-Trm112 complex. Cells were grown in complete Luria Bertani broth (LB). Antibiotics were added, when required, at the final concentrations of 50 μ g/ml for kanamycin, 200 μ g/ml for ampicillin and 15 μ g/ml for chloramphenicol.

Yeast strains were either purchased from Euroscarf, or purposely made following the transformation, and integration on the chromosome by homologous recombination, of suitable PCR cassettes generated with the DNA templates and the oligonucleotides listed in Table S5. Yeast strains were grown at 30°C in complete yeast extract-peptone-dextrose (2% each) (YPDA), unless otherwise stated. G418 was added at the final concentration of 300 μ g/ml. Strains expressing a catalytically defective allele of *DIMI* were generated as follows: *DIMI* open reading frame (ORF) was cloned with flanking promoter and terminator sequences into a low copy (ARS/CEN) plasmid by PCR from yeast genomic DNA, a single point substitution (Y131G) was introduced by site-directed mutagenesis, the resulting plasmid was transformed into a heterozygous *dim1 Δ /DIM1* strain and spores expressing the catalytic mutation in an otherwise deleted background selected following mitosis. YHE4 *bud23 Δ* strain (used in paramomycin sensitivity assay) was obtained following the transformation, and integration on the chromosome by homologous recombination, of a PCR cassette generated with the pRS316 plasmid template and oligonucleotides Bud23auxdelup/Bud23auxdellow (Table S5). Strains used in this study are listed in Table S6.

BUD23 gene tagging and generation of *bud23* mutants

The 3' tagging of *bud23* chromosomal locus was performed by homologous gene recombination in strain BY4741 using the selectable marker kanMX6 and ADH1 transcription terminator from plasmid pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6. These elements were amplified together with oligonucleotides bud23F3up and Bud23R1low listed in Table S4. The yVH102 strain was obtained on G418 plates and correct integration of the marker cassette was confirmed by PCR and sequencing. Genomic DNA from strain yVH102 was then used for PCR reaction with appropriate oligonucleotides introducing the desired point mutation in tandem with oligonucleotide Bud23R1low (for example amplification with primer Bud-E18A and Bud23R1low was done to create yVH133 strain carrying the E18A mutation in *bud23*). Then, the purified PCR product was used to transform BY4741. The presence of the mutation

in candidate colonies was verified by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and DNA sequencing. The oligonucleotides used and strains generated are listed in Tables S5 and S6, respectively.

Cloning and mutagenesis

The *BUD23* DNA region encoding fragment 1-202 was PCR-amplified from *S. cerevisiae* yeast (strain BY4741) chromosomal DNA using oligonucleotides Bud23Ndeup and Bud23-202H6 *Bgl*III introducing respectively *Nde*I site on the 5' end and the sequence encoding the (His)₆ tag, the UAG stop codon and *Bgl*III site on the 3' end (Table S2). This fragment was inserted in the pACYC-Duet1 vector between the *Nde*I and *Bgl*III to yield plasmid pVH474 (Table S1). For Bud23 mutants, this pVH474 plasmid was mutagenized following Quick change mutagenesis protocol (Stratagene) using oligonucleotides listed in Table S2 to generate plasmids listed in Table S1.

The *DHR1* DNA region encoding full-length protein was PCR-amplified from *S. cerevisiae* yeast (strain BY4741) chromosomal DNA with oligonucleotides Dhr1Nde989 and Dhr1BglII4825C (Table S2). Dhr1Nde989 introduces *Nde*I site overlapping start codon AUG and introduces a silent mutation suppressing the internal *Nde*I site. This fragment was inserted in the pET11a vector between the *Nde*I and *Bgl*III sites to yield pVH481 plasmid (Table S1).

Expression and purification of proteins

Bud23[1-202]-His₆ (WT and mutants) and Trm112 proteins were expressed from *E. coli* BL21-Gold (DE3) strain co-transformed by adapted plasmids (see Table S1) after induction with IPTG (1 mM) at 23°C at an optical density (600 nm) of 0.5 in LB medium containing ZnCl₂ (100 μM final), ampicillin, kanamycin and chloramphenicol overnight. These complexes were purified as previously described for ScMtq2-Trm112 (1), except for the use of His-Select Nickel affinity Gel (SIGMA) with the following resuspension/wash buffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 6 mM β-mercaptoethanol, 10μM ZnCl₂, 10mM Imidazole). Elution was done with the same buffer containing 150 mM Imidazole.

For crystallization purpose, two additional steps were introduced for the purification of the WT Bud23-Trm112 complex. The complex eluted from the His-Select Nickel affinity Gel was loaded on a Hitrap QP HP 5 mL (GE Healthcare) ion exchange chromatography pre-equilibrated in buffer 10mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol, 10μM ZnCl₂. The complex was eluted by a linear NaCl gradient (from 50 mM to 1M) and injected

on a Superdex 75 16/60 GE Healthcare in buffer 20 mM Tris HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 10 μ M ZnCl₂).

Western Blot Analysis

Proteins were separated on 15% SDS-polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose membranes, and western blot performed with specific primary antibodies, and peroxidase-coupled secondary antibodies with Immun-Star chemiluminescent substrate (Biorad), and Biorad Chemidoc XRS camera. We used anti-Bud23-Trm112 antibodies raised in rabbit against purified recombinant yeast complexes, and a mouse monoclonal anti-PGK1 (Invitrogen). Protein quantification was done using Image Lab software (Bio-Rad).

RNA extraction, Northern blotting and primer extension

Total yeast RNA extraction and Northern blots were performed as described previously (2). Oligonucleotides used in the hybridizations are listed in Table S7. For the analysis of high molecular weight species, 10 μ g of total RNA was separated on 1.2% agarose-6% formaldehyde gel; for low molecular weight species, 5 μ g of total RNA was separated on 8% urea-acrylamide gels. Phosphor imager quantification used a Fuji FLA-7000 and the native Multi Gauge software (v3.1). For mapping m^7G_{1575} , primer extension reactions were carried out as described in (3).

Sucrose gradient sedimentation analysis

Separation by sucrose gradient was performed exactly as previously described (4).

Crystallization and structure solution

Crystals were obtained after 3 days at 19°C from a mixture of *Sc*Bud23[1-202]-Trm112 complex (7 mg/ml) with an equal volume of the crystallization solution containing 80mM Hepes pH7.5, 20% polyethylene glycol 4000 (PEG 4K), 10% 2-propanol. Prior data collection, crystals were cryoprotected by transfer into the crystallization solution supplemented with 15 then 30% v/v ethylene glycol and then flash-frozen in liquid nitrogen. The datasets were collected on Proxima-1 beam line (SOLEIL, St Aubin, France).

The structure of the Bud23-Trm112 complex in the absence of SAM was solved by Zn-MAD (Multiple Anomalous Dispersion) using datasets collected at three wavelengths corresponding to inflexion, peak and remote of Zn-edge (see Table S3 for statistics). Data were processed

with XDS (5) and scaled using XSCALE. The space group was $P2_1$ ($a=74.8$ $b=54.1$ $c=83.8$ Å, $\alpha=90$ $\beta=95.3$ $\gamma=90^\circ$) with two heterodimer per asymmetric unit, corresponding to a solvent content of 46%. As expected from the presence of two Trm112 proteins in the asymmetric unit, two Zn atoms could be located by the HYSS submodule of the PHENIX package using data in the 50-2.4 Å resolution range (6). Refinement of the Zn atom coordinates, phasing and density modification were performed with SHARP program using the 50-2.4 Å resolution range (7). The previously determined crystal structure of ScTrm112 (PDB number 2AJ6; (1)) was positioned into the experimental density maps by molecular replacement using the MOLREP program (8). The Bud23 model was built into these maps using the COOT molecular modeling program (9). Iterative cycles of manual model rebuilding using COOT followed by refinement with PHENIX led to an almost complete model, which was then completed and refined using a higher resolution dataset (2 Å) to yield the final model (final R and R_{free} values of 19.1% and 24.2%, respectively). The statistics for data collection and refinement are summarized in Table S3. The final model contains 2 Bud23-Trm112 complexes as well as 2 zinc atoms, 327 water molecules, one polyethylene glycol molecule and 4 ethylene glycol molecules. Due to the absence of well-defined 2Fo-Fc electron density, the following regions were omitted from the final model: residues 133-135 from the first Trm112 molecule; 1-20, 126-131 and 202 from the first Bud23 molecule; 1-24 and 125-131 from the second Bud23 molecule.

In order to obtain information on the SAM binding mode, the crystals of the apo Bud23-Trm112 complex were soaked with 2.7 mM SAM. A dataset could be collected to 2.2 Å resolution from a crystal isomorphous to those obtained from the apo complex (Table S3). The structure of the apo Bud23-Trm112 complex was used for refinement using PHENIX and model building using COOT. The final model contains a SAM molecule bound to each Bud23 active site (final R and R_{free} values of 17.8% and 22.9%, respectively). The final model contains 2 Bud23-Trm112 complexes as well as 2 zinc atoms, 2 SAM molecules, 195 water molecules and 21 ethylene glycol molecules. Due to the absence of well-defined 2Fo-Fc electron density, the following regions were omitted from the final model: residue 135 from the first Trm112 molecule; 1-11 from the first Bud23 molecule and 1-17 and 126-131 from the second Bud23 molecule.

The atomic coordinates and structure factors of the structures of the apo- and SAM-bound Bud23-Trm112 complexes have been deposited to the Brookhaven Protein Data Bank under accession numbers 4QTT and 4QTU, respectively.

Equilibrium dialysis

The equilibrium dialysis set up consists in two chambers separated by a 1 kDa cut-off dialysis membrane. Initially, the ligand chamber contains 100 μ M unlabeled SAM (Sigma) and 8.25 nM [3 H]SAM (83 Ci/mmol, Perkin Elmer) and the protein chamber 200 μ M of the various Bud23-Trm112 complexes. After overnight rotation at 4°C in the following buffer (100 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10 mM NH₄Cl, 0.1 mg/mL Bovine Serum Albumin, the SAM content of chambers was determined using a Beckman Coulter LS6500 scintillation counter.

SUPPLEMENTARY RESULTS

Additional description on SAM binding

Bud23 binds SAM in a canonical manner compared to other class I SAM-dependent MTases. SAM is located at the C-terminal extremity of the central seven-stranded β -sheet. SAM binding stabilizes residues I12 to H20 and A126 to N131 from Bud23, which become defined in the 2Fo-Fc electron density map. The Y14 side chain from this region stacks onto SAM ribose moiety and Y22 side chain forms a hydrogen bond with the carboxylic acid from SAM. The amino terminal end of SAM interacts with Bud23 through direct (S61 hydroxyl group and G55 carbonyl atom) or water-mediated (D53 side chain and I117 main chain amide group) hydrogen bonds. The SAM ribose 2' and 3' hydroxyl groups form hydrogen bond with D77 side chain. The adenine ring of SAM is surrounded by side chains from hydrophobic residues (I78, M100 and W122) while its exocyclic amino group (N6) forms a hydrogen bond with D99 side chain.

Structural similarity between Bud23 and other MTases

Proteins sharing important structural similarity with Bud23 included *E. coli* ArmA (rmsd value with Bud23 of 3.1 Å over 151 C α atoms, 15% sequence identity) and RmtB (rmsd value with Bud23 of 3.3 Å over 164 C α atoms, 13% sequence identity), which target G1405 from 16S rRNA (10), the *E. cuniculi* mRNA cap guanine N^7 -MTase (rmsd value with Bud23 of 2.3 Å over 164 C α atoms, 16% sequence identity; (11)) and *Coffea canephora* xanthosine MTase (XMT; rmsd value with Bud23 of 3 Å over 171 C α atoms, 16% sequence identity; (12)). While the crystal structures of ArmA and RmtB could not be determined in the presence of GMP, both mRNA cap guanine N^7 -MTase and XMT structures were solved in the presence of a substrate. The superimposition of mRNA cap guanine N^7 -MTase bound to GTP onto Bud23-Trm112 complex shows that most of mRNA cap guanine N^7 -MTase residues involved in GTP binding are not conserved in Bud23 and that the GTP sterically clashes with helices α Y and α Z from Bud23. Altogether, this indicates that GMP is very unlikely to interact with Bud23 in a similar way as with mRNA cap guanine N^7 -MTase.

Table S1: Plasmids used in this study

Plasmid name	Plasmid, Marker, origin of replication	Protein expressed from T7 promoter	Source
pVH451	pET11a, Amp + Kan, ColE1	Trm112	(1)
pVH481	pET11a, Amp, ColE1	Dhr1	This study
pMG679	pGEX-6P1, Amp, ColE1	GST-Dhr1 [58-270]	This study
pVH474	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆	This study
pVH496	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆ K21E/R27E	This study
pVH491	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆ Y22A	This study
pVH497	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆ I31W	This study
pVH492	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆ D77A	This study
pVH498	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆ S118E	This study
pVH499	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆ S118R	This study
pVH495	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆ W122A	This study
pVH500	pACYC-Duet1, Cam, p15A	Bud23[1-202](His) ₆ Y159A	This study

Table S3: Data collection and refinement statistics

	MAD				
Data collection	Peak	Inflexion	Remote	High resolution	SAM
Resolution (Å) ^a	50-2.4 (2.4-2.54)	50-2.77 (2.77-2.93)	50-2.58 (2.58-2.77)	50-2 (2-2.12)	50-2.2 (2.2-2.33)
Wavelength (Å)	1.2822	1.2828	1.2757	0.9801	0.9801
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Unit cell parameters	a=74.8 Å b=54.1 Å c=83.8 Å β=95.3°	a=75.2 Å b=54.2 Å c=83.9 Å β=95.3°	a=74.9 Å b=54.2 Å c=83.9 Å β=95.3°	a=74.4 Å b=53.9 Å c=83.8 Å β=95.3°	a=75.5 Å b=53.7 Å c=85.2 Å β=94.5°
Total number of reflections	102656	69146	82578	183252	146142
Total number of unique reflections	49420	32485	39776	44594	34612
R _{sym} (%) ^b	4.8 (34.2)	6.2 (50)	6 (34.8)	4.5 (56.4)	5.7 (54.2)
Completeness (%)	95.4 (89.8)	96.2 (92.6)	95.4 (91.4)	96.5 (99.2)	94.7 (98.9)
I/σ(I)	12.6 (2.3)	12 (1.9)	12.5 (2.9)	18.3 (2.4)	16.2 (2.6)
Redundancy	2.08	2.13	2.07	4.1	4.2
Refinement					
Resolution (Å)				50-2	50-2.2
R/R _{free} (%) ^c				19.1/24.2	17.8/22.9
R.m.s.d. bonds (Å)				0.008	0.008
R.m.s.d. angles (°)				1.044	1.11
Ramachandran plot					
Most favored				95.4%	94%
Allowed				4.6%	6%

^a Numbers in brackets indicate values for the highest resolution shell

^b $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_i |I_{hi} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_i I_{hi}$, where I_{hi} is the i^{th} observation of the reflection h , while $\langle I_h \rangle$ is the mean intensity of reflection h .

^c $R_{\text{factor}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / |F_o|$. R_{free} was calculated with a small fraction (5%) of randomly selected reflections.

Table S4: Details of the electrostatic interactions involved in Bud23-Trm112 interaction

Bud23	Trm112
<i>Hydrogen bonds</i>	
Cys48 O	Asn49 Nδ2
Asp94 Oδ2	Lys2 N
Asp94 Oδ2	Thr5 Oγ1
Leu97 N	Pro126 O
Leu97 O	Leu128 N
Arg107 N	Phe8 O
Arg107 Nη2	Asn7 Oδ1
Arg107 Nε	Asn7 O
Arg107 Nη2	Arg53 O
Ser110 O	Arg53 Nη1
Pro105 O	Lys10 N
Glu92 O	Lys2 Nζ
<i>Salt bridges</i>	
Arg139	Asp17
Asp112	Arg53

Table S5: Oligonucleotides used for the construction of yeast strains

Oligonucleotide	Sequence	Strain
Bud23auxdelup	AGTAGTGCTAAAAAGGTGCGGTACGGAAACACAGGAAATATATC AGAGAAGCGTTTCGGTGATGAC	yHE4
Bud23auxdellow	GTGTGTATTTTTATAGTATACAAAAGAATATGCGTGTGAGGATGT GTGTTCTGATGCGGTATTTTCTCCT	yHE4
Bud23F3up	GGACTIONAAGTTACCGGGAGGAAAAGAAGACACAGGTTCTAGg gcgcgccacttctaaa	yVH102
Bud23R1low	GAGACAGAGACAGAGGGAAATGTATAAGTGTGTATTTTTATAGga attcgagctcgtttaaac	yVH102
Bud-E18A	AATGTCACGTCCTGAGGAGTTGGCACCACCGGAGATCTTCTATA ATGATAGCGCGGCACACAAGT	yVH133
Bud K21E R27E	CACCGGAGATTTTCTATAATGATAGCGAAGCACACGAGTACACC GGTTCGACCGAAGTGCAGCATATCCAGGCGAAGATGACGCTGAG	yVH161
Bud-Y22A	ACCACCGGAGATTTTCTATAATGATAGCGAAGCACACAAGGCCA CCGGTTCGACCAGAG	yVH104
Bud I31W	CGAAGCACACAAGTACACGGGTTTCGACCAGAGTGCAACATTGGC AGGCGAAGATGACGCTGAGG	yVH151
Bud-D77A	TTGACGCAGGAGGGAGACCATGTGTGGTGTGGTTTGGCGATATC GCCAGCATGCTTGCG	yVH134
Bud-D94A	TCGCCAGCATGCTTTCGACCGGTCTTAGTAGAGAGCTCGAGGG CGCGTTGATGTTGCAG	yVH137
Bud-D94R	TCGCCAGCATGCTTTCGACCGGTCTTAGTAGAGAGCTCGAGGG CCGCTTGTGATGTTGCAG	yVH138
Bud-M96A	GCATGCTTTCGACCGGTCTTAGTAGAGAGCTGGAGGGCGACTTG GCATTGCAGGATATGGG	yVH106
Bud-D112A	TATGGGCACCGGGATACCGTTCCGGGCGGGCTCGTTTGCCGCGG CTATTAGTATCAGTG	yVH107
BudD112R	TATGGGCACCGGGATACCGTTCCGGGCGGGCTCGTTTAGAGCGG CTATTAGTATCAGTG	yVH112
BudS118E	TCCGGGCGGGCTCGTTTGACGCGGCTATTAGTATCGAGGCGATC CAATGGCTGTGTAATGCGGACACTTCATACAACGATC	yVH158
Bud S118R	TCCGGGCGGGCTCGTTTGACGCGGCTATTAGTATCAGAGCGATC CAATGGCTGTGTAATGCGGACACTTCATACAACGATC	yVH164
BudW122A	CGTTTGACGCGGCTATTAGTATCAGTGCATCCAAGCGCTGTGCA ACGCGGACACTTCATACAAC	yVH113
Bud Y159A	GCTGCACTGAAGAAGGGAGGGAAATTTGTGGCCCAATTCGCCCC GAAAACGACGACCAGGTGGACG	yVH162

Nucleotide sequences from *S. cerevisiae* genome and from plasmid pFA6-GFP(S65T)-kanMX6 are indicated in capital and small letters respectively.

Table S6 : Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
BY4741	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
yHE4	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23Δ::ura3</i>	This study
yVH102	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23::kanMX6</i>	This study
yVH133	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(E18A)::kanMX6</i>	This study
yVH161	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(K21ER27E)::kanMX6</i>	This study
yVH104	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(Y22A)::kanMX6</i>	This study
yVH151	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(I31W)::kanMX6</i>	This study
yVH134	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(D77A)::kanMX6</i>	This study
yVH137	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(D94A)::kanMX6</i>	This study
yVH138	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(D94R)::kanMX6</i>	This study
yVH106	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(M96A)::kanMX6</i>	This study
yVH107	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(D112A)::kanMX6</i>	This study
yVH112	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(D112R)::kanMX6</i>	This study
yVH158	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(S118E)::kanMX6</i>	This study
yVH164	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(S118R)::kanMX6</i>	This study
yVH113	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(W122A)::kanMX6</i>	This study
yVH162	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud23(Y159A)::kanMX6</i>	This study
YDL2722 and YDL2724 (dim1- Y131G)	<i>MATa his3Δ1 ura3Δ0 dim1Δ::kanMX4 + pDL0812 (ARS-CEN-LEU2- dim1-Y131G)</i>	This study
YDL583 (pMET::d hr1)	<i>MAT a his3-11,15 ura3-1 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 TRP1 pMET::HA-dhr1</i>	(13)

Table S7: Oligonucleotides used for Northern-blot and primer extension analysis

Oligonucleotide	Sequence
Oligo a (LD2092)	CTCTGAGATGGAGTTGCCCC
Oligo b (LD471)	CGGTTTTAATTGTCCTA

LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1: Sequence alignments

Sequence alignments of Bud23 (A) and Trm112 (B) orthologs from *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* and human. Strictly conserved residues are in white on a black background. Partially conserved amino acids are boxed. Secondary structure elements assigned from the Trm112-Bud23 crystal structure are indicated above the alignment. Black stars indicate residues involved in complex formation. This figure was generated using the ESPript server (ESPript - <http://esprict.ibcp.fr>; (14)).

Figure S2: Functional and molecular characterization of Bud23 mutants

- A. Growth analysis of *BUD23* mutants. Serial ten-fold dilutions of strains were spotted on YPD plates and incubated at 30°C for 3 days.
- B. Western blot analysis of protein levels of WT and mutants Bud23-Trm112 complexes. PGK1 was used as a loading control (not shown).
- C. Analysis of 18S rRNA G1575 methylation in the different strains indicated. Series 1 and 2 correspond to two independent biological replicates.

Figure S3: 18S rRNA production in yeast strains expressing Bud23 mutations

Ethidium bromide staining of total RNA extracted from yeast strains indicated and separated on denaturing agarose gel. Mature 25S/18S rRNA ratio (see Table 1) established by Agilent Bioanalyzer capture.

Figure S4: SAM lies in a cavity surrounded by a highly conserved positively charged area

- A. Surface representation of the Bud23-Trm112 complex. Bud23 and Trm112 are colored cyan and green, respectively. The SAM cofactor bound to Bud23 is shown as sticks with carbon atoms shown in grey. The SAM methyl group (CH₃) transferred during the methylation reaction is shown as a sphere.
- B. Sequence conservation mapped at the surface of the Trm112-Bud23-MTase complex. Color gradient denotes conservation score from white (no conservation) to blue (strictly conserved). The conservation scores were calculated from a sequence alignment of 23 Bud23 and Trm112 eukaryotic orthologues (from *S. cerevisiae* to human) using the ConSurf server (15).

C. Electrostatic potential. Positively ($7.5 \text{ k}_B\text{T}/e^-$) and negatively ($-7.5 \text{ k}_B\text{T}/e^-$) charged regions are colored in blue and red, respectively. The electrostatic potential was calculated using PBEQ Solver server (16).

D. Analysis of the distribution of Bud23-Trm112 complexes by velocity gradient analysis (see Fig 2 for details). Bottom, quantification of panels.

Figure S5: Comparison of yeast 18S rRNA MTase Bud23-Trm112 and *E. coli* 23S rRNA RlmA^I

Superimposition of the crystal structure of *E. coli* RlmA^I (17) onto the structure of Trm112-Bud23 complex. The SAM molecules bound to RlmA^I and Trm112-Bud23 enzymes are shown as purple and grey sticks, respectively.

Figure S6: Cells deprived of Bud23 are cryosensitive for growth and hypersensitive to paromomycin

A. Serial dilutions of *bud23Δ* yeast cells and the isogenic wild type (WT) were spotted on complete medium (YPDA), supplemented or not with paromomycin (800μg/ml).

B. *bud23Δ* yeast cells and the isogenic wild-type (WT) were grown on complete medium for 3 days at 37°C, 30°C or 23°C.

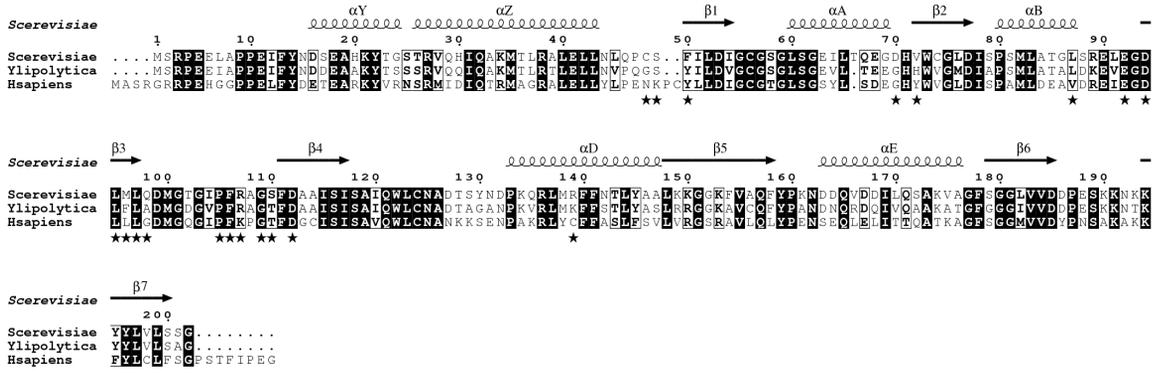
SUPPLEMENTARY INFORMATION REFERENCES

1. Heurgue-Hamard V, *et al.* (2006) The zinc finger protein Ynr046w is plurifunctional and a component of the eRF1 methyltransferase in yeast. *J Biol Chem* 281(47):36140-36148.
2. Colau G, Thiry M, Leduc V, Bordonné R, & Lafontaine DLJ (2004) The small nucleolar RNA cap trimethyltransferase is required for ribosome synthesis and intact nucleolar morphology. *Mol. Cell. Biol.* 24(18):7976-7986.
3. Figaro S, *et al.* (2012) Trm112 is required for Bud23-mediated methylation of the 18S rRNA at position G1575. *Mol Cell Biol* 32(12):2254-2267.
4. Schillewaert S, Wacheul L, Lhomme F, & Lafontaine DL (2012) The evolutionarily conserved protein Las1 is required for pre-rRNA processing at both ends of ITS2. *Mol Cell Biol* 32(2):430-444.
5. Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26:795-800.
6. Adams PD, *et al.* (2002) PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58(Pt 11):1948-1954.
7. Bricogne G, Vonrhein C, Flensburg C, Schiltz M, & Paciorek W (2003) Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59(Pt 11):2023-2030.

8. Vagin A & Teplyakov A (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* 30:1022-1025.
9. Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2126-2132.
10. Schmitt E, Galimand M, Panvert M, Courvalin P, & Mechulam Y (2009) Structural bases for 16 S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases. *J Mol Biol* 388(3):570-582.
11. Fabrega C, Hausmann S, Shen V, Shuman S, & Lima CD (2004) Structure and mechanism of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase. *Mol Cell* 13(1):77-89.
12. McCarthy AA & McCarthy JG (2007) The structure of two N-methyltransferases from the caffeine biosynthetic pathway. *Plant Physiol* 144(2):879-889.
13. Colley A, Beggs JD, Tollervey D, & Lafontaine DL (2000) Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. *Mol Cell Biol* 20(19):7238-7246.
14. Gouet P, Robert X, & Courcelle E (2003) ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 31(13):3320-3323.
15. Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, & Ben-Tal N (2010) ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W529-533.
16. Jo S, Vargyas M, Vasko-Szedlar J, Roux BÆ, & Im W (2008) PBEQ-Solver for online visualization of electrostatic potential of biomolecules. *Nucleic Acids Research* 36(suppl 2):W270-W275.
17. Das K, *et al.* (2004) Crystal structure of RlmAI: implications for understanding the 23S rRNA G745/G748-methylation at the macrolide antibiotic-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(12):4041-4046.

Figure S1

A.



B.

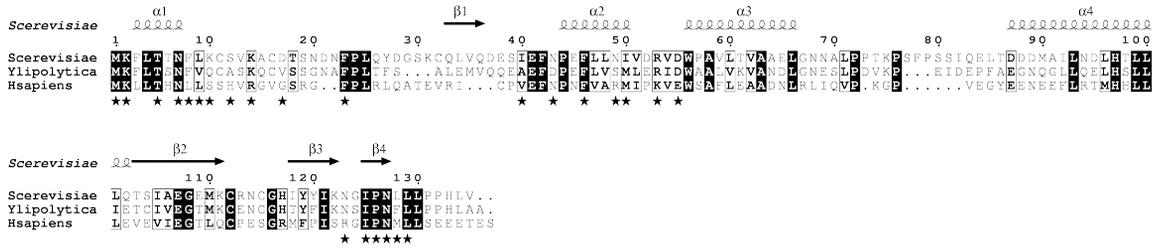
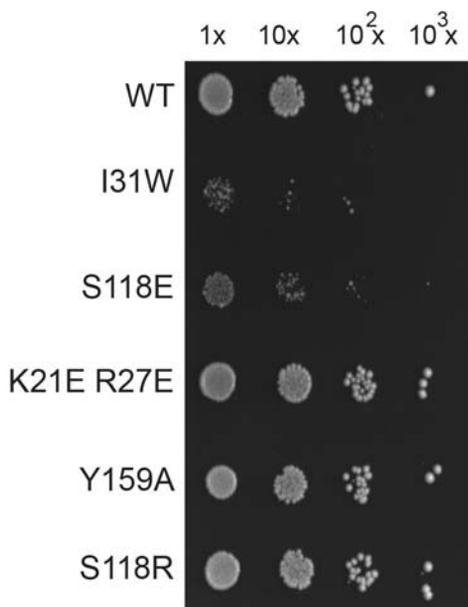
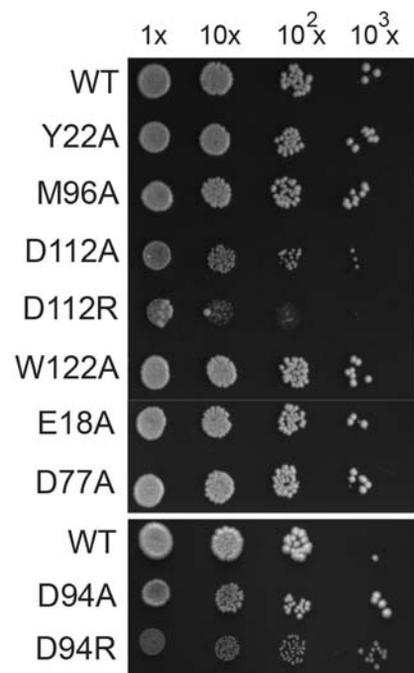
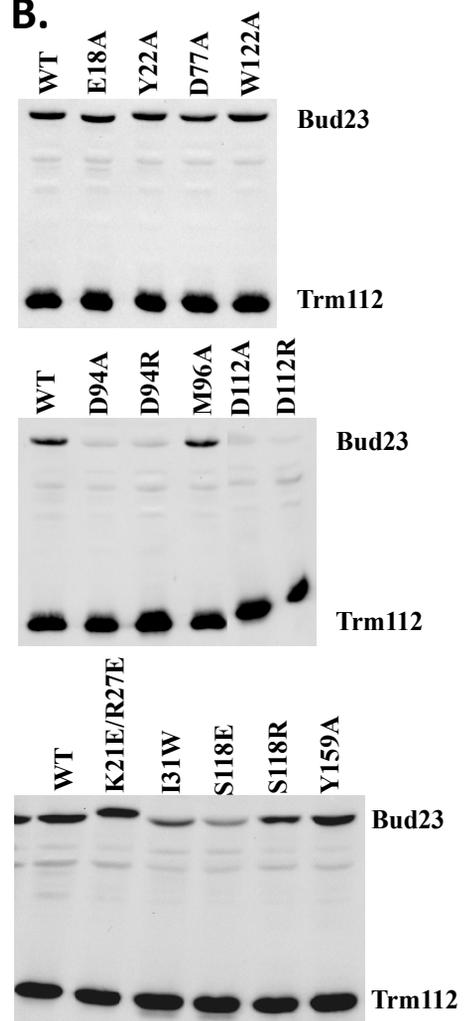


Figure S2

A.



B.



C.

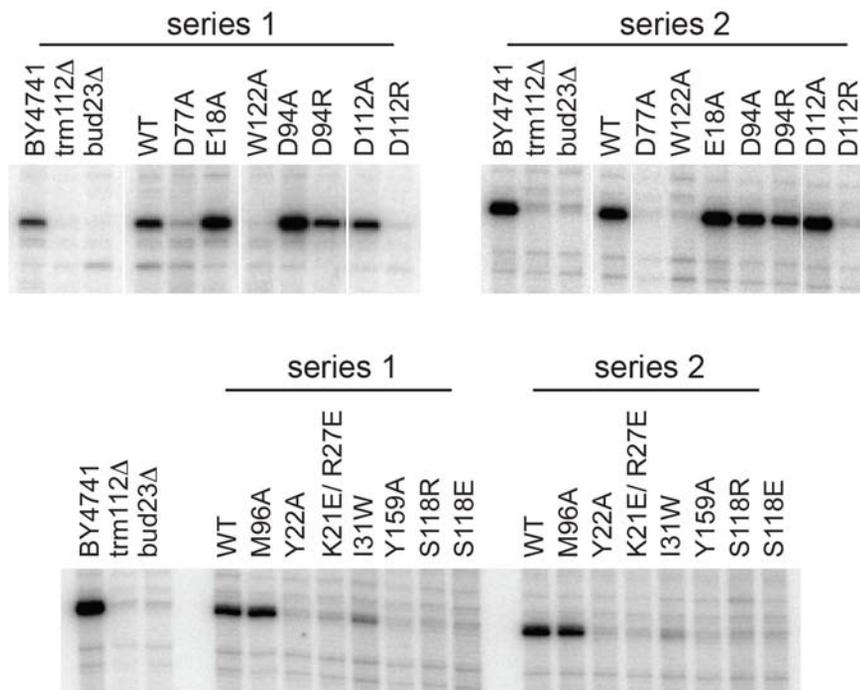


Figure S3

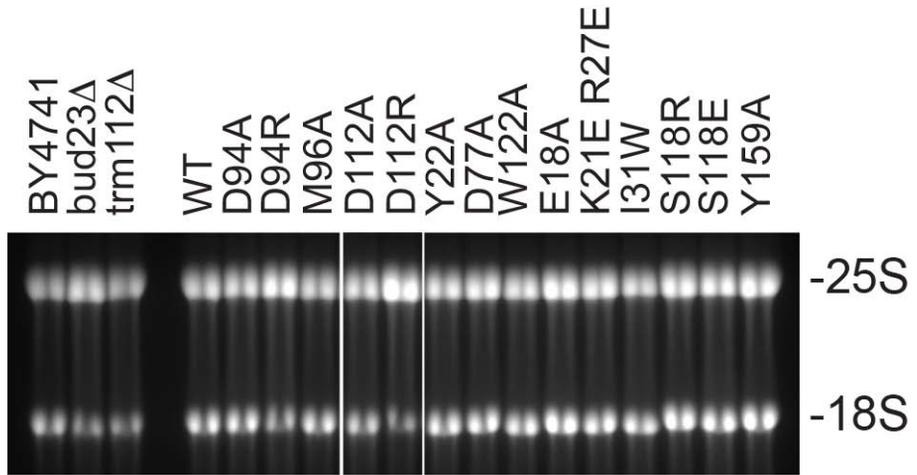
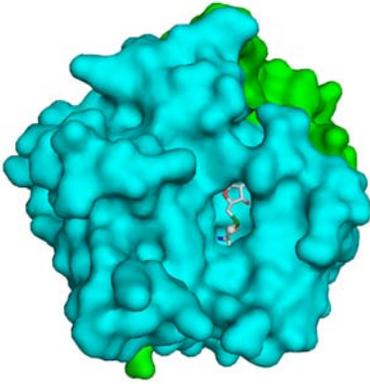
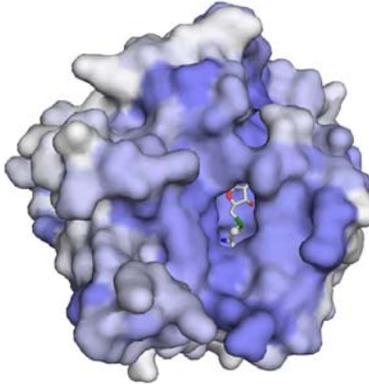


Figure S4

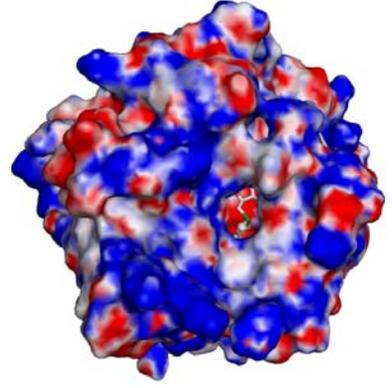
A.



B.



C.



D.

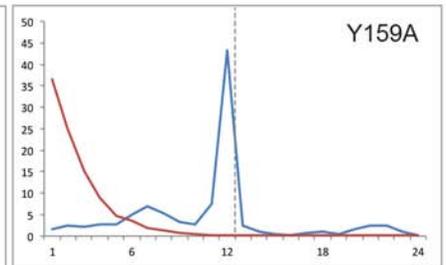
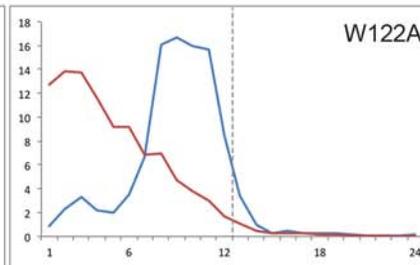
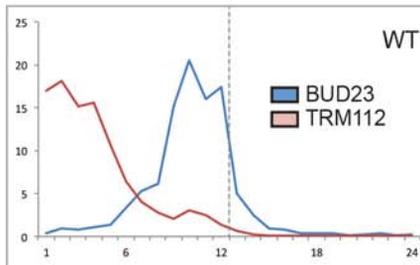
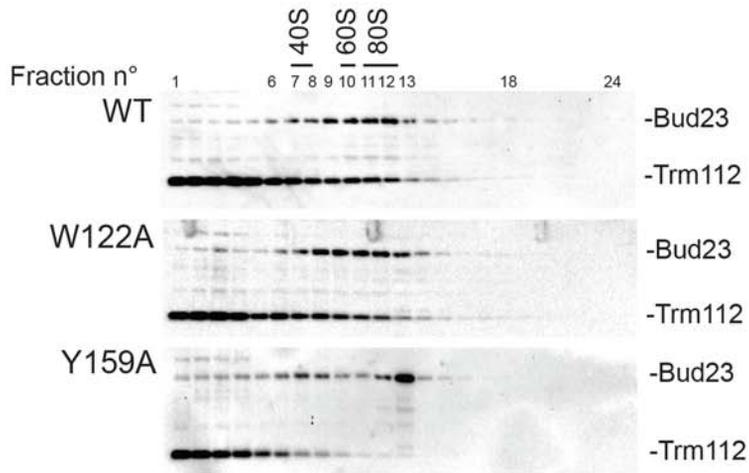


Figure S5

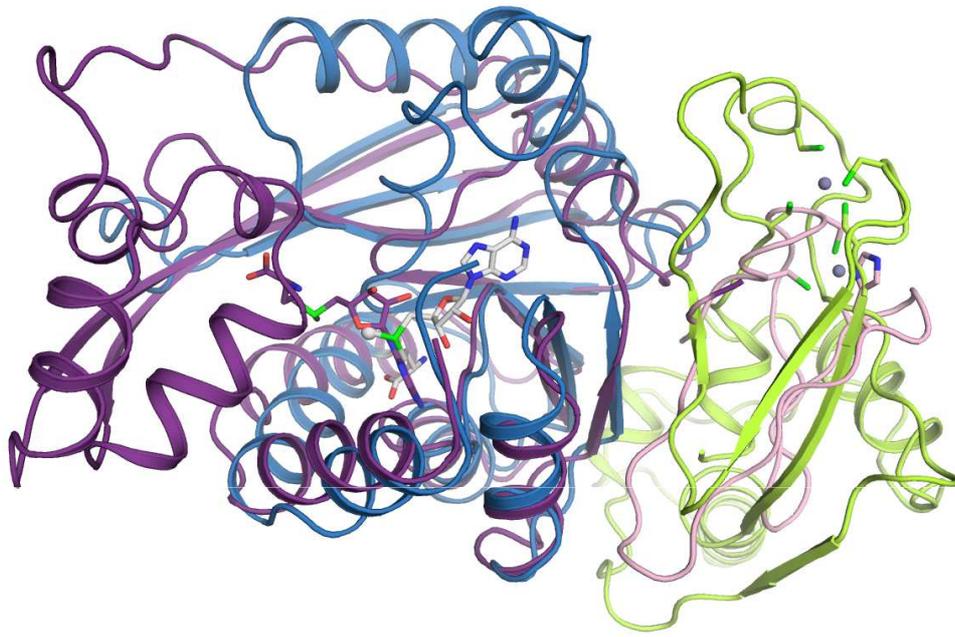
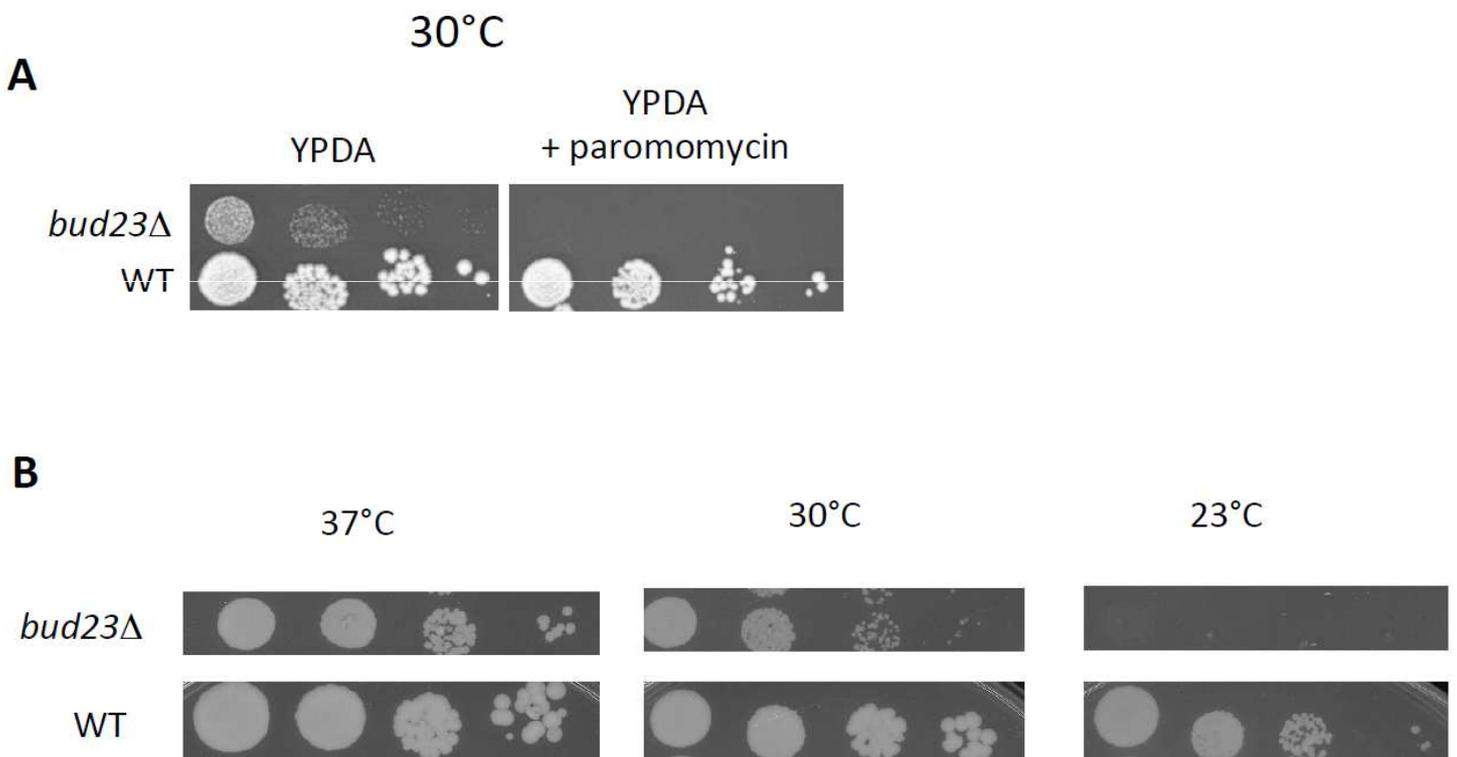


Figure S6



Conclusion,
Discussion
& Perspectives

CONCLUSION, DISCUSSION & PERSPECTIVES

La traduction représente un processus central au sein de la cellule, elle assure le transfert de l'information génétique de l'ARNm vers les protéines. De nombreux acteurs y sont impliqués directement ou indirectement et parmi eux, chez les eucaryotes, la petite protéine Trm112. Celle-ci participe à la modification de plusieurs acteurs directs en interagissant et en activant quatre MTases. Le facteur de terminaison eRF1 est méthylé par le complexe Mtq2-Trm112 (Liger *et al*, 2011), l'ARNr 18S par Bud23-Trm112 (Figaro *et al*, 2012) et certains ARNt par les complexes Trm9-Trm112 et Trm11-Trm112 (Mazauric *et al*, 2010; Purushothaman *et al*, 2005).

Mes travaux de thèse se sont articulés autour de deux aspects principaux qui seront discutés ci-après : l'analyse des complexes Trm9-Trm112 de levure et d'archée et l'étude de la plateforme d'activation de Trm112 d'un point de vue structural chez la levure et *in vivo* chez *Haloferax volcanii* (*Hvo*).

1. LE COMPLEXE TRM9-TRM112

Jusqu'ici, le complexe Trm9-Trm112 avait été étudié chez les eucaryotes. Cette MTase catalyse la formation de la mcm^5U34 à partir de la cm^5U34 . Cette modification permet le décodage précis de codons spécifiques.

1.1. Trm9-Trm112 : retour sur les principaux résultats

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le complexe Trm9-Trm112 de levure d'un point de vue structural et fonctionnel. La résolution de la structure cristallographique du complexe YTrm9N38-Trm112 combinée à l'étude de mutants *in vitro* et *in vivo* a permis de cartographier le site actif de l'enzyme et de proposer un modèle de mécanisme d'action. La majorité des résidus conservés du site actif permettrait d'assurer le positionnement précis de la SAM et de la cm^5U . La mesure de l'activité enzymatique à différents pH et la comparaison avec d'autres MTases a permis de montrer l'importance de la paire H116/R29 dans l'orientation de la fonction carboxylique de la cm^5U pour le transfert optimal du groupement méthyle de la SAM.

Par ailleurs, l'étude *in vitro* des orthologues de Trm9 et Trm112 chez *Hvo* a permis de mettre en évidence la présence de ce complexe chez certaines Archaea halophiles et de confirmer l'activité MTase du complexe.

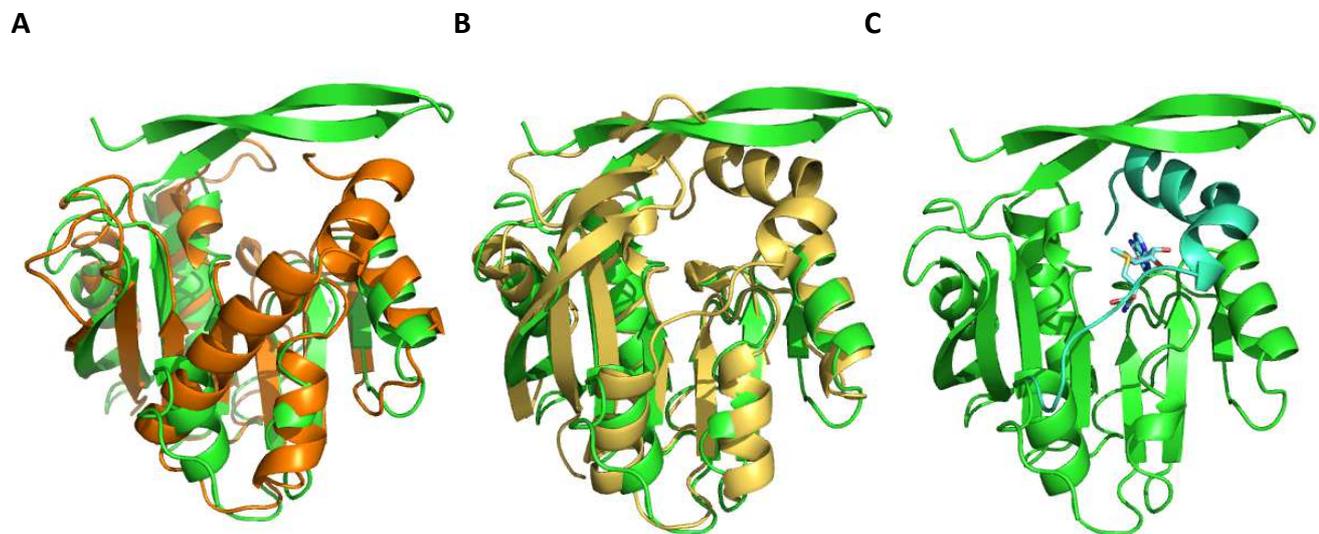


Figure 98 : Vers la modélisation de la région N-terminale de *YTrm9N38*.

A : Superposition de *YTrm9N38* (vert) et de *ScBud23C202* (orange) – RMSD : 2,1 Å ;

B : Superposition de *YTrm9N38* (vert) et de la MTase putative de *Rhodospseudomonas palustris* (crème) RMSD : 1,6 Å ;

C : *YTrm9N38* (vert) et modélisation de la partie N-Terminale (turquoise) et de la SAM (bâtonnets turquoise).

1.2. Perspectives : vers une validation du modèle

La structure cristallographique obtenue est celle du complexe *Y*Trm9N38-Trm112 où Trm9 est tronquée des 37 premiers résidus. D'après l'étude fonctionnelle réalisée, la région N-terminale de Trm9 semble jouer un rôle important dans l'interaction avec les substrats. Par ailleurs, la résolution de la structure cristallographique de ScBud23C202-Trm112 a permis de mettre en évidence la similarité structurale entre *Y*Trm9N38 et ScBud23C202 (RMSD : 2,08 Å ; seq% : 19%) (figure 98A). Par conséquent, il est possible de supposer que la partie N-terminale de Trm9 se structure de manière similaire à celle de Bud23. Comme le suggèrent les structures cristallographiques de ScBud23C202-Trm112 en absence ou présence de la SAM, la fixation de cette dernière dans le site actif entraîne la structuration en hélice de la partie N-terminale de Bud23. La modélisation de la partie N-terminale de Trm9 et de la SAM dans le site actif (figure 98C) a été réalisée en se basant sur la structure de Bud23 mais également sur la structure d'une MTase putative de *Rhodopseudomonas palustris*, RPA2492, structuralement très proche de Trm9 (pdb : 3E23 ; RMSD : 1,61Å ; seq% : 17%) (figure 98B).

Durant ma thèse, des essais de co-cristallisation et de trempage avaient été réalisés avec le complexe *Y*Trm9N38-Trm112 et des associations de SAM, SAH, cm^5U , mcm^5U . Cependant, la présence de la SAM entraînait une fissuration du cristal lors du trempage et aucun cristal n'a pu être obtenu dans les conditions de co-cristallisation testées. Ces observations, associées au fait que l'extrémité N-terminale de Trm9N38 soit impliquée dans un contact cristallin, laissent supposer que l'empilement cristallin dépendrait de l'absence de la SAM. De plus, la présence de celle-ci pourrait entraîner comme pour Bud23 un changement conformationnel de la partie N-terminale qui causerait la rupture du contact cristallin et expliquerait ainsi les résultats évoqués ci-dessus.

Les perspectives à court terme seraient d'obtenir la structure de Trm9-Trm112 en complexe avec la SAM/SAH et la cm^5U/mcm^5U : ceci permettrait de valider la modélisation de la partie N-terminale de Trm9 ainsi que le réseau d'interactions des résidus du site actif avec les substrats. Dans cette optique, une molécule chimère [SAM- cm^5U] est en cours de synthèse chez les collaborateurs (équipe de Mélanie Ethève-Quellejeu - LCBPT-Paris).

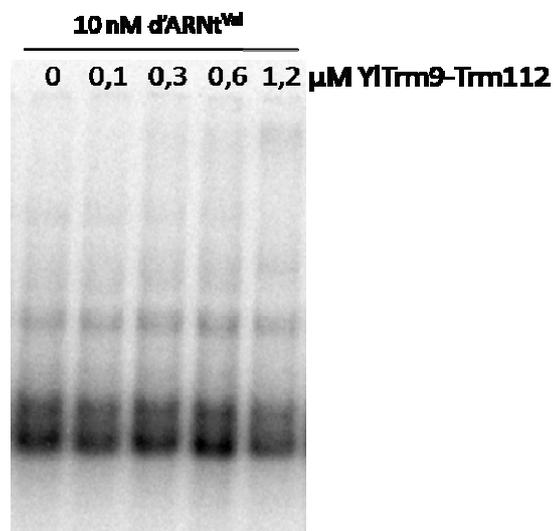


Figure 99 : Expérience de retard sur gel avec le complexe Y/Trm9-Trm112.

Cette synthèse fait intervenir une molécule de SAM activée qui possède une fonction azide à la place du groupement méthyle partant, cette molécule est un N-mustard analogue de la SAM (Du *et al*, 2012). La fusion consiste à faire réagir le N-mustard avec la fonction carboxylique de la cm^5U . Ce même type d'analogue a été utilisé pour obtenir un complexe stable entre la sous-unité catalytique de la phosphatase humaine PP2A et la MTase LCMT1 qui modifie le groupement carboxylate à l'extrémité C-terminale de la PP2A (Stanevich *et al*, 2011).

Les deux orthologues de Trm9 chez l'Homme sont impliqués dans différents cancers. Des études ont montré que la déplétion d'ABH8 ou de hTrm9L au sein des tumeurs rendait les cellules cancéreuses plus sensibles à certains antibiotiques tels que la bléomycine ou la paromomycine respectivement (Fu *et al*, 2010; Begley *et al*, 2013). A plus long terme, il pourrait être envisagé d'utiliser l'analyse du site actif de Trm9 de levure afin de créer des molécules inhibitrices d'ABH8 dont le domaine MTase est conservé entre l'Homme et la levure. L'objectif serait alors de développer de nouveaux traitements anticancéreux basés sur l'administration simultanée d'un inhibiteur d'ABH8 et de bléomycine. Une telle combinaison de plusieurs principes actifs dans un même médicament est utilisée dans différents traitements tels que le traitement antibiotique Augmentin qui se compose de l'acide clavulanique et de l'amoxicilline ou dans la tri-thérapie anti-HIV.

1.3. Interaction Trm9-Trm112/ARNt

Un des objectifs de l'analyse fonctionnelle de ScTrm9-Trm112 était d'étudier l'impact des mutations sur l'interaction du complexe avec l'ARNt. Cependant, les expériences de retard sur gel et de tamisage moléculaire réalisées ont montré que ScTrm9-Trm112 n'interagissait pas de manière spécifique avec les ARNt. D'après l'étude structurale et fonctionnelle du complexe Trm9-Trm112, le site actif apparaît assez restreint. Cette MTase ne semble pas être en mesure de discriminer les ARNt possédant un cm^5U_{34} et les autres uniquement sur la base de leur séquence nucléotidique. Par contre, le complexe Elongateur intervenant avant Trm9-Trm112 pourrait réaliser cette discrimination. Trm9-Trm112 pourrait alors fixer avec des affinités différentes une large gamme d'ARNt et agir seulement sur ceux ayant une cm^5U en position 34. De façon surprenante, cette hypothèse ne semble pas pouvoir s'appliquer pour le complexe Y/Trm9-Trm112. En effet, l'expérience de retard sur gel présentée dans la figure 99 montre que contrairement au complexe de Sc, Y/Trm9-Trm112 n'interagit pas avec l'ARNt^{Val} de Sc transcrit *in vitro*.

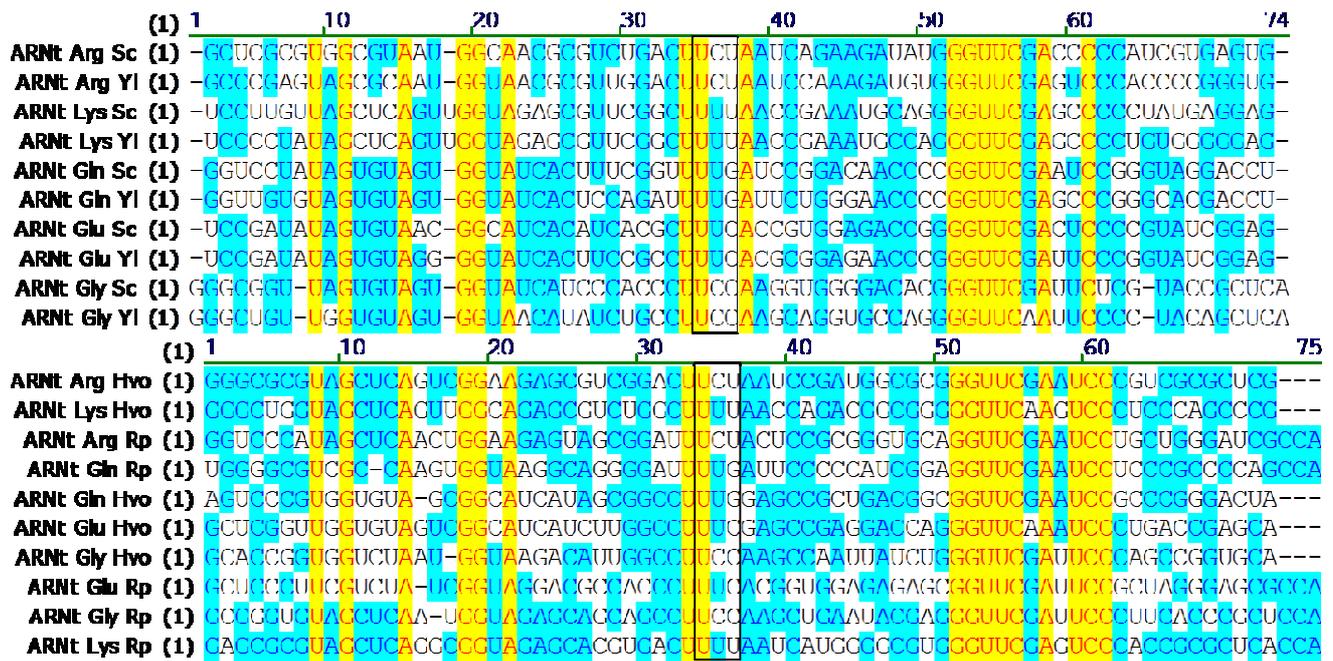


Figure 100 : Aligement des séquences d'ARNt modifiés par Trm9 (l'anticodon est encadré en noir).

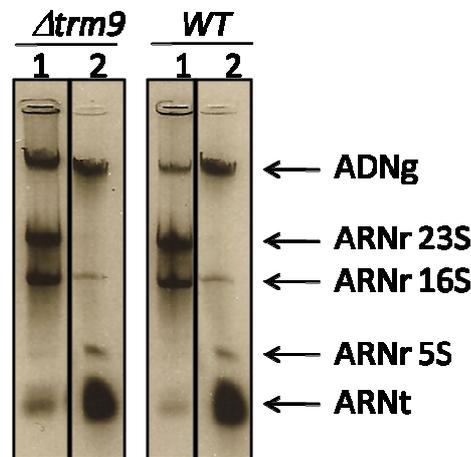


Figure 101 : Analyse de purification des ARNt de Hvo.

1 : Echantillon après extraction phénol/chloroforme et précipitation à l'isopropanol

2 : Echantillon à la fin de la purification

Ce résultat ne permet pas de conclure mais suggère que le complexe de *Yl* serait plus spécifique aux ARNt de *Yl* même si les différences entre les ARNt de *Sc* et de *Yl* ne semblent que mineures (figure 100).

Néanmoins, en considérant les différents résultats des tests enzymatiques *in vitro*, les complexes Trm9-Trm112 de *Sc*, *Yl* et *Hvo* présentent tous une activité de méthylation sur les ARNt extraits de la souche *ScΔtrm9*. Ceci souligne le fait que les ARNt de *Sc* interagissent aussi avec les complexes de *Yl* et *Hvo*. D'après les résultats de retard sur gel pour le complexe de *Yl*, cette interaction serait faible mais suffisante pour que la méthylation ait lieu. Néanmoins, les complexes de *Yl* et *Hvo* présentent des activités enzymatiques inférieures à celle de *ScTrm9-Trm112*. Ceci serait probablement dû à la spécificité de chaque complexe pour les ARNt issus de la même espèce. Cette hypothèse permettrait également d'expliquer le pourcentage de sensibilité à la zymocine observé pour une souche *Δtrm9::YITRM9 + YITRM112* (53±8%) qui est comparable à celui obtenu pour une souche *Δtrm9::YITRM9 + ScTRM112* (64±12%) alors qu'il est de 100% pour la souche sauvage. La moindre sensibilité à la zymocine de la souche *Δtrm9::YITRM9 + YITRM112*, serait alors principalement due à une affinité réduite du complexe protéique pour les ARNt de *Sc*. Le fait que l'activité spécifique de *ScTrm9-Trm112* mesurée *in vitro* en utilisant des *Sc*ARNt substrats soit 30 fois supérieure à celle de *YlTrm9-Trm112* renforce également l'hypothèse de départ.

Dans le but de mesurer l'activité enzymatique de *HvoTrm9-Trm112* sur les ARNt de *Hvo*, une souche *HvoΔtrm9* a été construite, cultivée et ses ARNt totaux ont été extraits et purifiés (figure 101). Cependant, aucune activité n'a pu être mesurée. La préparation des ARNt est à remettre en cause car, dans des conditions de réaction identiques, le complexe *Hvo* méthyle les ARNt de *Sc*. Même si la purification a permis d'enrichir l'échantillon en ARNt, la présence persistante d'ADN génomique de *Hvo* pourrait inhiber la réaction. Une purification des ARNt par extraction sur gel pourrait alors être envisagée afin d'éliminer les acides nucléiques contaminants. Les ARNt ainsi purifiés pourraient être testés comme substrats pour une réaction enzymatique mais également être digérés et les nucléotides modifiés identifiés par spectrométrie de masse. Ces analyses pourraient permettre d'élucider la cause de l'absence de méthylation des ARNt de *Hvo*. Elle pourrait être due à une instabilité de la cm^5U dans les conditions de culture, ce qui provoquerait une modification de la cm^5U en un autre nucléotide modifié non substrat de *Trm9-Trm112*.

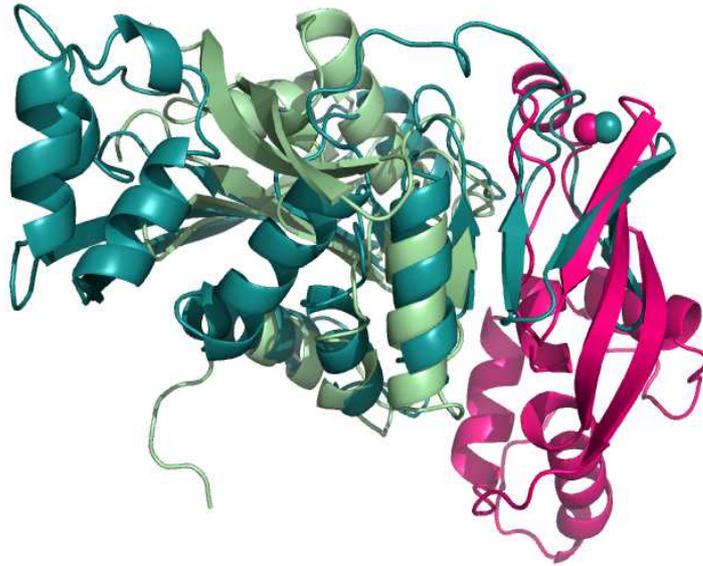


Figure 102 : Superposition de YTrm9N38-Trm112 et de RlmA(I).

YTrm9N38 est en vert clair, Trm112 est en rose, RlmA(I) est en bleu. Les atomes de zinc de Trm112 et RlmA(I) sont en sphères rose et bleu respectivement.

Dans un contexte assez similaire chez *S. cerevisiae*, des études ont montré il y avait une accumulation de ncm^5U dans des souches Δtrm9 et Δtrm112 (Chen *et al*, 2011). Les chercheurs proposent deux explications possibles à ce phénomène : la cm^5U serait générée à partir de la ncm^5U nécessitant l'intervention d'une déaminase ou bien la cm^5U serait un précurseur à la fois de la ncm^5U et la mcm^5U .

Au début de l'analyse fonctionnelle du complexe ScTrm9-Trm112, dans l'optique de mesurer les valeurs de K_m et V_{max} pour chacun des mutants sélectionnés, une tige-boucle de 17 nucléotides avait été synthétisée par l'équipe de Andrzej Malkiewicz (IOC – Pologne) :

UCUGACUU*CUAAUCAGA avec U* : cm^5U et en surligné les nucléotides appariés.

Cependant, aucune activité enzymatique n'a pu être mesurée en utilisant cette tige-boucle en tant que substrat. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : le repliement incorrect de la tige-boucle empêchant l'interaction ; l'ARNt entier est nécessaire pour que la réaction enzymatique ait lieu. Cette deuxième hypothèse pourrait être supportée par le rôle possible de Trm112 dans la fixation de l'ARNt. La superposition de la structure cristallographique du complexe Y/Trm9N38-Trm112 et de RlmA(I) (pdb : 1P91 ; RMSD : 2,43 Å ; seq% : 13%) montre que les domaines de fixation du zinc des deux MTases se superposent (figure 102). RlmA (I) est une MTase qui modifie l'ARNr 23S d'*E. coli* possédant à la fois un domaine MTase de classe I et un domaine de fixation du zinc (Das *et al*, 2004). Il a été suggéré que le domaine de fixation du zinc serait impliqué dans l'interaction avec l'ARNr (Das *et al*, 2004). Par analogie, Trm112 via ce même domaine pourrait jouer un rôle dans la fixation de l'ARNt. Il faut d'ailleurs noter que la mutation de certains résidus de Trm112 résulte en une diminution d'activité de méthylation de la protéine eRF1 par le complexe Mtq2-Trm112 de *S. cerevisiae* (Liger *et al*, 2011).

1.4. Trm9 chez les procaryotes

Jusqu'ici, la présence de Trm9-Trm112 avait été vérifiée chez les eucaryotes. Mes travaux de thèse ont permis de valider la présence de ce complexe chez l'organisme procaryote *Haloferax volcanii*. L'obtention de la structure cristallographique du complexe de Yl et son analyse structurale ont mis en exergue la structure de RPA2492, MTase putative de *Rhodospseudomonas palustris* (Rp). Cette structure a été résolue dans le cadre d'un projet de génomique structurale et le rôle de cette enzyme est encore inconnu.

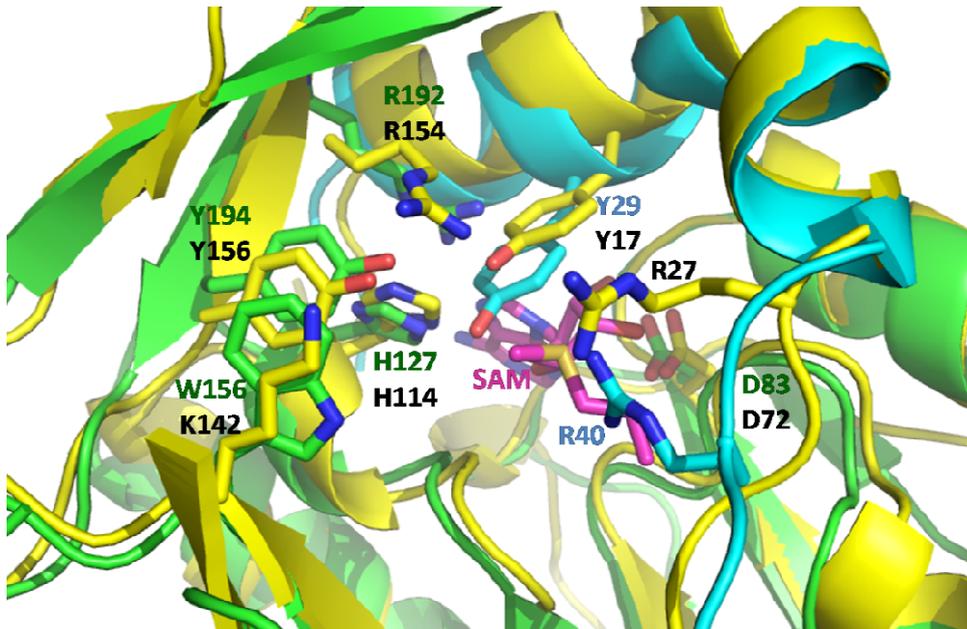


Figure 103 : Superposition des sites actifs de YTrm9 (vert et turquoise) et de RPA2492 (jaune).

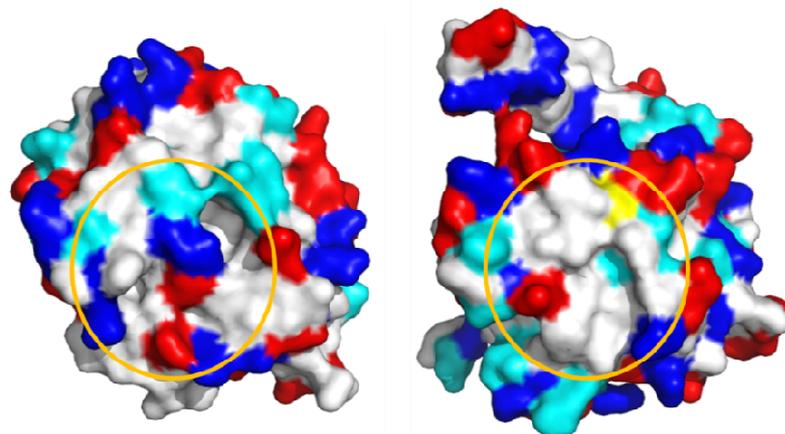


Figure 104 : Région de RPA2492 (gauche) correspondant au patch hydrophobe de YTrm9N38 (droite).

Représentation de la surface des protéines colorée en fonction du type de résidus. Les résidus hydrophobes sont en blanc, les résidus chargés négativement en rouge, positivement en bleu, polaires en cyan, soufrés en jaune.

	Section 1										
	(1)	1	10	20	30	48					
Trm112-Rp	(1)	MTTSASDRPEAG	VDRK	LLDILVC	PTIK	GPLEFDAAR	-----	QELI			
TRM112_ARCHAEA_Hvo	(1)	-----	MKES	LLMDIL	CDPLDK	SELE	LEVD	RDGDEI	IEGR	LI	
	Section 2										
	(49)	49	60	74							
Trm112-Rp	(41)	SRGAKLA	YPIRDGIP	IMLPE	EAR	ARKLG					
TRM112_ARCHAEA_Hvo	(37)	GTVTGEV	YPIEDGIP	NLLP	PD	MRDD-					

Figure 105 : Alignement des séquences protéiques de RpTrm112 et HvoTrm112.

Elle partage une très grande homologie de structure avec YTrm9N38 qui se traduit par un RMSD de 1,6 Å (figure 98B). De plus, de nombreux résidus du site actif de YTrm9 caractérisés comme importants pour l'activité enzymatique se superposent avec les résidus du site actif de RPA2492 (figure 103). En particulier, la paire H/R impliquée dans le positionnement de la fonction carboxylique est présente et les chaînes latérales de ces résidus sont structurellement très proches.

L'étude du contexte génétique du gène *RPA2492* a révélé la présence en aval, d'un gène annoté *ELP3* car présentant une homologie de séquence significative avec le gène codant pour la sous-unité catalytique du complexe Elongateur chez les eucaryotes. Il est à noter qu'il n'y a pas d'orthologue de RPA2492 chez toutes espèces bactériennes et que le contexte génétique n'est pas toujours conservé. Néanmoins, chez *Rp*, toutes ces informations laissent à penser que RPA2492 pourrait être l'orthologue de Trm9. Par contre, de par les résidus présents à sa surface, RPA2492 n'a pas besoin d'une autre protéine pour être soluble et stable. En effet, le patch hydrophobe situé à l'interface Trm9-Trm112 n'apparaît pas au niveau de la surface correspondante de RPA2492 (figure 104). Par ailleurs, un test de méthylation a été réalisé sur les ARNt substrats de *Sc* mais aucune activité enzymatique n'a pu être mesurée. L'activité de cette enzyme sur les ARNt, si elle existe, nécessite peut-être des conditions particulières et/ou RPA2492 aurait besoin d'une protéine activatrice qui pourrait jouer un rôle indispensable dans la réaction enzymatique elle-même ou dans la fixation du substrat. Dans ce cadre-là, l'orthologue possible de Trm112 chez *Rp* présente 38% d'identité de séquence avec *Hvo*Trm112 (figure 105).

Un autre aspect de cette étude est l'analyse des bases modifiées, cibles de Trm9. Actuellement, les modifications mcm^5U et mcm^5s^2U n'ont pas encore été répertoriées ni chez les archées ni chez les bactéries (tableaux 21&22). Une étude récente des modifications des ARNt chez *Hvo* et chez d'autres euryarchaea (*H. salinarum*, *H. marismortui* et *M. maripaludis*) a mis en évidence une nouvelle modification de l'uridine en position 34, la 5-cyanométhyluridine (cnm^5U) (Mandal *et al*, 2014). Par contre, cette modification n'a pas été identifiée chez *S. solfataricus* ou chez *E. coli* ou chez *S. cerevisiae*. Comme pour mcm^5U et mcm^5s^2U , il peut être supposé que certaines modifications telle que la cnm^5U seraient spécifiques de certaines espèces et non d'un domaine de la vie.

Tableau 21 : Modifications recensées des uridines des ARNt chez les archées.

Symbole	Dénomination
Ψ	Pseudouridine
D	Dihydrouridine
m⁵U	5-méthyluridine
Um	2'-O-méthyluridine
m¹Ψ	1-méthylpseudouridine
Ψm	2'-O-méthylpseudouridine
s²U	2-thiouridine
s⁴U	4-thiouridine
m⁵s²U	5-méthyl-2-thiouridine
s²Um	2-thio-2'-O-méthyluridine
mnm⁵s²U	5-méthylaminométhyl-2-thiouridine
mnm⁵se²U	5-méthylaminométhyl-2-sélénouridine
cnm⁵U	5-cyanométhyluridine

Tableau 22 : Modifications recensées des uridines des ARNt chez les bactéries.

Symbole	Dénomination
Ψ	pseudouridine
D	dihydrouridine
m⁵U	5-méthyluridine
Um	2'-O-méthyluridine
s²U	2-thiouridine
s⁴U	4-thiouridine
m⁵s²U	5-méthyl-2-thiouridine
acp³U	3-(3-amino-3-carboxypropyl) uridine
ho⁵U	5-hydroxyuridine
mo⁵U	5-méthoxyuridine
cmo⁵U	uridine 5-oxyacetic acid
mcmo⁵U	uridine 5-oxyacetic acid méthyl ester
nm⁵s²U	5-aminométhyl-2-thiouridine
mnm⁵U	5-méthylaminométhyluridine
mnm⁵s²U	5-méthylaminométhyl-2-thiouridine
mnm⁵se²U	5-méthylaminométhyl-2-sélénouridine
cmnm⁵U	5-carboxyméthylaminométhyluridine
cmnm⁵Um	5-carboxyméthylaminométhyl- 2'-O-méthyluridine
cmnm⁵s²U	5-carboxyméthylaminométhyl-2-thiouridine
inm⁵U	5-(isopentenylaminométhyl)uridine
inm⁵s²U	5-(isopentenylaminométhyl)- 2-thiouridine
inm⁵Um	5-(isopentenylaminométhyl)- 2'-O-méthyluridine

2. TRM112 : PLATEFORME D'ACTIVATION

La résolution de la structure cristallographique du complexe *EcMtg2-Trm112* et l'analyse de mutants d'interface de *Trm9* laissent à penser que *Trm112* interagissait de manière similaire avec ses 4 MTases partenaires (Liger *et al*, 2011).

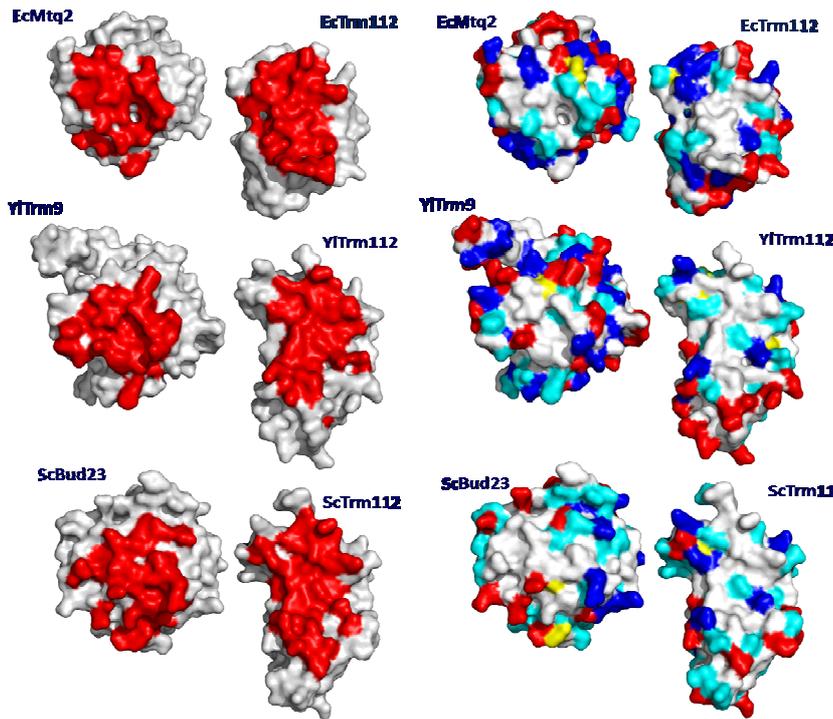
2.1. *Trm112* et ses 4 partenaires : retour sur les principaux résultats

La résolution des structures cristallographiques de *YTrm9N38-Trm112* et de *ScBud23C202-Trm112* a permis de vérifier l'hypothèse de départ et de comparer les différentes surfaces d'interaction. Cette analyse a mis en évidence que dans un même organisme, les séquences des 3 protéines ont évolué de manière à conserver l'interaction avec *Trm112*, caractéristique indispensable à leur solubilité et à leur activité. Même si les 4 partenaires présentent moins de 20% d'identité de séquence, les résidus clés pour l'interaction avec la petite protéine activatrice sont conservés ou partagent des caractéristiques identiques.

Jusqu'à ce jour, la présence de la plateforme d'activation *Trm112* n'avait été confirmée que chez les eucaryotes. Les premières études *in vivo* réalisées chez *Haloferax volcanii* au cours de ma thèse suggèrent que cette plateforme serait également présente chez certains organismes procaryotes.

2.2. Comparaison structurale avec d'autres MTases hétérodimériques

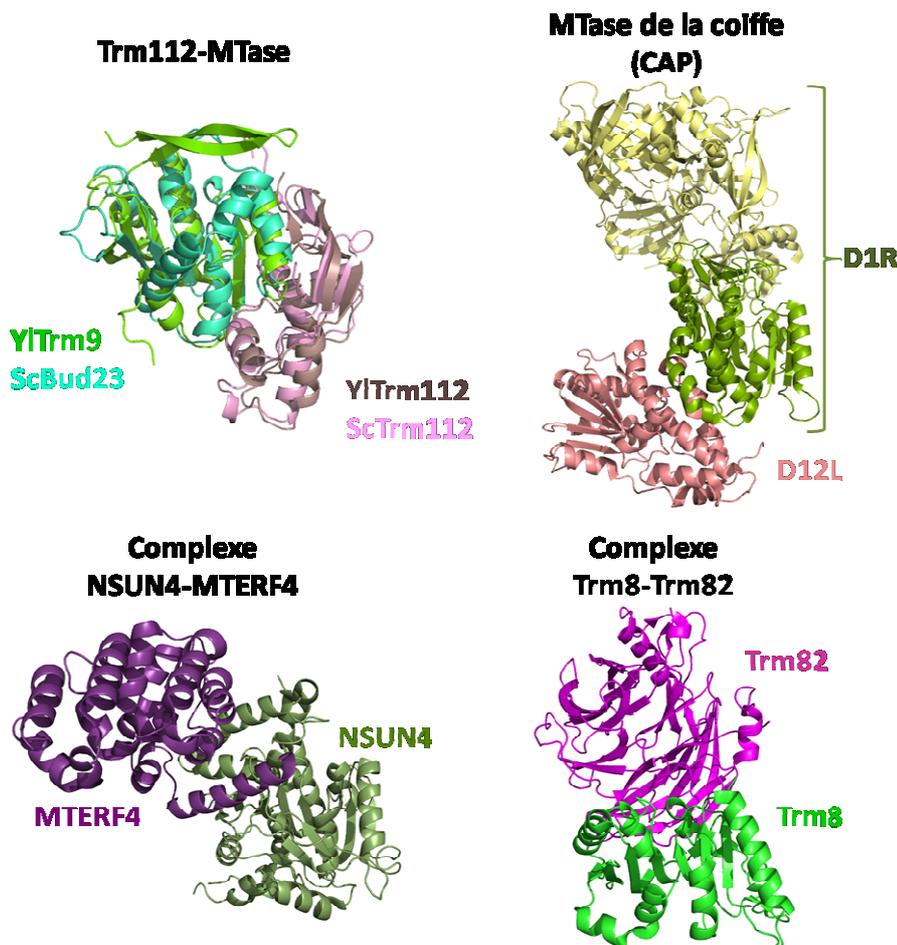
La résolution des structures cristallographiques de trois complexes impliquant *Trm112* a permis de caractériser les types d'interaction mis en jeu et de les comparer. Il s'avère que *Trm112* interagit avec ses partenaires via : un β -zipper soit des liaisons hydrogènes entre les chaînes principales ; des interactions électrostatiques dont 2 ponts salins principaux conservés et des interactions hydrophobes concentrées constituant un patch central de ces interfaces. Afin de caractériser l'interface de chaque complexe, les résidus impliqués ont été colorés en rouge sur une représentation en livre ouvert (figure 106). Puis, en gardant la même représentation, les résidus ont été colorés en fonction de leur type. Le patch hydrophobe (blanc) central des complexes impliquant *Trm112* est clairement mis en évidence grâce à cette représentation (figure 106).



Légende :
 A gauche, Les résidus situés à l'interface sont colorés en rouge à la surface de chaque partenaire ;
 A droite, la même orientation est conservée et les résidus sont colorés en fonction de leur type.

Les résidus hydrophobes sont en blanc, les résidus chargés négativement en rouge, positivement en bleu, polaires en cyan, soufrés en jaune. Pour chaque représentation, la sous-unité catalytique est à gauche et Trm112 est à droite.

Figure 106 : Représentation de l'interface des complexes impliquant Trm112.



Légende :

Toutes les MTases sont de classe I.

Le domaine MTase est orienté de la même manière pour chaque complexe et est coloré en vert.

La protéine activatrice est colorée en rose-violet.

Pour la MTase de la coiffe, le domaine MTase de la sous-unité catalytique est en vert et le reste de la protéine est en jaune.

Figure 107 : Représentations en ruban des complexes comparés.

Par ailleurs, il existe d'autres MTases de classe I qui se composent de deux sous-unités, une catalytique et une activatrice. Afin d'étudier le système d'interaction de la plateforme Trm112 dans un contexte plus large, trois MTases hétérodimériques ayant pour substrats des ARN ont été considérées pour une comparaison structurale des différents modes d'interaction.

La première est la MTase de la coiffe de Vaccinia virus (De la Pena *et al*, 2007; Zheng & Shuman, 2008). Ce complexe est multifonctionnel et s'associe à la polymérase virale pour catalyser les trois étapes de mise en place de la coiffe sur l'ARNm. La sous-unité catalytique est nommée D1R et la sous-unité activatrice D12L (figure 107).

La deuxième est le complexe NSUN4-MTERF4 qui est impliqué dans la biogenèse des ribosomes dans les mitochondries de mammifères et s'associe à la grande sous-unité (Yakubovskaya *et al*, 2012). La sous-unité catalytique est NSUN4 et MTERF4 joue le rôle d'activatrice (figure 107).

La troisième est le complexe de *Saccharomyces cerevisiae* Trm8-Trm82 qui modifie la guanosine 46 des ARNt (m^7G46) (Leulliot *et al*, 2008). Trm8 est la sous-unité catalytique et Trm82 est la sous-unité activatrice (figure 107).

Les différentes protéines activatrices présentent des structures très variées et interagissent avec la sous-unité catalytique via quatre régions distinctes du domaine MTase de classe I. La figure 107 présente les différents complexes avec les domaines MTase orientés de la même manière ce qui traduit la diversité des interactions. Celle-ci pourrait être reliée à des modes d'activation différents d'un complexe à un autre. La résolution de la structure de Trm8 montre que la liaison de Trm82 entraîne un changement conformationnel relié à l'activité catalytique de l'holoenzyme (Leulliot *et al*, 2008). En outre, l'activité de la MTase de la coiffe de vaccinia virus dépendrait d'un mécanisme allostérique induit par la liaison de la sous-unité activatrice qui aurait perdu sa fonction catalytique au cours de l'évolution (De la Pena *et al*, 2007).

Les différents complexes présentent des surfaces enfouies au niveau de l'interface d'environ 1500 à 3000 Å² (tableau 23). Cette aire est variable d'un complexe à un autre et n'est pas corrélée à la taille des sous-unités. Par contre, elle traduit le nombre de résidus localisés à l'interface qui varie de 15 à 40 en fonction du complexe (tableau 23).

Tableau 23 : Comparaison des caractéristiques des interfaces de chaque complexe

	Trm112- MTase	MTase de la Coiffe	NSUN4- MTERF4	Trm8- Trm82
Nombre de résidus de chaque sous-unité à l'interface (ordre de grandeur)	30	40	20	25
Surface enfouie (Å ²) (ordre de grandeur)	2000	3000	1500	2000
Nombre de ponts salins	2	2	3	2

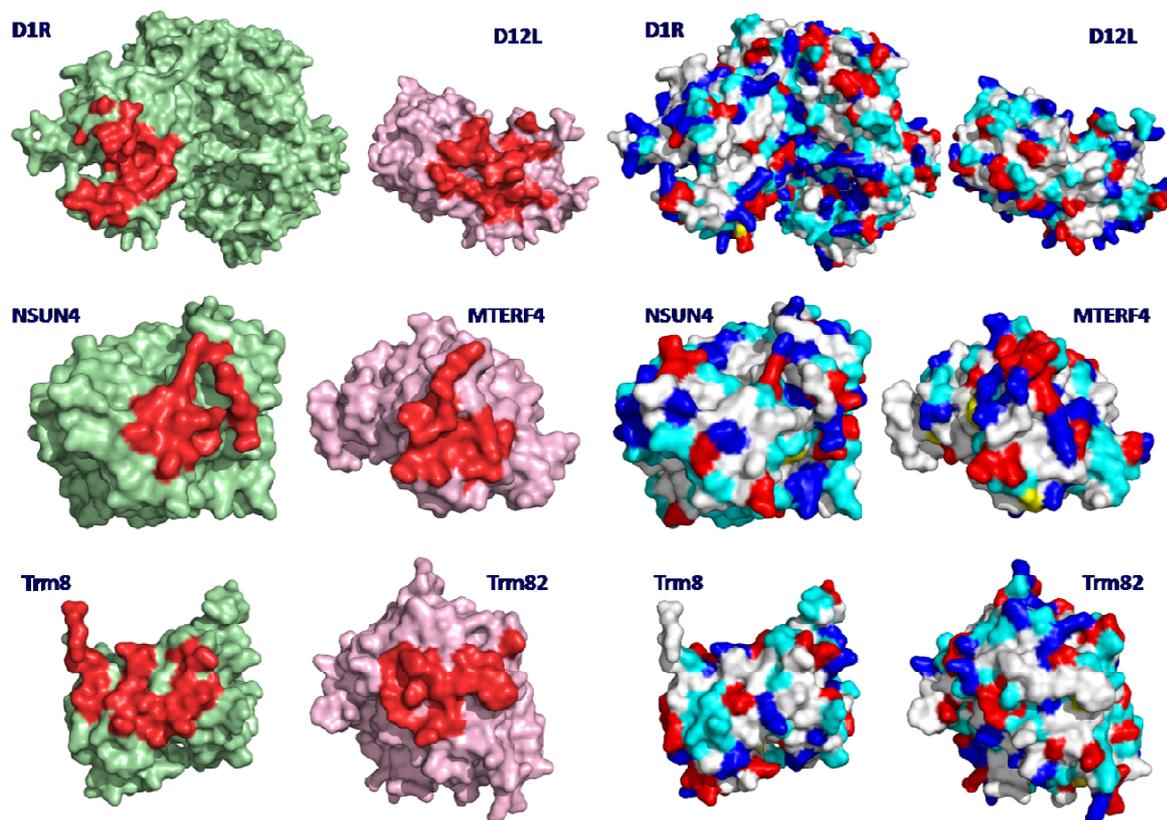


Figure 108 : Représentation de l'interface des trois complexes de l'étude comparative

A gauche, les résidus situés à l'interface sont colorés en rouge à la surface de chaque partenaire ; A droite, la même orientation est conservée et les résidus sont colorés en fonction de leur type. Les résidus hydrophobes sont en blanc, les résidus chargés négativement en rouge, positivement en bleu, polaires en cyan, soufrés en jaune. Pour chaque représentation, la sous unité catalytique est à gauche (vert) et la sous-unité activatrice (rose) est à droite.

Pour ces trois complexes, des résidus hydrophobes sont présents à l'interface. Cependant, ils sont davantage regroupés en plusieurs zones hydrophobes plutôt qu'en patch central (figure 108). Ceci explique que pour ces trois complexes, chaque sous-unité peut être purifiée indépendamment l'une de l'autre. Et contrairement à Trm112, les autres protéines activatrices ne sont pas indispensables à la solubilisation du partenaire.

La différence principale entre les complexes de Trm112 et les trois autres est le β -zipper formé par des liaisons hydrogènes entre les atomes des chaînes principales des deux sous-unités. Cette interaction est d'autant conservée qu'elle implique les brins β de deux domaines conservés et nécessaires à la fonction de l'enzyme, que ce soit le repliement classique des MTases de classe I ou le domaine de liaison au zinc de Trm112. Les interfaces des trois complexes étudiés comportent des résidus impliqués dans des liaisons hydrogènes, cependant, aucune ne se forme entre les atomes des chaînes principales des deux sous-unités. Par conséquent, ces interactions sont dépendantes de la séquence protéique de chaque partenaire.

La plateforme d'activation Trm112 possède donc une caractéristique spécifique qui est le cumul de 3 types interactions qui dépendent principalement du repliement de chaque sous-unité et à un moindre degré de la séquence protéique.

2.3. Perspectives : Etudes *in vivo* de la régulation de la plateforme d'activation

Les différentes analyses de cette plateforme d'activation suggèrent fortement qu'il y aurait une compétition entre les quatre MTases pour lier Trm112. Afin de confirmer ceci et de quantifier les cinq protéines de ce réseau d'interaction, la construction d'une souche comportant les versions étiquetées de Trm112 et de ses quatre partenaires a été envisagée. La technique considérée est celle de l'étiquetage à répétition permettant d'associer la même étiquette à l'ensemble des protéines d'intérêt et ainsi de faciliter à la fois la détection et la quantification des protéines lors d'un seul western blot. Ceci permettrait donc de comparer de manière quantitative les composants du réseau au cours des différentes phases de croissance, au cours du cycle cellulaire ainsi qu'en conditions de stress. Cette étude apporterait alors des informations sur la régulation de la plateforme d'activation.

Matériel & Méthodes

MATERIEL ET METHODES

Le principe de chaque méthode utilisée a été décrit dans la partie Résultats & Discussion. La grande majorité du matériel et méthodes a été détaillée dans les deux articles présentés dans les 1^{re} et 3^e partie des Résultats & Discussion.

1. MATERIEL

1.1. LES SOUCHES

1.1.1. Les souches d'*E. coli*

- ***E. coli* XL1-blue** (Stratagene) : *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^R)*].

Cette souche a été utilisée pour les préparations plasmidiques.

- ***E. coli* BL21 (DE3) Gold** (Agilent technologies) : *B, F⁻, ompT, hsdS, (r_B⁻ m_B⁻), dcm⁺, Tet^R, gal, λ(DE3), endA, Hte.*
- ***E. coli* BL21 (DE3) Codon plus RIL** (Agilent technologies) : *B, F⁻, ompT, hsdS, (r_B⁻ m_B⁻), dcm⁺, Tet^R, gal, λ(DE3), endA, Hte[*argU ileY leuW Cam^R*].*

Les protéines recombinantes sont produites dans ces deux dernières souches. Elles possèdent une copie du gène codant pour l'ARN polymérase du bactériophage T7 sous le contrôle du promoteur lac UV5. Ces bactéries sont mutées pour deux protéases limitant ainsi la dégradation éventuelle des protéines produites, lors de l'extraction. La souche BL21 (DE3) Codon plus RIL surexprime les ARNt utilisés pour la transcription de codons rares Ile, Leu et Arg.

1.1.2. Les souches de levures

Les souches de levure utilisées sont répertoriées dans la table S4 de l'article présenté dans la 1^{re} partie des Résultats & Discussion.

❖ *Kluyveromyces lactis*

- **AWJ137** (K. Breunig -University of Halle, Germany) : *α leu2 trp1[k1+k2+]*.
- **NK40** (R. Schaffrath -University of Leicester, UK) : *α ade1 ade2 leu2 [k2+]*.

Ces souches ont été utilisées pour les tests de résistance à la zymocine.

❖ *Saccharomyces cerevisiae*

- **YPH499** (Agilent technologies) : MATa *ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-Δ63 his1-Δ200 leu2-Δ1*.

Toutes les souches mutantes ont été construites à partir de cette souche. Les souches mutantes suivantes ont été construites en plus de celles spécifiées dans la table S4 de l'article et ont fait l'objet d'analyses décrites dans la 1^{re} partie des Résultats & Discussion :

- YPH499 *TRM9(C144Y)::kanMX6*
- YPH499 *TRM9(H244A)::kanMX6*
- YPH499 *TRM9(C144Y) -13Myc::TRP1*
- YPH499 *TRM9(H244A) -13Myc::TRP1*

1.1.3. Les souches d'*Haloferax volcanii*

- ***H. volcanii* DS70** (Wendoloski *et al*, 2001) : Souche sauvage débarrassée du plasmide endogène pHV2
- ***H. volcanii* H26** (Bitan-Banin *et al*, 2003) : DS70 Δ *pyrE2*

Les souches mutantes de *H. volcanii* ont été construites à partir de la souche H26 :

- H26 Δ *trm9*
- H26 Δ *trm112*
- H26 Δ *mtq2*

1.2. LES PLASMIDES

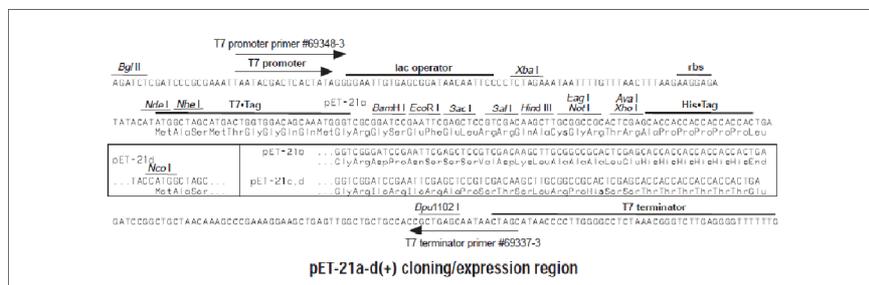
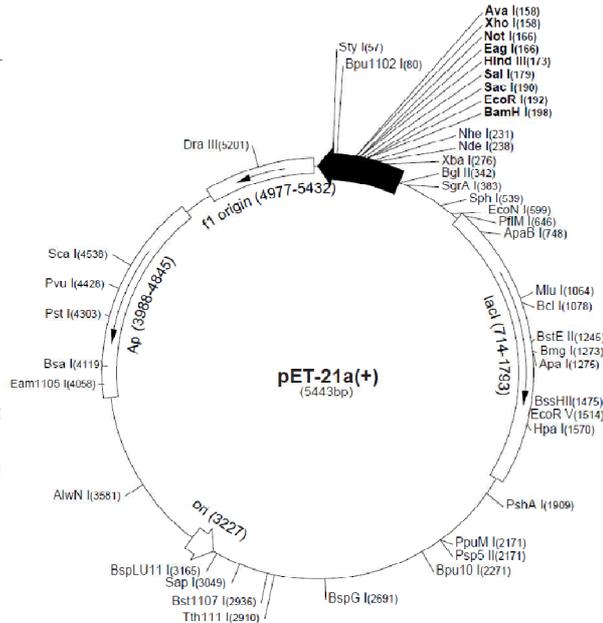
1.2.1. Les plasmides pour l'expression chez *E. coli*

➤ Plasmide pET21a (Novagen) :

pET-21a(+) sequence landmarks

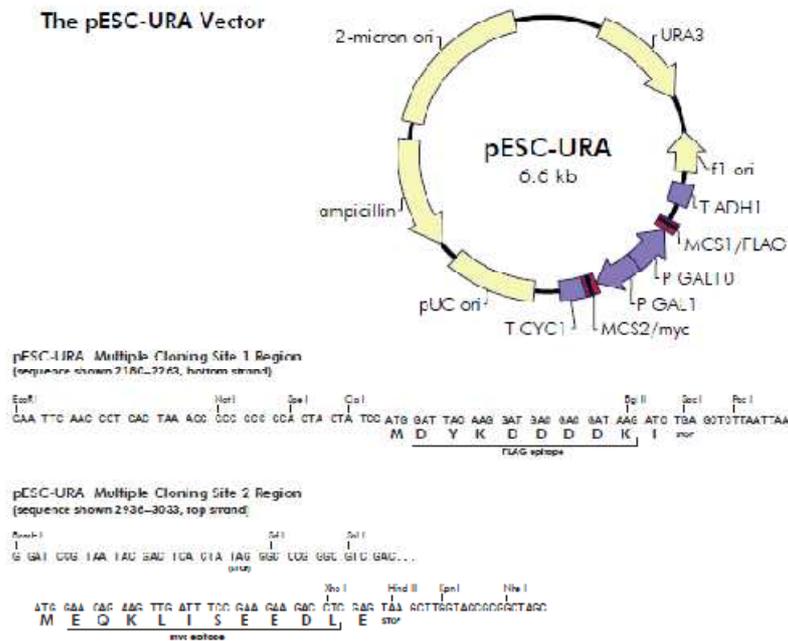
T7 promoter	311-327
T7 transcription start	310
T7*Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I <i>Xho</i> I)	158-203
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
<i>bla</i> coding sequence	3988-4845
f1 origin	4977-5432

The maps for pET-21b(+), pET-21c(+), and pET-21d(+) are the same as pET-21a(+) (shown) with the following exceptions:
 pET-21b(+) is a 5442bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198.
 pET-21c(+) is a 5441bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.
 pET-21d(+) is a 5440bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-21c(+). An *Nco* I site is substituted for the *Nde* I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-21c(+). As a result, *Nco* I cuts pET-21d(+) at 234, and *Nhe* I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-21a(+).
Nde I does not cut pET-21d(+). Note also that *Sty*I is not unique in pET-21d(+).



1.2.2. Le plasmide pour l'expression chez *S. cerevisiae*

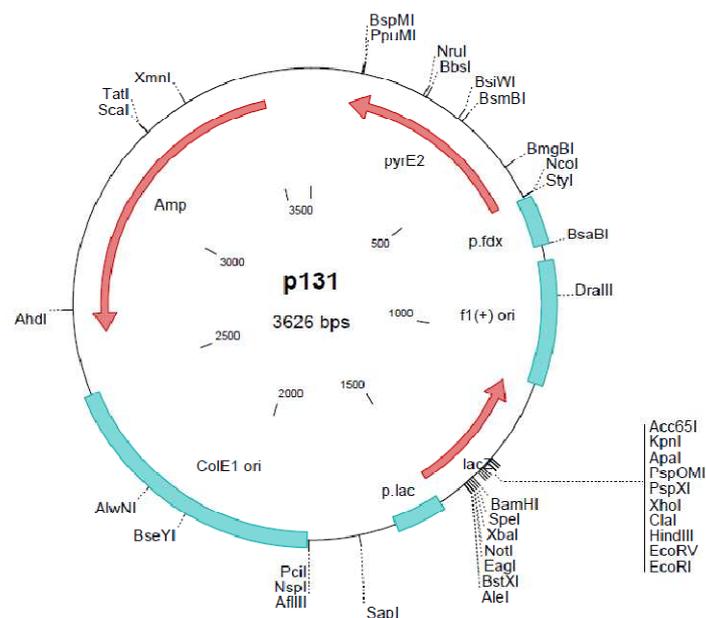
➤ Plasmide pESC-URA (Stratagene) :



Ce plasmide a été utilisé pour exprimer les différents gènes chez *S. cerevisiae* sous le contrôle d'un promoteur inducible par le galactose. La liste des plasmides utilisés constitue la table S7 de l'article présenté dans la 1^{re} partie des Résultats & Discussion.

1.2.3. Le plasmide pour l'expression chez *Haloferax volcanii*

➤ Plasmide pTA131 (Bitan-Banin *et al*, 2003) : dérivé du plasmide pBluescript II SK(+)



Ce plasmide a été utilisé pour l'expérience de Pop in – pop out chez *H. volcanii*. Trois plasmides ont été construits :

- pMG612 : les régions US et DS de *HvoTRM9* sont clonées entre *XbaI* et *XhoI*
- pMG613 : les régions US et DS de *HvoTRM112* sont clonées entre *XbaI* et *XhoI*
- pMG612 : les régions US et DS de *HvoMTQ2* sont clonées entre *XbaI* et *XhoI*.

1.3. LES OLIGONUCLEOTIDES

1.3.1. Les oligonucléotides utilisés pour la construction des souches mutantes de *S. cerevisiae*

La majorité des oligonucléotides utilisés pour la construction des souches de *S. cerevisiae* sont répertoriés dans la table S5 de l'article présenté dans la 1^{re} partie des Résultats & Discussion.

Les deux nucléotides suivants ont servi à la construction des souches YPH499 *TRM9(C144Y)::kanMX6* et YPH499 *TRM9(H244A)::kanMX6*. Le principe de la technique mise en œuvre est décrit dans la 1^{re} partie des Résultats & Discussion.

Nom	Séquence 5'-3'
Ftrm9 C144Y	ATCGAAGCTACGTCAGGGCCGACAAGCCTTAATATATTATTGGGCTCTA GAACAGGGCAG
Ftrm9 H244A	GAAAGAGAAGAGGTAAAATACCGATACTATGCATTATACCGAGAGGGC GAATTGGCTGAG

1.3.2. Les oligonucléotides utilisés pour la construction des plasmides pour l'expression chez *E. coli*

Les oligonucléotides utilisés pour la construction des plasmides sont répertoriés dans la table S6 de l'article présenté dans la 1^{re} partie des Résultats & Discussion. Les amorces utilisées pour le clonage des gènes *HvoTRM9* et *HvoTRM112* sont présentées ci-dessous.

Nom	Séquence 5'-3'	Description
5'Hvo NdeI TRM112	GGGCATATGAAAGAATCCCTGATGGA	Amplification <i>HvoTRM112</i> - site <i>NdeI</i> – amorce sens
3'Hvo NotI TRM112	TTTGCGGCCGCTCAGTCGTCTCGCATGTC CGGCG	Amplification <i>HvoTRM112</i> - site <i>NotI</i> – Amorce anti-sens
5'Hvo NcoI TRM9	GGGCCATGGACGGAGACGAACCCCG	Amplification <i>HvoTRM9</i> - site <i>NcoI</i> – Amorce sens
3'Hvo NotI TRM9H	TTTGCGGCCGCTCA ATGGTGATGGTGAT GGTG GCGAGCCGGCGACGACGGCGT	Amplification <i>HvoTRM9</i> – 6His - site <i>NotI</i> – Amorce anti-sens

1.3.3. Les oligonucléotides utilisés pour la construction des souches de *H. volcanii* mutantes

Les oligonucléotides ayant servi à la construction des plasmides pMG612-613 et 615, à la vérification du clonage par séquençage et au criblage des souches sont listés ci-dessous.

Nom	Séquence 5'-3'	Description
RL28	TTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	Séquençage insert dans pBluescript
RL29	ACCCAGGCTTTACACTTTATGC	Séquençage insert dans pBluescript
OMG72	GGGGGATCCGGACAAAGACCGCACGGGTC	Amplification US Trm9 - site <i>BamHI</i>
OMG73	CCCTCTAGAGCGGAACCAGGAGATGCTC	Amplification US Trm9 - site <i>XbaI</i>
OMG74	GGGCTCGAGGCGGAACCGGCCGTCGTCC	Amplification DS Trm9 - site <i>XhoI</i>
OMG75	CCCGGATCCGCGTTGGTCGGGACTGGGGC	Amplification DS Trm9 - site <i>BamHI</i>
OMG86	GGGGGATCCCGTCGTGACGGTGGATTGCG	Amplification US Trm112 - site <i>BamHI</i>
OMG87	CCCTCTAGACGTGCTCGCCGGCCTCGACG	Amplification US Trm112 - site <i>XbaI</i>
OMG88	GGGCTCGAGCACGTCGACCGCGGTTTGC	Amplification DS Trm112 - site <i>XhoI</i>
OMG89	CCCGGATCCACCTCATCGGACCTGAACG	Amplification DS Trm112 - site <i>BamHI</i>
OMG94	GGGGGATCCTAGACCGAGGTGTTTCATCC	Amplification US Mtq2 - site <i>BamHI</i>
OMG95	CCCTCTAGACGACATCGAGGTCGGCGTCCG	Amplification US Mtq2 - site <i>XbaI</i>
OMG96	GGGCTCGAGTCGTCCAGCGGAGTTGCC	Amplification DS Mtq2 - site <i>XhoI</i>
OMG97	CCCGGATCCGCACCGTGTTCCTCCTCGTG	Amplification DS Mtq2 - site <i>BamHI</i>
OMG161	CGGCTGTCTTGGGCCTCGTT	Criblage Trm9US
OMG162	ACTCGCCCTCGTTGCCGACG	Criblage Trm9DS
OMG163	CATCGCCGTCAACCACCTCG	Criblage Trm112US
OMG164	TCGGCTTCGACAGCGTCTCG	Criblage Trm112DS
OMG165	CGAACGACGTGGTGAGTTCCG	Criblage Mtq2US
OMG166	CGTCGAGTTCGGCCGCGACG	Criblage Mtq2DS

1.4. MILIEUX DE CULTURE

Les différents milieux de culture sont autoclavés à 121 °C sous 1 bar de pression pendant 20 minutes. Pour les milieux solides, l'agar est ajouté à 2 g/L.

1.4.1. Pour la culture des bactéries

Milieu LB : Tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5 g/L

Milieu 2xYT : Tryptone 16 g/L, extrait de levure 10 g/L, NaCl 5 g/L, 10 µM ZnCl₂

Milieu d'auto induction : constitué à partir des solutions suivantes

- ZY : Tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, 10 µM ZnCl₂
- Solution 5052 50X : Glycérol 250 g/L, Glucose 25 g/L, α-Lactose 100 g/L
- Solution MgSO₄ 1M
- Solution M 50X : Na₂SO₄ 0,25 M, NH₄Cl 2,5 M, KH₂PO₄ 1,25 M, Na₂HPO₄ 1,25 M
- Solution métaux (5000X) : 50 mM FeCl₃, 20 mM CaCl₂, 10 mM MnCl₂, 10mM ZnSO₄, 2 mM CoCl₂, 2 mM CuCl₂, 2 mM NiCl₂, 2 mM Na₂MoO₄, 2 mM Na₂SeO₃, 2 mM H₃BO₃

Antibiotiques :

- Ampicilline 100 mg/L
- Kanamycine 50 mg/L
- Chloramphénicol 25 mg/L préparé dans 100% éthanol

1.4.2. Pour la culture des levures

Milieu YPD : Bactopeptone 20 g/L, extrait de levure 10 g/L, glucose 20 g/L

Milieu YPG : Bactopeptone 20 g/L, extrait de levure 10 g/L, galactose 20 g/L

Milieu synthétique :

- YNB (Yeast Nitrogen Base) 6,7 g/L
- Supplément sans histidine, tryptophane, uracile et leucine 1,4 g/L
- Source de carbone (glucose ou galactose) 20 g/L

Additifs :

- Leucine 167X 10 mg/L
- Tryptophane 500X 10 mg/mL
- Uracile 100X 2mg/mL
- Histidine 500X 10 mg/mL
- Généticine 250X 50 mg/mL
- 5-FOA 1000X (5-Fluoroorotic acid) 50 mg/mL

1.4.3. Pour la culture de *H. volcanii*

Solution SW 30% : NaCl 4,1 M, MgCl₂ 150mM, MgSO₄ 140 mM, KCl 90 mM, Tris-HCl pH 7,5 20 mM

Milieu YPC : 18% SW, Extrait de levure 5 g/L, peptone 1 g/L, acides casamines 1 g/L, 3 mM CaCl₂

Milieu Casa : 18% SW, acides casamines 1 g/L, 3 mM CaCl₂

Additifs :

- Thymidine 100X 4 mg/mL
- Hypoxanthine 100X 4 mg/mL,
- Tryptophane 200X 10 mg/mL
- 5-FOA 1000X (5-Fluoroorotic acid) 50 mg/mL

1.5. LES SOLUTIONS ET TAMPONS

1.5.1. Pour la transformation de *H. volcanii*

Solution de sphéroplastes tamponnée : NaCl 1M, KCl 27 mM, Tris-HCl pH8,5 50 mM, 15% sucrose

Solution de sphéroplastes non tamponnée : NaCl 1M, KCl 27 mM, 15% sucrose, pH ajusté à 7,5

Solution de dilution des sphéroplastes : KCl 27 mM, 15% sucrose, 3mM CaCl₂

Solution de régénération : 18% SW, YPC 1X, 15% sucrose, 3mM CaCl₂

Solution pour congélation 4/3 : 80% glycérol, 6% SW, 1mM CaCl₂

1.5.2. Pour la transformation de *S. cerevisiae*

Solution de reprise des cellules : Acétate de lithium 0,1 M

Solution de transformation : 33% PEG 3350, acétate de lithium 0,1 M, 0,3 mg/mL d'ADN de sperme de saumon

1.5.3. Pour l'usage courant

Tampon de migration SDS PAGE : Trizmabase 3 g/L, glycine 14,4 g/L, SDS 1g/L

Solution de coloration I des gels SDS PAGE : 50% éthanol, 10% acide acétique

Solution de coloration II des gels SDS PAGE : 7% éthanol, 7,5% acide acétique

Solution stock de coloration des gels SDS PAGE : 0,25% bleu de Coomassie G250, 96% éthanol

TAE 50X : Trizmabase 240 g/L, acide acétique 5,7%, EDTA pH8 50 mM

2. METHODES

2.1. TECHNIQUES DE GENIE GENETIQUE

2.1.1. Clonage

Les séquences codant pour les protéines d'intérêt sont amplifiées par PCR en utilisant l'ADN polymérase Phusion (Thermo Scientific) qui allie fidélité (taux d'erreur $4,4 \cdot 10^{-7}$ par nucléotide par cycle) et rapidité (15 à 30 s/kb), et un couple d'amorces permettant l'ajout aux extrémités de sites de restriction compatibles avec le vecteur de destination. Une des amorces peut également contenir une séquence codante pour une étiquette 6 Histidines fusionnées à la protéine.

L'amplification PCR est réalisée à partir de l'ADN génomique de l'organisme choisi (*S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *H. volcanii*) ou à partir d'un plasmide contenant la séquence codante d'intérêt.

Le programme de base utilisé est le suivant :

98°C – 5'
98°C – 30''
55°C (45 à 65°C) – 30'' } 30 cycles
72°C – 15 à 30'' par kb }
72°C – 5'

Les produits PCR sont purifiés en utilisant le kit Qiagen (PCR purification kit) puis 1 µg est digéré par les enzymes de restriction adéquates. Parallèlement, 1 µg de plasmide de destination est digéré par les enzymes appropriées. Les produits de digestion sont purifiés par extraction sur gel d'agarose en utilisant le kit Gel extraction (Qiagen).

La ligation par la T4 DNA ligase (Thermo-Scientific) est réalisée à partir de 50 ng de vecteur et d'un excès molaire de cinq fois du fragment. Des bactéries *E. coli* XL1-blue chimio-compétentes sont ensuite transformées par le produit de ligation. Après sélection des transformants sur milieu sélectif, les clones contenant le plasmide recombinant sont identifiés par PCR sur colonie en utilisant le kit Taq 2X Master mix (NEB). Cette amplification est réalisée avec la Taq ADN polymérase qui est moins fidèle (taux d'erreur $2,2 \cdot 10^{-5}$ par nucléotide par cycle) et moins rapide (1 min/kb) que la Phusion mais qui est moins onéreuse et adaptée à une étape de criblage.

Le programme de base utilisé est le suivant :

95°C – 5'
95°C – 30''
55°C (45 à 65°C) – 30'' } 35 cycles
68°C – 1' par kb }
68°C – 5'

La préparation de leurs plasmides est réalisée d'après le protocole de mini-préparations du kit Nucleospin-plasmid (Macherey-Nagel). La séquence est vérifiée par séquençage en utilisant les amorces universelles du plasmide utilisé.

2.1.2. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée par PCR est réalisée avec l'ADN polymérase Phusion (Thermo-Scientific) et un couple d'oligonucléotides dessinés de manière à obtenir un recouvrement minimal entre chaque amorce (Zheng *et al*, 2004). 50 ng de plasmide à muter sont utilisés comme matrice. Les produits PCR sont traités par l'endonucléase *DpnI* afin d'éliminer la matrice initiale méthylée. Après transformation des bactéries *E. coli* XL1-blue chimio-compétentes et sélection des transformants sur milieu sélectif, les plasmides sont purifiés en utilisant le protocole de mini-préparations du kit Nucleospin-plasmid (Macherey-Nagel). La séquence est vérifiée par séquençage en utilisant les amorces universelles du plasmide utilisé.

2.2. SUREXPRESSON HETEROLOGUE CHEZ *E. COLI*

2.2.1. Tests d'expression à petite échelle (3mL)

Afin de déterminer les conditions optimales d'expression d'une nouvelle protéine, plusieurs paramètres sont testés à petite échelle : la souche d'expression et la température d'induction. Les deux souches BL21-DE3 Gold et Codon+ sont transformées par le plasmide recombinant. Les clones obtenus sur milieu solide servent à ensemercer 3 mL de milieu d'auto-induction contenant les antibiotiques appropriés. Après 3 heures à 37°C, 3 températures d'induction sont testées : 3 heures à 37°C, 20 heures à 25°C ou 20°C. Les cellules sont récoltées par centrifugation 4000 g 20 minutes. Les culots sont repris dans 500 µL de tampon A (50 mM Tris-HCl pH7,5, 200 – 1M NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol, 10 µM ZnCl₂) puis les cellules sont lysées par sonication (Branson sonifier 250 ; 20s à 10% de puissance – 50% de temps actif). La clarification est réalisée par centrifugation pendant 20 minutes à 20 000g. 10 µL du lysat non clarifié et 10 µL de surnageant après clarification sont analysés par SDS PAGE. Ceci permet de comparer le niveau d'expression et de solubilité de la protéine d'intérêt dans les différentes conditions testées. La souche et la température d'induction permettant d'obtenir le meilleur rendement en protéine soluble sont sélectionnées pour la culture à échelle moyenne.

2.2.2. Expression à échelle moyenne (1L)

Les cellules BL21(DE3) transformées par le plasmide d'intérêt sont utilisées pour ensemercer 10 mL de milieu riche LB contenant les antibiotiques adéquats. Cette pré-culture réalisée sur la nuit, permet l'ensemencement d'1 L de milieu sélectif 2xYT ou d'auto-induction à une DO_{600nm} de 0,1. Dans le cas d'une culture en milieu d'auto-induction, celle-ci est placée à 25°C pendant 20 heures.

Dans le cas d'une culture en milieu 2xYT, celle-ci est placée dans un premier temps à 37°C ce qui permet aux cellules d'atteindre la phase exponentielle de croissance correspondant à une DO_{600nm} de 0,6-0,8. L'expression de la protéine d'intérêt est alors induite par l'ajout de 500 μ L d'IPTG 1M dans le milieu. La culture est alors placée à 20 ou 25°C pendant 20 heures.

A la fin de la culture, les cellules sont collectées par centrifugation à 6000 g pendant 20 minutes. Le culot est repris dans 30 mL de tampon A (50 mM Tris-HCl pH7,5, 0,2 – 1M NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, 10 μ M $ZnCl_2$) puis la suspension est stockée à -20°C.

2.3. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

2.3.1. Purification des protéines

Les cellules sont décongelées et lysées par sonication (Branson sonifier 250 - 6 cycles d'une minute à 90% de puissance – 50% de temps actif). Le lysat est ensuite clarifié par centrifugation pendant 30 minutes à 20 000 g et à 4°C.

La purification se déroule en trois étapes de chromatographies.

La première étape est une chromatographie d'affinité sur résine NiNTA.

Le surnageant issu de la clarification est incubé 30 minutes à 4°C sous agitation douce avec de la résine Ni-NTA agarose (Qiagen) préalablement équilibrée avec du tampon W20 (50 mM Tris-HCl pH7,5, 0,2 – 1M NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, 20 mM imidazole, 10 μ M $ZnCl_2$). Par action de la gravité, les protéines portant l'étiquette 6Histidines et les protéines associées sont retenues par les billes d'agarose grâce à la chélation des ions Ni^{2+} par le noyau imidazole des histidines. Les molécules contaminantes (protéines et acides nucléiques) sont ensuite éliminées par deux étapes de lavage réalisées avec le tampon W20. L'imidazole présent dans le tampon rentre en compétition avec les histidines de l'étiquette. A faible concentration, ceci permet de décrocher les protéines retenues non spécifiquement sur la résine et à forte concentration, l'imidazole entraîne l'élution de la protéine d'intérêt. L'élution est réalisée en trois paliers avec des tampons contenant 100, 200 et 400 mM d'imidazole.

Les étapes suivantes sont réalisées de manière automatisée sur des systèmes Akta FPLC, Akta express, Akta purifier (GE Healthcare) ou Biologic DuoFlow (BioRad). A cours de chaque chromatographie, plusieurs paramètres sont mesurés et en particulier l'absorbance à plusieurs longueurs d'ondes qui permet de détecter la présence de protéines dans les différentes fractions collectées.

La deuxième étape de purification est, en fonction de la protéine, une chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine ou une chromatographie échangeuse d'anions.

L'héparine est un de glycosamino-glycane constituée de disaccharides (glucosamine et acide uronique) trisulfatés qui miment les phosphates des molécules d'acides nucléiques. Les protéines ayant une affinité pour les acides nucléiques seront retenues par la résine de la colonne HiTrap Heparin HP – 5 mL (GE healthcare). L'élution est réalisée par un gradient de concentration en NaCl allant de 50 mM à 1 ou 1,5M dans les conditions suivantes, 50 mM Tris-HCl pH7,5, 5 mM β -mercaptoéthanol, 10 μ M $ZnCl_2$.

La chromatographie échangeuse d'ions permet de séparer les protéines en fonction de leur charge de surface. Les points isoélectriques théoriques des complexes à purifier sont inférieurs à 5,5. A pH 7,5, la charge globale de la protéine est négative, une colonne échangeuse d'anions HiTrap MonoQ FF – 5 mL (GE Healthcare) est alors utilisée. L'élution est réalisée par un gradient de concentration en NaCl allant de 50 mM à 1 ou 1,5M dans les conditions suivantes, 50 mM Tris-HCl pH7,5, 5 mM β -mercaptoéthanol, 10 μ M $ZnCl_2$.

La dernière étape de purification est une chromatographie d'exclusion de taille.

Cette étape permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire et leur forme par passage sur un tamis moléculaire de billes poreuses. En tant que dernière étape de purification, elle permet d'éliminer les derniers contaminants, de juger de l'état d'oligomérisation de la protéine d'intérêt, et de placer la protéine dans le tampon adéquat pour son utilisation ultérieure.

Un volume maximum de 5 mL (1 mL) d'échantillon protéique concentré est injecté sur colonne Superdex 75 16/60 (10/30) HL (GE Healthcare).

Une analyse SDS PAGE est réalisée à chaque étape de purification.

2.3.2. ITC (Isothermal Titration Calorimétrie) ou microcalorimétrie

Les expériences d'ITC ont été réalisées dans la plateforme de microcalorimétrie de l'IBBMC en collaboration avec Magali Aumont-Nicaise.

Cette technique est utilisée pour étudier des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand et en déterminer les paramètres thermodynamiques et la constante de dissociation (K_d).

Les expériences ont été réalisées à 20°C en utilisant un microcalorimètre ITC 200 (MicroCal). Un volume de 300 µL de la protéine à titrer est déposé dans la cellule.

Le titrant (protéine ou ligand) est chargé dans la seringue et doit être 10 à 12 fois plus concentré que la protéine à titrer. 2 µl du titrant sont injectés automatiquement dans la cellule toutes les 180 secondes. Le dégagement ou l'absorption de chaleur de la réaction sont mesurés au cours de l'expérience. Les données sont intégrées à l'aide du programme Origin afin de générer des courbes représentant l'aire sous les pics en fonction du ratio molaire titrant/protéine. A température constante, la variation d'énergie libre ΔG° est définie selon l'équation suivante :

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K_a$$

Avec ΔH° la variation d'enthalpie, ΔS° la variation d'entropie, R la constante des gaz parfaits, T la température de la réaction en Kelvin, K_a est la constante d'équilibre (en M^{-1}).

La constante de dissociation K_d est égale à $1/K_a$ et s'exprime en M.

2.3.3. MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering)

Ces expériences ont été réalisées sur la plateforme de biophysique de l'IBBMC en collaboration avec Bruno Collinet et Noureddine Lazar.

Cette technique permet d'estimer la masse molaire absolue d'un échantillon en sortie de chromatographie d'exclusion de taille.

Le système utilisé combine trois types de détection : un détecteur de viscosité qui mesure la densité molaire de l'échantillon, un réfractomètre qui mesure l'indice de réfraction de l'échantillon permettant d'en estimer la masse molaire, un détecteur sensible de diffusion de lumière à certains angles de diffusion. Ce dernier permet le calcul direct de la masse moléculaire. La diffusion est mesurée sur deux angles au sein d'un seul détecteur via une cellule d'écoulement de faible volume.

2.3.4. Expériences de retard sur gel

Ces expériences permettent de tester l'interaction entre une protéine ou un complexe protéique et une molécule, ici ARN. Si les deux molécules interagissent, le complexe formé a une mobilité électrophorétique plus faible que les deux molécules séparément.

2 à 10 nM d'ARN préalablement marqué au ^{32}P sont mélangés avec des quantités variables de complexe protéique (0,15 – 0,3 – 0,6 – 1,2 μM). La réaction de 10 μL est réalisée dans la glace dans les conditions suivantes : 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM β -mercaptoéthanol, 2,5 mM MgCl_2 .

Après 10 minutes, les réactions sont analysées sur un gel natif de polyacrylamide 6% contenant 2,5% de glycérol. Après séchage, le gel est mis au contact d'un écran phosphorescent de stockage puis la révélation est réalisée à l'aide d'un scanner Typhoon (GE Healthcare).

2.4. CRISTALLOGENESE

La cristallisation des protéines a été réalisée sur la plateforme mise en place par l'équipe Fonction et Architecture des Assemblages Macromoléculaires à IBMC (Université Paris-Sud, Orsay) ainsi qu'au sein du Laboratoire de Biochimie de l'Ecole Polytechnique.

L'utilisation des kits commerciaux Qiagen (Classics, PEG1, PEGII, JCSG, Procomplex, Nucleix) et des robots de micropipetage (Cartesian Nanodrop, Mosquito, Tecan Genesis) a permis le criblage de nombreuses conditions de cristallisation. Ces expériences sont réalisées suivant la méthode de diffusion de vapeur dans des plaques de 96 puits (TTP Labtech) où un mélange de 0,1 μL de protéine et 0,1 μL de solution de précipitant est déposé en goutte assise sur un support séparé du réservoir. Les boîtes sont scellées et stockées à 19°C. Des photographies des gouttes sont prises régulièrement sur plusieurs semaines à l'aide d'un robot de visualisation (Rockimager 182-Formulatrix).

Si les cristaux sont petits ou imbriqués, une étape d'optimisation est nécessaire. En fonction des conditions de cristallisation, des gradients 1D ou/et 2D sont réalisés afin de faire varier un ou deux paramètres. Les gradients 2D sont réalisés en utilisant les robots de micropipetage de façon similaire à la première étape de criblage. Les gradients 1D sont réalisés à la main dans des plaques 24 puits. Un mélange de 1 μL de protéine et 1 μL de la solution de précipitant est déposé sur une lamelle siliconée selon le principe de la goutte suspendue.

Les cristaux dont on veut tester le pouvoir de diffraction sont pêchés à l'aide de boucles en nylon, transférés dans un mélange de la solution de cristallisation supplémenté d'un agent de cryoprotection (15 puis 30 % d'éthylène glycol) puis congelés dans de l'azote liquide. L'utilisation d'un cryoprotectant permet d'éviter la formation de glace cristalline et de maintenir un état vitreux amorphe transparent aux rayons X.

2.5. CRISTALLOGRAPHIE

Le pouvoir de diffraction des cristaux a été testé dans le faisceau de rayons X de la ligne PROXIMA 1 au Synchrotron SOLEIL. Les clichés de diffraction ont été collectés et enregistrés sur le détecteur PILATUS. Les données collectées ont été traitées avec les programmes XDS et XSCALE (Kabsch, 1993).

Les structures ont été résolues par MAD en utilisant le signal anomal de l'atome de zinc. Les coordonnées fractionnaires des atomes de zinc sont déterminées par le programme SHELXD (Schneider & Sheldrick, 2002). La résolution des phases a été réalisée à l'aide du programme SHARP (Bricogne *et al*, 2003). Les cartes de densité électronique expérimentales sont calculées à partir des facteurs de structure et de la phase en utilisant le programme FFT de la suite CCP4 (CCP4, 1994). Les structures finales sont obtenues par l'accomplissement d'une série de cycles d'affinement et reconstruction en utilisant les programmes Phenix.refine (Adams *et al*, 2002) et COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

2.6. TECHNIQUES CHEZ *S. CEREVISIAE*

Les cultures de *S. cerevisiae* sur milieux solide et liquide ont été réalisées à 30°C, température optimale de croissance de l'organisme modèle.

2.6.1. Préparation d'ADN génomique

A partir de culture sur milieu solide, quelques cellules récoltées à l'aide d'un cure-dent sont placées dans 15 µl d'une solution de phosphate de sodium 0,1 M pH7,5 contenant 2,5 mg/mL de lyticase. Cette suspension est placée successivement 20 minutes à 25°C, 5 minutes à 37°C et 5 minutes à 95°C, ce qui permet la lyse de la paroi ainsi que l'éclatement des cellules. 60 µL d'eau sont ensuite ajoutés. Cette suspension sert alors de matrice d'ADN génomique 10 fois concentrée pour les analyses PCR.

2.6.2. Transformation de *S. cerevisiae*

La souche à transformer est mise en culture à 30°C la veille de la transformation. L'ensemencement est réalisé de manière à obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance le jour de la transformation. Lorsque la DO_{600nm} de la culture atteint 1, ce qui correspond d'après le spectrophotomètre utilisé à $3 \cdot 10^7$ cellules/mL, les levures sont récoltées, lavées et reprises dans une solution d'acétate de lithium 0,1 M. Dans chaque tube, sont répartis 10^8 cellules préalablement culotées.

Sur ce culot sont appliqués successivement et sans mélange : 240 μL de PEG 3350 50%, 36 μL d'acétate de lithium 1M, 50 μL d'une solution d'ADN de sperme de saumon à 2 mg/mL et 25 μL de produit à introduire (5 μg de produit PCR purifié ou 200 ng de plasmide). Les réactifs sont alors mélangés jusqu'à homogénéité puis placé à température ambiante pendant 40 minutes puis pendant 20 minutes à 42°C.

Après une centrifugation d'une minute à 6000 g à température ambiante, les cellules sont reprises, soit dans 1 mL d'eau stérile puis étalées sur le milieu synthétique sélectif adéquat, soit dans 1 mL de milieu riche YPD, incubées à 30°C 3 heures, puis étalées sur milieu YPD-généticine. Les boîtes de Petri sont placées à 30°C et le suivi de l'apparition des colonies se déroule sur plusieurs jours.

2.6.3. Préparation d'extrait de protéines solubles et co-immunoprécipitation

Les extraits de protéines solubles sont préparés par la technique des billes de verres à partir de 10^8 à 10^9 cellules en phase exponentielle de croissance.

Après récolte des cellules par centrifugation à 5000 g pendant 20 minutes, celles-ci sont lavées à l'eau. Les culots sont ensuite repris dans 100 μL de tampon de cassage froid (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 5 mM EDTA, 1% NP-40) supplémenté d'anti-protéases (Complete EDTA-free anti-protease cocktail - Roche Diagnostics). Après l'ajout de billes de verre 0,5 mm (Biospec), la lyse des cellules est réalisée par l'application de 5 cycles de 30 secondes d'agitation vortex séparés par un refroidissement dans la glace. Les extraits de protéines solubles sont collectés par centrifugation à 15 000 g pendant 20 minutes à 4°C. La quantité de protéines dans les fractions solubles est évaluée par dosage Bradford (BioRad Protein assay).

500 mg de protéines sont incubées avec des anticorps monoclonaux de souris 9E10 anti-myc (Santa Cruz Biotechnology) pendant 1 heure dans la glace. 50 μL de billes d'agarose couplées à des protéines G 50% sont ajoutées aux complexes immuns et le mélange est incubé 30 minutes à 4°C sous agitation douce. Après 4 lavages des billes avec 200 μL de tampon de cassage, le culot est repris dans 100 μL de tampon de dénaturation (40 mM Tris-HCl, pH 6,8, 8 M Urée, 5% SDS, 0,1 mM EDTA, 1% β -mercaptoéthanol, 0,04% bleu de bromophénol). Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C afin de décrocher les protéines des billes d'agarose.

Les protéines issues de la fraction soluble et celles issues du surnageant final sont analysées sur gel de polyacrylamide 15% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose Protran (Whatman). Un western blot est ensuite réalisé en utilisant des anticorps de souris anti-myc 9E10 (Santa Cruz Biotechnology) et des anticorps de lapin polyclonaux anti-ScTrm112 comme anticorps primaires dilués au 1/5000^e. Les anticorps de mouton anti-souris et anti-lapin IgG couplés à la HRP (GE Healthcare) sont utilisés comme anticorps secondaires dilués au 1/5000^e. La révélation a été réalisée avec de l'ECL (GE HealthCare).

2.7. TECHNIQUES CHEZ *HALOFERAX VOLCANII*

Les cultures de *H. volcanii* sur milieux solide et liquide ont été réalisées à 45°C, température optimale de croissance de l'organisme modèle. Les cultures liquides sont effectuées avec agitation à 200 rpm.

2.7.1. Transformation de *H. volcanii* (Pop in)

La souche à transformer est mise en culture dans 10 mL de milieu YPC à 45°C la veille de la transformation. L'ensemencement est réalisé à partir d'une colonie isolée. Lorsque la DO_{600nm} de la culture atteint 1-1,5, les cellules sont récoltées par centrifugation à 4000g pendant 10 minutes, lavées par 2 mL d'une solution de sphéroplastes tamponnée puis reprises dans 600 µL de la même solution. Cette suspension est répartie en aliquots de 200 µL auxquels sont ajoutés 20 µL d'EDTA 0,5 M pH8. Après 10 minutes à température ambiante, 30 µL d'un mélange contenant 15 µL de solution de sphéroplastes non tamponnée, 5 µL d'EDTA 0,5 M pH8 et 10 µL d'ADN à introduire (1-2 µg de plasmide purifié d'une souche *dam*⁻) sont ajoutés dans chaque tube. Après 5 minutes à température ambiante, 250 µL d'une solution 60% PEG600 sont ajoutés au mélange. Après une homogénéisation douce, la suspension est incubée 30 minutes à température ambiante. Après ajout de 1,5 mL de solution de dilution des sphéroplastes, les cellules sont récoltées par centrifugation de 8 minutes à 6000 g à température ambiante. 1 mL de solution de régénération est appliqué sur le culot cellulaire (sans reprise du culot) puis cette suspension est incubée à 45°C pendant 90 minutes sans agitation suivies de 3 heures sous agitation. Après centrifugation de 8 minutes à 6000 g à température ambiante, les cellules sont reprises dans 1 mL d'une solution de 18% SW puis étalées sur milieu Casa-ura. Les boîtes de Petri sont placées à 45°C et le suivi de l'apparition des colonies se déroule sur plusieurs jours.

2.7.2. Pop out chez *H. volcanii*

3 mL de milieu YPC sontensemencés à partir d'une colonie isolée issue du pop in. Cette pré-culture est réalisée sur la nuit à 45°C. 6 µL de cette pré-culture servent àensemencer 3 mL de milieu YPC et cette culture est incubée 24 heures à 45°C. Cette dernière étape est renouvelée une fois. Le jour suivant, plusieurs dilutions de la culture sont réalisées dans une solution de 18% SW (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) et étalées sur milieu Casa-5FOA. Les boites de Petri sont incubées à 45°C. L'apparition des colonies peut prendre plusieurs semaines.

2.7.3. Suivi de croissance et test de viabilité

3 mL de milieu YPC sontensemencés par un clone isolé de la souche à étudier. Cette pré-culture est incubée à 45°C pendant 24 heures. Après mesure de la DO_{600nm} , des dilutions sont réalisées dans le milieu YPC pour obtenir des suspensions présentant des DO_{600nm} initiales de 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, puis elles sont incubées 15 heures à 45°C. Le lendemain matin, les cultures en phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} entre 0,05 et 0,2) font l'objet de 4 tests de viabilité réalisés toutes les 2 heures.

Le test de viabilité par étalement consiste à réaliser, à un temps donné, des dilutions de la culture à suivre dans une solution de 18% SW (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). 20 µL de chaque dilution sont déposés sur milieu solide YPC. Une fois les gouttes évaporées, les boites de Petri sont placées à 45°C pour 4 à 5 jours. Un comptage des colonies en fonction de la dilution permet de déterminer pour chaque temps le CFU (Colony Forming Unit)/mL. En traçant la courbe des valeurs de CFU en fonction du temps, il est possible de déterminer le temps de génération : $t_g = \ln 2 / \mu_{max}$, avec μ_{max} le taux népérien de croissance en phase exponentielle.

2.8. Transcription d'ARN *in vitro*

Dans un premier temps, une matrice d'ADN double-brin linéaire portant un promoteur T7 en amont de la séquence codant l'ARN est générée par PCR. La transcription d'ARN *in vitro* est réalisée à l'aide de l'ARN T7 polymérase produite au laboratoire. La réaction se déroule à 37°C pendant 3 heures dans un volume de 50 µL et se compose de :

- 30 mM HEPES-KOH pH 7,6, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM spermidine
- 0,5 à 1 µg d'ADN matrice
- un mélange d'ATP, GTP et CTP (1 mM), UTP (0,1 mM), 3 µL UTP [α -³²P] (3000 Ci/mmol; 10 mCi/mL; Perkin Elmer)
- 2 µL d'inhibiteur de RNase (40 U/µL RNaseOUT, Invitrogen)
- 50 U d'ARN T7 polymérase

Afin d'éliminer l'ADN matrice, un traitement à la DNase I est réalisé à 37°C pendant 30 minutes. Les produits de transcription sont purifiés sur colonne de chromatographie microBioSpin (BioRad - BioGel P6). L'ARN radiomarké est élué avec 50 µL d'eau et sa concentration est estimée à l'aide du compteur à scintillation (Beckman Coulter LS6500). La structuration de l'ARN est réalisée par chauffage à 65°C pendant 10 minutes suivies d'un refroidissement lent à température ambiante dans les conditions de tampon suivante : 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM β -mercaptoéthanol, 2,5 mM MgCl₂.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Abelson J, Trotta CR & Li H (1998)** tRNA splicing. *The Journal of biological chemistry* **273**: 12685–8
- Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung LW, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK & Terwilliger TC (2002) PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica Section D* **58**: 1948–1954
- Agris PF (1996) The importance of being modified: roles of modified nucleosides and Mg²⁺ in RNA structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **53**: 79–129
- Alexandrov A, Grayhack EJ & Phizicky EM (2005) tRNA m7G methyltransferase Trm8p/Trm82p: evidence linking activity to a growth phenotype and implicating Trm82p in maintaining levels of active Trm8p. *RNA* **11**: 821–830
- Allers T & Mevarech M (2005) Archaeal genetics - the third way. *Nature reviews genetics* **6**: 58–73
- Anantharaman V, Koonin E V & Aravind L (2002) SPOUT: a class of methyltransferases that includes spoU and trmD RNA methylase superfamilies, and novel superfamilies of predicted prokaryotic RNA methylases. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **4**: 71–5
- Ander M & Aqvist J (2009) Does glutamine methylation affect the intrinsic conformation of the universally conserved GGQ motif in ribosomal release factors? *Biochemistry* **48**: 3483–3489
- Andersen GR, Nissen P & Nyborg J (2003) Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in biochemical sciences* **28**: 434–41
- Anderson J, Phan L & Hinnebusch AG (2000) The Gcd10p/Gcd14p complex is the essential two-subunit tRNA(1-methyladenosine) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 5173–5178
- Anger AM, Armache J-P, Berninghausen O, Habeck M, Subklewe M, Wilson DN & Beckmann R (2013) Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* **497**: 80–5
- Armengaud J, Urbonavicius J, Fernandez B, Chaussinand G, Bujnicki JM & Grosjean H (2004) N²-methylation of guanosine at position 10 in tRNA is catalyzed by a THUMP domain-containing, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, conserved in Archaea and Eukaryota. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 37142–37152
- Aström SU & Byström AS (1994) Rit1, a tRNA backbone-modifying enzyme that mediates initiator and elongator tRNA discrimination. *Cell* **79**: 535–46
- Atkins JF & Björk GR (2009) A gripping tale of ribosomal frameshifting: extragenic suppressors of frameshift mutations spotlight P-site realignment. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **73**: 178–210
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB & Steitz TA (2000)** The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905–20
- Banerjee AK (1980) 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiological reviews* **44**: 175–205
- Becker T, Franckenberg S, Wickles S, Shoemaker CJ, Anger AM, Armache J-P, Sieber H, Ungewickell C, Berninghausen O, Daberkow I, Karcher A, Thomm M, Hopfner K-P, Green R & Beckmann R (2012) Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* **482**: 501–6
- Begley TJ, Rosenbach AS, Ideker T & Samson LD (2002) Damage recovery pathways in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic phenotyping and interactome mapping. *Molecular cancer research : MCR* **1**: 103–12

Bibliographie

- Begley TJ, Rosenbach AS, Ideker T & Samson LD (2004) Hot spots for modulating toxicity identified by genomic phenotyping and localization mapping. *Molecular cell* **16**: 117–25
- Begley U, Dyavaiah M, Patil A, Rooney JP, DiRenzo D, Young CM, Conklin DS, Zitomer RS & Begley TJ (2007) Trm9-catalyzed tRNA modifications link translation to the DNA damage response. *Molecular Cell* **28**: 860–870
- Begley U, Sosa MS, Avivar-Valderas A, Patil A, Endres L, Estrada Y, Chan CT, Su D, Dedon PC, Aguirre-Ghiso JA & Begley T (2013) A human tRNA methyltransferase 9-like protein prevents tumour growth by regulating LIN9 and HIF1- α . *EMBO Molecular Medicine* **5**: 366–383
- Behm-Ansmant I, Urban A, Ma X, Yu Y-T, Motorin Y & Branlant C (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* U2 snRNA:pseudouridine-synthase Pus7p is a novel multisite-multisubstrate RNA:Psi-synthase also acting on tRNAs. *RNA* **9**: 1371–82
- Benelli D & Londei P (2011) Translation initiation in Archaea: conserved and domain-specific features. *Biochemical Society transactions* **39**: 89–93
- Bennett CB, Lewis LK, Karthikeyan G, Lobachev KS, Jin YH, Sterling JF, Snipe JR & Resnick MA (2001) Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nature Genetics* **29**: 426–434
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G & Yusupov M (2010) Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* **330**: 1203–1209
- Bernstein KA, Granneman S, Lee A V, Manickam S & Baserga SJ (2006) Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases involved in large ribosomal subunit biogenesis. *Molecular and cellular biology* **26**: 1195–208
- Bitan-Banin G, Ortenberg R & Mevarech M (2003) Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *Journal of bacteriology* **185**: 772–8
- Björk G (1995) tRNA: structure, biosynthesis, and function
- Bleichert F, Granneman S, Osheim YN, Beyer AL & Baserga SJ (2006) The PINc domain protein Utp24, a putative nuclease, is required for the early cleavage steps in 18S rRNA maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 9464–9
- Bohnsack MT, Martin R, Granneman S, Ruprecht M, Schleiff E & Tollervey D (2009) Prp43 bound at different sites on the pre-rRNA performs distinct functions in ribosome synthesis. *Molecular cell* **36**: 583–92
- Bricogne G, Vornrhein C, Flensburg C, Schiltz M & Paciorek W (2003) Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallographica Section D* **59**: 2023–2030
- Brown JR & Doolittle WF (1997) Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiology and molecular biology reviews* **61**: 456–502
- Bujnicki JM (2000) Phylogenomic analysis of 16S rRNA:(guanine-N2) methyltransferases suggests new family members and reveals highly conserved motifs and a domain structure similar to other nucleic acid amino-methyltransferases. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **14**: 2365–8
- Butler AR, Porter M & Stark MJ (1991) Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin gamma subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant. *Yeast* **7**: 617–25
- Cantara WA, Crain PF, Rozenski J, McCloskey JA, Harris KA, Zhang X, Vendeix FA, Fabris D & Agris PF (2011) The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Research* **39**: D195–201
- Cantoni GL (1975) Biological methylation: selected aspects. *Annual review of biochemistry* **44**: 435–51

- CCP4 (1994) The CCP4 Suite : Programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D* **760**–763
- Chavatte L, Frolova L, Kisselev L & Favre A (2001) The polypeptide chain release factor eRF1 specifically contacts the s(4)UGA stop codon located in the A site of eukaryotic ribosomes. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**: 2896–904
- Chen C, Huang B, Anderson JT & Bystrom AS (2011) Unexpected accumulation of ncm(5)U and ncm(5)S(2) (U) in a trm9 mutant suggests an additional step in the synthesis of mcm(5)U and mcm(5)S(2)U. *PLoS One* **6**: e20783
- Chen J & Stubbe J (2005) Bleomycins: towards better therapeutics. *Nature Review Cancer* **5**: 102–112
- Chen M & Gartenberg MR (2014) Coordination of tRNA transcription with export at nuclear pore complexes in budding yeast. *Genes & development* **28**: 959–70
- Cheng X & Blumenthal RM (1999) S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and functions
- Cheng X, Kumar S, Posfai J, Pflugrath JW & Roberts RJ (1993) Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* **74**: 299–307
- Cheng X & Roberts RJ (2001) AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic acids research* **29**: 3784–95
- Cheng Z, Saito K, Pisarev A V, Wada M, Pisareva VP, Pestova T V, Gajda M, Round A, Kong C, Lim M, Nakamura Y, Svergun DI, Ito K & Song H (2009) Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes & development* **23**: 1106–18
- Cheutin T, O'Donohue M-F, Beorchia A, Vandelaer M, Kaplan H, Deféver B, Ploton D & Thiry M (2002) Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *Journal of cell science* **115**: 3297–307
- Chow CS, Lamichhane TN & Mahto SK (2007) Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *ACS chemical biology* **2**: 610–9
- Colley A, Beggs JD, Tollervey D & Lafontaine DL (2000) Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. *Molecular and cellular biology* **20**: 7238–46
- Crick FH (1966) Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *Journal of molecular biology* **19**: 548–55
- D**as K, Acton T, Chiang Y, Shih L, Arnold E & Montelione GT (2004) Crystal structure of RlmAI: implications for understanding the 23S rRNA G745/G748-methylation at the macrolide antibiotic-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 4041–4046
- Daugeron M-C, Lenstra TL, Frizzarin M, El Yacoubi B, Liu X, Baudin-Baillieu A, Lijnzaad P, Decourty L, Saveanu C, Jacquier A, Holstege FCP, de Crécy-Lagard V, van Tilbeurgh H & Libri D (2011) Gcn4 misregulation reveals a direct role for the evolutionary conserved EKC/KEOPS in the t6A modification of tRNAs. *Nucleic acids research* **39**: 6148–60
- De Crécy-Lagard V, Brochier-Armanet C, Urbonavicius J, Fernandez B, Phillips G, Lyons B, Noma A, Alvarez S, Droogmans L, Armengaud J & Grosjean H (2010) Biosynthesis of wyosine derivatives in tRNA: an ancient and highly diverse pathway in Archaea. *Molecular biology and evolution* **27**: 2062–77
- De la Pena M, Kyrieleis OJ & Cusack S (2007) Structural insights into the mechanism and evolution of the vaccinia virus mRNA cap N7 methyl-transferase. *EMBO Journal* **26**: 4913–4925
- Decatur WA & Fournier MJ (2002) rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences* **27**: 344–51
- Dennis PP (1997) Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**: 1007–10

- Deutscher MP (1990) Ribonucleases, tRNA nucleotidyltransferase, and the 3' processing of tRNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **39**: 209–40
- Dever TE & Green R (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**: a013706
- Dincbas-Renqvist V, Engstrom A, Mora L, Heurgue-Hamard V, Buckingham R & Ehrenberg M (2000) A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation. *EMBO Journal* **19**: 6900–6907
- Dixon MM, Huang S, Matthews RG & Ludwig M (1996) The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12. *Structure* **4**: 1263–75
- Djordjevic S & Stock AM (1997) Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine. *Structure* **5**: 545–58
- Doll A & Grzeschik KH (2001) Characterization of two novel genes, WBSR20 and WBSR22, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Cytogenetics and cell genetics* **95**: 20–7
- Dong J, Lai R, Nielsen K, Fekete CA, Qiu H & Hinnebusch AG (2004) The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *The Journal of biological chemistry* **279**: 42157–68
- Dragon F, Gallagher JEG, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlege RE, Shabanowitz J, Osheim Y, Beyer AL, Hunt DF & Baserga SJ (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**: 967–70
- Du Y, Hendrick CE, Frye KS & Comstock LR (2012) Fluorescent DNA labeling by N-mustard analogues of S-adenosyl-L-methionine. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **13**: 2225–33
- Dudock BS, Katz G, Taylor EK & Holley RW (1969) Primary structure of wheat germ phenylalanine transfer RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **62**: 941–5
- Dutca LM, Gallagher JEG & Baserga SJ (2011) The initial U3 snoRNA:pre-rRNA base pairing interaction required for pre-18S rRNA folding revealed by in vivo chemical probing. *Nucleic acids research* **39**: 5164–80
- Eklund H, Uhlin U, Farnegardh M, Logan DT & Nordlund P (2001) Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Progress Biophysics & Molecular Biology* **77**: 177–268
- El Yacoubi B, Bailly M & de Crécy-Lagard V (2012) Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annual review of genetics* **46**: 69–95
- Elledge SJ & Davis RW (1990) Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Development* **4**: 740–751
- Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D* **60**: 2126–2132
- Fatica A, Oeffinger M, Dlakić M & Tollervey D (2003) Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Molecular and cellular biology* **23**: 1798–807
- Fayet-Lebaron E, Atzorn V, Henry Y & Kiss T (2009) 18S rRNA processing requires base pairings of snR30 H/ACA snoRNA to eukaryote-specific 18S sequences. *The EMBO journal* **28**: 1260–70
- Fichtner L, Frohloff F, Jablonowski D, Stark MJR & Schaffrath R (2002) Protein interactions within *Saccharomyces cerevisiae* Elongator, a complex essential for *Kluyveromyces lactis* zymocidity. *Molecular microbiology* **45**: 817–26

- Fichtner L & Schaffrath R (2002) KTI11 and KTI13, *Saccharomyces cerevisiae* genes controlling sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Molecular Microbiology* **44**: 865–875
- Figaro S, Scrima N, Buckingham RH & Heurgue-Hamard V (2008) HemK2 protein, encoded on human chromosome 21, methylates translation termination factor eRF1. *FEBS Letters* **582**: 2352–2356
- Figaro S, Wacheul L, Schillewaert S, Graille M, Huvelle E, Mongeard R, Zorbas C, Lafontaine DL & Heurgue-Hamard V (2012) Trm112 is required for Bud23-mediated methylation of the 18S rRNA at position G1575. *Molecular Cell Biology* **32**: 2254–2267
- Fontecave M, Atta M & Mulliez E (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends in biochemical sciences* **29**: 243–9
- Franckenberg S, Becker T & Beckmann R (2012) Structural view on recycling of archaeal and eukaryotic ribosomes after canonical termination and ribosome rescue. *Current opinion in structural biology* **22**: 786–96
- Francklyn CS & Minajigi A (2010) tRNA as an active chemical scaffold for diverse chemical transformations. *FEBS letters* **584**: 366–75
- Frohloff F, Fichtner L, Jablonowski D, Breunig KD & Schaffrath R (2001) *Saccharomyces cerevisiae* Elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *The EMBO journal* **20**: 1993–2003
- Frolova L, Le Goff X, Zhouravleva G, Davydova E, Philippe M & Kisselev L (1996) Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* **2**: 334–41
- Frolova LY, Tsivkovskii RY, Sivolobova GF, Oparina NY, Serpinsky OI, Blinov VM, Tatkov SI & Kisselev LL (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* **5**: 1014–1020
- Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C & Fasiolo F (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**: 17–42
- Fu D, Brophy JA, Chan CT, Atmore KA, Begley U, Paules RS, Dedon PC, Begley TJ & Samson LD (2010) Human AlkB homolog ABH8 Is a tRNA methyltransferase required for wobble uridine modification and DNA damage survival. *Molecular Cell Biology* **30**: 2449–2459
- Furuichi Y, LaFiandra A & Shatkin AJ (1977) 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266**: 235–9
- Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, et al (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141–147
- Gerber AP & Keller W (1999) An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. *Science* **286**: 1146–9
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK & Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737–741
- Giegé R & Lapointe J (2009) Transfer RNA aminoacylation and modified nucleosides. In *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*, Grosjean H (ed) pp 475–492. Landes Bioscience.
- Glatt S, Letoquart J, Faux C, Taylor NM, Seraphin B & Muller CW (2012) The Elongator subcomplex Elp456 is a hexameric RecA-like ATPase. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 314–320
- Goedecke K, Pignot M, Goody RS, Scheidig AJ & Weinhold E (2001) Structure of the N6-adenine DNA methyltransferase M.TaqI in complex with DNA and a cofactor analog. *Nature Structural Biology* **8**: 121–125

Bibliographie

- Gong W, O’Gara M, Blumenthal RM & Cheng X (1997) Structure of pvu II DNA-(cytosine N4) methyltransferase, an example of domain permutation and protein fold assignment. *Nucleic Acids Research* **25**: 2702–2715
- Grabowski PJ, Seiler SR & Sharp PA (1985) A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **42**: 345–53
- Graille M, Heurgue-Hamard V, Champ S, Mora L, Scrima N, Ulryck N, van Tilbeurgh H & Buckingham RH (2005) Molecular basis for bacterial class I release factor methylation by PrmC. *Molecular Cell* **20**: 917–927
- Grandi P, Rybin V, Bassler J, Petfalski E, Strauss D, Marzioch M, Schäfer T, Kuster B, Tschochner H, Tollervey D, Gavin AC & Hurt E (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Molecular cell* **10**: 105–15
- Gray M, Kupiec M & Honigberg SM (2004) Site-specific genomic (SSG) and random domain-localized (RDL) mutagenesis in yeast. *BMC biotechnology* **4**: 7
- Green R & Noller HF (1999) Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochemistry* **38**: 1772–9
- Grewal SIS & Rice JC (2004) Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Current opinion in cell biology* **16**: 230–8
- Grosjean H, Gaspin C, Marck C, Decatur WA & de Crécy-Lagard V (2008) RNomics and Modomics in the halophilic archaea *Haloferax volcanii*: identification of RNA modification genes. *BMC genomics* **9**: 470
- Grosjean H, Szweykowska-Kulinska Z, Motorin Y, Fasiolo F & Simos G (1997) Intron-dependent enzymatic formation of modified nucleosides in eukaryotic tRNAs: a review. *Biochimie* **79**: 293–302
- Guarino E, Salguero I & Kearsley SE (2014) Cellular regulation of ribonucleotide reductase in eukaryotes. *Seminars in cell & developmental biology* **30**: 97-103
- Gunge N, Tamaru A, Ozawa F & Sakaguchi K (1981) Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of bacteriology* **145**: 382–90
- Guy MP, Podyma BM, Preston MA, Shaheen HH, Krivos KL, Limbach PA, Hopper AK & Phizicky EM (2012) Yeast Trm7 interacts with distinct proteins for critical modifications of the tRNAPhe anticodon loop. *RNA* **18**: 1921–33
- H**adjiolov AA (1980) Biogenesis of ribosomes in eukaryotes. *Sub-cellular biochemistry* **7**: 1–80
- Hall KB, Sampson JR, Uhlenbeck OC & Redfield AG (1989) Structure of an unmodified tRNA molecule. *Biochemistry* **28**: 5794–801
- Hani J & Feldmann H (1998) tRNA genes and retroelements in the yeast genome. *Nucleic acids research* **26**: 689–96
- Hartman AL, Norais C, Badger JH, Delmas S, Haldenby S, Madupu R, Robinson J, Khouri H, Ren Q, Lowe TM, Maupin-Furlow J, Pohlschroder M, Daniels C, Pfeiffer F, Allers T & Eisen JA (2010) The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS One* **5**: e9605
- Hartmann E & Hartmann RK (2003) The enigma of ribonuclease P evolution. *Trends in genetics : TIG* **19**: 561–9
- Haurlyuk V, Zavialov A, Kisselev L & Ehrenberg M (2006) Class-1 release factor eRF1 promotes GTP binding by class-2 release factor eRF3. *Biochimie* **88**: 747–57
- Helm M, Giegé R & Florentz C (1999) A Watson-Crick base-pair-disrupting methyl group (m1A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNALys. *Biochemistry* **38**: 13338–46

- Henras AK, Soudet J, G erus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Mougin A & Henry Y (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**: 2334–59
- Henry Y, Wood H, Morrissey JP, Petfalski E, Kearsey S & Tollervey D (1994) The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO journal* **13**: 2452–63
- Heurgu e-Hamard V, Champ S, Engst om  , Ehrenberg M & Buckingham RH (2002) The hemK gene in *Escherichia coli* encodes the N(5)-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors. *EMBO Journal* **21**: 769–78.
- Heurgue-Hamard V, Champ S, Mora L, Merkulova-Rainon T, Kisselev LL & Buckingham RH (2005) The glutamine residue of the conserved GGQ motif in *Saccharomyces cerevisiae* release factor eRF1 is methylated by the product of the YDR140w gene. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 2439–2445
- Heurgue-Hamard V, Graille M, Scrima N, Ulryck N, Champ S, van Tilbeurgh H & Buckingham RH (2006) The zinc finger protein Ynr046w is plurifunctional and a component of the eRF1 methyltransferase in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 36140–36148
- Hopper AK (2013) Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **194**: 43–67
- Hopper AK & Phizicky EM (2003) tRNA transfers to the limelight. *Genes Development* **17**: 162–180
- Horie N, Hara-Yokoyama M, Yokoyama S, Watanabe K, Kuchino Y, Nishimura S & Miyazawa T (1985) Two tRNA^{Ala1} species from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8: effect of 2-thiolation of ribothymidine on the thermostability of tRNA. *Biochemistry* **24**: 5711–5
- Horn DM, Mason SL & Karbstein K (2011) Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production. *The Journal of biological chemistry* **286**: 34082–7
- Huang B, Johansson MJ & Bystrom AS (2005) An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA* **11**: 424–436
- Huang B, Lu J & Bystrom AS (2008) A genome-wide screen identifies genes required for formation of the wobble nucleoside 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **14**: 2183–2194
- Hughes JM (1996) Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA. *Journal of molecular biology* **259**: 645–54
- Hurto RL (2011) Unexpected functions of tRNA and tRNA processing enzymes. *Advances in experimental medicine and biology* **722**: 137–55
- Ito K, Ebihara K & Nakamura Y (1998) The stretch of C-terminal acidic amino acids of translational release factor eRF1 is a primary binding site for eRF3 of fission yeast. *RNA* **4**: 958–72
- Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, Jarmolowski A, McGuigan C & Mattaj IW (1995) A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376**: 709–12
- Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, Jankowska M, Darzynkiewicz E & Mattaj IW (1994) A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **78**: 657–68
- Jabbari K & Bernardi G (2004) Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene* **333**: 143–9
- Jablonowski D & Schaffrath R (2007) Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochemical Society transactions* **35**: 1533–7
- Jackson RJ, Hellen CUT & Pestova T V (2012) Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Advances in protein chemistry and structural biology* **86**: 45–93

- Jangani M, Poolman TM, Matthews L, Yang N, Farrow SN, Berry A, Hanley N, Williamson AJK, Whetton AD, Donn R & Ray DW (2014) The methyltransferase WBSR22/Merm1 enhances glucocorticoid receptor function and is regulated in lung inflammation and cancer. *The Journal of biological chemistry* **289**: 8931–46
- Jarrett JT (2003) The generation of 5'-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes. *Current opinion in chemical biology* **7**: 174–82
- Jin B & Robertson KD (2013) DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **754**: 3–29
- Jin H, Kelley AC, Loakes D & Ramakrishnan V (2010) Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 8593–8
- Johansson MJ, Esberg A, Huang B, Bjork GR & Bystrom AS (2008) Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 3301–3312
- Jühling F, Mörl M, Hartmann RK, Sprinzl M, Stadler PF & Pütz J (2009) tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic acids research* **37**: D159–62
- Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**: 795–800
- Kaempfer R, Rosen H & Israeli R (1978) Translational control: recognition of the methylated 5' end and an internal sequence in eukaryotic mRNA by the initiation factor that binds methionyl-tRNA^{fMet}. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 650–4
- Kalhor HR & Clarke S (2003) Novel Methyltransferase for Modified Uridine Residues at the Wobble Position of tRNA. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 9283–9292
- Kanaya S, Yamada Y, Kudo Y & Ikemura T (1999) Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* **238**: 143–55
- Karbstein K (2011) Inside the 40S ribosome assembly machinery. *Current opinion in chemical biology* **15**: 657–63
- Kim SH, Suddath FL, Quigley GJ, McPherson A, Sussman JL, Wang AH, Seeman NC & Rich A (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **185**: 435–40
- King TH, Liu B, McCully RR & Fournier MJ (2003) Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Molecular cell* **11**: 425–35
- Kiss T, Fayet-Lebaron E & Jády BE (2010) Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Molecular cell* **37**: 597–606
- Kisselev L (2002) Polypeptide release factors in prokaryotes and eukaryotes: same function, different structure. *Structure* **10**: 8–9
- Kisselev LL & Buckingham RH (2000) Translational termination comes of age. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 561–566
- Klimasauskas S, Kumar S, Roberts RJ & Cheng X (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**: 357–69
- Kobayashi K, Saito K, Ishitani R, Ito K & Nureki O (2012) Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex. *Nucleic acids research* **40**: 9319–28

- Kolosov P, Frolova L, Seit-Nebi A, Dubovaya V, Kononenko A, Oparina N, Justesen J, Efimov A & Kisselev L (2005) Invariant amino acids essential for decoding function of polypeptide release factor eRF1. *Nucleic acids research* **33**: 6418–25
- Komine Y, Adachi T, Inokuchi H & Ozeki H (1990) Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12. *Journal of molecular biology* **212**: 579–98
- Kong C, Ito K, Walsh MA, Wada M, Liu Y, Kumar S, Barford D, Nakamura Y & Song H (2004) Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*. *Molecular cell* **14**: 233–45
- Kononenko A V, Mitkevich VA, Dubovaya VI, Kolosov PM, Makarov AA & Kisselev LL (2008) Role of the individual domains of translation termination factor eRF1 in GTP binding to eRF3. *Proteins* **70**: 388–93
- Korostelev A, Zhu J, Asahara H & Noller HF (2010) Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1. *EMBO journal* **29**: 2577–85
- Korostelev AA (2011) Structural aspects of translation termination on the ribosome. *RNA (New York, N.Y.)* **17**: 1409–21
- Krogan NJ, Peng W-T, Cagney G, Robinson MD, Haw R, Zhong G, Guo X, Zhang X, Canadien V, Richards DP, Beattie BK, Lalev A, Zhang W, Davierwala AP, Mnaimneh S, Starostine A, Tikuisis AP, Grigull J, Datta N, Bray JE, et al (2004) High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Molecular cell* **13**: 225–39
- Kushnirov V V, Ter-Avanesyan MD, Telckov M V, Surguchov AP, Smirnov VN & Inge-Vechtomov SG (1988) Nucleotide sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **66**: 45–54
- Lafontaine D, Vandenhoute J & Tollervey D (1995) The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes & Development* **9**: 2470–2481
- Lafontaine DL & Tollervey D (2006) Ribosomal RNA. *eLS*: 1–7
- Le H, Tanguay RL, Balasta ML, Wei CC, Browning KS, Metz AM, Goss DJ & Gallie DR (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *The Journal of biological chemistry* **272**: 16247–55
- Lee SJ & Baserga SJ (1997) Functional separation of pre-rRNA processing steps revealed by truncation of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein component, Mpp10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13536–41
- Leidel S, Pedrioli PGA, Bucher T, Brost R, Costanzo M, Schmidt A, Aebersold R, Boone C, Hofmann K & Peter M (2009) Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature* **458**: 228–32
- Leulliot N, Bohnsack MT, Graille M, Tollervey D & Van Tilbeurgh H (2008a) The yeast ribosome synthesis factor Emg1 is a novel member of the superfamily of alpha/beta knot fold methyltransferases. *Nucleic Acids Research* **36**: 629–639
- Leulliot N, Chaillet M, Durand D, Ulryck N, Blondeau K & van Tilbeurgh H (2008b) Structure of the yeast tRNA m7G methylation complex. *Structure* **16**: 52–61
- Leulliot N, Quevillon-Cheruel S, Sorel I, Li de La Sierra-Gallay I, Collinet B, Graille M, Blondeau K, Bettache N, Poupon A, Janin J & van Tilbeurgh H (2004) Structure of protein phosphatase methyltransferase 1 (PPM1), a leucine carboxyl methyltransferase involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity. *The Journal of biological chemistry* **279**: 8351–8
- Liger D, Mora L, Lazar N, Figaro S, Henri J, Scrima N, Buckingham RH, van Tilbeurgh H, Heurgue-Hamard V & Graille M (2011) Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 “hub” protein. *Nucleic Acids Research* **39**: 6249–6259

- Liu M & Douthwaite S (2002) Methylation at nucleotide G745 or G748 in 23S rRNA distinguishes Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **44**: 195–204
- Liu P, Nie S, Li B, Yang ZQ, Xu ZM, Fei J, Lin C, Zeng R & Xu GL (2010) Deficiency in a glutamine-specific methyltransferase for the release factor causes mouse embryonic lethality. *Molecular and cellular Biology* **30**: 4245–4253
- Liu PC & Thiele DJ (2001) Novel stress-responsive genes EMG1 and NOP14 encode conserved, interacting proteins required for 40S ribosome biogenesis. *Molecular biology of the cell* **12**: 3644–57
- Lo Conte L, Chothia C & Janin J (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of molecular biology* **285**: 2177–98
- Loh PG & Song H (2010) Structural and mechanistic insights into translation termination. *Current opinion in structural biology* **20**: 98–103
- Longtine MS, McKenzie 3rd A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P & Pringle JR (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953–961
- López-Camarillo C, Lopez-Casamichana M, Weber C, Guillen N, Orozco E & Marchat LA (2009) DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoeba histolytica* and related protozoan parasites. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **9**: 1051–6
- Lu J, Huang B, Esberg A, Johansson MJ & Bystrom AS (2005) The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *RNA* **11**: 1648–1654
- Lüking A, Stahl U & Schmidt U (1998) The protein family of RNA helicases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **33**: 259–96
- Lund E & Dahlberg JE (1998) Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* **282**: 2082–5
- Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman AS & Helleday T (2005) Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* **33**: 3799–3811
- Lussier M, White AM, Sheraton J, di Paolo T, Treadwell J, Southard SB, Horenstein CI, Chen-Weiner J, Ram AF, Kapteyn JC, Roemer TW, Vo DH, Bondoc DC, Hall J, Zhong WW, Sdicu AM, Davies J, Klis FM, Robbins PW & Bussey H (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 435–50
- M**alone T, Blumenthal RM & Cheng X (1995) Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *Journal of molecular biology* **253**: 618–32
- Mandal D, Köhrer C, Su D, Babu IR, Chan CTY, Liu Y, Söll D, Blum P, Kuwahara M, Dedon PC & Rajbhandary UL (2014) Identification and codon reading properties of 5-cyanomethyl uridine, a new modified nucleoside found in the anticodon wobble position of mutant haloarchaeal isoleucine tRNAs. *RNA* **20**: 177–88
- Mangus DA, Evans MC & Jacobson A (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome biology* **4**: 223
- Marck C & Grosjean H (2002) tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA* **8**: 1189–232
- Marquet R, Isel C, Ehresmann C & Ehresmann B (1995) tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie* **77**: 113–24

- Martin JL & McMillan FM (2002) SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology* **12**: 783–793
- Martin R, Straub AU, Doebele C & Bohnsack MT (2013) DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. *RNA biology* **10**: 4–18
- Massenet S, Motorin Y, Lafontaine DL, Hurt EC, Grosjean H & Branlant C (1999) Pseudouridine mapping in the *Saccharomyces cerevisiae* spliceosomal U small nuclear RNAs (snRNAs) reveals that pseudouridine synthase pus1p exhibits a dual substrate specificity for U2 snRNA and tRNA. *Molecular and cellular biology* **19**: 2142–54
- Matthews BW (1968) Solvent content of protein crystals. *Journal of molecular biology* **33**: 491–7
- Mazauric MH, Dirick L, Purushothaman SK, Bjork GR & Lapeyre B (2010) Trm112p is a 15-kDa zinc finger protein essential for the activity of two tRNA and one protein methyltransferases in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 18505–18515
- Mora L, Heurgue-Hamard V, de Zamaroczy M, Kervestin S & Buckingham RH (2007) Methylation of bacterial release factors RF1 and RF2 is required for normal translation termination in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 35638–35645
- Moss B, Gershowitz A, Wei CM & Boone R (1976) Formation of the guanylated and methylated 5'-terminus of vaccinia virus mRNA. *Virology* **72**: 341–51
- Motorin Y & Grosjean H (1998) Modification and Editing of RNA
- Motorin Y & Helm M (2010) tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry* **49**: 4934–4944
- Motorin Y & Helm M (2011) RNA nucleotide methylation. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **2**: 611–31
- Motorin Y, Keith G, Simon C, Foiret D, Simos G, Hurt E & Grosjean H (1998) The yeast tRNA:pseudouridine synthase Pus1p displays a multisite substrate specificity. *RNA* **4**: 856–69
- Mullineux S-T & Lafontaine DLJ (2012) Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie* **94**: 1521–32
- Murphy F V & Ramakrishnan V (2004) Structure of a purine-purine wobble base pair in the decoding center of the ribosome. *Nature structural & molecular biology* **11**: 1251–2
- N**akahigashi K, Kubo N, Narita S, Shimaoka T, Goto S, Oshima T, Mori H, Maeda M, Wada C & Inokuchi H (2002) HemK, a class of protein methyl transferase with similarity to DNA methyl transferases, methylates polypeptide chain release factors, and hemK knockout induces defects in translational termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* **99**: 1473–1478
- Nakai Y, Nakai M, Lill R, Suzuki T & Hayashi H (2007) Thio modification of yeast cytosolic tRNA is an iron-sulfur protein-dependent pathway. *Molecular and cellular biology* **27**: 2841–7
- Nakazawa Y, Arai H & Fujita N (2011) The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis. *Cancer research* **71**: 1146–55
- Noma A, Sakaguchi Y & Suzuki T (2009) Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic acids research* **37**: 1335–52
- Noon KR, Guymon R, Crain PF, McCloskey JA, Thomm M, Lim J & Cavicchioli R (2003) Influence of temperature on tRNA modification in archaea: *Methanococcus burtonii* (optimum growth temperature [Topt], 23 degrees C) and *Stetteria hydrogenophila* (Topt, 95 degrees C). *Journal of bacteriology* **185**: 5483–90
- O**hbayashi I, Konishi M, Ebine K & Sugiyama M (2011) Genetic identification of Arabidopsis RID2 as an essential factor involved in pre-rRNA processing. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **67**: 49–60

- Okimoto R & Wolstenholme DR (1990) A set of tRNAs that lack either the T psi C arm or the dihydrouridine arm: towards a minimal tRNA adaptor. *EMBO journal* **9**: 3405–11
- Oliva R, Cavallo L & Tramontano A (2006) Accurate energies of hydrogen bonded nucleic acid base pairs and triplets in tRNA tertiary interactions. *Nucleic acids research* **34**: 865–79
- Öunap K, Käsper L, Kurg A & Kurg R (2013) The human WBSCR22 protein is involved in the biogenesis of the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *PLoS one* **8**: e75686
- Ozanick SG, Bujnicki JM, Sem DS & Anderson JT (2007) Conserved amino acids in each subunit of the heterologomeric tRNA m1A58 Mtase from *Saccharomyces cerevisiae* contribute to tRNA binding. *Nucleic Acids Research* **35**: 6808–6819
- Palmer JL & Abeles RH (1979) The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *The Journal of biological chemistry* **254**: 1217–26
- Papadimitriou A & Gross HJ (1996) Pre-tRNA 3'-processing in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of exo- and endoribonucleases. *European journal of biochemistry / FEBS* **242**: 747–59
- Pastore C, Topalidou I, Forouhar F, Yan AC, Levy M & Hunt JF (2012) Crystal structure and RNA binding properties of the RNA recognition motif (RRM) and AlkB domains in human AlkB homolog 8 (ABH8), an enzyme catalyzing tRNA hypermodification. *The Journal of Biological Chemistry* **287**: 2130–2143
- Patil A, Chan CT, Dyavaiah M, Rooney JP, Dedon PC & Begley TJ (2012) Translational infidelity-induced protein stress results from a deficiency in Trm9-catalyzed tRNA modifications. *RNA Biology* **9**: 990–1001
- Peifer C, Sharma S, Watzinger P, Lamberth S, Kötter P & Entian K-D (2013) Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m1A 645 base modification of 25S rRNA. *Nucleic acids research* **41**: 1151–63
- Perrochia L, Crozat E, Hecker A, Zhang W, Bareille J, Collinet B, van Tilbeurgh H, Forterre P & Basta T (2013) In vitro biosynthesis of a universal t6A tRNA modification in Archaea and Eukarya. *Nucleic acids research* **41**: 1953–64
- Phillips G & de Crécy-Lagard V (2011) Biosynthesis and function of tRNA modifications in Archaea. *Current opinion in microbiology* **14**: 335–41
- Phipps KR, Charette JM & Baserga SJ (2011) The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **2**: 1–21
- Phizicky EM & Hopper AK (2010) tRNA biology charges to the front. *Genes Dev* **24**: 1832–1860
- Piekna-Przybylska D, Decatur WA & Fournier MJ (2008) The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis. *Nucleic acids research* **36**: D178–83
- Pisarev A V, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina O V, Rakotondrafara AM, Hentze MW, Hellen CUT & Pestova T V (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Molecular cell* **37**: 196–210
- Polevoda B, Span L & Sherman F (2006) The yeast translation release factors Mrf1p and Sup45p (eRF1) are methylated, respectively, by the methyltransferases Mtq1p and Mtq2p. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 2562–2571
- Popow J, Englert M, Weitzer S, Schleiffer A, Mierzwa B, Mechtler K, Trowitzsch S, Will CL, Lührmann R, Söll D & Martinez J (2011) HSPC117 is the essential subunit of a human tRNA splicing ligase complex. *Science* **331**: 760–4
- Proudfoot N & O'Sullivan J (2002) Polyadenylation: a tail of two complexes. *Current biology : CB* **12**: R855–7

- Purushothaman SK, Bujnicki JM, Grosjean H & Lapeyre B (2005) Trm11p and Trm112p are both required for the formation of 2-methylguanosine at position 10 in yeast tRNA. *Molecular and cellular biology* **25**: 4359–4370
- Ragsdale, S. W. (2008). Catalysis of methyl group transfers involving tetrahydrofolate and B(12). *Vitamins and Hormones* **79**: 293–324.
- Rich A & RajBhandary UL (1976) Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annual review of biochemistry* **45**: 805–60
- Ring G, Londei P & Eichler J (2007) Protein biogenesis in Archaea: addressing translation initiation using an in vitro protein synthesis system for *Haloferax volcanii*. *FEMS microbiology letters* **270**: 34–41
- Samarsky DA & Fournier MJ (1998) Functional mapping of the U3 small nucleolar RNA from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **18**: 3431–44
- Samuelsson T, Borén T, Johansen TI & Lustig F (1988) Properties of a transfer RNA lacking modified nucleosides. *The Journal of biological chemistry* **263**: 13692–9
- Sardana R & Johnson AW (2012) The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits. *Molecular Biology of the cell* **23**: 4313–4322
- Sardana R, Zhu J, Gill M & Johnson AW (2014) Physical and functional interaction between the methyltransferase Bud23 and the essential DEAH-box RNA helicase Ecm16. *Molecular and cellular biology*
- Schaffrath R & Meinhardt F (2005) *Kluyveromyces lactis* zymocin and other plasmid-encoded yeast killer toxins. *Microbial protein toxins*
- Schneider TR & Sheldrick GM (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallographica Section D* **58**: 1772–1779
- Schubert HL, Blumenthal RM & Cheng X (2003a) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 329–335
- Schubert HL, Phillips JD & Hill CP (2003b) Structures along the catalytic pathway of PrmC/HemK, an N5-glutamine AdoMet-dependent methyltransferase. *Biochemistry* **42**: 5592–5599
- Schubert HL, Wilson KS, Raux E, Woodcock SC & Warren MJ (1998) The X-ray structure of a cobalamin biosynthetic enzyme, cobalt-precorrin-4 methyltransferase. *Nature structural biology* **5**: 585–92
- Seiser RM, Sundberg AE, Wollam BJ, Zobel-Thropp P, Baldwin K, Spector MD & Lycan DE (2006) Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **174**: 679–91
- Selmer M, Dunham CM, Murphy F V, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR & Ramakrishnan V (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science (New York, N.Y.)* **313**: 1935–42
- Serebrov V, Clarke RJ, Gross HJ & Kisselev L (2001) Mg²⁺-induced tRNA folding. *Biochemistry* **40**: 6688–98
- Sharma K & Tollervey D (1999) Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 5' end of 18S rRNA is required for pre-rRNA processing. *Molecular and cellular biology* **19**: 6012–9
- Sharma S, Watzinger P, Kötter P & Entian K-D (2013a) Identification of a novel methyltransferase, Bmt2, responsible for the N-1-methyl-adenosine base modification of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **41**: 5428–43
- Sharma S, Yang J, Duttmann S, Watzinger P, Kotter P & Entian KD (2014) Identification of novel methyltransferases, Bmt5 and Bmt6, responsible for the m3U methylations of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **42**: 3246–3260

Bibliographie

- Sharma S, Yang J, Watzinger P, Kötter P & Entian K-D (2013b) Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. *Nucleic acids research* **41**: 9062–76
- Shigi N (2014) Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Frontiers in genetics* **5**: 67
- Shimada K, Nakamura M, Anai S, De Velasco M, Tanaka M, Tsujikawa K, Ojii Y & Konishi N (2009) A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression. *Cancer Research* **69**: 3157–3164
- Shin B-S, Kim J-R, Walker SE, Dong J, Lorsch JR & Dever TE (2011) Initiation factor eIF2 γ promotes eIF2-GTP-Met-tRNAⁱ(Met) ternary complex binding to the 40S ribosome. *Nature structural & molecular biology* **18**: 1227–34
- Shiratori A, Shibata T, Arisawa M, Hanaoka F, Murakami Y & Eki T (1999) Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast* **15**: 219–53
- Shoemaker CJ & Green R (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 1392–8
- Silverman E, Edwalds-Gilbert G & Lin R-J (2003) DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**: 1–16
- Song H, Mugnier P, Das AK, Webb HM, Evans DR, Tuite MF, Hemmings BA & Barford D (2000) The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1—mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* **100**: 311–321
- Songe-Møller L, van den Born E, Leihne V, Vagbo CB, Kristoffersen T, Krokan HE, Kirpekar F, Falnes PO & Klungland A (2010) Mammalian ALKBH8 possesses tRNA methyltransferase activity required for the biogenesis of multiple wobble uridine modifications implicated in translational decoding. *Molecular and cellular biology* **30**: 1814–1827
- Sprinzl M & Cramer F (1975) Site of aminoacylation of tRNAs from *Escherichia coli* with respect to the 2'- or 3'-hydroxyl group of the terminal adenosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 3049–53
- Sprinzl M, Horn C, Brown M, Loudovitch A & Steinberg S (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic acids research* **26**: 148–53
- Stanevich V, Jiang L, Satyshur KA, Li Y, Jeffrey PD, Li Z, Menden P, Semmelhack MF & Xing Y (2011) The structural basis for tight control of PP2A methylation and function by LCMT-1. *Molecular cell* **41**: 331–42
- Storici F, Lewis LK & Resnick MA (2001) In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature biotechnology* **19**: 773–6
- Strunk BS & Karbstein K (2009) Powering through ribosome assembly. *RNA (New York, N.Y.)* **15**: 2083–104
- Studte P, Zink S, Jablonowski D, Bar C, von der Haar T, Tuite MF & Schaffrath R (2008) tRNA and protein methylase complexes mediate zymocin toxicity in yeast. *Molecular Microbiology* **69**: 1266–1277
- Suzuki Y, Noma A, Suzuki T, Ishitani R & Nureki O (2009) Structural basis of tRNA modification with CO2 fixation and methylation by wybutosine synthesizing enzyme TYW4. *Nucleic acids research* **37**: 2910–25
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification* **41**: 207–34

- Taylor D, Unbehauen A, Li W, Das S, Lei J, Liao HY, Grassucci RA, Pestova T V & Frank J (2012) Cryo-EM structure of the mammalian eukaryotic release factor eRF1-eRF3-associated termination complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 18413–8
- Thiry M, Lamaye F & Lafontaine DLJ (2011) The nucleolus: when 2 became 3. *Nucleus* **2**: 289–93
- Thompson M, Haeusler RA, Good PD & Engelke DR (2003) Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes. *Science* **302**: 1399–401
- Toulmay A & Schneider R (2006) A two-step method for the introduction of single or multiple defined point mutations into the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 825–831
- Towns WL & Begley TJ (2012) Transfer RNA methyltransferases and their corresponding modifications in budding yeast and humans: activities, predications, and potential roles in human health. *DNA Cellular Biology* **31**: 434–454
- Urbonavicius J, Armengaud J & Grosjean H (2006) Identity elements required for enzymatic formation of N²,N²-dimethylguanosine from N²-monomethylated derivative and its possible role in avoiding alternative conformations in archaeal tRNA. *Journal of molecular biology* **357**: 387–99
- Veldman GM, Klootwijk J, de Regt VC, Planta RJ, Branlant C, Krol A & Ebel JP (1981) The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. *Nucleic acids research* **9**: 6935–52
- Vidgren J, Svensson LA & Liljas A (1994) Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* **368**: 354–8
- Warner JR (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences* **24**: 437–40
- Weinger JS & Strobel SA (2006) Participation of the tRNA A76 hydroxyl groups throughout translation. *Biochemistry* **45**: 5939–48
- Wende S, Platzer EG., Jühling F, Pütz J, Florentz C, Stadler PF. & Mörl M (2014) Biological evidence for the world's smallest tRNAs. *Biochemistry* **100**: 151–158
- White J, Li Z, Sardana R, Bujnicki JM, Marcotte EM & Johnson AW (2008) Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. *Molecular and cellular Biology* **28**: 3151–3161
- Woese CR, Kandler O & Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4576–9
- Woodard RW, Tsai MD, Floss HG, Crooks PA & Coward JK (1980) Stereochemical course of the transmethylation catalyzed by catechol O-methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **255**: 9124–7
- Woolford JL & Baserga SJ (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**: 643–81
- Woolfs HA, Lamanna AC & Karbstein K (2011) Roles of Dim2 in ribosome assembly. *The Journal of biological chemistry* **286**: 2578–86
- Wu JC & Santi D V (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **262**: 4778–86
- Yakubovskaya E, Guja KE, Mejia E, Castano S, Hambardjjeva E, Choi WS & Garcia-Diaz M (2012) Structure of the essential MTERF4:NSUN4 protein complex reveals how an MTERF protein collaborates to facilitate rRNA modification. *Structure* **20**: 1940–1947

Bibliographie

- Yang Z, Shipman L, Zhang M, Anton BP, Roberts RJ & Cheng X (2004) Structural characterization and comparative phylogenetic analysis of *Escherichia coli* HemK, a protein (N5)-glutamine methyltransferase. *Journal of Molecular Biology* **340**: 695–706
- Yao R, Zhang Z, An X, Bucci B, Perlstein DL, Stubbe J & Huang M (2003) Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 6628–6633
- Yarian C, Townsend H, Czestkowski W, Sochacka E, Malkiewicz AJ, Guenther R, Miskiewicz A & Agris PF (2002) Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides. *The Journal of biological chemistry* **277**: 16391–5
- Yeates TO (2002) Structures of SET domain proteins: protein lysine methyltransferases make their mark. *Cell* **111**: 5–7
- Yoshihisa T, Ohshima C, Yunoki-Esaki K & Endo T (2007) Cytoplasmic splicing of tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **12**: 285–97
- Zheng L, Baumann U & Reymond J-L (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic acids research* **32**: e115
- Zheng S & Shuman S (2008) Structure-function analysis of vaccinia virus mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase. *RNA* **14**: 696–705
- Zubieta C, He XZ, Dixon RA & Noel JP (2001) Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nature structural biology* **8**: 271–9
- Zubieta C, Ross JR, Koscheski P, Yang Y, Pichersky E & Noel JP (2003) Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *The Plant cell* **15**: 1704–16

Etudes structurales et fonctionnelles de complexes entre Trm112 et différentes méthyltransférases impliquées dans la traduction

La traduction représente un processus central au sein de la cellule, elle assure le transfert de l'information génétique de l'ARNm vers les protéines. De nombreux acteurs y sont impliqués directement ou indirectement et parmi eux, chez les eucaryotes, la petite protéine Trm112. Celle-ci participe à la modification de plusieurs acteurs directs en interagissant et en activant quatre MTases. Le facteur de terminaison eRF1 est méthylé par le complexe Mtq2-Trm112, l'ARNr 18S par Bud23-Trm112 et certains ARNt par les complexes Trm9-Trm112 et Trm11-Trm112. Au cours de ce travail, les structures cristallographiques de Trm9-Trm112 et de Bud23-Trm112 de levure ont été résolues. L'étude comparative structurale de ces complexes et de la structure connue de Mtq2-Trm112, a permis de mettre en évidence que dans un même organisme, les séquences des trois protéines ont évolué de manière à conserver l'interaction avec Trm112. Même si les quatre partenaires présentent moins de 20% d'identité de séquence, les résidus clés pour l'interaction avec la petite protéine activatrice sont conservés ou partagent des caractéristiques identiques. En plus de l'analyse structurale, le complexe Trm9-Trm112 a fait l'objet d'une étude fonctionnelle chez *S. cerevisiae* ce qui a permis de cartographier le site actif de l'enzyme et de proposer un modèle de mécanisme d'action. Enfin, les premières études *in vivo* réalisées chez *Haloferax volcanii* suggèrent que cette plateforme serait également présente chez certains organismes procaryotes.

Mots clés : Traduction, Trm112, Trm9, Méthyltransférase, ARNt, Bud23, Modification des ARN

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

ECOLE POLYTECHNIQUE - UMR7654 CNRS

Route de Saclay

91128 PALAISEAU CEDEX

ECOLE DOCTORALE 425

INNOVATION THERAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUE

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY cedex